

Aus dem  
Center for Cardiovascular Research  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogen-  
Expression und Parametern der fötalen Programmierung

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Astrid Mersmann

aus Kiel

Datum der Promotion: 23.06.2019

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	6
<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Fötale Programmierung	7
1.1.1. Advanced Fetal Programming Hypothesis	9
1.2. Die Rolle der Plazenta	10
1.2.1. Aufbau und Größe der Plazenta während der Schwangerschaft	10
1.3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	12
1.3.1. Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	12
1.3.2. Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der Schwangerschaft	13
1.3.3. Angiotensinogen	14
1.4. Aufgabenstellung	16
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1. Die Kohorte	19
2.2. Datenerhebung	20
2.3. Material	22
2.4. Methoden	27
2.4.1. Proteinextraktion	27
2.4.2. Western Blot	28
2.4.3. Proteinbestimmung	29
2.4.4. Auswertung	32
2.4.5. Statistik	33
2.5. Abgrenzung zu anderen Arbeiten	34

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<hr/>		
3.1.	Studienpopulation	35
3.2.	Angiotensinogen in Bezug auf das Gestationsalter	36
3.3.	Deskriptive Statistik	40
3.4.	Explorative Statistik	45
3.4.1.	Körpergewicht der Mutter als Risikofaktor	45
3.4.2.	Arterieller Hypertonus als Risikofaktor	48
3.4.3.	Diabetes mellitus als Risikofaktor	50
3.4.4.	Nikotinabusus als Risikofaktor	51
3.4.5.	Geburtsgewicht des Kindes	55
3.4.6.	Ponderal-Index des Kindes	57
3.4.7.	Kopfumfang des Kindes	59
3.4.8.	Länge des Kindes	60
3.4.9.	APGAR und Nabelarterien-pH des Kindes	61
3.4.10.	Weitere kindliche Parameter	64
3.4.11.	Plazentagewicht	65
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
<hr/>		
4.1.	Mütterliche Risikofaktoren	67
4.2.	Kindliche Faktoren	74
4.3.	Die Rolle der Plazenta in der fötalen Programmierung	81
<b>5.</b>	<b>Limitationen der Arbeit</b>	<b>84</b>
<hr/>		
<b>6.</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>87</b>
<hr/>		
6.1.	Literaturverzeichnis	87
6.2.	Abkürzungsverzeichnis	96
6.3.	Abbildungsverzeichnis	98
6.4.	Tabellenverzeichnis	100

Eidesstattliche Erklärung	101
Lebenslauf	102
Danksagung	103

## Zusammenfassung

Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen und Gründe für Krankenhausaufenthalte. Immer mehr Kinder und Jugendliche sind gefährdet, chronische Erkrankungen zu entwickeln und leiden schon früh an Diabetes mellitus Typ 2, sowie an koronarer Herzkrankheit. Sie sind dadurch auf dauerhafte medizinische Versorgung angewiesen. Nach epidemiologischen Daten besteht ein Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und einem erhöhtem Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter zu entwickeln. Ein Erklärungsversuch für diesen Zusammenhang ist die Hypothese der fötalen Programmierung. Diese besagt, dass Organe und Gewebe des Fötus durch das intrauterine Milieu bereits im Mutterleib auf Umweltbedingungen des späteren Lebens programmiert werden. Veränderungen dieses Milieus können in einem geringeren Geburtsgewicht resultieren und erhöhen somit das Risiko im Erwachsenenalter kardiovaskuläre Erkrankungen auszubilden. Bedeutsam wäre die Evaluation eines möglichen Prädiktors, über den eine frühzeitige Identifikation eines erhöhten Risikoprofils für die Entwicklung weiterer Erkrankungen im späteren Leben gelingen könnte. Weiterführend könnte dann, im Sinne einer individualisierten Medizin eine gezielte Prävention angeboten werden.

Als möglichen Marker bestimmten wir die plazentare Angiotensinogenkonzentration aus 338 Proben mittels Western Blot. Dabei stellte die Angiotensinogenkonzentration eine relative Konzentration in Bezug zum Aktgehalt der Probe dar. Wir setzten die bestimmten Werte in Korrelation zu mütterlichen, kindlichen und plazentaren Parametern, welche in einer umfangreichen Datenbank erfasst wurden. Insbesondere wurde das Augenmerk auf die Korrelation zwischen der relativen plazentaren Angiotensinogenkonzentration und dem Geburtsgewicht des Kindes, welches den bekanntesten Surrogatparameter der fötalen Programmierung darstellt, gelegt. Unsere Hypothese ist, dass ein Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und mütterlichen sowie kindlichen Parametern und dem Plazentagewicht besteht, wobei Angiotensinogen ein Marker für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung im späteren Leben sein könnte. In unseren Ergebnissen zeigte sich bezogen auf das Geburtsgewicht ein Unterschied in der plazentaren Angiotensinogenkonzentration zwischen einzelnen Quartilen der untersuchten Kohorte. Bei höherem Geburtsgewicht zeigte sich eine höhere plazentare Angiotensinogenkonzentration, als in Quartilen mit geringerem Geburtsgewicht, allerdings zeigten sich dabei ausgeprägte interindividuelle Unterschiede, so dass Aussagen zu Einzelwerten nicht möglich sind.

## **Abstract**

Cardiovascular diseases are worldwide the most common reason for mortality and for hospitalisation. More and more children and adolescents are at risk to develop chronic illnesses like Type 2 diabetes and coronary heart disease, which need permanent medical support. According to epidemiological data, there is an association between low birth weight and an increased risk of developing cardiovascular disease in adult life. An explanation for this connection is the fetal programming hypothesis. This means that the organs and tissues of the fetus are programmed by the intrauterine milieu already in the womb on environmental conditions of later life. Changes in this milieu may result in lower birth weight and thus increase the risk of developing cardiovascular disease in adulthood. It would be important to evaluate a possible predictor that would enable an early identification of an increased risk profile for the development of further diseases in later life, in order to offer targeted prevention in the sense of individualized medicine.

As a possible marker, we determined the angiotensinogen concentration from 338 samples from the placenta using Western Blot. The angiotensinogen concentration was a relative concentration in relation to the actin content of the sample. We correlated the determined values with maternal, pediatric and placental parameters collected in a large database. In particular attention has been paid to the correlation between the relative angiotensinogen concentration and the child's birth weight, which is the most prominent surrogate parameter of fetal programming. Our hypothesis is that there is an association between placental angiotensinogen concentration and maternal and pediatric parameters, as well as placental weight, and that angiotensinogen may be a marker for the development of coronary heart disease in later life. In our results, there was a difference in birth weight between placental angiotensinogen concentrations between individual quartiles of the cohort studied. Increased birth weight showed a higher placental angiotensinogen concentration than quartiles with lower birth weight, but showed pronounced interindividual differences so that statements on individual values are not possible.

# **1. Einleitung**

In der westlichen Welt sind kardiovaskuläre Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen (1, 104). Obwohl die Zahl an Todesfällen durch koronare Herzkrankheiten seit den frühen siebziger Jahren in medizinisch gut entwickelten Ländern stetig abnahm und auch weiterhin sinkt, sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen der häufigste Grund für Krankenhausaufenthalte (1). Erschreckend ist, dass immer mehr Kinder und Jugendliche massiv an Gewicht zunehmen und damit stark gefährdet sind chronische Erkrankungen zu entwickeln. Zuletzt waren im Jahr 2015 über 100 Millionen junge Menschen betroffen (105). So besteht schon jetzt bei immer mehr jungen Erwachsenen eine koronare Herzkrankheit, sowie ein Diabetes mellitus Typ 2 und sie sind auf dauerhafte medizinische Versorgung angewiesen (105). Die Kosten für die Behandlung werden voraussichtlich auch in den folgenden Jahren weiter ansteigen (1, 104). Dabei wurde die arterielle Hypertonie als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen identifiziert. Es ist bekannt, dass genetische Faktoren, aber auch Übergewicht oder der Nikotinkonsum, wichtige Parameter bei der Entwicklung der koronaren Herzerkrankung darstellen; doch reichen diese Faktoren als alleinige Erklärung für die Grundlage der Entstehung nicht vollständig aus (104).

## **1.1. Fötale Programmierung**

Aus traditioneller Sicht werden der adulte Lebensstil und die genetische Grundlage als bekannte Hauptursachen für das Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen zu leiden verantwortlich gemacht (3). Epidemiologische Daten ergaben allerdings, dass negative Einflüsse in frühen Entwicklungsstadien und speziell während der fötalen Entwicklungsphase das Risiko im späteren Leben an genau diesen Erkrankungen zu leiden steigert (4). Dieses Konzept wird als fötale Programmierung bezeichnet. Die Hypothese der fötalen Programmierung besagt, dass der Fötus während gewisser Zeitfenster in der Schwangerschaft funktionelle und strukturelle Veränderungen durchläuft, welche im späteren Leben die Ausprägung der Erkrankungen des metabolischen Syndroms begünstigen können. Faktoren, die das Risiko erhöhen, sind beispielsweise eine mütterliche Unterernährung während der Schwangerschaft oder eine plazentare Insuffizienz (5-7).

Die Hypothese, dass ein geringes intrauterines Wachstum und ein geringes Geburtsgewicht in Zusammenhang mit der Entwicklung von koronarer Herzerkrankung und Diabetes mellitus Typ 2 im Erwachsenenalter stehen, wurde als erstes von Barker et al. aufgestellt und basiert

auf einigen in Großbritannien geführten epidemiologischen Studien (5, 8, 9). In diesen zeigte sich ein geographischer Zusammenhang in Wales zwischen einer Säuglingssterblichkeit in den zwanziger Jahren und einer erhöhten Anzahl an Menschen, die in den siebziger Jahren an einer koronaren Herzkrankheit verstarben. Dabei war der genaue Grund der Säuglingssterblichkeit retrospektiv aufgrund fehlender Dokumentation nicht immer eindeutig eruierbar (9). Barker et. al. (10) überprüften den Zusammenhang zwischen geringem intrauterinem Wachstum (worauf sie letztendlich die Säuglingssterblichkeit zurückführten) und der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung genauer. Er verglich bei mehreren tausend Männern um die sechzig Jahre, bei welchen das Geburtsgewicht verzeichnet worden war, deren Geburtsgewicht mit dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit im Erwachsenenalter (10). Dabei zeigte sich, dass die Männer mit einem niedrigen Geburtsgewicht (in Bezug auf das Gestationsalter) von etwa im Mittel 2,5 kg ein doppelt so hohes Risiko aufwiesen an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken, als Gleichaltrige welche ein Geburtsgewicht von im Mittel 4,3 kg hatten (10).

Widdowson et al. (15) beschrieben im Tiermodell die Existenz mehrerer „kritischer Zeitfenster“ die lediglich für einen gewissen Zeitraum geöffnet sind (15). Besonders wenn der Fötus ein solches „kritisches Zeitfenster“ durchläuft, können sich Organe und Gewebe an die intrauterinen Gegebenheiten gut anpassen. Sie sind in dieser Phase jedoch auch anfällig irreversible morphologische und funktionelle Veränderungen zu erfahren, wenn es zu beeinflussenden Ereignissen kommt (16). Dieser Vorgang wird als „Programmierung“ bezeichnet (16). Da bei intrauterinem Nahrungs- oder Sauerstoffmangel die Zellteilung langsamer abläuft, verbessert der Fötus in Mangelsituationen dadurch seine Überlebenschancen. Somit werden Regelsysteme dauerhaft bis in das Erwachsenenalter auf Sollwerte eingestellt. Diese Sollwerte, die im fötalen und postnatalen Leben die Überlebenschancen verbessern, können im fortgeschrittenen Leben ein Risiko für eine koronare Herzerkrankung darstellen, insbesondere dann, wenn die auf Mangel programmierten Organe später einem Nahrungsüberschuss ausgesetzt sind (15-17). Daraus wurde die Hypothese der fötalen Programmierung entwickelt (9, 106).

Zusammenfassend kann man sagen, dass ungünstige Einflüsse auf den Fötus während der Schwangerschaft langanhaltende Effekte auf die Gesundheit eines Menschen haben können (106). Dies kann in der Entwicklung einer Adipositas, von Gefäßkrankheiten, einer gestörten Glukosetoleranz, erhöhten Blutdruckwerten und einem erhöhten Risiko für renale und kardiovaskuläre Erkrankungen resultieren (106).



### 1.1.1. Advanced Fetal Programming Hypothesis

Exogene Faktoren wie die mütterliche Ernährung und Konstitution spielen für die fötale Entwicklung eine große Rolle (9, 10, 106). Neuere Erkenntnisse zeigen aber auch, dass der materne Genpool die fötale Entwicklung steuern und beeinflussen kann (19). Er wirkt sich auf den plazentaren Blutfluss und somit auf die Nährstoffversorgung des Fötus aus und bereitet das Ungeborene auf seine weitere postnatale Entwicklung vor. Diese Hypothese wurde weiterführend als „advanced fetal programming hypothesis“ bezeichnet (19, 21).

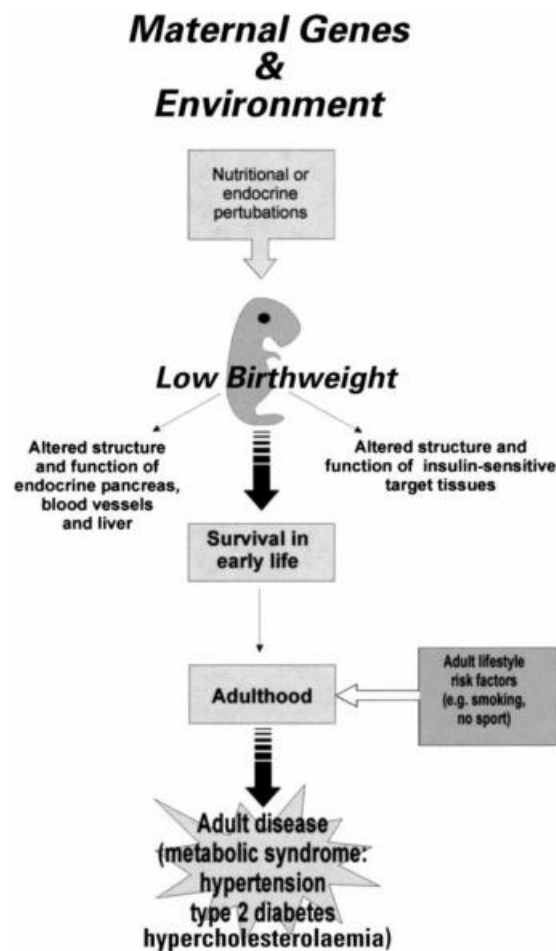


Abb.1: Hoher et al. The advanced fetal programming hypothesis (19).

Aufgrund der stetig wachsenden Anzahl an Patienten, welche bereits in immer jüngeren Lebensjahren Herz-Kreislauf-Erkrankungen entwickeln (1, 104, 105, 106), ist es von besonderem Interesse einen Prädiktor zu finden, mit dessen Hilfe möglichst frühzeitig Risikopatienten identifiziert werden könnten, um dann gezielt diese Menschen einer Primärprävention (Reduktion anderer Risikofaktoren) zuführen zu können.

## **1.2. Die Rolle der Plazenta**

In der Schwangerschaft sind Mutter und Fötus nur über die Plazenta miteinander verbunden; sie nimmt Einfluss auf das intrauterine Milieu und so auch auf die fötale Programmierung. Veränderungen ihrer Funktion oder Struktur können die Entstehung vieler Schwangerschaftskomplikationen sein oder sogar zu einem intrauterinen Wachstumsstopp führen (24). Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle in der fötalen Entwicklung (23) hielten wir es für naheliegend die Plazenta bezüglich der Detektion eines Prädiktors genau zu untersuchen.

### **1.2.1. Aufbau und Größe der Plazenta während der Schwangerschaft**

Die Plazenta weist zum Ende der Schwangerschaft die Form einer Scheibe auf welche einen Durchmesser von 15 bis 20 cm hat. An der dezidualen mütterlichen Seite gibt es 15-20 Lappchen, welche als Kotyledonen bezeichnet werden, und welche von einer dünnen Schicht aus der Decidua basalis bedeckt sind (90, 91). Die Furchen zwischen den Kotyledonen werden durch Dezidualepten hervorgerufen. Demgegenüber weist die fetale Seite der Plazenta keine Kotyledonen auf. Diese wird von der Chorionplatte, welche vom Amnion überzogen ist gebildet. Hier befindet sich die Plazentaschranke, die das mütterliche vom fetalen Blut trennt. Die Übertragung der Nährstoffe beziehungsweise der Abtransport der Stoffwechselabbauprodukte des Fötus erfolgt über Diffusion. Hier gibt es eine große Anzahl von Choriongefäßen, welche Richtung Nabelschnur hin konvergieren (90, 91). Die Nabelschnur inseriert meist exzentrisch, gelegentlich sogar marginal. Das Größenwachstum der Plazenta, das bedeutet sowohl das Gewicht, als auch die Basalfläche, während der Schwangerschaft wird in Perzentilen angegeben. Anhand dieser lässt sich eine Wachstumsstörung erkennen und definieren. Bei gleichgewichtigen Plazenten kommt der Basalflächenausdehnung beispielsweise eine pathogenetische Bedeutung zu. So gibt es in einer großflächigen Plazenta mehr Spiralarterien, welche dem Fötus im Vergleich zu kleinflächigeren Formen eine bessere Versorgung anbietet (89-90).

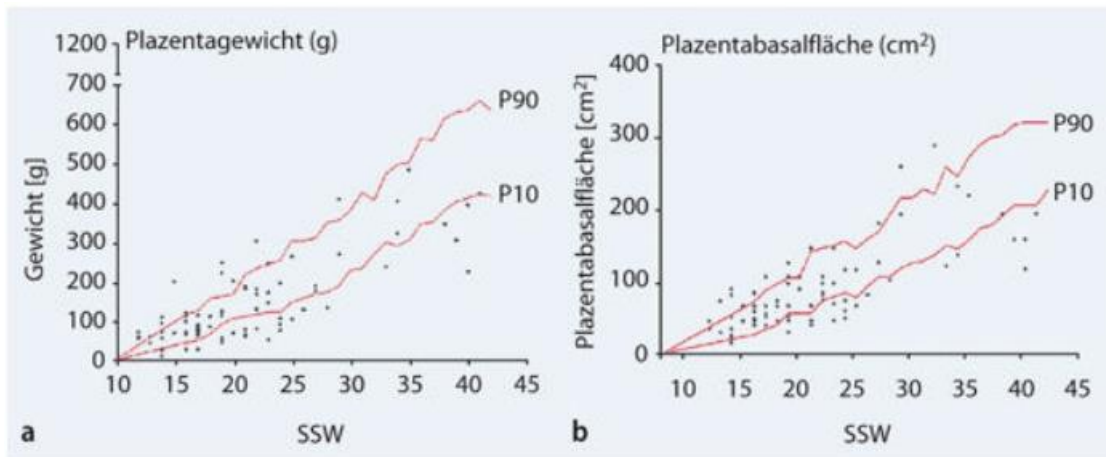


Abb. 2: Entwicklung des Plazentagewichtes und der Plazentabasalfläche im Verlauf der Schwangerschaft (92).

Der Plazentaquotient soll das Verhältnis zwischen dem Plazentagewicht und dem Gewicht des Kindes ausdrücken. Werte unterhalb der 10. Perzentile beziehungsweise oberhalb der 90. Perzentile sind Hinweise für eventuelle Entwicklungsstörungen (89).

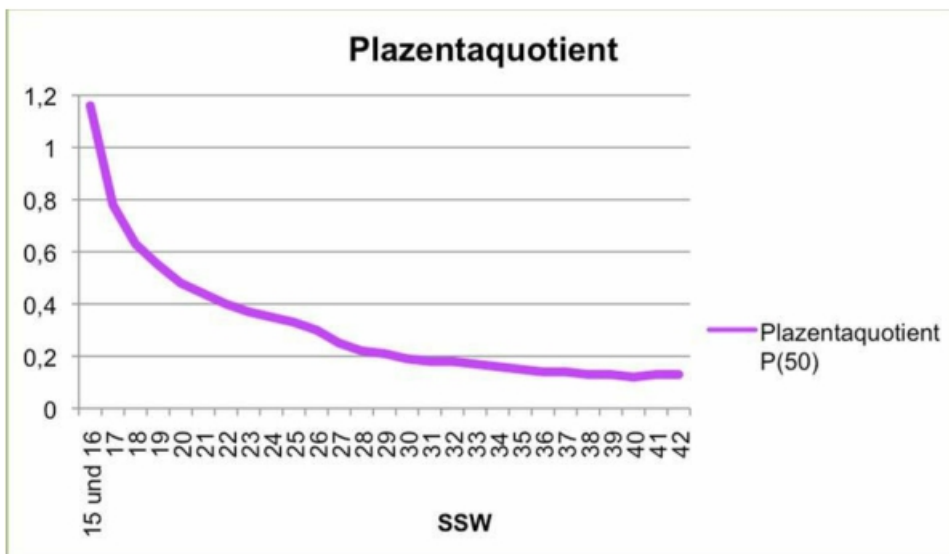


Abb. 3: Plazentaquotient im Verlauf der Schwangerschaft, 50. Perzentile (89).

Die Plazenta ist in der 14. Schwangerschaftswoche strukturell ausgereift und hat im 5. Schwangerschaftsmonat ihre maximale Dicke von 2 bis 4 cm erreicht. Das Gewicht der Plazenta beträgt zum Geburtstermin im Durchschnitt 500 g (91). Zur makroskopischen Beschreibung der Plazenta wird stets neben dem Gewicht die Basalfläche die sich aus dem größten Längs- und Querdurchmesser berechnet und die Dicke angegeben (91).

### **1.3. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine entscheidende Rolle in der Kreislaufregulation durch Vasokonstriktion und damit für die Blutdruckregulation. Während der Schwangerschaft ist das plazentare RAAS eines der wichtigsten außerhalb der Niere (51-52). Für den Ablauf einer komplikationslosen Schwangerschaft ist eine normale plazentare Funktion des RAAS erforderlich (46). Weiterhin wurde gezeigt, dass erhöhte Werte des zirkulierenden RAAS während der fötalen Phase zur Ausprägung einer Hypertonie im Erwachsenenalter beitragen kann (106). Zur Identifikation einer möglichen Vorhersagevariablen im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen untersuchten wir Komponenten dieser Kaskade näher.

#### **1.3.1. Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems**

Das RAAS ist eine Hormon-Signal-Kaskade, welche ursprünglich in der Niere beschrieben wurde. Sie reguliert maßgeblich den Blutdruck, sowie den Wasser- und Elektrolythaushalt. Als Antwort auf Hypotonie oder geringes zirkulierendes Natrium-Chlorid (NaCl) wird im juxtaglomerulären Apparat der aufsteigenden Nierenarteriolen das Enzym Renin synthetisiert und exprimiert (46). Dabei wird die Renin-Expression von Prostaglandinen der Macula densa der Niere reguliert (47).

Renin wirkt als Protease und spaltet von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I (AT-I) ab. Dies kann als limitierender Schritt in der Hormon-Kaskade angesehen werden. Angiotensin I besitzt selber keine Bioaktivität und wird vom Angiotensinogen-Converting-Enzym (ACE), welches vorrangig vom Lungenendothel produziert wird, zum biologisch aktiven Oktapeptid Angiotensin II (AT-II) umgewandelt (47). Die beiden wichtigsten Rezeptoren sind der AT1- und der AT2-Rezeptor. Beide Rezeptoren haben eine Sequenz-Identität von 34% und eine vergleichbare Affinität für AT-II, wobei über den AT1-Rezeptor der Hauptanteil der AT-II Übertragung geregelt ist (48). Der AT1-Rezeptor ist ubiquitär vorhanden und wird unter anderem in der adulten Niere sowie auf glatten Muskelzellen der Gefäße und in der Nebenniere vorgefunden (48). Er ist mit dem Gq-Protein, einem rezeptorbindenden Protein, gekoppelt; seine Aktivierung bewirkt den Anstieg des intrazellulären Calciums, Vasokonstriktion, Sympathikusaktivität, Aldosteronfreisetzung, NaCl- und Wasser-Retention. Eine chronische Wirkung über den AT1-Rezeptor kann jedoch auch zu Umbauprozessen im Sinne von Fibrosierung der Gefäßwand führen (46).

Der im Erwachsenen weniger häufig vorkommende AT2-Rezeptor wird vorrangig während der fötalen Entwicklung exprimiert und ist zum Beispiel in der fötalen Niere vorhanden. Er nimmt mit der voranschreitenden neonatalen Phase quantitativ ab (49). Die Tatsache, dass der AT2-Rezeptor im embryonalen Gewebe hoch exprimiert wird, aber unter physiologischen Bedingungen eine viel geringere Expression im erwachsenen Gewebe hat, lässt auf eine mögliche Rolle für Entwicklung und Zelldifferenzierung spekulieren (107). Über den AT2-Rezeptor hemmt AT-II das Zellwachstum, steigert die Apoptose, bewirkt eine Vasodilatation und beeinflusst die Entwicklung des fötalen Gewebes (50).

Zusätzlich zu dem klassischen RAAS der Niere existieren lokale Systeme in weiteren Organen, wie beispielsweise Gehirn, Herz, Ovarien und auch in der Plazenta (51-52). Während der Schwangerschaft ist das plazentare RAAS eines der wichtigsten außerhalb der Niere. In 1967 wird das plazentare RAAS erstmals von Hodari et al. beschrieben (53). Pro-Renin, Angiotensinogen, ACE, AT-I und AT-II wurden im fötalen und plazentaren Gewebe nachgewiesen (54). Auch in der Spiralarterie der Decidua fand man Angiotensinogen, Renin und ACE vor. Dies zeigt, dass die fötale Plazenta, sowie die materne Decidua alle nötigen Komponenten des RAAS enthalten (55-56).

### **1.3.2. Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der Schwangerschaft**

Das RAAS ist für die Regulierung der Elektrolytbalance in der Schwangerschaft, und somit für das Wohlbefinden von Mutter und Kind von großer Bedeutung. Für diese Balance ist nicht nur das renale RAAS, sondern auch das uteroplazentare RAAS relevant (57).

Einzelheiten zum plazentaren RAAS in der frühen Schwangerschaft sind jedoch noch nicht genau untersucht. Bekannt ist, dass die Reninproduktion in den Ovarien und der mütterlichen Decidua in der frühen Schwangerschaft zu steigen beginnt (58). Die wachsende Plazenta produziert Östrogen, welches wiederum die Synthese von Angiotensinogen in der Leber anregt und damit den Spiegel von AT-II und Aldosteron anhebt (59). Dabei nimmt die Aldosteronproduktion über die Schwangerschaft hin kontinuierlich zu und korreliert mit dem Plasmalevel von Östrogen (103). Während einer normalen Schwangerschaft unterläuft das RAAS einer Vielzahl von Anpassungen und Veränderungen. Der ACE-Spiegel ist bei Frauen mit Präeklampsie im Gegensatz zu normotensiven Müttern vermindert (60).

Der erhöhte Bedarf an Nährstoffen und Blutversorgung in der Gestation wird durch eine kardiale und renale Anpassung gewährleistet. Um eine Schwangerschaft aufrecht zu erhalten

durchläuft die Plazenta während der Gestation mehrere Phasen umfangreicher Modulationen. So gewährleisten zum Beispiel AT1-rezeptorreiche plazentare Trophoblasten adäquate Antworten auf Regulationen des RAAS (61). Demzufolge ist eine einwandfreie Interaktion zwischen der Plazenta und dem RAAS für den Ablauf einer komplikationslosen Schwangerschaft erforderlich (46).

### **1.3.3. Angiotensinogen**

Als Ausgangspunkt des RAAS ist Angiotensinogen mittelbar an der Blutdruckregulation beteiligt. Seine Konzentration stellt hierbei eine limitierende Größe dar; es wird durch Renin zu AT-I gespalten (41). Da Angiotensinogen am Beginn dieser wichtigen Hormon-Signalkaskade steht analysierten wir dieses Protein genauer.

Angiotensinogen ist ein globuläres Glykoprotein und gehört auf Grund seiner Struktur zur Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Die Leber ist der Hauptproduktionsort des Angiotensinogens, wobei im Zytoplasma der Hepatozyten in der perizentralen Zone der Leberläppchen eine größere Menge an Angiotensinogen nachgewiesen werden konnte (43). Es wird von der Leber kontinuierlich produziert. Ein sehr großer Anteil wird als frei zirkulierendes Plasmaprotein in das Serum exprimiert; dabei wird die Exkretion durch Kortisol und AT-II stimuliert (43). Weitere Gewebe, in denen Angiotensinogen lokalisiert ist, sind unter anderem das Gehirn, die Aorta, die Milz und die Plazenta (41).

Definitionsgemäß wird jedes Protein als Angiotensinogen bezeichnet, welches vom Enzym Renin zu AT-I gespalten wird. So existiert zum einen die Gruppe des „low molecular weight angiotensinogen“ (LMrA) und zum anderen die Gruppe des „high molecular weight angiotensinogen“ (HMrA). LMrA ist die gut beschriebene führende Form des Plasma-Angiotensinogens, während das HMrA vor allem bei Schwangeren vorkommt (44-45). Die unterschiedlichen Formen des Angiotensinogens kommen durch Unterschiede in der Glykosylierung zustande, wobei das LMrA ein Molekulargewicht von 61,4 kDa und das HMrA ein Gewicht von 65,4 kDa aufweist (44-45).

Das HMrA in Amnion, Chorion und Plazenta ist mit einem Anteil von 60-70% des totalen Angiotensinogens die dominante Form in der Schwangerschaft. Bei der normotensiven Schwangeren sind im Gewebe von Amnion, Chorion, Plazenta und Fruchtwasser fünf unterschiedliche Formen des HMrA vorhanden. Im Plasma dagegen machen die Formen I-III über 95% des gesamten HMrA aus (44-45).

In der quantitativen Analyse zeigte sich jedoch, dass der plazentare Teil des HMrA den geringsten Teil der Menge bildet (44).

Probe	N	Gesamt	HMrA I	HMrA II	HMrA III	HMrA IV	HMrA V
Plazenta	6	30	4,4 ± 1,1	7,0 ± 0,4	9,3 ± 0,6	5,3 ± 0,7	4,0 ± 0,7
Plasma	4	380	57,7 ± 24,2	202 ± 17,7	104 ± 16,2	12,5 ± 10,7	3,7 ± 42

Angaben in Nanogramm/ANG I/Milliliter

Tabelle 1: Quantitativer Anteil der HMrA-Formen in Plazenta und Plasma der normotensiven Schwangeren, Mittelwert ± SD (aus Tewksbury et al (44))

Bei nicht schwangeren Frauen war der im Plasma gemessene HMrA Wert niedrig (3-5% des gesamten Angiotensinogens), Frauen mit normotensiver Schwangerschaft hatten einen höheren Wert (15% des gesamten Angiotensinogens) und Frauen mit schwangerschaftsinduziertem Hypertonus wiesen einen deutlich erhöhten Wert des HMrA (24% des gesamten Angiotensinogens) auf (44-45). Die nachfolgende Abbildung (Abb. 4) zeigt die prozentualen Anteile des HMrA der Plazenta nach der Geburt.

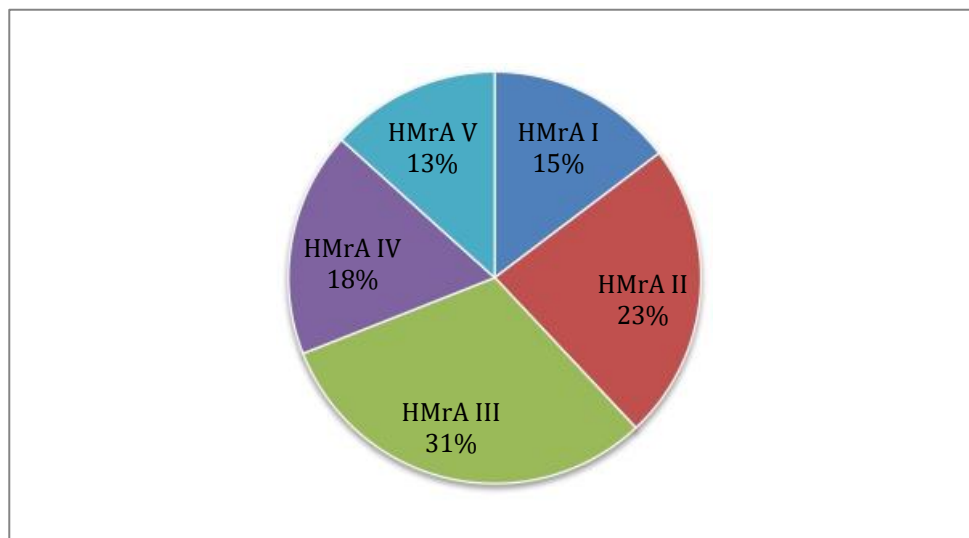


Abb. 4: Prozentuale Anteile der Formen von HMrA in der humanen Plazenta bei normotensiven Schwangeren (nach Tewksbury et al (44)).

Während der ersten Hälfte der Schwangerschaft steigt das gesamte HMrA im Plasma schnell von einem niedrigen Level auf ein moderat erhöhtes Level an, um bis zur Geburt konstant auf diesem zu bleiben. Nach der Geburt fällt es innerhalb von 6-8 Wochen wieder ab (83).

Lumbers et al. zeigten in der untenstehenden Abbildung (Abb. 5) einen Anstieg des Angiotensinogens im mütterlichen Plasma über die Schwangerschaft (83). Ob es sich hierbei methodisch bedingt um das Gesamtangiotensinogen handelt, oder um das HM<sub>r</sub>A, wurde nicht genauer beschrieben.

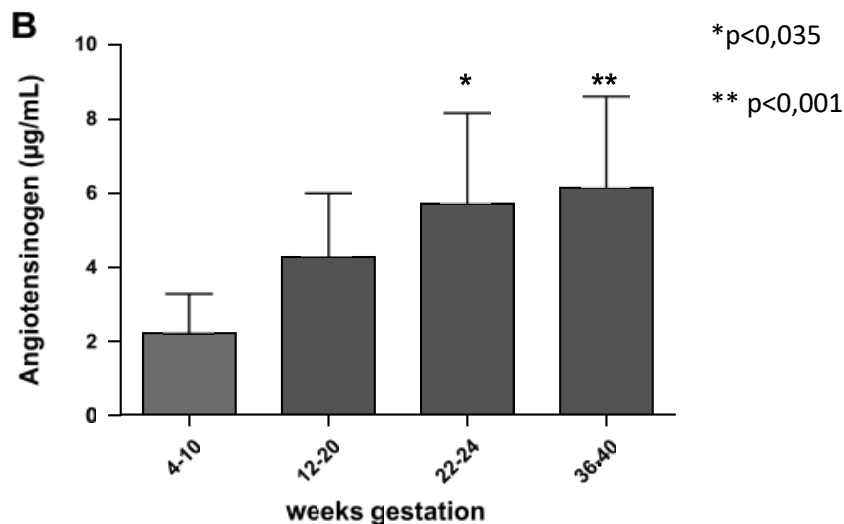


Abb. 5: Plasmarer Angiotensinogengehalt über die Schwangerschaft (Lumbers et al., Am J Physiol 306, p R93), Angiotensinogengehalt +/- SD (83).

Das Angiotensinogenlevel nach der zwanzigsten Schwangerschaftswoche ist signifikant höher als vor dieser (83).

## 1.4. Aufgabenstellung

Als primärer Stoffwechselfaustauschort zwischen Mutter und Fötus ist die Plazenta entscheidend für die fötale Entwicklung. Der Mechanismus, über den die Plazenta die fötale Entwicklung beeinflusst, ist jedoch noch nicht ganz verstanden. Die Betrachtung des Einflusses der mütterlichen Ernährung und oxidativen Stresses während der Schwangerschaft auf die Entwicklung der Plazenta könnte der Schlüssel zum genaueren Verständnis der Risikoentwicklung für Erkrankungen des Neugeborenen in späteren Dekaden seines Lebens sein (38, 106).

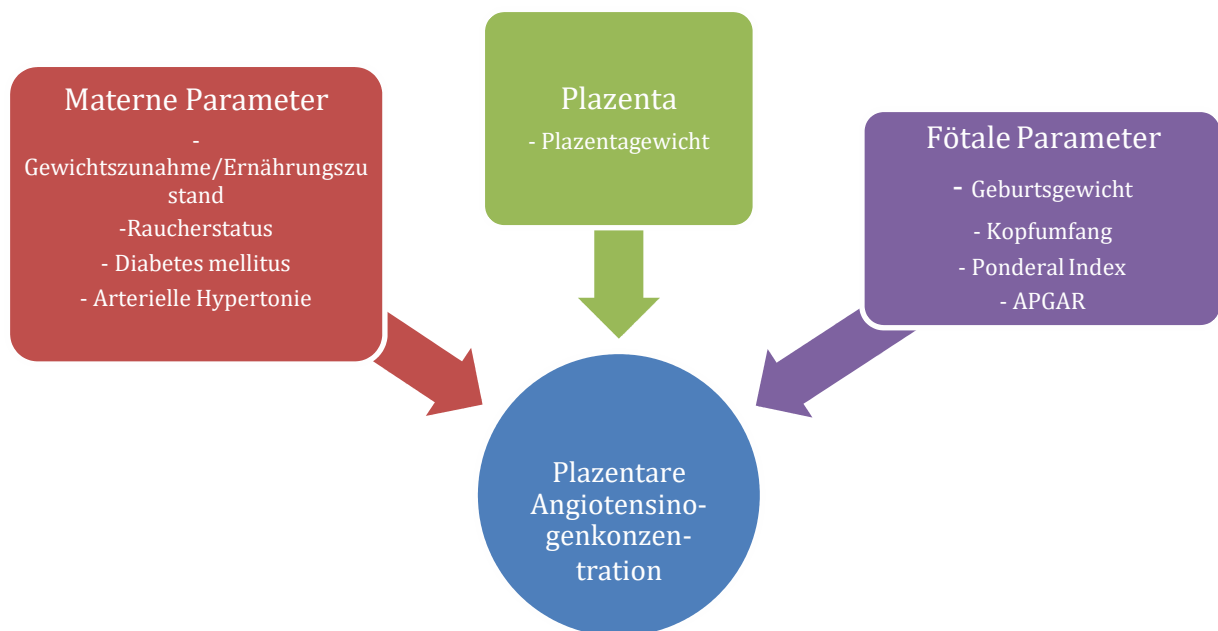
In diesem Kontext erschien es uns wichtig, plazentare Marker für die Entwicklung zum Beispiel einer koronaren Herzerkrankung im späteren Leben zu finden, um präventive Maßnahmen für potenziell betroffene Personen noch früher einleiten zu können.



Als mögliche plazentare Marker könnten Proteine gelten, die unter anderem durch die Plazenta exprimiert werden und hierdurch Einfluss auf die fötale Programmierung nehmen könnten.

In dieser Arbeit wurde an einem Patientenkollektiv von 338 Müttern ein möglicher Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und den die fötale Programmierung beeinflussenden Parametern (63-70, 104, 106) auf mögliche Zusammenhänge untersucht:

- Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und mütterlichen Parametern
- Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und fötalen Parametern
- Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und dem Plazentagewicht.



Unsere Hypothese ist, dass ein Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und den oben genannten mütterlichen und kindlichen Parametern, sowie dem Plazentagewicht besteht.

Falls diese These bestätigt werden könnte, wäre die Angiotensinogenkonzentration der Plazenta eventuell ein möglicher Prädiktor, über den eine frühzeitige Identifikation eines erhöhten Risikoprofils für die Entwicklung weiterer Erkrankungen im späteren Leben gelingen könnte, um dann weiterführend, im Sinne einer individualisierten Medizin, eine gezielte Prävention anzubieten. Falls ein Zusammenhang zwischen den oben genannten Parametern und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration nicht nachgewiesen, die Nullhypothese einer fehlenden Korrelation also nicht verworfen werden kann, wäre unter Umständen nach weiteren Proteinmarkern zu suchen (Arbeiten des Forschungsprojektes).

Da es sich hierbei um eine klinisch epidemiologische Assoziationsstudie handelt, in der es darum geht Hypothesen zu testen und neue Hypothesen zu generieren, erfolgte keine Betrachtung der plazentaren Regelsysteme auf zellulärer Ebene. Eine kausale Ableitung auf diese kann somit nicht getroffen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Die Kohorte**

In der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité Campus Mitte, Universitätsklinikum der Humboldt - und Freien Universität Berlin wurden von Januar 2000 bis Dezember 2004 schwangere Frauen vor ihrer Entbindung eingeladen, an dieser prospektiven Kohortenstudie teilzunehmen. Diese prospektive Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Von den befragten Frauen willigten 93,7% schriftlich durch eine Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie ein und erteilten ihre Erlaubnis, das Plazentagewebe im Labor untersuchen zu lassen. Es wurden dabei nur die Mütter eingeschlossen, welche einen vollständig geführten Mutterpass vorweisen konnten. Zudem wurden zur fehlerfreien Erhebung der Sozialdaten nur Teilnehmerinnen eingeschlossen die eine ausreichende Kenntnis der deutschen oder englischen Sprache hatten. Da die Gewebeproben über Jahre für weitere Studien untersucht wurden, mussten Proben, bei denen auch nach mehrmaligen Versuchen keine Proteinanalyse durchgeführt werden konnte, retrospektiv ausgeschlossen werden. Es wurden insgesamt über zweitausend Proben akquiriert, von denen für diese Arbeit 342 per Zufallsprinzip ausgewählte Proben zugeteilt wurden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen gab es bei vier Proben Unstimmigkeiten bezüglich der Laborergebnisse, welche durch mehrere Kontrollen nicht ausgeschlossen werden konnten, sodass diese Proben nicht in die weiteren Berechnungen eingingen. Somit wurden insgesamt 338 Proben in dieser vorliegenden Auswertung berücksichtigt.

#### **Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Die Gewinnung des Untersuchungsmaterials erfolgte in Zusammenarbeit mit den Hebammen und Ärztinnen/Ärzten der Klinik für Geburtsmedizin, Campus Charité Mitte - Universitätsmedizin Berlin. Nach makroskopischer Beurteilung der Plazenta auf Vollständigkeit und anatomischer Unauffälligkeit durch die verantwortlichen Ärztinnen/Ärzte wurde aus der Mitte der Plazenta eine Kotedone entnommen und in einem bereitgestellten Gefäß an das Labor übergeben. Es erfolgte die Einfrierung der Proben bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Die weitere Aufbewahrung und Bearbeitung des Plazentagewebes erfolgte dann im Center for Cardiovascular Research der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

## 2.2. Datenerhebung

Aus den Daten der Studienteilnehmerinnen und ihrer Neugeborenen wurde eine Mutter-Kind-Datenbank mit unterschiedlichen biometrischen und klinischen Parametern, unter anderem bezüglich Mutter, Neugeborene, Geburtsvorgang, eventuelle Vorerkrankungen und dem Nikotinkonsum der Mutter erstellt. Weiterhin wurden das Vorliegen und die vorbestehende Therapie eines Diabetes mellitus berücksichtigt, wobei hier zwischen einem präexistenten und einem Gestationsdiabetes unterschieden wurde. Ebenfalls hat man die Familienanamnese, insbesondere bezüglich primärer arterieller Hypertonie als auch Schwangerschaftshypertonie, metabolische Erkrankungen sowie vorangegangene Schwangerschaften im Allgemeinen mit einbezogen. Weiterhin wurde nach Fettstoffwechselstörungen und anderen mütterlichen Risikofaktoren gefragt, wie z.B. renale Erkrankungen. Diese Daten wurden in einem strukturierten persönlichen Interview erhoben und einige, für diese Arbeit relevanten in Tabelle 2 zusammengefasst. Zudem wurde eine umfangreiche laborchemische Diagnostik durchgeführt, in welcher unter anderem Lipide und Retentionsparameter (zusätzlich zum Interview) genauer untersucht wurden.

Daten aus dem Interview

Biometrische Daten der Mutter	Geburtsdatum, Größe, Gewicht (vor der Schwangerschaft)
Risikofaktoren der Mutter	Quantitativer Nikotinkonsum (vor und während der Schwangerschaft)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren der Mutter	Diabetes mellitus (vor und während der Schwangerschaft, sowie familiäre Disposition)  Arterieller Hypertonus (vor und während der Schwangerschaft, sowie familiäre Disposition)

Tabelle 2: Datenerhebung der Studienteilnehmer, strukturiertes Interview

Aus dem Mutterpass entnahm man unter anderem das Alter der Mutter, die Anzahl der Schwangerschaften und Geburten, der berechnete und der korrigierte Geburtstermin, das Vorliegen von Ödemen und Blutdruckwerte. Die Datenerfassung des Mutterpasses erfolgte jeweils von dem behandelnden Fachärztin/Arzt für Frauenheilkunde und Geburtshilfe und ist in Tabelle 3 nochmals zusammengefasst.

## Klinische Daten

Biometrische Daten der Mutter	Geburtsdatum, Größe, Gewicht (vor der Schwangerschaft und im Verlauf)
Biometrische Daten des Kindes	Geburtsgewicht, Geschlecht, Länge, Kopfumfang, berechneter und korrigierter Geburtstermin
Geburtsspezifische Daten	Anzahl der Schwangerschaften, Anzahl der Geburten, Gestationsalter, APGAR-Score, Geburtsmodus, Lage
Risikofaktoren in der Schwangerschaft	Ödeme, Blutdruckwerte (während der Schwangerschaft bei Vorsorgeuntersuchungen), Infektionen, Impfungen, sonstige Schwangerschaftskomplikationen

Tabelle 3: Datenerhebung aus dem Mutterpass sowie dem klinischen Verlauf

Von den postpartalen Ergebnissen der pädiatrischen Untersuchung der Neugeborenen wurden deren biometrische und klinische Daten wie Länge, Geburtsgewicht, Kopfumfang, Geschlecht, Gestationsalter und der APGAR-Score für die weitere Analyse verwendet.

## 2.3. Material

### Chemikalien

Stoff	Hersteller
Ammoniumpersulfat	Fluka, Hamburg, Deutschland
BSA bovine serum albumin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Complete protease inhibitor	F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
p-Comarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PAA Polyacryl Säure	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ponceau-S	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Rotiload 1	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdiacetat)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Bio Rad, München, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Complete Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien

## **Lösungen und Puffer**

Alle Lösungen und Puffer wurden im Labor selber hergestellt.

### **Zusammensetzung des Lysepuffers RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay)**

---

0,5% (w/v) SDA  
50 mM Tris pH 8,5  
150 mM NaCl  
0,1 % (v/v) SDS  
1% (v/v) Triton X-100  
2x Roche complete protease inhibitor  
NaN<sub>3</sub> 0,2%

### **Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers**

---

25 mM Tris  
250 mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS  
pH 8,3 (HCl, KOH)  
H<sub>2</sub>O bidest

### **Zusammensetzung des TBS-T Puffers**

---

140 mM NaCl  
0,1% (v/v) Tween-20  
pH 7,6 (HCl, KOH)  
20 mM Tris

### **Zusammensetzung des Transferpuffers**

---

184 mM Glycin  
24 mM Tris  
20% (v/v) Methanol

### **Zusammensetzung des Strippingpuffers**

---

25 mM Glycin  
1% (w/v) SDS  
pH 2,0 (HCl, KOH)

### **Zusammensetzung der Enhanced chemiluminescence (ECL-Mix)**

---

#### **Lösung 1**

Luminol (0,88 g in 20 ml DMSO)  
p-Comarinsäure (0,29 g in 20 ml DMSO)  
1 M Tris-HCl pH 8,5  
H<sub>2</sub>O

#### **Lösung 2**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %  
1 M Tris-HCl pH 8,5  
H<sub>2</sub>O

### **Zusammensetzung der Western Blot Gele**

**Trenngel 10 % (v/v), Acrylamid, Rotiphorese Gel 30**

---

9,9 ml H<sub>2</sub>O (deionisiertes Aqua bidest)  
8,3 ml 30 % (w/v) Polyacrylsäure  
6,3 ml 1,5 M Tris, pH 8,8 eingestellt und autoklaviert  
0,25 ml 10 % (w/v) SDS  
Polymerationsstarter:  
0,25 ml 10% (w/v) APS  
0,01 ml TEMED (Tetramethylethyldiamin)



### **Sammelgel 5 % (v/v), Acrylamid, Rotiphorese Gel 30**

---

10,2 ml H<sub>2</sub>O (deionisiertes Aqua bidest)  
2,53 ml 30 % (w/v) Polyacrylsäure  
6,3 ml 1,88 M Tris, pH 6,8 eingestellt und autoklaviert  
0,15 ml 10% (w/v) SDS  
0,25 ml 10% (w/v) APS  
0,015 ml TEMED (Tetramethylethylendiamin)

### **Zusammensetzung der Ponceau Lösung**

---

0,04 g Ponceau-S, 0,1 % (w/v)  
2 ml 100 % (v/v) Essigsäure  
28 ml H<sub>2</sub>O

### **Antikörper**

---

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Angiotensinogen (H-170, sc-20791)	Santa Cruz Biotech
Anti Actin (20-33, A5060) polyclonal rabbit	Sigma
Donkey anti goat IgG-HRP (sc-2020)	Santa Cruz Biotech
Goat anti rabbit IgG-HRP (sc-2054)	Santa Cruz Biotech

---

## Verwendete Instrumente

<b>Instrument</b>	<b>Hersteller</b>
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa AG, Mortsel, Belgien
Feinwaage	Sartorius BL600, Sartorius AG, Göttingen
Gel-Elektrophorese-Kammer	HU10W Wide Format Mini-Plus, Scie Plas Ltd., Cambridge, UK
Netzgerät	Biometra standard P25, Whatman Biometra GmbH, Tübingen
pH-Meter	WTW pH537, Wiss.-Techn. Werstätten GmbH, Weilheim
Photometer	Spectrophotometer Du530 UV/Vis, Beckmann Coulter, Krefeld
Pipetten	Eppendorf Reference® variabel, Eppendorf AG, Hamburg
Präzisionswaage	Scaltec SBC22, Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Scanner	Canon CanoScan 4400F, Canon Inc., Tokyo, Japan
Schüttler	Schüttler WT-17, Biometra, Göttingen
Semi Dry Blotter	Transblot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tischerhitzer	Test Tube Thermostat TCR 100, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ultraschall-Gerät	Sonoplus, Bandelin, Berlin
Vortex	Vortex Genie 2-Mixer, Bender & Holbein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 13, Heraeus Sepatech GmbH, Hanau

Tabelle 5: Instrumente

## **2.4. Methoden**

### **2.4.1. Proteinextraktion**

Die in Form einer Kotyledone entnommenen humanen Plazentaprobe bewahren wir bis zur weiteren Verwendung im gefrorenen Zustand auf. Von jeder Probe wurden aus dem mittleren Querschnitt möglichst gleich große, circa ein Gramm schwere, gewebereiche Stücke mit einem sterilen Skalpell entnommen und in einem 1,5 ml fassenden standardisierten Reaktionsgefäß 3810 (Eppendorf AG) unter Stickstoffkühlung auf  $-196\text{ °C}$  gekühlt und gelagert. Zur weiteren Bearbeitung konnten die Proben dann jederzeit wieder entnommen werden. Im nachfolgenden Schritt zerkleinerten wir die Gewebestücke mit einem durch Stickstoff gekühlten Metallmörser und füllte sie in ein standardisiertes Reaktionsgefäß mit bekanntem Leergewicht um abschließend das Gewicht zu ermitteln. Anschließend füllte man die gemörserten Proben mit Lysepuffer und Proteaseinhibitor auf. Dabei kam auf 100 mg des gemörserten Plazentagewebes 1 ml Lysepuffer. Die Proben wurden mittels Vortex gemischt und mit Ultraschall behandelt. Die Zellmembranen wurden durch die Bearbeitung mittels Ultraschallwellen aufgebrochen, so dass die intrazellulären Proteine in das Trägermedium überführt werden konnten. Es wurden fünf Zyklen über jeweils drei mal fünf Sekunden durchgeführt; die Proben wurden dabei mit 80%-iger Intensität mit 7/10 Beschallungsintervallen behandelt. Anschließend musste das Lysat für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Für die weitere Evaluation der Proteine war es erforderlich, zunächst größere Zellorganellen und weitere, nicht aufgeschlossene Zellen mittels Zentrifugation zu trennen. Die Proben mussten dafür über zwölf Minuten bei 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert werden; anschließend wurde der Überstand zur weiteren Untersuchung abpipettiert und der Zelldebris verblieb im Gefäß.

### **Proteinbestimmung**

Zunächst wurde der Gesamtproteingehalt (mit der Methode nach Smith) mittels Bicinchoninsäure Protein Assay Kit (BCA Kit, Thermo Fischer Scientific Inc., Rockford, USA) bestimmt, um dann gleiche Mengen des isolierten Proteins ermitteln und auf die Gelelektrophorese übertragen zu können (84).

Zur kolorimetrischen Evaluation des Gesamtproteingehalts der Proben wurde (mit der Methode nach Wiechelman) die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch die Komplexbildung zweier Peptidgruppen der Bicinchoninsäure um das zentrale  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion, welches eine Violett färbung hervorruft, genutzt (85).

Um eine Eichgrade aus verschiedenen Konzentrationen anfertigen zu können, wurde bovines Serumalbumin (BSA) als Standardprotein verwendet.

Anschließend erfolgte eine dreifache Auftragung auf eine sterile 96-Well-Platte der Standardproteinproben sowie der Proteinlysate des placentaren Gewebes. Die Proben wurden bei 37 °C für dreißig Minuten inkubiert. Abschließend erfolgte die Kühlung der Platte auf Raumtemperatur; die Farbintensität konnte gemessen werden, wobei sich die Endkonzentration aus den Eichgeraden des BSA ergaben. Die Proben konnten aufgrund des zuvor bestimmten Gesamtproteingehaltes mit Aqua bidest auf 5 µg/ml der Gesamtproteinkonzentration verdünnt werden. Zur Analysegenauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde als Referenz für die einzelnen Proben aus allen Proteinlysaten ein Standardgemisch und Regressionsgrade erstellt (siehe Abb. 7). Hierfür wurden die Proben mittels Vortex gemischt und davon 100 µl in einem 20 ml Falcon Röhrchen bei – 20 °C aufbewahrt (85).

#### **2.4.2. Western Blot**

Zur weiteren Evaluation des Molekulargewichts wurden die Proteinlysate mit der Methode nach Laemmli aufgetrennt (86). Zunächst reinigten wir die Glasplatten, die Spacer, die Kämmen und die Gießhalterungen mit Ethanol. Die Glasplatten wurden in die Gießhalter gespannt und mit 25 ml eines 10%-igen Trenngels aufgegossen. Auf das Trenngel wurde 0,5 ml Isopropanol zur Vermeidung von Kontakt mit Sauerstoff und um eine glatte Kante zu erhalten gegeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Die Kämmen wurden in die Kammern eingesetzt und mit 15 ml eines 5%-igen Sammelgels auf jeder Seite aufgefüllt; danach erfolgte eine 30-minütige Polymerisation bei Raumtemperatur (86).

#### **Elektrophorese**

Nachdem die Proben langsam auf Eis aufgetaut waren, wurden 15 µl von jeder Probe abgenommen, mit 7,5 µl H<sub>2</sub>O und 7,5 ml reduziertem Ladepuffer (Rotiload 1, Roth) in einem Safelock-Tube versetzt und im Vortex gemischt. Aus dem Standardmix erstellten wir eine Probenreihe mit aufsteigender Konzentration (20, 25, 30, 35, 40 µg Protein/ml) und versetzten diese ebenfalls mit H<sub>2</sub>O und Ladepuffer. Abschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 90°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert.

Die eingespannten Glasplatten wurden in die Kammern eingesetzt und mit ca. 0,7 l Elektrophoresepuffer außen aufgefüllt; danach konnten die Kämmen entfernt werden. Jeder Kamm hatte 48 Zinken, somit wurde je Gel die Standardreihe und 15 weitere Proben mit 12 µl pro Probe aufgetragen. Sowohl die Standardreihe, als auch die Proben trugen wir doppelt auf. Zur besseren Stabilisierung und Orientierung wurde ein Molekulargewicht-Marker (Fermentas, PageRulerPrestained Protein Ladder) mit 3 µl verwendet. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei 4°C zuerst für 30 Minuten bei einer Spannung von 80 Volt, dann ca. zwei Stunden bei einer Spannung von 110 Volt durchgeführt (86, 109).

### **Blotten**

Für die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde das Semi-Dry Blot Verfahren angewandt (86, 109). Zur Vorbereitung wurden für jedes Gel vier Lagen eines Filterpapiers (Whatman-Papier) und zwei Lagen Nitrozellulosemembran jeweils auf 5,5 x 18 cm zurechtgeschnitten. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen für zwei Minuten in destilliertem H<sub>2</sub>O aktiviert. Danach mussten die Membranen, das Filterpapier und die Gele, in getrennten Gefäßen, für zehn Minuten mit Transferpuffer in Kontakt gebracht werden. Dann wurden zwei Lagen Whatman-Papier, eine Membran, ein Gel und wiederum zwei Lagen Whatman-Papier in den Semi-Dry-Blotter gelegt. Um die sich auf dem Gel befindenden Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran zu blotten, musste für eine Stunde Spannung von 25V/500mA angeschlossen werden. Der Blot wurde anschließend mit Ponceau-S Färbung temporär angefärbt, um mögliche Fehler, welche im Rahmen des Blot-Verfahrens auftreten können, bereits früh zu detektieren. Mögliche Fehler wären dabei zum Beispiel eine zu geringe Proteinfärbung durch zu wenig Proteingehalt in der extrahierten Lösung, sodass in einem solchen Fall diese Probe erneut untersucht werden musste (86, 109).

## **2.4.3. Proteinbestimmung**

### **Immunfärbung**

Die mit Semi-Dry Blot auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteinbanden wurden mittels Ponceau-S Färbung sichtbar gemacht (110) und für die Banden des Angiotensinogens (65 kDa) und Aktins (40 kDa) zurechtgeschnitten. Da es sich bei unseren Analysen um die relative plazentare Angiotensinogenkonzentration der untersuchten Probe handelte und keine Differenzierung zwischen LMrA und HMrA erfolgte, sind die Größenangaben hier divergent

zu den oben genannten Angaben für das LMrA und HMrA, welches in der Literatur quantifiziert wurde.

Um die Farbrückstände hinterher wieder zu entfernen erfolgte eine dreimalige Waschung der Membranen über fünf Minuten in TBS-T. Danach konnten die Membranen für eine Stunde in 5%-igem Milchpulver bei Raumtemperatur geblockt werden.

Durch eine erneute dreimalige Waschung über fünf Minuten wurden dann die Milchpulverreste entfernt und ein primärer Antikörper, in diesem Fall Angiotensinogen (N-10, sc 7419, Santa Cruz Biotech), auf die Membranen aufgebracht. Anschließend erfolgte über Nacht die Inkubation der Membranen bei 4 °C auf einem Schüttler.

Am darauf folgenden Tag wurde der primäre Antikörper mittels dreimaliger Waschung über zehn Minuten wieder entfernt. Auf die gewaschenen Membranen wurde ein sekundärer Antikörper, in diesem Fall Donkey anti goat (IgG-HrP (sc-2020), Santa Cruz Biotech), aufgetragen und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch dieser musste anschließend für dreimal zehn Minuten mittels Waschung in TBS-T wieder entfernt werden.

### **Fotos**

Im Verhältnis von 1:1 mit ECL Solution 1 und ECL Solution 2 wurde ein ECL-Mix erstellt. Die Membran inkubierte für ca. drei Minuten in dem Mix, um danach zusammen mit dem Fotopapier in einer KodakR Filmkassette eingelegt und belichtet zu werden. Die erstellten Bilder wurden im Durchschnitt für zwei, fünf und zehn Minuten belichtet. Das Fotopapier wurde mit einem vollautomatischen Entwickler entwickelt.

Zur weiteren Verwendung wurde die Membran für dreimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, in einem vorgeheizten Wasserbad bei 50°C für 30 Minuten mittels Stripping Buffer gestrippt, und erneut für dreimal zehn Minuten mit TBS-T gereinigt, um dann eine Stunde in 5% Milch in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt zu werden. Dann erfolgte eine erneute Reinigung der Membran mittels TBS-T für dreimal zehn Minuten, um dann eine Stunde mit primärem Antikörper (anti Actin (20-33, A5060) polyclonal rabbit, Sigma) in 5% TBS-T-Milch bei Raumtemperatur zu inkubieren. Erneut wurde sie für drei mal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, und dann für eine Stunde im sekundären Antikörper (goat anti rabbit IgG-HRP (sc-2054), Santa Cruz Biotech) in 4% TBS-T-BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurde die Membran für dreimal zehn Minuten gereinigt und mit dem ECL-Mix inkubiert, belichtet. Abschließend konnten dann Fotos erstellt werden (siehe Abb. 7-9).

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen exemplarisch eigene entwickelte und digitalisierte Fotofilme der Proteinbanden für Angiotensinogen und Aktin, sowie eine erstellte Eichgrade des Gesamtproteingehalts.

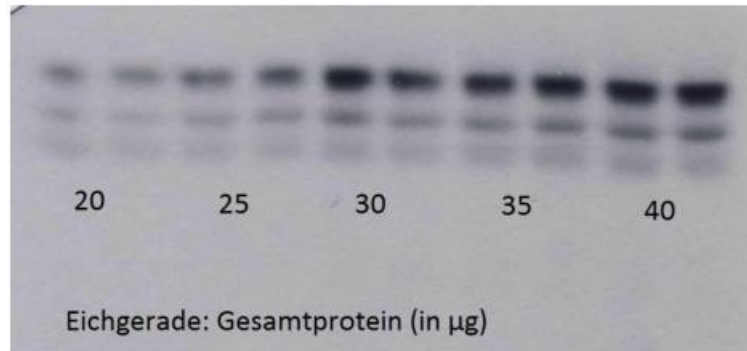


Abb.6: Doppelt aufgetragene Eichgeradengemische von 20, 25, 30, 35 und 40 µg Gesamtproteinkonzentration (eigene Darstellung, Auszug aus Gruppe 10b)

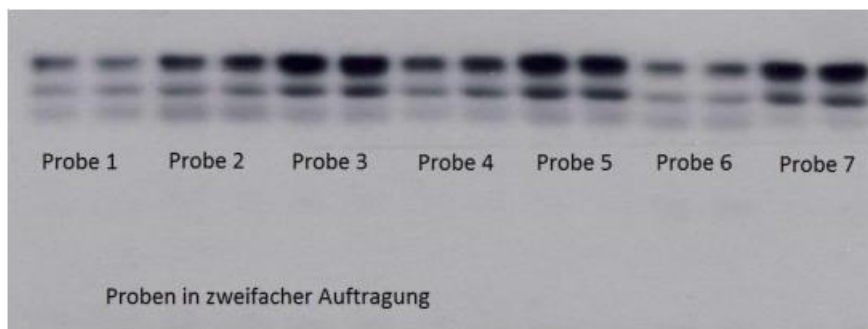


Abb.7: Doppelt aufgetragene Proben im Western Blot (eigene Darstellung, Auszug aus Gruppe 10b)

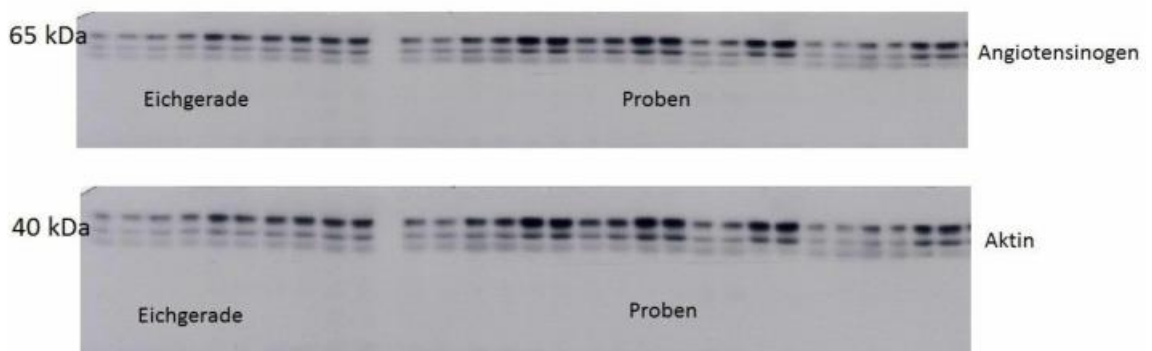


Abb.8: Fotofilm der Western Blots aus Plazentalysaten, Angiotensinogen und Aktin (eigene Darstellung, Auszug aus Gruppe 10b)

#### 2.4.4. Auswertung

Die Bilder wurden mit dem Canon (Tokyo, Japan) CanoScan 4400F Scanner (Auflösung von 600 dpi) eingescannt. Als nächstes wurden bei allen Proben die Signalintensität der Banden des Angiotensinogens sowie des Aktins mit dem AlphaEase™ Version 3.1.2. ermittelt und die gemessenen Werte (Integrated Density Value (IDV), Area und Background) in erstellte Tabellen in Open Office™ eingefügt. Aus den standardisierten Proben (siehe Abb. 6) wurde eine Regressionsgerade erstellt, indem die Signalintensität der vermessenen Proteinbanden von der durchschnittlichen Intensität des Hintergrundes abgezogen wurde (siehe Abb. 9).

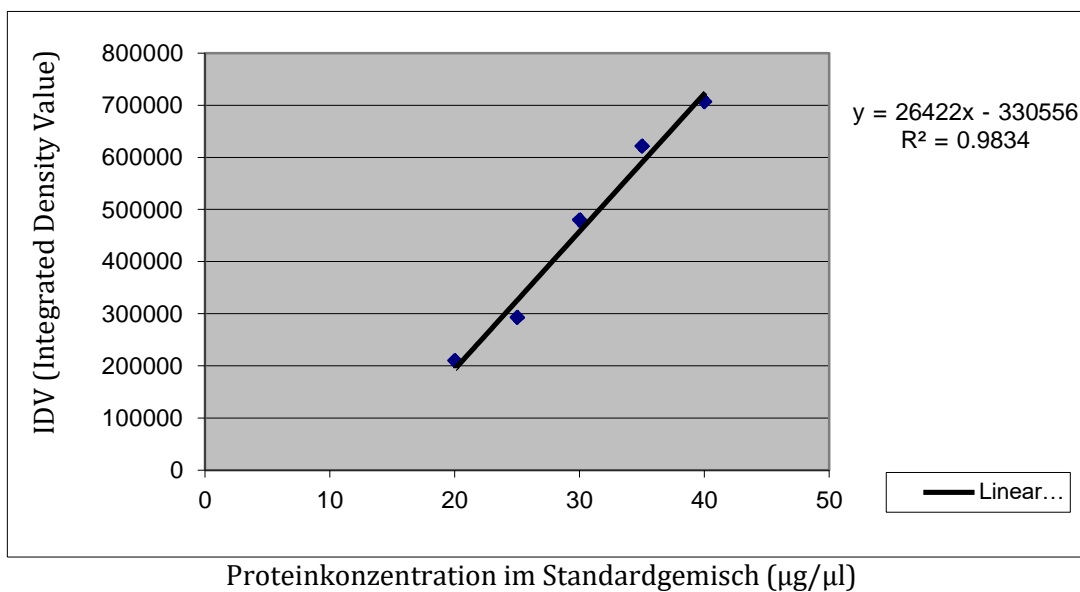


Abb. 9: Regressionsgerade zur Berechnung der Angiotensinogenkonzentration

Der y-Abschnitt  $n$  wird vom erhaltenen Wert abgezogen und durch den linearen Faktor der Geradengleichung dividiert ( $y = mx + n$ ). Somit konnten die absoluten Werte der Einzelproben mit der Standardreihe abgeglichen werden. Es ermöglichte die unterschiedlichen Bedingungen der Experimente auszugleichen. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  erklärt dabei den Anteil der Variabilität der abhängigen Variable ( $y$ ), in diesem Fall des IDV, wobei 1,0 einen perfekt linearen Zusammenhang anzeigt. Das Ergebnis wurde wiederum durch die Signalintensität der Aktinbande dividiert. Auch bei Aktin wurde vom IDV das Produkt aus der Fläche der Proteinbanden und der durchschnittlichen Hintergrundintensität subtrahiert und über die Referenzgrade abgeglichen. Der Aktin Gehalt sollte bei allen Proben gleich sein, somit konnte eine relative Proteinkonzentration des Zielproteins bestimmt werden. Die Daten stellten demnach eine relative Proteinkonzentration dar. Alle Messungen wurden mindestens zweimal durchgeführt.



## 2.4.5. Statistik

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Grafiken wurde mit SPSS Version 24 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Beratung in statistischen Fragen erfolgte durch die Clinical Research Organization unter der Leitung von Frau Dr. med. Kottmann. Die Darstellung der metrischen Variablen erfolgte als Mittelwerte und Mediane, während die Streumaße als Standardabweichungen und Quartile angegeben wurden.

Die metrische Variable wurde mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Normalverteilungstests überprüfen die Verteilungsform von stetigen Zahlen einer Stichprobe. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung besteht bei einem  $p < 0,05$ ; in diesem Falle sind für die betreffende Variablen nichtparametrische Test zu benutzen. Die Durchführung von Normalverteilungen erfolgt am häufigsten mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test. Die getestete Variable wies keine Normalverteilung auf (Kolmogorow-Smirnow-Test:  $p < 0,05$ ). Bei dem Vergleich der Stichproben wurden durchgehend nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen. Bei den folgenden Gruppenvergleichen der vorliegenden Stichproben liegen unabhängige Stichproben vor, d.h., dass die Werte in keinem direkten Zusammenhang stehen. Beim Vergleich von zwei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als zwei unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben der H-Test nach Kruskal und Wallis angewandt (78, 79).

Die Korrelation zwischen zwei Parametern wurde durch den Korrelationseffizienten nach Spearman-Rho berechnet (78, 79). Dabei wurde der Korrelationskoeffizient nachfolgender Einteilung bewertet:

<b>Korrelationskoeffizient</b>	<b>Einteilung</b>
$r < 0,2$	Sehr geringe Korrelation
$r = 0,2 - 0,5$	Geringe Korrelation
$r = 0,5 - 0,7$	Mittlere Korrelation
$r = 0,7 - 0,9$	Hohe Korrelation
$r > 0,9$	Sehr hohe Korrelation

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant angenommen wurde.

Zur Darstellung der Mediane und Quartilsabstände wurden Boxplots angefertigt. Während in den Boxen der Median, sowie die 25. bis 75. Perzentile aufgetragen sind, entsprechen die T-Balken dem kleinsten und größten Wert, sofern diese keine Ausreißer bzw. Extremwerte sind. Die Ausreißer sind dabei Werte, die zwischen 1,5 bis 3 Boxlängen außerhalb der Box lagen: sie sind in den Grafiken als Kreise dargestellt, während Extremwerte, die mehr als 3 Boxlängen außerhalb der Box gemessen wurden, als Kreuze aufgetragen sind. Die Verteilung von Werten stetiger Variablen wurden in Histogrammen aufgetragen, während Häufigkeiten von kategorisierten bzw. normalverteilten Parametern in Kreisdiagrammen veranschaulicht wurden (78, 79).

## **2.5. Abgrenzung zu anderen Arbeiten**

Diese Dissertation ist ein Teil einer Studie, in der noch weitere Arbeitsgruppen unter gleichen Bedingungen weitere plazentare Proteine quantifizierten. Dabei wurde das Protein Expressionsmuster der Plazenta, durch welches das intrauterine Milieu mitbestimmt wird, im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge mit Parametern der fötalen Programmierung untersucht. Unter anderem wurden die Proteine Klotho, quantifiziert durch Herrn Christoph Reichetzedler (112) und die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase, quantifiziert durch Herrn Tim Andermann (111) untersucht.

Bei der Quantifizierung der einzelnen, oben beispielhaft angeführten Proteine war das Extraktionsverfahren jeweils identisch. Augenmerk in allen Arbeiten wurde speziell auf die biologischen Parameter der Neugeborenen gelegt. Dabei war als Surrogatparameter das Geburtsgewicht besonders wichtig.

Es konnten jedoch weder bei der Analyse zum Protein Klotho noch in Bezug auf die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase ein Zusammenhang zwischen den biologischen Parametern des Neugeborenen evaluiert werden (111, 112).

Hinsichtlich weiterer Fragestellungen zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Arbeiten. So wurden zum Beispiel Interaktionen zwischen Klotho und anderen plazentaren Proteinen wie unter anderem der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase analysiert. Diesbezüglich zeigte sich die statistische Auswertung mittels Regressionsanalyse signifikant (112).

Untersuchungen bezüglich etwaiger Interaktionen zu anderen plazentaren Proteinen wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Studienpopulation

Insgesamt wurden Plazentaprobe von über 2000 Frauen konserviert. Die erhobenen Daten der Mütter sowie der jeweiligen Kinder wurden in eine Mutter-Kind-Datenbank übertragen in welcher verschiedene Parameter bezüglich der Mutter, des Neugeborenen und der Entbindung vermerkt sind. Für diese Arbeit wurden die Daten und Plazentaprobe von 342 Müttern und ihren Kindern verwendet. Bei vier Proben waren die bestimmten plazentaren Angiotensinogenkonzentrationen aufgrund von mutmaßlichen Messfehlern abweichend, sodass diese Proben nicht eingerechnet wurden. Bei 338 Proben lag eine valide Angiotensinogenkonzentration mit reproduzierbaren Ergebnissen vor.

Nachfolgend sind die für diese Arbeiten relevanten Daten tabellarisch aufgeführt.

<b>Alter (Jahren)</b>	30,5 ± 5,8
<b>Größe der Mutter (cm)</b>	167,6 ± 6,8
<b>BMI zu Beginn der Schwangerschaft</b>	23,6 ± 4,2
<b>Gestationsalter zur Geburt (Wochen)</b>	38,8 ± 2,1
<b>Geburtsgewicht des Kindes (kg)</b>	3427,8 ± 619,0
<b>Geburtsgewicht &lt; 2500g (%)</b>	6,85 (n=24)
<b>APGAR 5 min.</b>	9,34 ± 0,87
<b>APGAR 10 min.</b>	9,69 ± 0,58
<b>Hypertonus vor/während der Schwangerschaft (%)</b>	3,4/3,7
<b>Familienanamnese Hypertonus (%)</b>	38
<b>Diabetes mellitus vor/während der Schwangerschaft (%)</b>	1,0/4,5
<b>Familienanamnese für Diabetes mellitus (%)</b>	36
<b>Rauchen vor der Schwangerschaft</b>	56 (16,7%)
<b>Rauchen während der Schwangerschaft</b>	57 (17,0%)
<b>Rauchen vor/während der Schwangerschaft</b>	113 (33,6%)
<b>Packyears vor der Schwangerschaft</b>	3,15 ± 6,51
<b>Konsumierte Zigaretten während der Schwangerschaft</b>	1,09 ± 3,08
<b>Geschlecht des Kindes männlich/weiblich (%)</b>	51,7/48,3

Tabelle 6: Charakterisierung der Studienpopulation

### 3.2. Angiotensinogen in Bezug auf das Gestationsalter

Bei der statistischen Auswertung der plazentaren Angiotensinogenkonzentration in Bezug auf das Gestationsalter lagen von den oben erwähnten 338 Proben bei 332 Müttern zusätzlich Daten hinsichtlich der Schwangerschaftswoche zum Zeitpunkt der Entbindung vor. Dabei wurden die meisten Kinder um den errechneten Geburtstermin geboren. Ein Kind, welches nach Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche geboren wird gilt als reifgeboren. Wenn es vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche geboren wird gilt es als Frühgeborenes.

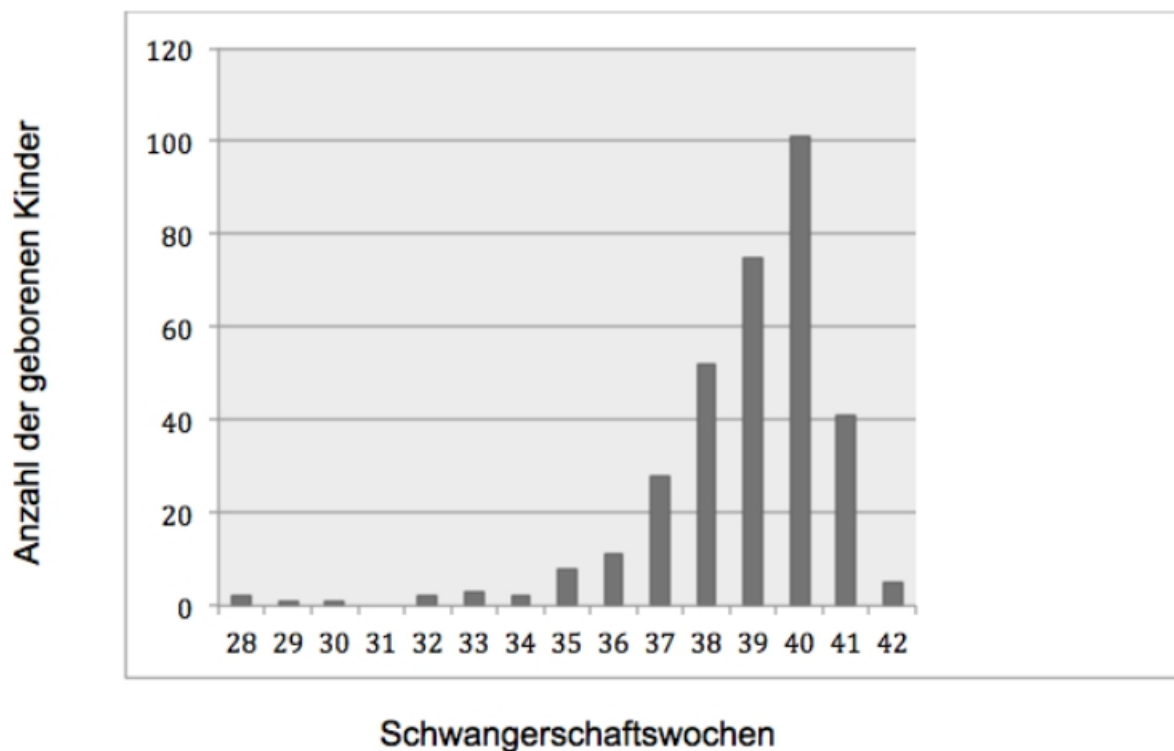


Abb. 10: Aufteilung der Anzahl der geborenen Kinder auf die Schwangerschaftswoche

Unter Einbeziehung aller 332 Kinder zeigt sich die folgende Korrelation zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und der Schwangerschaftswoche (siehe Abb. 9).

In sämtlichen Grafiken der Statistik, in denen eine Korrelation mit Angiotensinogen hergestellt wurde, wurde auf der y-Achse, welche mit Angiotensinogen benannt wurde, stets die relative Angiotensinogenkonzentration angegeben. Diese stellt eine zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar und weist keine Einheit auf.

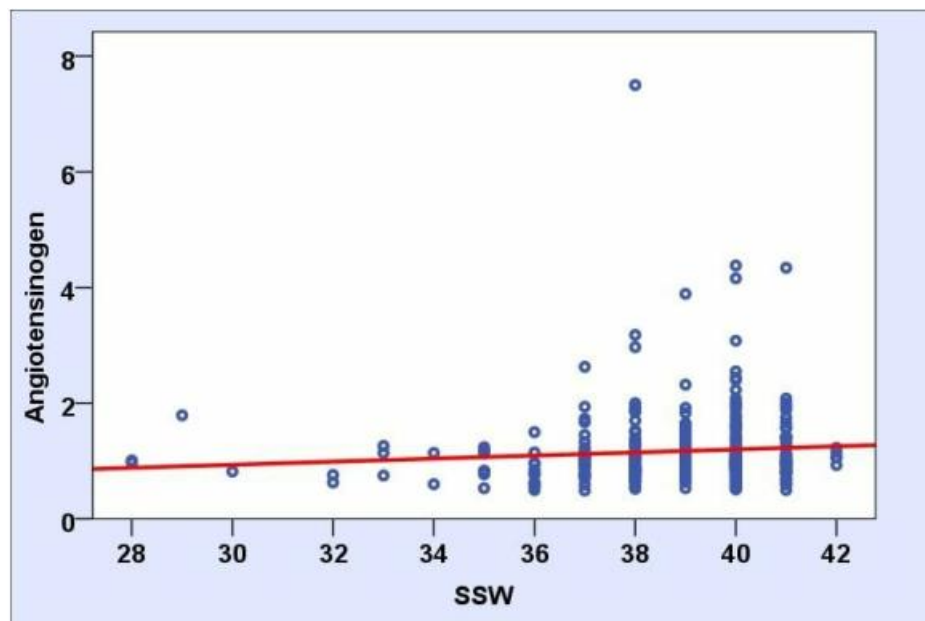


Abb. 11: Korrelation zwischen plazentarer Angiotensinogenkonzentration und der Schwangerschaftswoche bei allen Kindern  
Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

In unseren Untersuchungen wurde keine Differenzierung zwischen LMrA und HMrA durchgeführt, sodass es sich bei unseren Angaben um die gesamte plazentare Angiotensinogenkonzentration der einzelnen Probe handelt.

Da es sich hierbei um eine nicht normalverteilte Variable handelte, erfolgte die Korrelation nach Spearman Rho. In dieser Berechnung zeigte sich mit einem  $r = 0,111$  in der zweiseitigen Analyse mit einem  $p = 0,044$  eine signifikante, jedoch sehr schwache Korrelation.

			Angiotensinogen Konzentration	SSW
Spearman-Rho	Angiotensinogen konzentration	Korrelationskoeffizient	1,000	0,111*
		Sig. (2-seitig)		0,044
		N	338	332
SSW		Korrelationskoeffizient	0,111*	1,000
		Sig. (2-seitig)	0,044	
		N	332	335

\*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

Tabelle 7: Korrelation nach Spearman Rho für die Angiotensinogenkonzentration und die Schwangerschaftswoche

Auffällig sind wenige Ausreißer in einigen frühen Entbindungsterminen, sodass nachfolgend für die Berechnungen der Korrelation mit Angiotensinogen nur die Fälle ab der 34. Schwangerschaftswoche ( $n = 323$ ) berücksichtigt wurden. Diese Grenze wurde aufgrund der statistischen Berechnungen gezogen und spiegelt nicht den Entwicklungszustand des Kindes wieder.

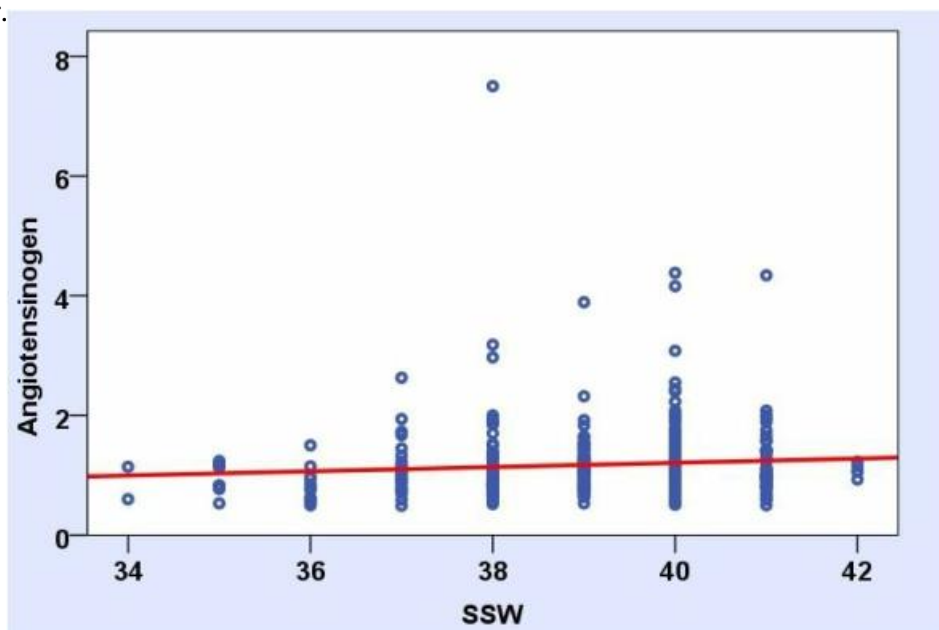


Abb. 12: Korrelation zwischen Angiotensinogen und den ab der 34. Schwangerschaftswoche geborenen Kindern

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Nachdem nur noch die Kinder ab der 34. Schwangerschaftswoche und darüber in die statistischen Auswertungen einbezogen wurden, zeigte sich derselbe Korrelationstest nach Spearman Rho in der zweiseitigen Analyse als nicht signifikant ( $p=0,065$ ). Somit ist die Signifikanz in der Korrelation der plazentaren Angiotensinogenkonzentration mit allen entbundenen Kindern nur den wenigen Ausreißern unterhalb der 34. Schwangerschaftswoche geschuldet. Es handelte sich hierbei jedoch um normal entwickelte Kinder, so dass diese Ausreißer nicht auf eine intrauterine Wachstumsretardierung zurückzuführen sind.

<b>Aufschlüsselung der Proben</b>	
Proben insgesamt	342
Proben mit valider Angiotensinogenkonzentration	338
Proben mit dokumentierter Schwangerschaftswoche bei der Entbindung	335
Kinder geboren ab der 34. Schwangerschaftswoche	323

Tabelle 8: Probenverteilung

### 3.3. Deskriptive Statistik

Da von insgesamt 335 Müttern eine Angabe der Schwangerschaftswoche vorlag, und neun Proben aufgrund einer Geburt vor der 34. Schwangerschaftswoche als Ausreißer gewertet und nicht berücksichtigt wurden, wurde die weitere deskriptive Statistik anhand von 326 Probandinnen erstellt.

#### Alter der Mutter

Insgesamt konnten die Daten von 326 Müttern ausgewertet werden. Hierbei wies das Alter der Mütter einen arithmetischen Mittelwert von 30,45 Jahren auf, wobei die jüngste Frau 15 Jahre alt war und die älteste Frau 45 Jahre.

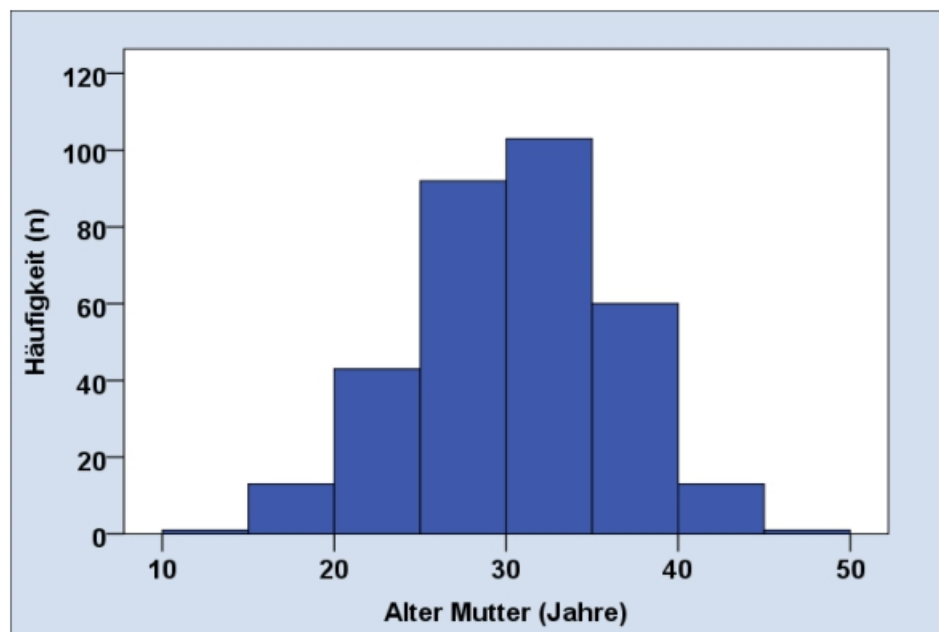


Abb. 13: Alter der Mutter (Jahre)



## Der Body-Mass-Index zu Beginn der Schwangerschaft

Bei 320 ausgewerteten Angaben hinsichtlich des Body-Mass-Index (BMI) zu Beginn der Schwangerschaft zeigte sich ein arithmetischer Mittelwert von 23,53 kg/m<sup>2</sup>.

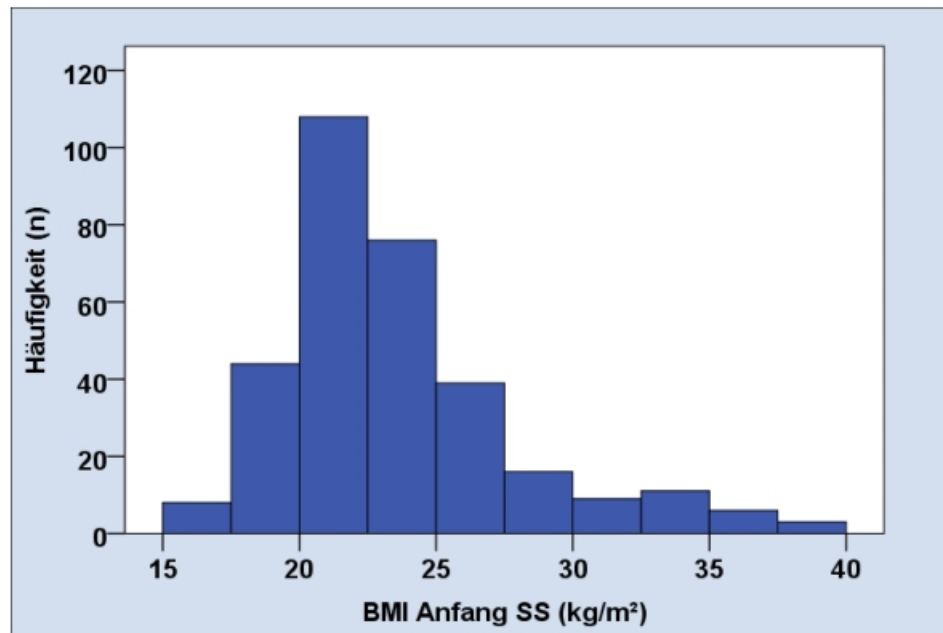


Abb. 14: Body-Mass-Index zu Beginn der Schwangerschaft

Definitionsgemäß (laut World Health Organization) entspricht ein BMI zwischen 20 kg/m<sup>2</sup> und 25 kg/m<sup>2</sup> dem Normalgewicht. In unserer Kohorte sind somit die meisten Frauen normalgewichtig (25. Perzentile: 20,8 kg/m<sup>2</sup>; 75. Perzentile: 25,15 kg/m<sup>2</sup>).

### Hypertonus vor und während der Schwangerschaft

In unserem Patientenkollektiv wiesen 87,4% der insgesamt 326 Frauen keine arterielle Hypertonie vor oder während der Schwangerschaft auf. Lediglich in 5,5% der Fälle (n=18) lag bereits vor der Schwangerschaft eine arterielle Hypertonie vor. Bei 3,7% der Frauen (n=12) entwickelte sich in der Schwangerschaft ein Gestationshypertonus. Die Genese des Hypertonus ließ sich aus denen uns vorliegenden Daten jedoch nicht eruieren.

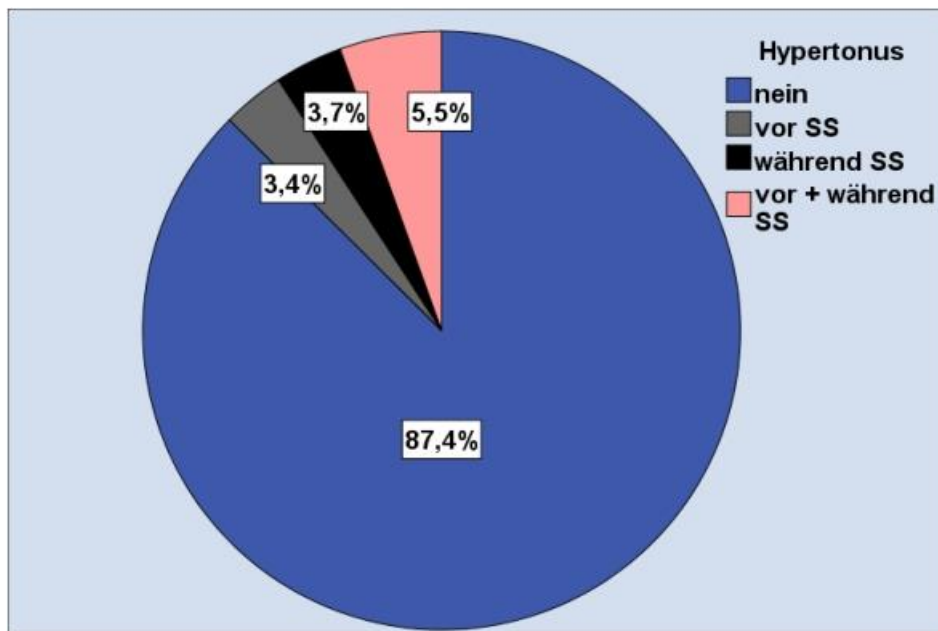


Abb.15 : Verteilung von arterieller Hypertonie vor und während der Schwangerschaft

Weiterführend betrachteten wir zusätzlich die bei 319 Frauen vorliegende erhobene Familienanamnese hinsichtlich einer familiären Disposition eines arteriellen Hypertonus (betroffen ist dabei mindestens ein Mitglied der Verwandtschaft ersten Grades).

Dabei wiesen 60,7% der Frauen (n=198) keine familiäre Disposition auf.

### Nikotinkonsum vor und während der Schwangerschaft

Von 326 Frauen gaben 217 (66,6%) an nie in der Schwangerschaft geraucht zu haben. In 16,3% (n=53) der Fälle wurde angegeben, dass sowohl vor, als auch während der Schwangerschaft Zigaretten konsumiert wurden. Dabei haben 17,2% der Frauen (n= 56) nach eigenen Angaben den Nikotinkonsum vor der Schwangerschaft beendet.

In den Angaben variierte die Anzahl der gerauchten Zigaretten während der Schwangerschaft von 0 bis zu maximal 20 Zigaretten pro Tag.

## Geburtsgewicht des Kindes

Das Geburtsgewicht der 326 untersuchten Kinder lag durchschnittlich bei 3463,5 g. Diese wurden im Mittel in der 39. Schwangerschaftswoche geboren.

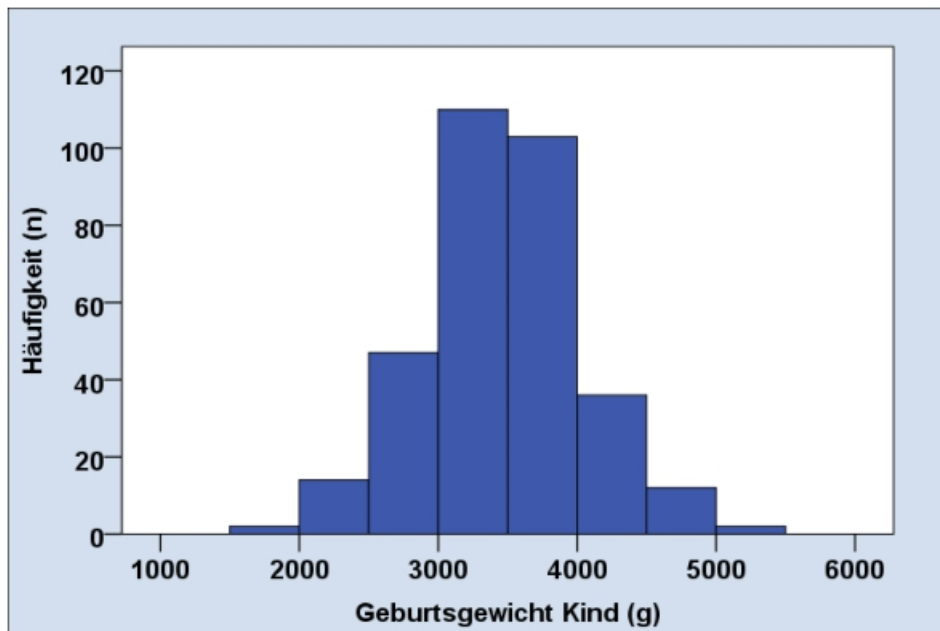


Abb. 16: Geburtsgewicht des Kindes

Die zum größten Teil reif (ab der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche) geborenen Kinder wiesen insgesamt zu 95,1% ein Geburtsgewicht von über 2500 g auf. Dabei kamen 91,1% der Kinder auf natürlichem Wege zur Welt nur 8,9% wurden per Kaiserschnitt entbunden. Der APGAR-Wert lag nach 5 Minuten im Mittel bei 9,35 und nach 10 Minuten bei 9,70.

Normalerweise wachsen die Kinder proportional zur Dauer der Schwangerschaft. Wenn die Kinder mit ihrem Geburtsgewicht jedoch unter der 10. Perzentile der Bevölkerungsbezogenen Wachstumskurve, beziehungsweise mindestens zwei Standardabweichungen unterhalb des Mittelwertes liegen, so werden sie als zu klein für ihr Reifungsalter (small for gestational age = SGA) bezeichnet (108).

In unserer Kohorte kamen 24 Kinder mit einem Geburtsgewicht von < 2500 g zur Welt. Davon wurden 8 Kinder vor der 34. Schwangerschaftswoche geboren. Wenn man den Maßstab des Unterschreitens der 10. Perzentile als Definition für ein SGA-Kind anwendet, so gab es in unserer Kohorte lediglich zwei Kinder, die diese Kriterien erfüllten. Beide Kinder kamen als reifgeborene Kinder in der 38. beziehungsweise 40. Schwangerschaftswoche zur Welt. Aufgrund der niedrigen Inzidenz in unserer Kohorte lassen sich keine statistischen Berechnungen für diese zwei Kinder durchführen. Aufgrund der geringen Anzahl ist hier jedoch auch kein Einfluss auf die Ergebnisse zu erwarten.

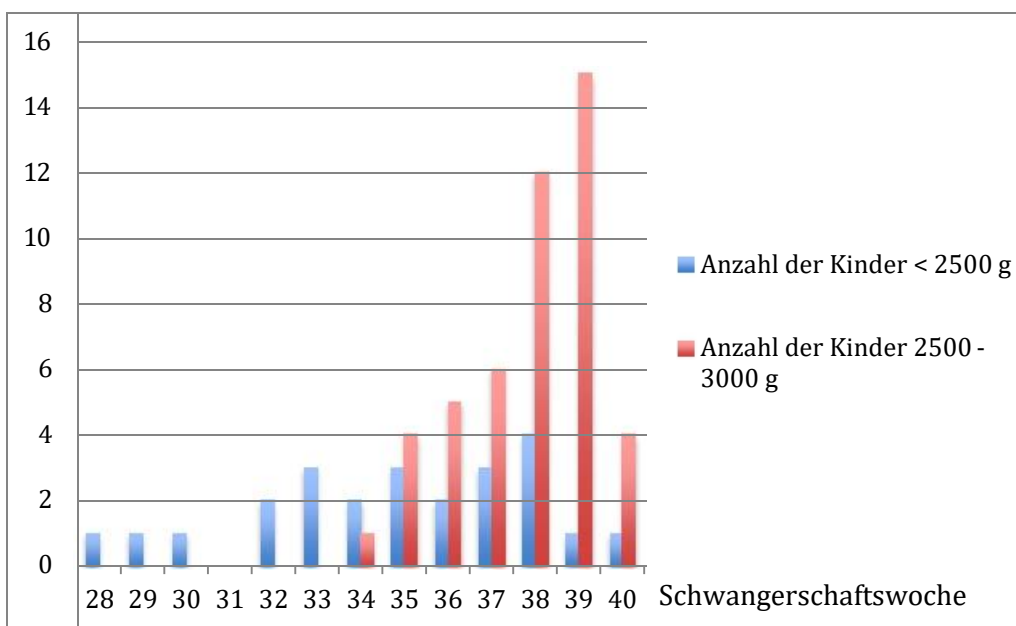


Abb.17: Verteilung der Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht auf die Schwangerschaftswochen  
(x-Achse: Schwangerschaftswoche, y-Achse: Anzahl der Kinder)

Die Abbildung 17 zeigt die Kohorte der Neugeborenen aufgeteilt in zwei Gruppen im Bezug zur Schwangerschaftswoche. Dabei wird die Anzahl der Kinder mit einem Geburtsgewicht von < 2500 g mit den Kindern mit einem Geburtsgewicht zwischen 2500 – 3000 g verglichen.

### 3.4. Explorative Statistik

#### 3.4.1. Körpergewicht der Mutter als Risikofaktor

Ziel unserer Untersuchungen war es herauszufinden, ob möglicherweise eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht der Mutter zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration besteht.

Wir teilten die Frauen hierfür ihrem BMI nach in Quartile ein, um die plazentare Angiotensinogenkonzentration zwischen diesen etwa gleich großen Gruppen zu vergleichen.

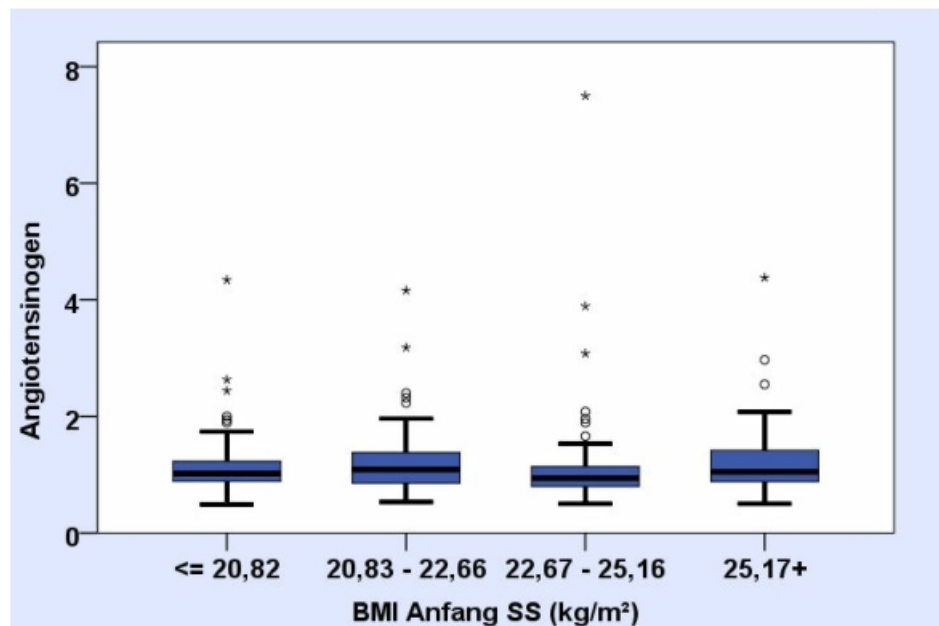


Abb. 18: Angiotensinogen bei Frauen mit unterschiedlichem BMI am Anfang der Schwangerschaft

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Gruppe A (n=80)	BMI $\leq 20,82$ kg/m <sup>2</sup>
Gruppe B (n=79)	BMI 20,83 – 22,66 kg/m <sup>2</sup>
Gruppe C (n=80)	BMI 22,67 – 25,16 kg/m <sup>2</sup>
Gruppe D (n=78)	BMI $> 25,17$ kg/m <sup>2</sup>

In dieser Analyse zeigte sich, dass die Verteilung der plazentaren Angiotensinogenkonzentration über die einzelnen Kategorien des BMI zu Beginn der Schwangerschaft im Kruskal-Wallis-Test signifikant unterschiedlich ist ( $p=0,042$ ).

Aufgrund dieses Ergebnisses korrelierten wir die einzelnen Gruppen gegeneinander. Hierbei ergab sich nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur, mit welchen die Signifikanzwerte für mehrere Tests angepasst wurden, lediglich ein Signifikanztrend ( $p=0,056$ ) zwischen der Gruppe C mit einem BMI zwischen 22,67 und 25,16 kg/m<sup>2</sup> und der Gruppe D mit einem BMI über 25,17 kg/m<sup>2</sup>.

Stichprobenvergleich	Teststatistik	Std. Fehler	Standard Teststatistik	Signifikanz	Angepasste Signifikanz
Gruppe C – A	24,756	14,490	1,708	0,088	0,525
Gruppe C – B	33,949	14,536	2,335	0,020	0,117
Gruppe C – D	-37,916	14,583	-2,600	0,009	<b>0,056</b>
Gruppe A – B	-9,193	14,536	-0,632	0,527	1,000
Gruppe A – D	-13,159	14,583	-0,902	0,367	1,000
Gruppe B – D	-3,967	14,629	-0,271	0,786	1,000

Tabelle 9: Statistik plazentare Angiotensinogenkonzentration und Körpergewicht der Mutter (BMI)

Tabelle 9 zeigt die Überprüfung der Nullhypothese der einzelnen Gruppen untereinander. Die Verteilungen zwischen der ersten genannten Gruppe und der zweiten Gruppe ist gleich. Hierbei werden die asymptotischen Signifikanzwerte angezeigt, wobei das Signifikanzniveau bei 0,05 liegt. Abschließend wurden die Signifikanzwerte durch die Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. Hierbei war die Teststatistik eine Zufallsvariable, die aus Stichprobendaten berechnet wird und in einem Hypothesentest verwendet wird. Der Standardfehler stellte ein Streuungsmaß für eine Schätzfunktion für einen unbekannt Parameter der Grundgesamtheit dar (80-82).

Wir konnten zeigen, dass die Verteilung von Angiotensinogen über die verschiedenen Kategorien des Körpergewichtes in der ersten Hälfte der Schwangerschaft identisch ist ( $p=0,920$ ). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Werte in der zweiten Schwangerschaftshälfte ( $p=0,733$ ).

Auch unsere Nullhypothese, dass die Angiotensinogenkonzentration über die Kategorien des Körpergewichtes in den drei Trimenen identisch ist, konnten wir beibehalten. Hierbei zeigte der Kruskal-Wallis-Test für das erste Trimenon einen p-Wert von 0,680. Für das zweite Trimenon betrug  $p=0,796$  und für das dritte Trimenon  $p=0,821$ .

Beispielhaft ist nachfolgend in Abbildung 26 das Körpergewicht der Mütter im dritten Trimenon im Box-Plot Diagramm aufgeführt.

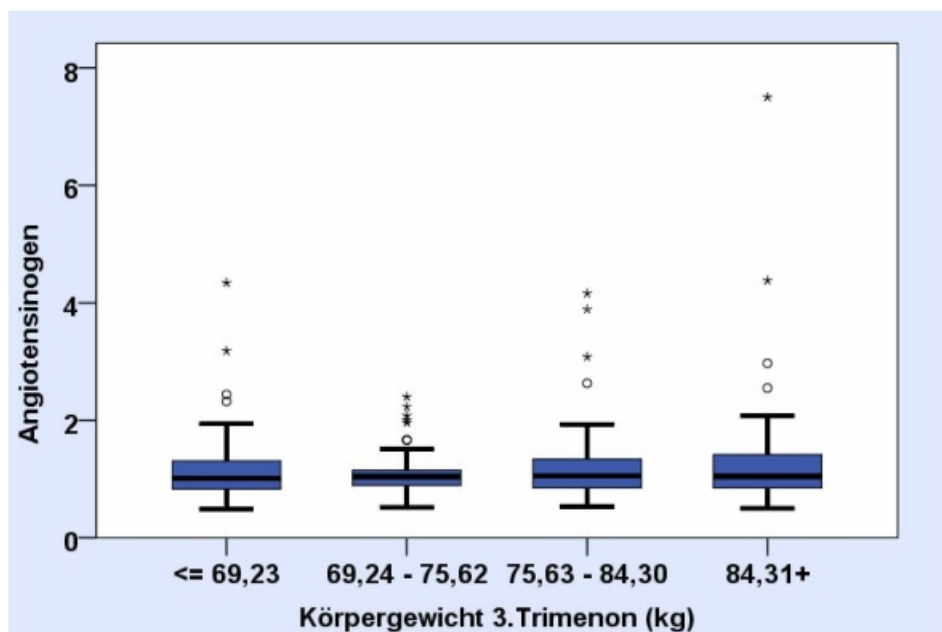


Abb. 19: Angiotensinogen bei unterschiedlichem Körpergewicht der Mutter; als Beispiel hier im dritten Trimenon.

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

Zusammenfassend ließ sich in keiner unserer Berechnungen ein Unterschied in der Angiotensinogenkonzentration bei den Körpergewichten in den unterschiedlichen Phasen der Schwangerschaft zeigen.

### 3.4.2. Arterieller Hypertonus als Risikofaktor

Es zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen mit 195 Frauen ohne familiäre Vorbelastung und 121 Frauen mit einer positiven Familienanamnese hinsichtlich einer arteriellen Hypertonie im Mann-Whitney-U-Test mit einem  $p=0,200$  kein signifikanter Unterschied.

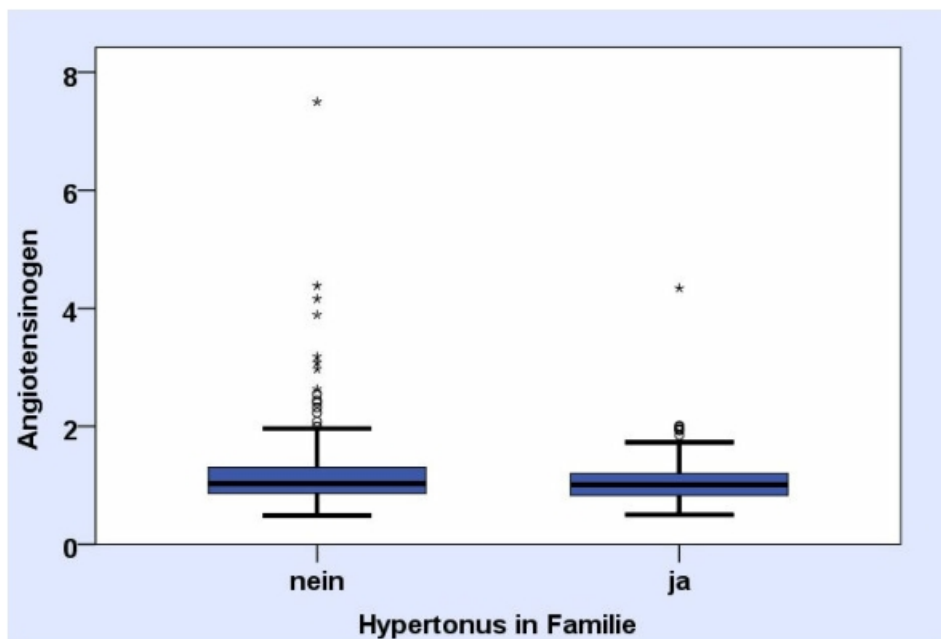


Abb. 20: Angiotensinogen bei Frauen ohne vs. mit arterieller Hypertonie in der Familienanamnese

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar



Es wurden Frauen mit einem arteriellen Hypertonus vor der Schwangerschaft (n=11), solche mit einem Gestationshypertonus (n=12) und Frauen mit einer Hypertonie vor und während der Schwangerschaft (n=18) mit gesunden Frauen (n=282) verglichen.

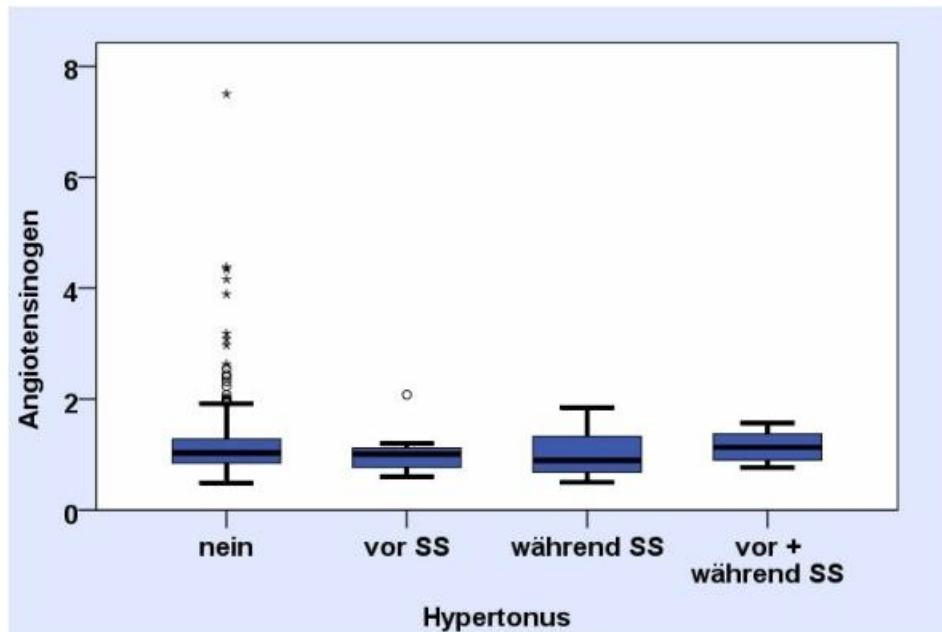


Abb. 21: Angiotensinogen bei Frauen mit unterschiedlichen Formen des Hypertonus

Angiotensinogen - angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Hierbei ließ sich mit einem  $p=0,433$  im Kruskal-Wallis-Test eine identische Verteilung der plazentaren Angiotensinogenkonzentration über die Kategorien des arteriellen Hypertonus nachweisen.

### 3.4.3. Mütterlicher Diabetes mellitus als Risikofaktor

Wir teilten unser Patientenkollektiv ein in Mütter, welche einen Gestationsdiabetes entwickelten (n=15), Frauen die bereits vor der Schwangerschaft an einem Diabetes mellitus erkrankten (n=2) und Frauen ohne Diabetes mellitus (n= 305).

Zwischen der Gruppe der Gestationsdiabetikerinnen und den Frauen ohne Diabetes mellitus zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test mit einem  $p=0,699$  keine Signifikanz.

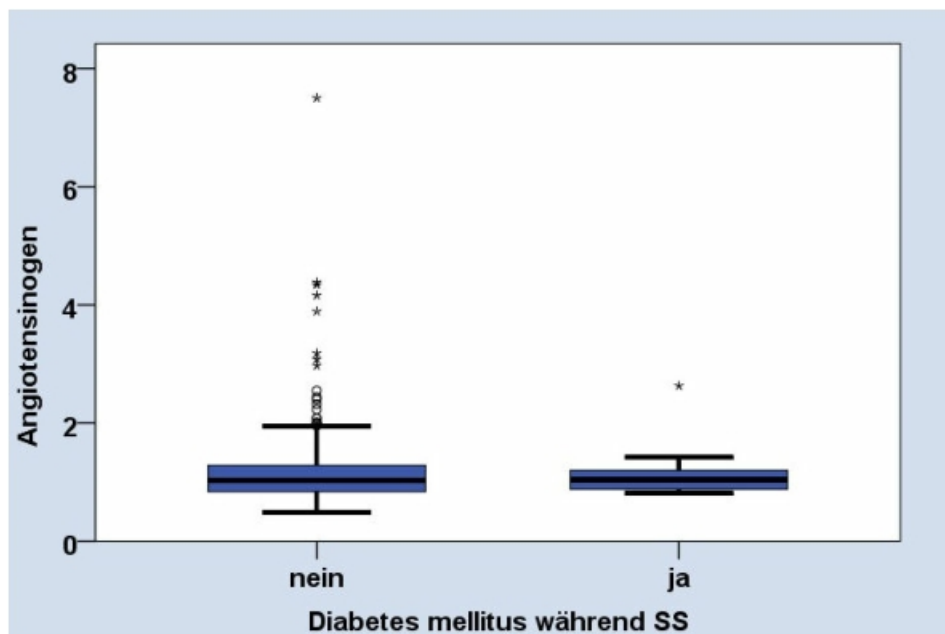


Abb. 22: Angiotensinogen bei Frauen ohne vs. mit Diabetes mellitus während der Schwangerschaft

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

In unserem Patientenkollektiv litten lediglich zwei Frauen bereits vor der Schwangerschaft an einem Diabetes mellitus, so dass die statistische Auswertung aufgrund der sehr kleinen Fallzahl nur eingeschränkt möglich ist. Die Berechnung wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und zeigte keine Signifikanz bei einer eingeschränkten Beurteilbarkeit angesichts der Verteilung der Gruppen.

### 3.4.4. Nikotinkonsum als Risikofaktor

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Nikotinkonsum vor und/oder während der Schwangerschaft, sowie dessen Quantität in Zusammenhang mit der plazentaren Angiotensinogenkonzentration gestellt werden könnte. Im Vergleich der plazentaren Angiotensinogenkonzentrationen von Raucherinnen (n = 108) und Nichtraucherinnen (n = 215) zeigte sich in unserer Analyse keine Signifikanz.

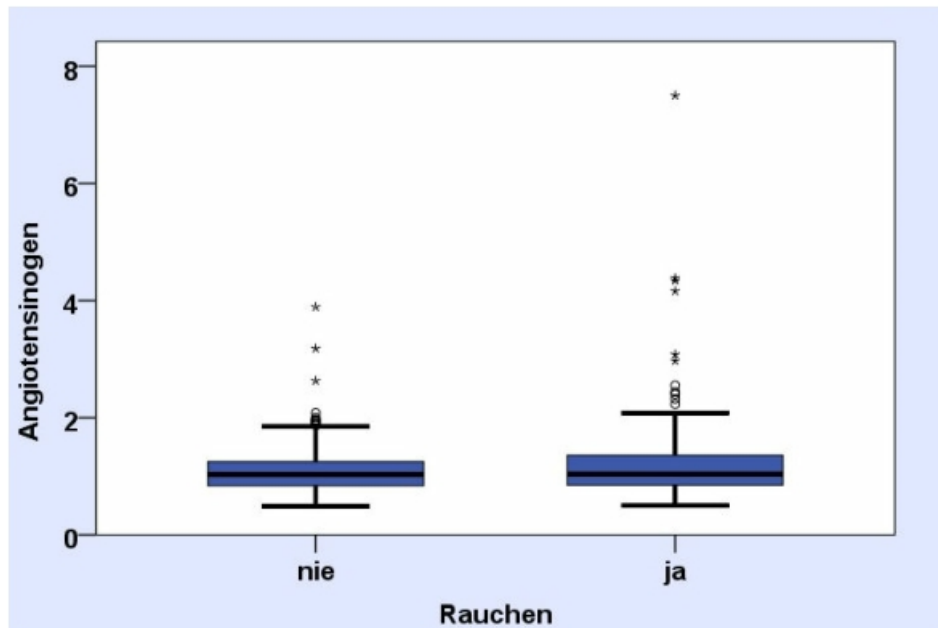


Abb.23: Vergleich von Angiotensinogen bei Nichtrauchern vs. Rauchern

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich mit einem  $p=0,473$  keine asymptotische Signifikanz bei einer zweiseitigen Testung.

In weiteren Berechnungen überprüften wir, ob sich Unterschiede in der plazentaren Angiotensinogenkonzentration zeigten, wenn das Rauchverhalten weiter aufgeschlüsselt wird. Hierbei wurde der Gruppe von Nichtrauchern einerseits die Gruppe des fortgesetzten Nikotinkonsums über die Schwangerschaft, und die Gruppe des vor der Schwangerschaft beendeten Nikotinkonsums gegenübergestellt. Doch auch in dieser Konstellation zeigte sich mit einem  $p=0,767$  keine Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben.

Unsere nächste These war die Überlegung, dass auch bei einer unterschiedlichen Anzahl von Packyears vor der Schwangerschaft die Konzentration des Angiotensinogens in der Plazenta nicht maßgeblich beeinflusst wird. Wir bildeten hierfür drei Gruppen von Frauen:

Nichtraucherinnen mit null Packyears (n=215), Frauen mit ein bis vier Packyears vor der Schwangerschaft (n=30) und Frauen mit fünf oder mehr Packyears vor der Schwangerschaft (n=74). Jedoch zeigte sich auch zwischen diesen Gruppen kein Unterschied hinsichtlich der Angiotensinogenkonzentration in der Plazenta.

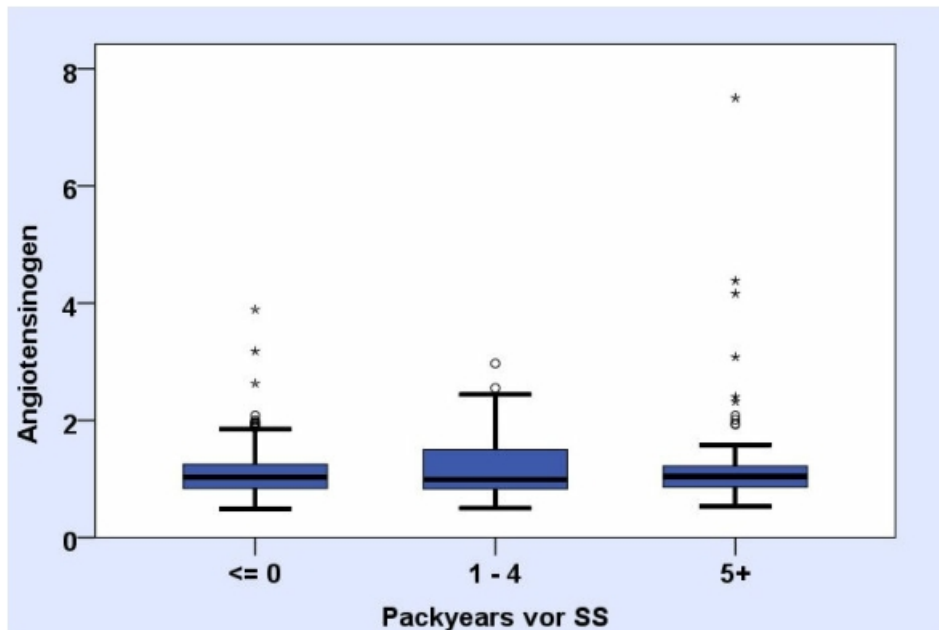


Abb. 24: Angiotensinogen bei unterschiedlichen Packyears vor der Schwangerschaft

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Im Kruskal-Wallis-Test konnte mit einem  $p=0,713$  diese These bestätigt werden, dass die plazentare Angiotensinogenkonzentration in den verschiedenen Kategorien von Packyears vor der Schwangerschaft identisch ist.

Nachdem die vor der Schwangerschaft gerauchten Zigaretten keinen Einfluss auf die Angiotensinogenkonzentration nehmen, untersuchten wir den Einfluss der während der Schwangerschaft gerauchten Zigaretten weiter.

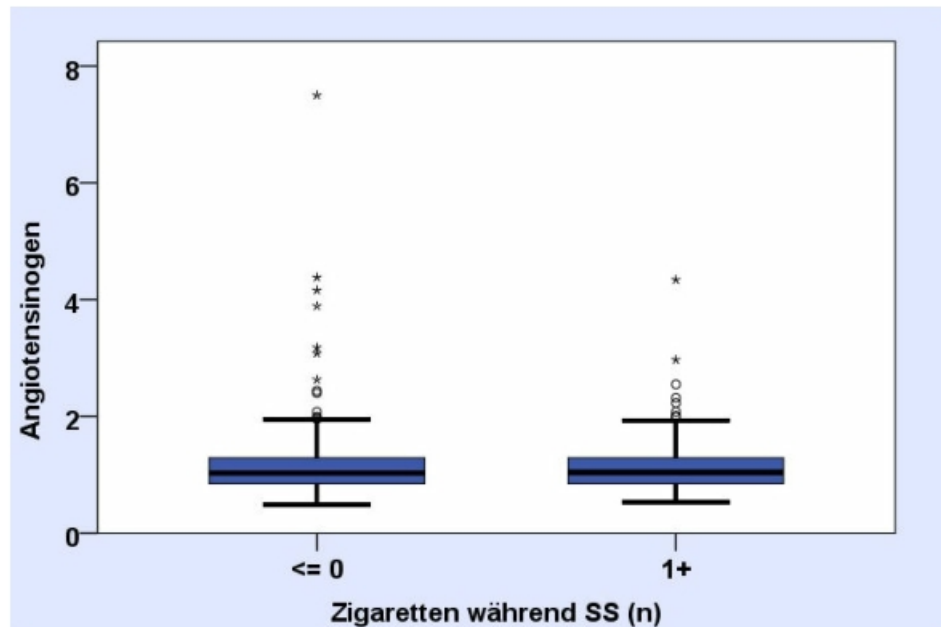


Abb. 25: Angiotensinogen bei unterschiedlicher Anzahl gerauchter Zigaretten während der Schwangerschaft

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Jedoch ließ sich auch hier bei einem  $p=0,793$  im Mann-Whitney-U-Test keine Signifikanz nachweisen.

Zusammenfassend zeigt die nachfolgende Tabelle die Mittelwerte, Mediane und Perzentilen für die Raucherinnen vor und während beziehungsweise vor der Schwangerschaft im Vergleich zu Nichtraucherinnen. Die Gruppe der Nichtraucherinnen ist mit zwei Drittel der Frauen hierbei am größten.

	Angiotensinogenkonzentration			
	Rauchen während der SS			
	Nie	vor und während	nur vor der SS	Gesamt
Mittelwert	1,11	1,24	1,37	1,17
SD	0,43	0,69	1,14	0,65
95% KI - untere G.	1,05	1,05	1,06	1,10
95% KI - obere G.	1,17	1,42	1,67	1,25
25. Perzentile	0,84	0,85	0,86	0,85
Median	1,03	1,04	1,03	1,03
75. Perzentile	1,26	1,29	1,45	1,27
Minimum	0,49	0,53	0,50	0,49
Maximum	3,89	4,34	7,50	7,50
Anzahl	217	53	56	326
Gültige Anzahl	215	53	55	323

Tabelle 10: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Rauchverhalten

### 3.4.5. Geburtsgewicht des Kindes

Das Geburtsgewicht der Kinder wurde in Quartile eingeteilt, welche aus etwa gleich großen Gruppen bestanden. Wir konnten zeigen, dass die Verteilung der plazentaren Angiotensinogenkonzentration über die Kategorien von den Gruppen der Geburtsgewichte der Kinder nicht identisch ist ( $p=0,004$ ).

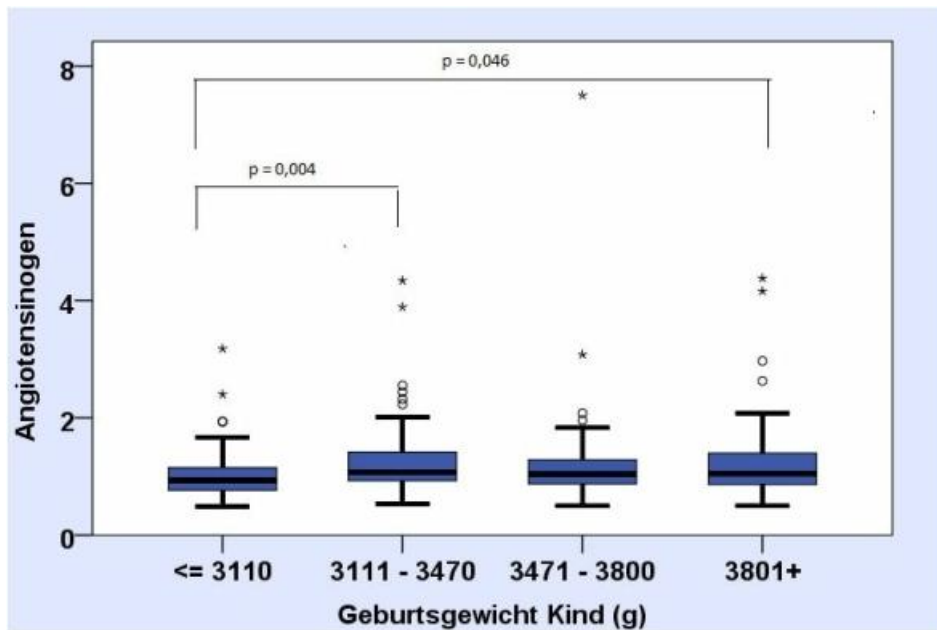


Abb. 26: Angiotensinogen bei unterschiedlichem Geburtsgewicht der Kinder  
Angiotensinogen - angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktinhalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

Gruppe A (n=76)	Geburtsgewicht $\leq 3110$ g
Gruppe B (n=84)	Geburtsgewicht 3111 – 3470 g
Gruppe C (n=80)	Geburtsgewicht 3471 – 3800 g
Gruppe D (n=83)	Geburtsgewicht $> 3801$ g

Im Vergleich zwischen den Kindern mit einem Geburtsgewicht von unter 3100 g (Gruppe A) und über 3801 g (Gruppe D) zeigte sich auch nach einer Korrektur ein signifikanter p-Wert von 0,046. Der Vergleich der Kinder mit einem Geburtsgewicht von unter 3100 g (Gruppe A) und einem Gewicht zwischen 3111 g und 3470 g (Gruppe B) wies ebenfalls auch nach der Bonferroni-Korrektur einen signifikanten p-Wert von 0,004 auf.

Stichprobenvergleich	Teststatistik	Std. Fehler	Standard Teststatistik	Signifikanz	Angepasste Signifikanz
Gruppe A – C	- 38,218	14,957	-2,555	0,011	0,064
Gruppe A – D	- 39,508	14,825	-2,665	0,008	<b>0,046</b>
Gruppe A – B	- 50,445	14,783	-3,412	0,001	<b>0,004</b>
Gruppe C – D	- 1,290	14,630	-0,088	0,930	1,000
Gruppe C – B	12,227	14,587	0,838	0,402	1,000
Gruppe D – B	10,937	14,452	0,757	0,449	1,000

Tabelle 11: Statistik Angiotensinogenkonzentration und Geburtsgewicht des Kindes

In der Tabelle 11 testete jede Zeile die Nullhypothese, dass die Verteilungen zwischen der ersten der beiden Gruppen und die zweite Gruppe gleich sind. Hierbei werden die asymptotischen Signifikanzwerte angezeigt, wobei das Signifikanzniveau bei 0,05 liegt. Abschließend wurden die Signifikanzwerte durch die Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst. Hierbei war die Teststatistik eine Zufallsvariable, die aus Stichprobendaten berechnet wird und in einem Hypothesentest verwendet wird. Der Standardfehler stellt ein Streuungsmaß für eine Schätzfunktion für einen unbekannt Parameter der Grundgesamtheit dar (80-82).

Die nachfolgende Tabelle weist die einzelnen Mittelwerte und Mediane der Gruppen der Geburtsgewichte im Detail auf. Hierbei weist die mit 76 Kindern kleinste Gruppe der Kinder unter 3110 g bei Geburt einen niedrigeren Mittelwert beziehungsweise Median auf, als die restlichen Gruppen.

	Angiotensinogenkonzentration				
	Geburtsgewicht Kind (g)				
	<= 3110	3111 - 3470	3471 - 3800	3801+	Gesamt
Mittelwert	1,01	1,26	1,20	1,22	1,17
SD	0,42	0,62	0,82	0,65	0,65
95% KI - untere G.	0,91	1,12	1,02	1,08	1,10
95% KI - obere G.	1,10	1,39	1,38	1,36	1,25
25. Perzentile	0,77	0,93	0,88	0,85	0,85
Median	0,94	1,07	1,04	1,05	1,03
75. Perzentile	1,15	1,42	1,29	1,40	1,27
Minimum	0,49	0,53	0,50	0,50	0,49
Maximum	3,18	4,34	7,50	4,38	7,50
Anzahl	77	85	81	83	326
Gültige Anzahl	76	84	80	83	323

Tabelle 12: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Geburtsgewicht der Kinder

Hierbei gab es lediglich zwei Kinder, welche als small for gestational age (SGA) definiert werden können, also unterhalb der 10. Perzentile liegen (108).



### 3.4.6. Ponderal-Index des Kindes

Der Ponderal-Index (PI) ist eine Maßzahl zur Beurteilung des Körpergewichtes in Relation zur Körpergröße. Im Unterschied zum BMI wird die Masse  $m$  in Kilogramm jedoch durch die dritte Potenz der Körpergröße  $l$  in Metern geteilt, also auf ein Volumen statt auf eine Fläche bezogen ( $PI = m/l^3$ ).

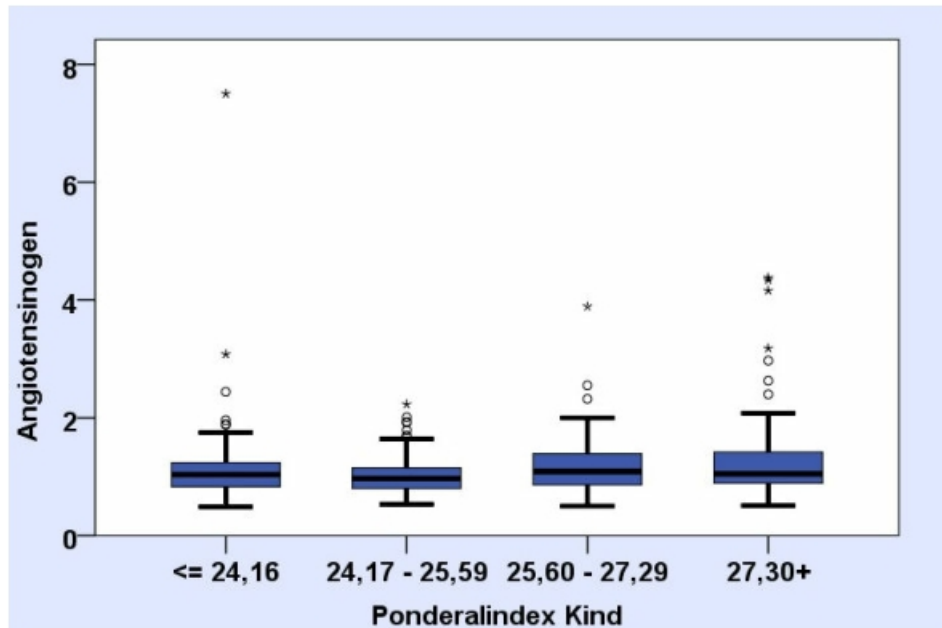


Abb. 27: Angiotensinogen bei unterschiedlichem Ponderal-Index der Kinder  
Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Für unsere Berechnungen teilten wir die 323 Kinder in etwa gleich große Quartile ein, und verglichen die plazentare Angiotensinogenkonzentration dieser Gruppen untereinander. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Angiotensinogenkonzentration zwischen den Gruppen.

Somit konnten wir zeigen, dass die Verteilung der Angiotensinogenkonzentration über die Kategorien der Ponderal-Indices der Kinder identisch ist ( $p=0,098$ ).

Um die Abbildung genauer zu erläutern führen wir die Werte numerisch für die einzelnen Quartile in der unten abgebildeten Tabelle auf.

	Angiotensinogenkonzentration				
	Ponderalindex Kind				
	<= 24,16	24,17 - 25,59	25,60 - 27,29	27,30+	Gesamt
Mittelwert	1,17	1,04	1,19	1,29	1,17
SD	,85	,35	,51	,77	,65
95% KI - untere G.	,98	,96	1,08	1,12	1,10
95% KI - obere G.	1,37	1,12	1,30	1,46	1,25
25. Perzentile	,83	,80	,85	,89	,85
Median	1,04	,97	1,09	1,05	1,03
75. Perzentile	1,24	1,15	1,40	1,42	1,27
Minimum	,49	,53	,50	,51	,49
Maximum	7,50	2,23	3,89	4,38	7,50
Anzahl	79	81	83	83	326
Gültige Anzahl	78	80	83	82	323

Tabelle 13: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichen Ponderal Indices der Kinder

### 3.4.7. Kopfumfang des Kindes

Zur Testung einer Korrelation zwischen der Angiotensinogenkonzentration und dem Kopfumfang des Kindes teilten wir die ausgewerteten Daten von 317 Kindern ebenfalls in Quartile ein wobei die Gruppe der Kinder mit einem Kopfumfang von 34 cm oder weniger die GröÙte darstellte. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Angiotensinogenkonzentration zwischen den 4 Gruppen (Beibehaltung der Nullhypothese).

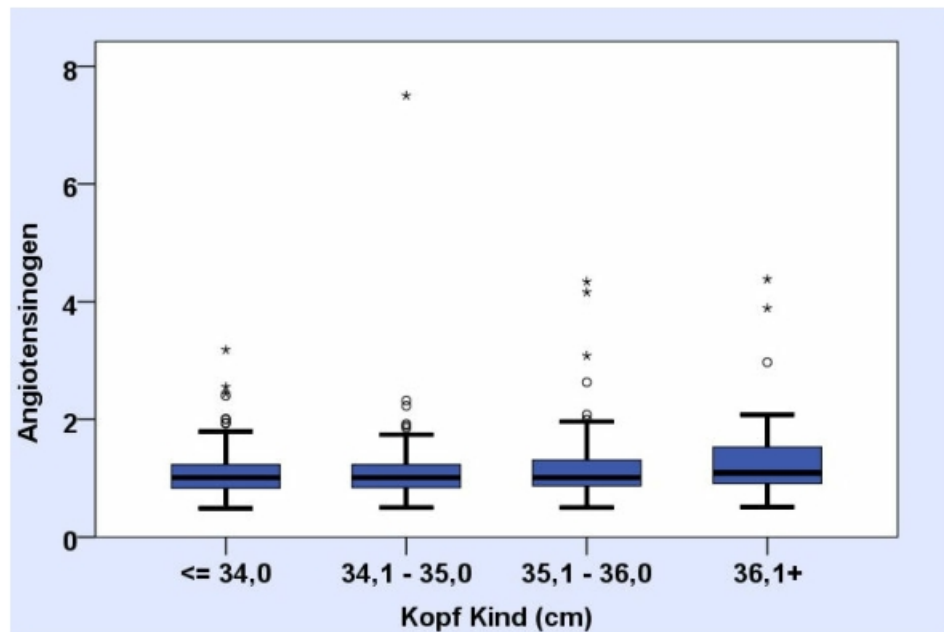


Abb. 28: Angiotensinogen bei Kindern mit unterschiedlichem Kopfumfang  
Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

Unsere Nullhypothese, dass die plazentare Angiotensinogenkonzentration in den verschiedenen Kategorien des Kopfumfanges der Kinder identisch ist, konnte somit mit einem  $p=0,145$  im Kruskal-Wallis-Test beibehalten werden.

### 3.4.8. Länge des Kindes

Die Länge des Kindes fließt unter anderem in den Ponderal Index ein, welcher jedoch keinen Einfluss auf die Angiotensinogenkonzentration in der Plazenta gezeigt hat. Um zu überprüfen, ob die Länge des Kindes mit der Angiotensinogenkonzentration in der Plazenta korreliert, teilten wir die 323 Kinder in Quartile ein, wobei die Gruppe der Kinder mit 50 cm Länge oder weniger die größte Gruppe darstellte. Jedoch zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

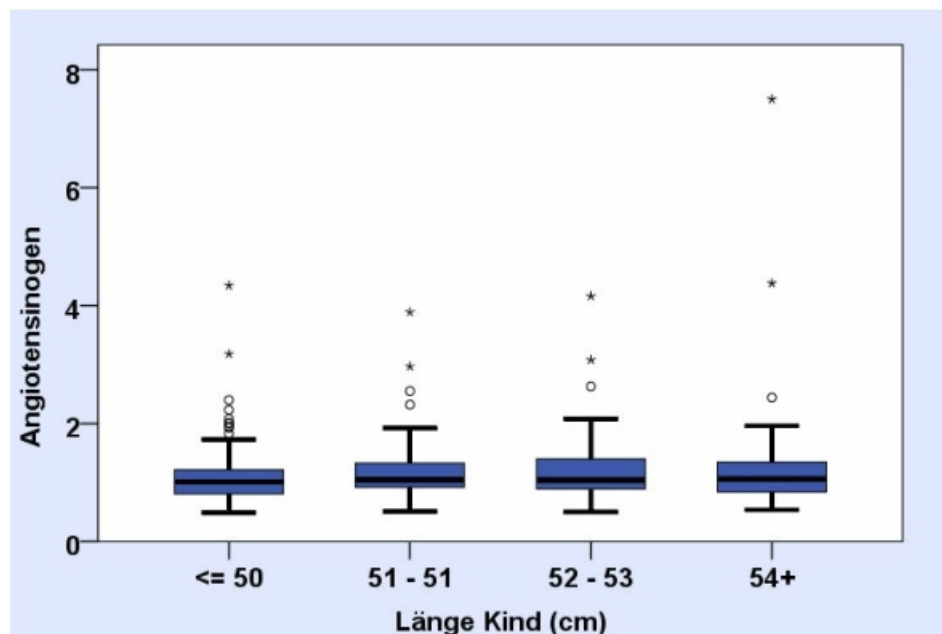


Abb. 29: Angiotensinogen bei Kindern mit unterschiedlichem Längenwachstum  
Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Somit zeigten unsere Ergebnisse, dass die plazentare Angiotensinogenkonzentration in den verschiedenen Kategorien der Körperlänge der Kinder mit einem  $p=0,216$  im Kruskal-Wallis-Test keinen Unterschied aufweist.

### 3.4.9. APGAR und Nabelarterien-pH des Kindes

Der APGAR-Wert nach 5 und 10 Minuten gibt einen Hinweis auf die kindliche Entwicklung bzw. die Anpassung des Kindes nach der Geburt. Für uns stellte sich somit die Frage, ob die versorgende Plazenta eines Kindes mit einem niedrigeren APGAR-Wert eine andere Angiotensinogenkonzentration hat, oder ob hierfür die Angiotensinogenkonzentration keine Rolle spielt.

#### APGAR-Wert nach 5 Minuten

In der nachfolgenden Abbildung zeigt sich die Verteilung der Kinder mit einem APGAR-Wert nach 5 Minuten von  $\leq 8$  in Bezug auf die Schwangerschaftswoche. Hierbei zeigte sich keine Häufung von niedrigen APGAR-Werten in den niedrigen Schwangerschaftswochen.

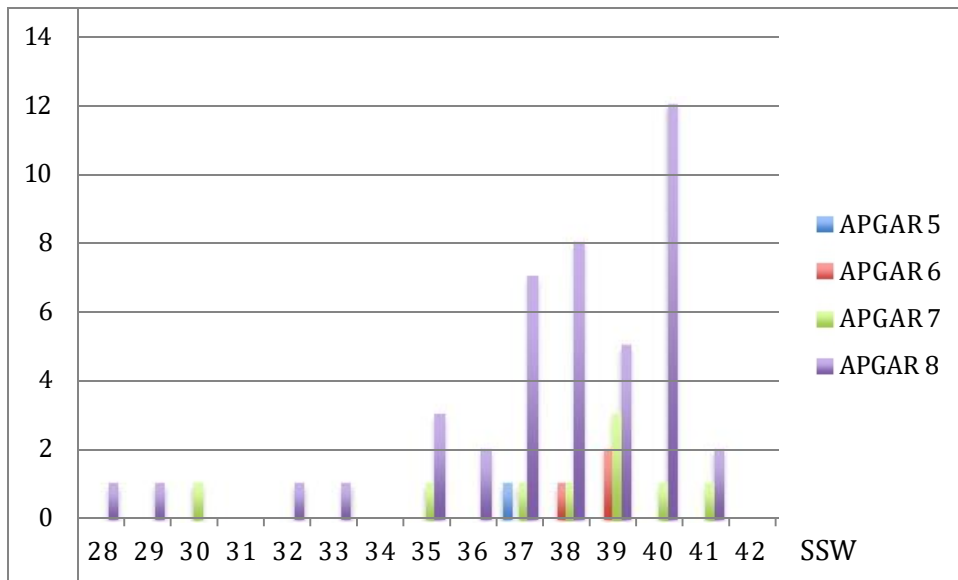


Abb.30: APGAR nach 5 min.  $\leq 8$  in Bezug zur Schwangerschaftswoche  
(x-Achse: Schwangerschaftswoche, y-Achse: Anzahl der Kinder)

Im direkten Vergleich der Kinder mit einem APGAR-Wert von  $\leq 9$  nach 5 Minuten mit den Kindern die einen APGAR-Wert von 10 hatten, ergab sich im Mann-Whitney-U-Test mit einem  $p=0,262$  keine Signifikanz.

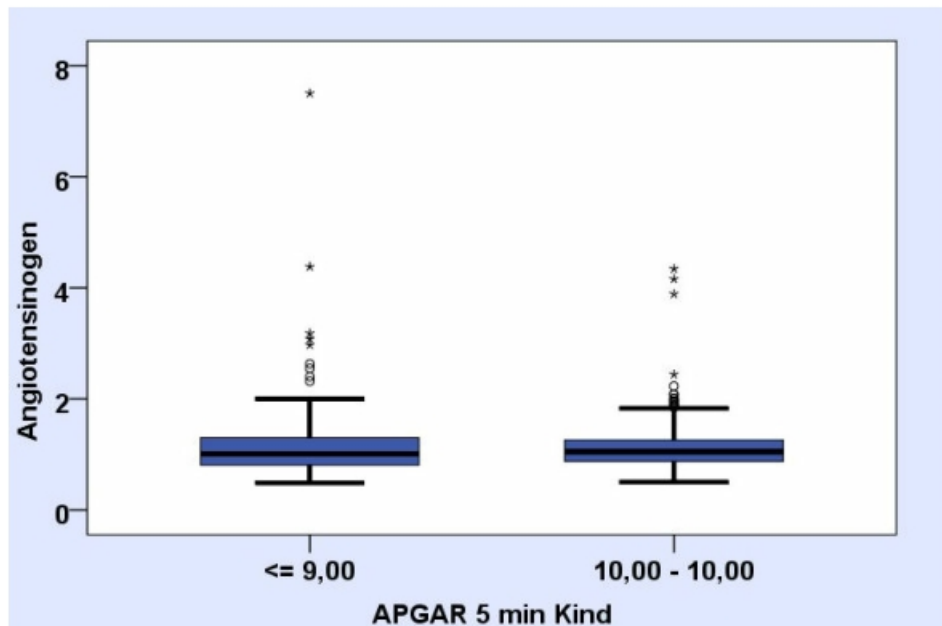


Abb. 31: Angiotensinogen bei Kindern mit unterschiedlichen APGAR-Werten nach 5 Minuten.

### APGAR-Wert nach 10 Minuten

Auch nach zehn Minuten konnte mit einem  $p=0,205$  im Mann-Whitney-U-Test ebenfalls keine Signifikanz erreicht werden.

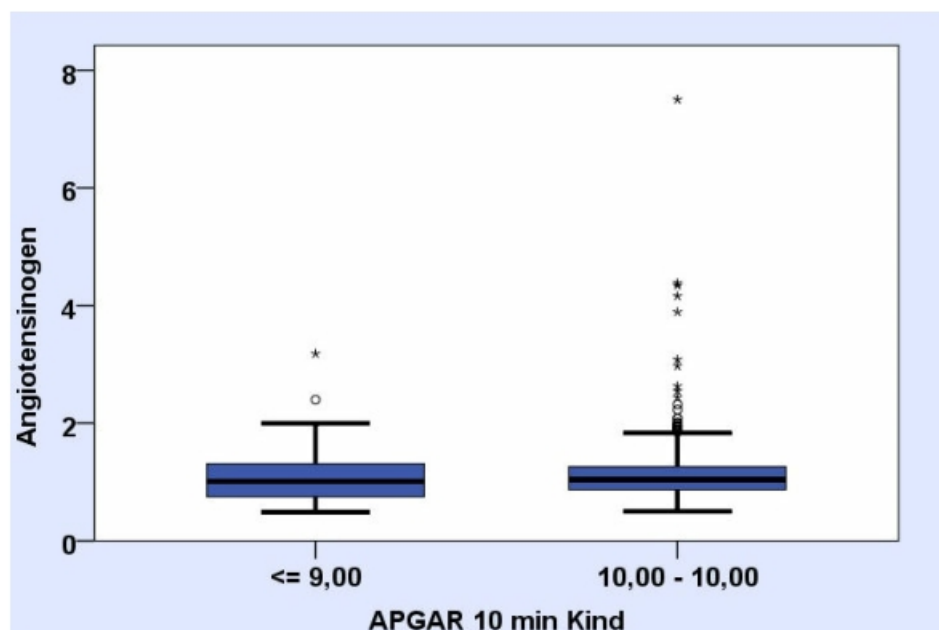


Abb. 32: Angiotensinogen bei Kindern mit unterschiedlichen APGAR-Werten nach 10 Minuten.

Angiotensinogen –jeweils angegeben als Konzentration- stellt eine zum Akttingehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar.

## Nabelarterien-pH-Wert

Als weiteren Parameter hinsichtlich des Zustandes des Kindes bei der Entbindung untersuchten wir weiterhin den Nabelarterien-pH-Wert. Jedoch blieb auch hier die Untersuchung in vier Quartilen ohne Signifikanz zwischen den Gruppen.

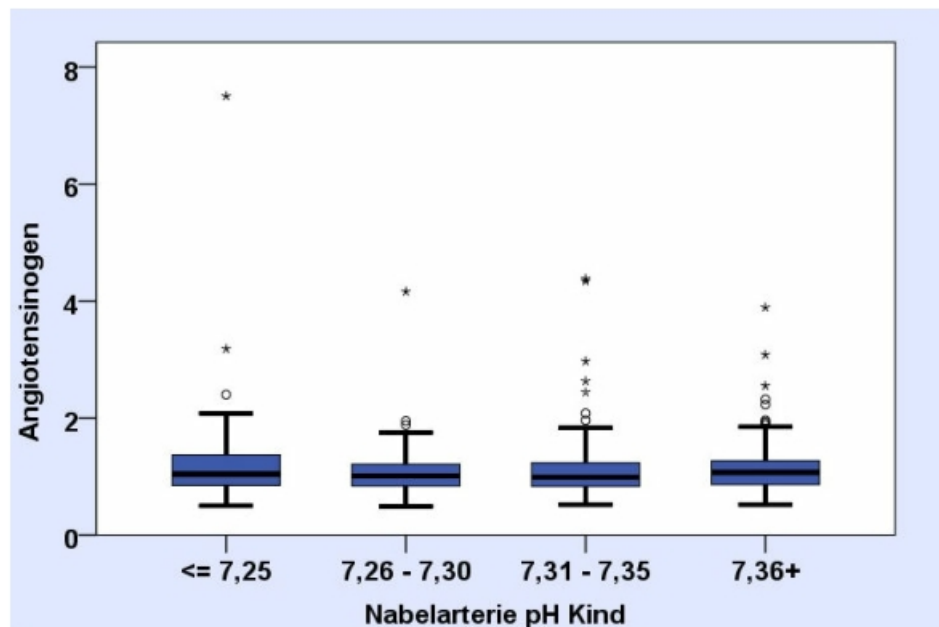


Abb. 33: Angiotensinogen in Bezug zum pH-Wert der Nabelarterie

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Unsere Nullhypothese, dass der Nabelarterien-pH-Wert der Kinder in den verschiedenen Kategorien gleich ist, konnten wir mit einem  $p=0,615$  im Kruskal-Wallis-Test beibehalten.

### 3.4.10. Weitere kindliche Parameter

Nachdem es bei den kindlichen Parametern Unterschiede hinsichtlich der plazentaren Angiotensinogenkonzentration in Korrelation mit dem Geburtsgewicht des Kindes gab, untersuchten wir weiterhin die plazentare Angiotensinogenkonzentration hinsichtlich eines geschlechterspezifischen Zusammenhanges. In unserer Kohorte wurden 168 Jungen und 157 Mädchen geboren, der Median lag bei beiden Geschlechtern bei 1,03.

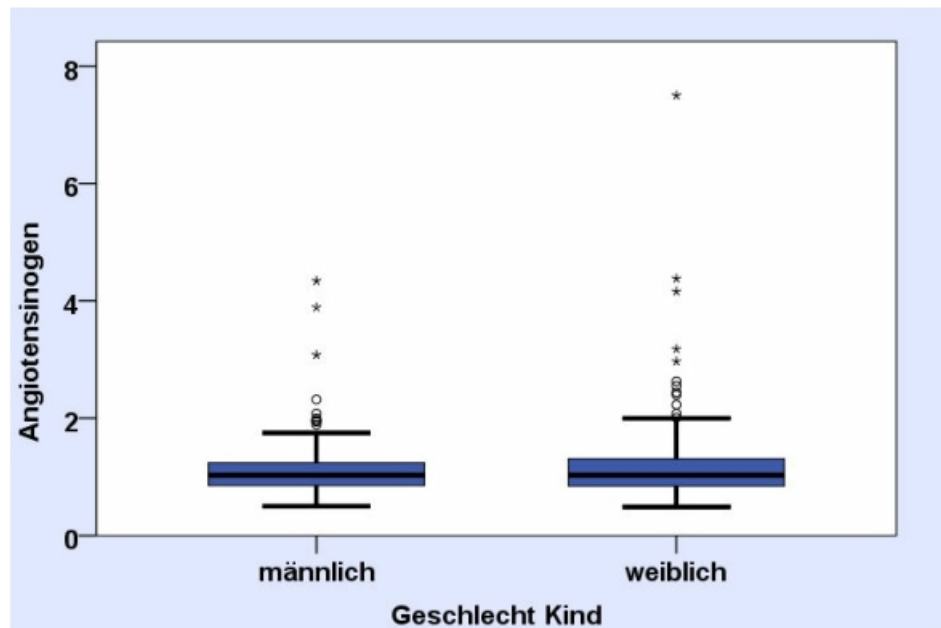


Abb. 34: Angiotensinogen bei männlichen vs. weiblichen Kindern

Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktgehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der plazentaren Angiotensinogenkonzentration zwischen den Geschlechtern ( $p=0,504$ ).



### 3.4.11. Plazentagewicht

Um das Plazentagewicht in ein Verhältnis mit dem darin enthaltenen Angiotensinogen zu setzen, teilten wir die vorliegenden Daten von 290 Plazenten in Quartile mit vier etwa gleich großen Gruppen ein. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gewichten der Plazenta und ihrer Angiotensinogenkonzentration.

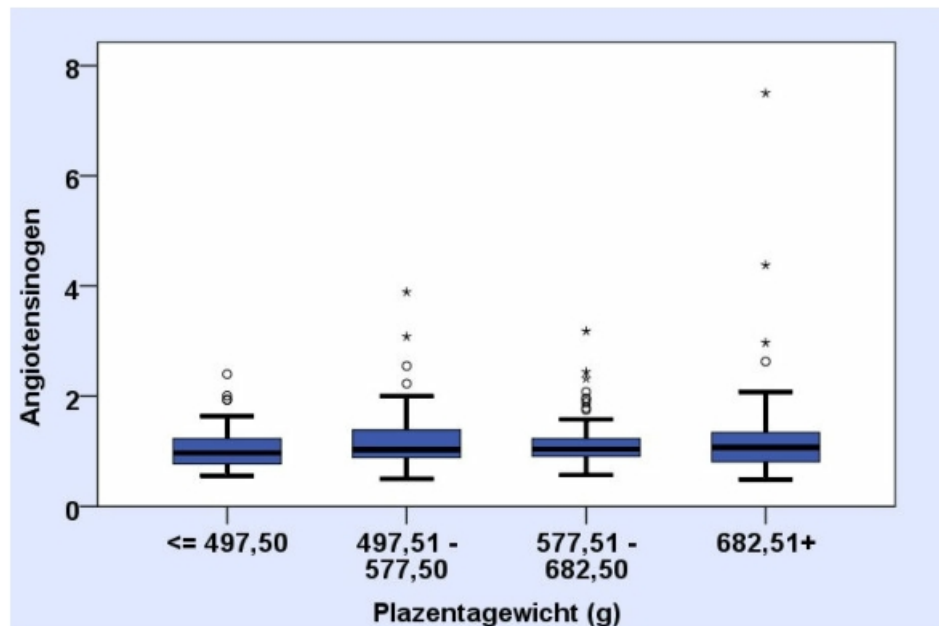


Abb. 35: Angiotensinogen bei unterschiedlichem Plazentagewicht  
Angiotensinogen -angegeben als Konzentration- stellt eine zum Aktingehalt der Probe relative Proteinkonzentration dar

Mit unseren Berechnungen konnten wir zeigen, dass in der Verteilung der Angiotensinogenkonzentration über die Kategorien des Plazentagewichtes bei einem  $p=0,220$  im Kruskal-Wallis-Test kein Unterschied angenommen werden kann das heißt die Nullhypothese konnte nicht verworfen werden.

Zur weiteren numerischen Erläuterung der Abbildung erfolgte die Aufschlüsselung der einzelnen Quartile in der unten angeführten Tabelle 14.

	Angiotensinogenkonzentration				
	Plazentagewicht (g)				
	<= 497,50	497,51 - 577,50	577,51 - 682,50	682,51+	Gesamt
Mittelwert	1,04	1,20	1,16	1,26	1,17
SD	,36	,56	,45	,95	,63
95% KI - untere G.	,95	1,07	1,06	1,03	1,09
95% KI - obere G.	1,13	1,33	1,27	1,48	1,24
25. Perzentile	,77	,89	,91	,81	,85
Median	,97	1,03	1,04	1,07	1,03
75. Perzentile	1,23	1,39	1,23	1,34	1,27
Minimum	,56	,50	,57	,49	,49
Maximum	2,40	3,89	3,18	7,50	7,50
Anzahl	69	76	74	74	293
Gültige Anzahl	68	76	73	73	290

Tabelle 14: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Plazentagewicht

## **4. Diskussion**

### **4.1. Mütterliche Risikofaktoren**

Verschiedene mütterliche Parameter stehen mit einer Einschränkung der fötalen Versorgung in Verbindung. Wir untersuchten einzelne Parameter der Mutter-Kind-Datenbank wie das mütterliche Rauchverhalten, sowie materne Erkrankungen (Hypertonus, Diabetes mellitus) und deren Korrelationen mit der plazentaren Angiotensinogenkonzentration. Untersucht werden sollte, ob diese Risikofaktoren zu signifikanten Änderungen der Angiotensinogenkonzentration führen.

#### **Körpergewicht der Mutter**

In der Literatur wurde unter anderem ein Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht der Mutter und dem Geburtsgewicht des Kindes beschrieben (63). Mehrere Autoren führten dabei eine Veränderung des Geburtsgewichtes auf eine veränderte mütterliche Ernährung zurück, wobei am häufigsten eine Mangelernährung mit einem niedrigen Geburtsgewicht in Zusammenhang gebracht wurde (65, 67, 68, 70). Wang et al. (63) beschrieben, dass Mütter, welche selbst ein niedriges Gewicht bei der Geburt hatten, häufiger Kinder mit einem niedrigeren Geburtsgewicht (in Bezug auf das Gestationsalter) bekommen haben (63).

In vielen Arbeiten wird nur das Körpergewicht vor und nach der Schwangerschaft als Parameter verwendet (63, 65, 66, 68, 69). Das Körpergewicht der Schwangeren nimmt naturgemäß über die Schwangerschaft zu. Hellerstedt et al. (65) beschrieben eine optimale Gewichtszunahme von 7 bis 11,5 kg für übergewichtige Frauen und 11,5 bis 16 kg für normalgewichtige Frauen in Bezug auf die Entwicklung des Kindes. Somit verglichen wir die plazentare Angiotensinogenkonzentration bezogen auf das unterschiedliche Körpergewicht (eingeteilt in Quartile mit interindividuellen Unterschieden) in den drei Trimenen der Schwangerschaft. Jedoch zeigte sich anhand unserer Daten, dass zwischen Veränderungen des mütterlichen Körpergewichtes in den verschiedenen Stadien der Schwangerschaft und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration bei der Geburt keine signifikante Korrelation besteht (Abb. 19).

In einigen Arbeiten wurde zwar eine Korrelation zwischen dem mütterlichen Gewicht und dem Körpergewicht des Kindes dargestellt (65, 66, 68, 69); nach unseren Daten muss jedoch angenommen werden, dass die plazentare Angiotensinogenkonzentration dabei nicht maßgeblich ist, sondern dass andere äußere Einflüsse, wie unter anderem die mütterliche Ernährung oder der Nikotinkonsum der Mutter eine führende Rolle spielen (65, 66, 68, 69).

Kramer et al. (70) führten die Entwicklungsverzögerung des Kindes bei untergewichtigen Müttern maßgeblich auf eine Mangelernährung der Mutter zurück. Vor allem in Entwicklungsländern spielt laut Kramer et al. der BMI der Mutter während der Schwangerschaft hierfür eine Rolle (70). Auch wenn Wang et al. (63) einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Körpergewicht der Mutter zu einem niedrigen Geburtsgewicht (in Bezug auf das Gestationsalter) des Kindes herstellten, so lässt sich dies nach unseren Daten nicht über eine Veränderung der Angiotensinogenkonzentration der Plazenta erklären. Im Vergleich der Mütter mit einem BMI zwischen 22,67 kg/m<sup>2</sup> und 25,16 kg/m<sup>2</sup> mit übergewichtigen Müttern mit einem BMI von mehr als 25,17 kg/m<sup>2</sup> (Abb. 18) zeigt sich nach der Korrektur der Ergebnisse lediglich ein Signifikanztrend.

Insgesamt besteht jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration im Vergleich der einzelnen Quartile untereinander. Weder im Hinblick auf das Ausgangsgewicht der Mutter vor der Schwangerschaft noch im Hinblick auf das mütterliche Gewicht in einzelnen Schwangerschaftsabschnitten.

### **Arterieller Hypertonus der Mutter**

Der arterielle Blutdruck wird über das RAAS maßgeblich gesteuert, dabei stellt Angiotensinogen einen limitierenden Faktor dar (41). Zudem ist die arterielle Hypertonie ein frühes klinisches Zeichen der Präeklampsie und wird unter anderem, wie das Vorliegen eines Diabetes mellitus, als bekannter Risikofaktor zur Ausbildung einer solchen gewertet (98). Vorangegangene Studien zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aktivität des renalen RAAS und der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie, sowie einer Proteinurie bei Müttern mit Präeklampsie (97, 106). So zeigten Yilmaz et al., dass das lokale RAAS der Niere an der Ausprägung von einem arteriellen Hypertonus und einer Präeklampsie beteiligt ist (97).

In der von uns untersuchten Kohorte befanden sich zwar keine Mütter, welche eine Präeklampsie entwickelten, jedoch hatten 12,6 % einen arteriellen Hypertonus vor und/oder während der Schwangerschaft. Dabei wurde in unserer Arbeit der arterielle Hypertonus als ein Blutdruck von > 140 mmHg systolisch, beziehungsweise > 90 mmHg diastolisch in mindestens zwei Messungen unter Ruhebedingungen gewertet. Ein Gestationshypertonus hingegen wurde erst diagnostiziert, wenn der Hypertonus nach der 20. Schwangerschaftswoche auftrat, und sich bis 12 Wochen post partum zurückbildete. Diese Werte sind bis heute in den Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie verankert (113).

Anhand unserer Daten untersuchten wir, ob ein Zusammenhang zwischen der mütterlichen arteriellen Hypertonie und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration (als Komponente des plazentaren RAAS) vorliegt. Dabei wurden die Frauen mit einem Hypertonus vor der Schwangerschaft, Frauen mit einem Gestationshypertonus und Frauen mit einer arteriellen Hypertonie vor und während der Schwangerschaft mit gesunden Frauen verglichen. Auch wenn die Gruppen der erkrankten Frauen jeweils klein waren, so ließ sich eine identische Verteilung der plazentaren Angiotensinogenkonzentration über die Kategorien des Hypertonus nachweisen (Abb. 21). Da eine ungleiche Verteilung der Gruppen mit wenigen Frauen mit einem Hypertonus im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vorliegt, ist das Ergebnis dennoch nur eingeschränkt aussagekräftig.

Weiterführend wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und einer familiären Disposition bezüglich einer arteriellen Hypertonie besteht. Dabei musste zur Einstufung einer familiären Disposition mindestens ein Mitglied der Verwandtschaft ersten Grades einen arteriellen Hypertonus aufweisen. Die statistische Auswertung zeigte auch hier keine Korrelation zwischen der familiären Disposition für eine arterielle Hypertonie und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration (Abb. 20).

Bis heute wird die Genese der Entstehung eines Schwangerschaftshypertonus unterschiedlich diskutiert (99). Es besteht Grund zur Annahme, dass Frauen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Schwangerschaftshypertonus Variationen in Bezug auf den kardiovaskulären, plazentaren sowie klinischen Phänotyp aufweisen (99).

In Untersuchungen durch McLaughlin et al. zeigte sich zum Beispiel, dass hämodynamische Prozesse (Blutdruck, Herzfrequenz, nicht invasive Bestimmung des Herzzeitvolumens der Mutter, Pulsatilität der uterinen Gefäße mittels gepulstem Doppler) sowie die Variation der zirkulierenden Proteine (z.B. Myeloperoxidase, Endothelin) zur Entstehung eines schwangerschaftsinduzierten Hypertonus beitragen (99). Eine Vielzahl von Faktoren müssen berücksichtigt werden. Hierbei sind physiologische Interaktionen, wie die Anpassung des Kreislaufs an die Gegebenheiten der Schwangerschaft, sowie die morphologische Veränderung der Plazenta als wichtiger Bestandteil des Mutter-Fötus-Komplexes und Entstehungsort verschiedener Erkrankungen, wichtige Mediatoren bei der Entwicklung eines Gestationshypertonus (99). Jedoch besteht anhand unserer Daten kein Hinweis dafür, dass das plazentare Angiotensinogen bei diesem System maßgeblich beteiligt ist.

## **Diabetes mellitus der Mutter**

Das Vorliegen eines Diabetes mellitus in der Schwangerschaft, sei es, dass die Mutter bereits vor der Schwangerschaft an Diabetes mellitus erkrankt ist, oder es sich um die Entwicklung eines Gestationsdiabetes handelt, ist immer noch eine Hochrisikokonstellation für Mutter und Kind. Auch in spezialisierten Zentren besteht beim Vorliegen eines Diabetes mellitus ein zwei bis fünffach erhöhtes Risiko eine Schwangerschaftskomplikation zu entwickeln im Vergleich zu Müttern ohne Diabetes mellitus (100-101). Der mütterliche Diabetes mellitus gilt als Risikofaktor für die Schwangerschaft selbst und hat beispielsweise Auswirkungen auf eine Steigerung des Geburtsgewicht des Kindes über eine erhöhte fötale Insulinsekretion als Antwort auf erhöhte mütterliche Glukosewerte im Blut (96). So wird teilweise neben dem Begriff der „Fötalen Programmierung“ auch der Begriff der „Fötalen Insulinhypothese“ verwendet, welcher besagt, dass genetische Varianten des Fötus zu einer verminderten Insulinsekretion oder einem veränderten Stoffwechsel des Kindes führen können (96).

Somit sind Kinder mit einem niedrigeren Geburtsgewicht in Bezug auf ihr Gestationsalter nach Freathy et al. (96) durch genetische Faktoren dafür prädestiniert, im Erwachsenenalter einen Diabetes mellitus zu entwickeln. Freathy et al. (96) bezogen sich in ihren Angaben auf Daten aus vier Studien mit Kindern ab der 36. Schwangerschaftswoche. In dieser Metaanalyse wurden die Daten auf Geschlecht und Gestationsalter adjustiert (96). Es besteht somit einerseits ein Zusammenhang zwischen einem maternen Diabetes mellitus und einem erhöhten Geburtsgewicht, andererseits scheint jedoch ein niedrigeres Geburtsgewicht über genetische Faktoren die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 im Erwachsenenalter zu begünstigen.

Bedeutend für uns war es eventuelle Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen eines mütterlichen Diabetes mellitus und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration zu überprüfen. Weiterführend haben wir ebenfalls die Zusammenhänge der Angiotensinogenkonzentration in Bezug auf das Geburtsgewicht untersucht (siehe Kapitel 3.4.5. und 4.2.). Wir untersuchten differenziert die Gruppe der Frauen, welche bereits vor der Schwangerschaft einen Diabetes mellitus entwickelt hatten und Mütter, welche an einem Gestationsdiabetes erkrankten. Da in unserer untersuchten Kohorte lediglich zwei Mütter bereits vor der Schwangerschaft einen Diabetes mellitus hatten, ist die statistische Aussagekraft hier sehr kritisch zu betrachten. Einen Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und dieser Gruppe konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Einen Gestationsdiabetes hingegen entwickelten in unserer Kohorte 15 Frauen. Aber auch in dieser Gruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang bezüglich der plazentaren Angiotensinogenkonzentration nachgewiesen werden (Abb. 22).

Es finden sich bis dato keine Literaturangaben zur plazentaren Angiotensinogenkonzentration bei Diabetikerinnen. Beschrieben ist zwar, dass ein Diabetes mellitus in der Schwangerschaft beispielsweise Auswirkungen auf eine Steigerung des Geburtsgewicht des Kindes über eine erhöhte fötale Insulinsekretion als Antwort auf erhöhte mütterliche Glukosewerte im Blut hat (96). Nach unseren Ergebnissen scheint dieser Mechanismus jedoch nicht über das Protein Angiotensinogen in der Plazenta reguliert zu werden. Diese Beobachtungen unsererseits sind jedoch durch die geringe Anzahl an Diabetikerinnen in unserer Kohorte nur eingeschränkt aussagekräftig und sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### **Nikotinkonsum der Mutter**

Die genauen Gründe, weshalb Neugeborene mit niedrigem Körpergewicht innerhalb des Normgewichtes bezogen auf das Gestationsalter geboren werden, sind heute immer noch weitestgehend unbekannt. Außer genetischen Faktoren spielen Umwelteinflüsse, wie unter anderem die Lebensgewohnheiten der Mutter eine wichtige Rolle (63).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Nikotinkonsum unter der Schwangerschaft das Risiko erhöht, ein untergewichtiges Kind zu gebären (64-69). Rauchen während der Schwangerschaft ist ein wichtiger modifizierbarer Faktor, der das Risiko der intrauterinen Wachstumsrestriktion beeinflusst (70-71). Doch nicht alle Mütter, die in der Schwangerschaft rauchen, bekommen Neugeborene mit geringem Geburtsgewicht. Der Grund für diese Variabilität ist noch nicht genau bekannt (72). Der Nikotinkonsum der Mutter vor sowie während der Schwangerschaft scheint nach unseren Daten das plazentare Angiotensinogen nicht quantitativ zu verändern (Abb. 23-25).

Den Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und dem Nikotinabusus der Mutter zu erklären ist dadurch erschwert, dass noch nicht ausreichende Daten über die Auswirkungen von Nikotin auf das RAAS oder Angiotensinogen vorliegen. Jedoch ist bekannt, dass ungünstige intrauterine Konditionen den Fötus in Entwicklung und Wachstum schädigen können. Diese frühen Entwicklungsschäden des Kindes können auch im späteren Leben noch Gesundheit und Verhalten beeinträchtigen (76). Gerade die mütterliche Exposition zu Nikotin (dabei ist sowohl der aktive Nikotinabusus der Mutter, als auch das passive Inhalieren von Rauch relevant) ist während der Schwangerschaft für das ungeborene Kind sehr gefährlich (76). Nikotin gelangt von der Mutter über die Plazenta zum Fötus und

kann ihn stark schädigen da die fötale Nikotinkonzentration um 15% höher liegen kann als die mütterliche. In jedem Trimenon können die Auswirkungen des Nikotins auf den Fötus erheblich sein; von der erhöhten Abortenrate im ersten Trimenon über Frühgeburtslichkeit bis hin zum erniedrigten Geburtsgewicht im letzten Trimenon (77). Das Geburtsgewicht wird maßgeblich durch zwei Faktoren beeinflusst. Hierbei handelt es sich zum einen um das Gestationsalter bei der Geburt und zum anderen um den Grad des fötalen Wachstums. Nikotin nimmt Einfluss auf beide Faktoren (77).

Studien zeigten, dass Kinder, deren Mütter in der Schwangerschaft rauchen, nicht nur ein höheres Risiko haben mit reduziertem Gewicht geboren zu werden, auch ist die Entwicklung dieser Kinder eingeschränkt (76, 114): sie haben ein erhöhtes Risiko im späteren Leben krank zu werden und sind häufig psychologisch (im Sinne eines erhöhten Aggressionspotentials) auffällig (76). Zudem liegen sie intellektuell hinter gleichaltrigen Kindern, deren Mütter nicht geraucht haben (76, 114).

Knopik et al. (76) nehmen an, dass epigenetische Signalübertragungswege, die wichtig für die fötale Entwicklung und das Wachstum sind, durch Nikotin beeinträchtigt werden (76). Diese Hypothese resultiert aus der Verbindung zwischen maternem Konsum in der Schwangerschaft und der daraus resultierenden DNA-Methylierung mit Veränderungen der microRNA Expression (76). Doch ist noch nicht näher bekannt, inwieweit die epigenetischen Veränderungen die Gesundheit und das Verhalten des Kindes im Erwachsenenalter beeinflussen können (76).

Im Tierversuch aber auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Nikotin den mütterlichen Blutdruck und die Herzfrequenz steigern kann, während es gleichzeitig die Blutzufuhr zum Uterus reduziert (76, 77, 114). Störungen der placentaren Blutzufuhr auf der mütterlichen Seite können ihre Funktion und Morphologie verändern und nehmen damit Einfluss auf das intrauterine Milieu, und so auch auf die fötale Programmierung (24).

Jansson et al. beschrieben, dass eine intrauterine Wachstumsretardierung durch erhöhte vaskuläre Widerstände in der Plazenta und eine erhöhte fötale Herzarbeit bedingt sein kann (24). Sie stellten so einen möglichen Zusammenhang zwischen der veränderten placentaren Struktur und der fötalen Programmierung für kardiovaskuläre Erkrankungen her (24). Bleibt die Gewichtszunahme der Plazenta aufgrund der nikotinbedingten reduzierten Blutzufuhr zum Uterus aus kann ihre Funktion und Struktur nicht vollständig ausgebildet werden (24). Dieses wirkt sich möglicherweise auf die Expression von Proteinen in der Plazenta aus (24).

In unserer Kohorte konnte jedoch kein Hinweis dafür gefunden werden, dass die placentare Angiotensinogenkonzentration durch das Rauchverhalten beeinflusst wird (Tab. 11).



Somit spielt bei den oben genannten Mechanismen entweder eine Beeinflussung anderer Proteine eine Rolle, oder es handelt sich um andere Regelkreisläufe wie die Vasokonstriktion oder arteriosklerotische Veränderungen unter Nikotinkonsum (24). Solche Faktoren sind weiterhin in der Pathophysiologie mit einer Erhöhung des Blutdrucks vergesellschaftet (24). In der neueren Literatur schrieben Laule et al. (95) nach Induktion einer Präeklampsie durch Unterbindung der Blutzufuhr zur Plazenta bei Ratten über eine Veränderung der Blutdruckwerte nach Nikotinzufuhr (95). Die Konstitution der Nachkommen dieser Ratten wurde hierdurch jedoch nicht beeinflusst (95). Diese Ergebnisse widersprechen somit der These, dass es zu einer Verminderung des Plazenta- oder Kindsgewichtes über den Weg der Vasokonstriktion durch Nikotinkonsum kommt. Es wird Gegenstand weiterer Arbeiten sein, die genauen Mechanismen der Wirkung von Nikotin auf die Entwicklung eines Ungeborenen und die Entwicklung der Plazenta zu erarbeiten.

## **4.2. Kindliche Faktoren**

### **Geburtsgewicht als Surrogatparameter der fötalen Programmierung**

Aus traditioneller Sicht werden der adulte Lebensstil und die genetische Grundlage als bekannte Hauptursachen für das Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen und einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln verantwortlich gemacht (3). Epidemiologische Daten deuten darauf hin, dass negative Einflüsse in frühen kindlichen Entwicklungsstadien und speziell während der fötalen Entwicklungsphase das Risiko, im späteren Leben genau diese Erkrankungen zu entwickeln steigert (4). Dieses Konzept wird als fötale Programmierung bezeichnet. Die Hypothese der fötalen Programmierung besagt, dass der Fötus während der Schwangerschaft (besonders ab der neunten Schwangerschaftswoche, also der Fötalperiode) funktionelle und strukturelle Veränderungen durchläuft, welche im späteren Leben die Ausprägung der Erkrankungen des metabolischen Syndroms begünstigen können (6).

Die Zeitfenster für diese Veränderungen sind unterschiedlich für die einzelnen Gewebe und ziehen sich über die gesamte Fötalperiode abhängig von der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr (6). Faktoren, die das Risiko erhöhen, sind beispielsweise mütterliche Unterernährung während der Schwangerschaft oder eine plazentare Insuffizienz (5-7).

Die Hypothese, dass ein geringes intrauterines Wachstum und ein geringes Geburtsgewicht (in Bezug auf das Gestationsalter) in Zusammenhang mit der Entwicklung von koronarer Herzerkrankung und Diabetes mellitus Typ 2 im Erwachsenenalter stehen, wurde als erstes von Barker et al. aufgestellt und basiert auf einigen in Großbritannien geführten epidemiologischen Studien (5, 8, 9). Interessant dabei war ein geographischer Zusammenhang (in Wales) zwischen einer Säuglingssterblichkeit in den Jahren 1921-1925 und einer erhöhten Anzahl an Menschen, die zwischen 1968-1978 an koronarer Herzkrankheit verstarben. Dabei war der genaue Grund der Säuglingssterblichkeit retrospektiv aufgrund fehlender Dokumentation nicht immer eindeutig eruierbar (9). Barker et. al. (10) überprüften den Zusammenhang zwischen dem geringem intrauterinem Wachstum, worauf sie die Säuglingssterblichkeit zurückführten, und der Entstehung koronarer Herzerkrankung genauer. Dabei fanden sie in von Hebammen erstellten Aufzeichnungen über die Geburtsmaße von 5654 männlichen Säuglingen, welche Anfang des letzten Jahrhunderts geboren wurden. Man machte diese Männer ca. 60 Jahre später ausfindig und verglich deren Geburtsgewicht mit dem Auftreten von koronarer Herzkrankheit im Erwachsenenalter (10). Es zeigte sich, dass die Männer mit einem niedrigen Geburtsgewicht (in Bezug auf das Gestationsalter) von etwa im Mittel 2,5 kg ein doppelt so hohes Risiko aufwiesen an einer KHK zu erkranken als Gleichaltrige welche ein Geburtsgewicht von im Mittel 4,3 kg hatten (10).

In der größten Studie dieser Art, der US-amerikanischen „Nurses Health Study“ wurden über 60.000 Probanden bezüglich Geburtsgewicht und dem Auftreten koronarer Herzkrankheit untersucht. Auch diese retrospektive Analyse zeigte Hinweise für den Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und dem späteren Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen (11).

Es ist bekannt, dass das Geburtsgewicht des Kindes durch viele Faktoren beeinflusst wird. (65-73). Um diese Korrelation besser verstehen zu können war es von Bedeutung nachzuvollziehen, welche Faktoren zu einem geringeren intrauterinen Wachstum und somit zu geringerem Geburtsgewicht führen können.

Ziel unserer Analysen war es herauszufinden, ob die Angiotensinogenkonzentration in der Plazenta mit dem Geburtsgewicht des Kindes korreliert. Anhand unserer Analyse zeigten wir im Vergleich der einzelnen Quartile untereinander im Hinblick auf das Geburtsgewicht und die plazentare Angiotensinogenkonzentration folgende Unterschiede: bei höherem Geburtsgewicht lag eine höhere plazentare Angiotensinogenkonzentration vor, als bei Quartilen mit einem geringeren Geburtsgewicht (Abb. 26). Allerdings zeigten sich dabei ausgeprägte interindividuelle Unterschiede, so dass Aussagen zu Einzelwerten nicht möglich sind. Wir können zudem nicht aussagen, ob diese Unterschiede zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko im Erwachsenenalter führen da die Kinder aus unserer Kohorte weder nachverfolgt wurden noch sich bisher im Erwachsenenalter befinden.

Weitere Daten konnten aus einer retrospektiven Analyse von Dokumentationen, die während des Zweiten Weltkrieges in den Niederlanden gemacht wurden, erhoben werden (11-12). Der Westen der Niederlande unterlag einer Hungersnot die zeitlich sehr genau festgehalten werden konnte. Es handelt es sich dabei um den Zeitraum zwischen Ende November 1944 bis Anfang Mai 1945. Die offizielle Kalorienzufuhr der Menschen lag zu der Zeit zwischen 400 und 800 Kalorien pro Tag. Untersucht wurden hierbei Neugeborene aus einer Schwangerschaft während dieser Kalorienrestriktion. Dabei zeigte sich, dass diese Kinder bei Geburt ein niedrigeres Körpergewicht und im Erwachsenenalter die Tendenz zur verminderten Glukosetoleranz aufwiesen (11-12). Dieser Zusammenhang konnte in weiteren Studien von Yajnik et al. (13) bestätigt werden. Sie zeigten, dass bei einer Kohorte von vierjährigen Kindern ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und gestörter Glukosetoleranz bestand (13). Law und Shiell beschrieben 1996 die Korrelation zwischen Geburtsgewicht und der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie im Erwachsenenalter (14). Ein niedriges Geburtsgewicht könnte somit nicht nur ein direkter Marker für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung sein, sondern auch bekannte Risikofaktoren zur Entwicklung

kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigen. Wie kommt es nun zu dem Zusammenhang zwischen einem niedrigem Geburtsgewicht und einem erhöhtem Risiko für eine koronare Herzkrankheit? Widdowson et al. (15) beschrieben anhand von Untersuchungen an Ratten die Existenz mehrerer „kritischer Zeitfenster“, die lediglich für einen gewissen Zeitraum geöffnet sind und vom Rattenjungen während der Entwicklung durchlaufen werden (15).

Lucas et al. (16) beschrieben anhand von Daten am Menschen, dass sich besonders in der Zeit, in der der Fötus ein solches „kritisches Zeitfenster“ durchläuft, Organe und Gewebe an die intrauterinen Gegebenheiten gut anpassen können (16). Ereignisse, die während dieser Phase auftreten, können nach Ansicht von Lucas et al. (16) zu irreversiblen morphologischen und funktionellen Veränderungen an den fötalen Organen führen (16). Dieser Vorgang wird als „Programmierung“ bezeichnet, welcher sich von der Phase der Organogenese hinsichtlich des Zeitfensters unterscheidet. Dadurch, dass bei intrauterinem Nahrungs- oder Sauerstoffmangel die Zellteilung langsamer abläuft, verbessert der Fötus in Mangelsituationen seine Überlebenschancen (16-17). Somit werden nach Lucas et al. (16) Regelsysteme dauerhaft bis in das Erwachsenenalter auf andere Sollwerte eingestellt. Diese „Sollwertverstellungen“, die im fötalen und postnatalen Leben die Überlebenschancen verbessern, können im fortgeschrittenen Leben ein Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung darstellen; insbesondere dann, wenn die auf Mangel programmierten Organe später einem Nahrungsüberschuss ausgesetzt sind (16-17).

Der bekannteste Surrogatparameter der fötalen Programmierung ist das Geburtsgewicht in Bezug auf das Gestationsalter, sodass durch uns mögliche Zusammenhänge zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und dem Geburtsgewicht in Bezug auf das Gestationsalter untersucht wurden (Abb. 11, 12, 17).

Die Bestimmung der plazentaren Angiotensinogenkonzentration erfolgte ausschließlich zum Zeitpunkt der Geburt und stellt somit eine Momentaufnahme dar. Dies muss jedoch kritisch betrachtet werden, da die intrauterine Entwicklung und das fötale Wachstum dynamische Prozesse sind und die plazentare Angiotensinogenkonzentration (nachgewiesen im Tierversuch) im Verlauf der Schwangerschaft schwankt (88). Da eine Bestimmung der Angiotensinogenkonzentration der Plazenta longitudinal über die Schwangerschaft hinweg aus methodischen sowie ethischen Gründen nicht möglich ist, wurde nicht nur der Zusammenhang zu dem absoluten Geburtsgewicht, sondern auch in Bezug auf das Gestationsalter hin untersucht (Abb. 17).

In unserer Kohorte gab es lediglich zwei Kinder, welche per Definition (108) als „small for gestational age“ bezeichnet werden können. Hierbei handelte es sich um Kinder, die in der 38.

und 40. Schwangerschaftswoche geboren wurden und somit in unsere Berechnungen einfließen, jedoch aufgrund der niedrigen Zahl die Ergebnisse nicht beeinflussen.

Die vorliegenden Auswertungen zeigten in unserer Kohorte ab der 34. Schwangerschaftswoche einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und der plazentaren Angiotensinogenkonzentration (Abb. 26, Tab. 11). In dieser weist das erste Quartil eine niedrigere Angiotensinogenkonzentration auf als die übrigen Quartile. Da das Geburtsgewicht jedoch vielen Einflüssen unterliegt, ist eine isolierte Betrachtung dieser Korrelation natürlich kritisch zu bewerten. Angiotensinogen ist lediglich Bestandteil des komplexen RAAS, welches vielen unterschiedlichen Komponenten und Pathomechanismen unterliegt.

Gheorghe et al. (23) testeten im Mausmodell die Hypothese, dass proteinarme Nahrung während der Gestation in Veränderungen des systemischen, fötalen RAAS resultierten. Sie erkannten, dass bei einer Proteinrestriktion um 50% des Ausgangswertes, besonders während der zweiten Gestationshälfte, das fötale Gewicht signifikant sank und dass die hepatozelluläre Angiotensinogenexpression im Fötus signifikant reduziert war (23). Sie beschrieben auch die ernährungsbedingten Veränderungen anderer Bestandteile des RAAS, wie beispielsweise die Reduktion des Renin-mRNA- und Proteinspiegels und zogen die Schlussfolgerung, dass ein Proteinmangel in der Gestation Veränderungen im systemischen RAAS des Fötus verursachen könnte und eventuell zur Entwicklung eines arteriellen Hypertonus in der erwachsenen Maus beiträgt (23).

Ähnliche Ergebnisse wurden im Bezug auf das renale RAAS durch Woods et al. (73) bei Ratten beschrieben. Sie zeigten, dass die Suppression des intrarenalen RAAS der neugeborenen Ratte zu einer geringeren Anzahl an ausgebildeten Glomeruli führt; was wiederum mit der Ausprägung erhöhten arteriellen Blutdrucks in erwachsenen Ratten zusammenhing. Dabei wurden die Auswirkungen der Suppression des fötalen intrarenalen RAAS in Abhängigkeit zur mütterlichen Nahrungsaufnahme im Sinne der proteinarmen Ernährung, besonders im Zeitfenster der neonatalen Nephrogenese gestellt (73).

Weiterhin fiel auf, dass die intrarenale Renin mRNA- sowie die Reninkonzentration als auch der intrarenale AT-II-Spiegel bei Nachkommen von Ratten mit Proteinrestriktion im Zeitfenster der Nephrogenese supprimiert war, und somit eine gestörte Entwicklung der Nephronen vorlag (73).

Diesbezüglich zeigten unterschiedliche Studien bei Tieren (Mäusen, Ratten) und Menschen eine Beeinflussung einzelner RAAS durch die mütterliche Nahrungsaufnahme; wobei besonders eine Proteinrestriktion in der zweiten Gestationshälfte das Geburtsgewicht negativ

beeinflusste (73). Hier ist zu differenzieren, dass es sich bei den erwähnten Daten um lokale, sowie systemische, als auch um Untersuchungen des mütterlichen sowie des fötalen RAAS handelt. In unseren Untersuchungen wurden keine Daten hinsichtlich der Ernährung der Mütter in der Schwangerschaft erhoben. Wenn man jedoch postuliert, dass eine proteinarme Ernährung der Mutter sich über die Angiotensinogenkonzentration in der Plazenta auf das Geburtsgewicht des Kindes auswirken könnte, wäre es Gegenstand weiterer Studien, dies genauer zu betrachten. Denn wenn eine nahrungsbedingte Verminderung der hepatozellulären Angiotensinogenkonzentration zu verzeichnen ist, könnten eventuell die gleichen Mechanismen auch das plazentare Gewebe beeinflussen, und ebenfalls eine Verminderung der Angiotensinogenkonzentration in der Plazenta, mit den daraus resultierenden Beeinflussungen des Fötus bewirken.

Möglich wäre somit eine Auswirkung der mütterlichen Proteinrestriktion über das RAAS, und als Bestandteil dessen Angiotensinogen, auf die unter anderem davon abhängige Nephrogenese (Nachweis von Woods et al. im Rattenmodell (73)). Wenn dieses Tiermodell auf den Menschen übertragen werden könnte, bestünde möglicherweise ein indirekter Einfluss des RAAS auf das Risiko des Kindes im Erwachsenenalter ein metabolisches Syndrom zu entwickeln.

Eventuell könnte daraus vermutet werden, dass eine Proteinrestriktion in der mütterlichen Ernährung sich auf das Neugeborenenengewicht, darüber hinaus aber auch auf das fötale RAAS und dessen Bestandteile, sowie Angiotensinogen auswirkt. Dieses könnte dann wiederum das Risiko der Entwicklung eines arteriellen Hypertonus im Erwachsenenalter, und so ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen nach sich ziehen (46).

Gheorghe et al. (23) fanden zudem im Mausmodell heraus, dass die mütterliche Proteinrestriktion eine Hochregulation der Gene verursacht, die für die negative Regulation des Zellwachstums und den Metabolismus in der Plazenta zuständig sind. Sie erkannten, dass die Proteinrestriktion in unterschiedlichen Geweben und unterschiedlichem Alter ähnliche Gen-Gruppen beeinflussen, die alle verantwortlich für ein vermindertes Zellwachstum und einen reduzierten Metabolismus sind (23). Die vaskuläre, metabolische und endokrine Anpassung des Fötus an eine Unterernährung der Mutter könnte die Funktion und Struktur der fötalen Organe programmieren, und somit Grundlagen liefern für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und eines insulinunabhängigen Diabetes mellitus (6).

Zusätzlich zu dem Risiko der Unterernährung wurde von Siffert das 825T-Allel des „Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-3 (GNB3)“ Gens beschrieben, welches die  $\beta 3$  Untereinheit des heterotrimerischen G-Proteins kodiert. Der molekulare Phänotyp dieses

Allels wird charakterisiert durch eine erhöhte Transduktion über G-Proteine durch die Generation einer Varianten, genannt G $\beta$ 3s. Dieses Allel geht häufig einher mit der Entstehung einer hypertensiven Herzerkrankung, Adipositas sowie mit dem erhöhtem Risiko eines Diabetikers, ein terminales Nierenversagen zu entwickeln (18).

Hochoer et al. fanden zusätzlich heraus, dass ein Zusammenhang zwischen dem mütterlichen 825T-Allel der G-Protein beta-3-Untereinheit und erniedrigtem Geburtsgewicht bei Kindern besteht, obwohl diese sonst keine Risikofaktoren für intrauterine Wachstumsverzögerung aufwiesen. Somit kann vermutet werden, dass das 825T-Allel alleine bereits ein Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt (19).

Diese Ergebnisse wurden 2002 von Masuda et al. (20) an japanischen Frauen bestätigt. Es gelang, den Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und einem verringerten Kopfumfang bei Neugeborenen nachzuweisen (20). Hochoer et al. (19) erkannten, dass Kinder deren Mütter Trägerinnen mindestens einer  $\beta$ 3-Untereinheit des 825T-Allels sind, selbst eine erhöhte Inzidenz des 825T-Allels aufweisen. Jedoch wurde nachgewiesen, dass das Allel für den Träger selber kein Risikofaktor darstellt; es führt dennoch zu einem Risiko für den Fötus, sofern die Mutter Trägerin des Allels ist (19, 21).

Wang et al. (22) zeigten in einer Fall-Kontroll-Studie, dass zudem auch die mütterlichen Polymorphismen zweier Enzyme der hepatischen Biotransformation (CYP1A1 und GSTT1) Einfluss auf das Geburtsgewicht des Kindes nehmen konnten (22).

Somit können sowohl exogene Faktoren, wie auch der Genpool der Mutter die fötale Entwicklung steuern und beeinflussen, was als „advanced fetal programming hypothesis“ bezeichnet wird (21).

Vor dem Hintergrund, dass ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für die Ausprägung kardiovaskulärer Risikofaktoren und einer koronaren Herzerkrankung einhergeht und nach unseren Daten ein niedriges Geburtsgewicht mit einer verringerten Angiotensinogenkonzentration einhergeht, könnte möglicherweise die plazentare Angiotensinogenkonzentration einen Prädiktor für dieses erhöhte kardiovaskuläre Risiko bereits in der Neonatalphase sein. Eine frühzeitige Identifizierung dieser Menschen wird wahrscheinlich nicht durch eine einzelne Messung des plazentaren Angiotensinogens erfolgen können. Ob eine Kombination mit weiteren Markern, seien sie plazentar oder aus sonstigen Parametern eine individuelle Charakterisierung eines kardiovaskulären Risikos im späteren Leben erlaubt muss Gegenstand weiterer prospektiver Untersuchungen sein.

### **Weitere kindliche Parameter**

Das Alter des Fötus wird in der Fetalperiode durch die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) oder die Scheitel-Fersen-Länge (SFL) ausgedrückt (90). Voigt et al. (93) untersuchten anhand von Perinataldaten von über zwei Millionen Neugeborenen welche zwischen 1995 bis 2000 in Deutschland geboren wurden Perzentilwerte für das Geburtsgewicht, die Länge, den Kopfumfang und das längenbezogene Geburtsgewicht für Mädchen und Jungen. Im Vergleich zu Voruntersuchungen konnten bereits Daten ab der 20. vollendeten Schwangerschaftswoche angegeben werden. Die Berechnung durch Voigt et al. erfolgte mithilfe des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung unter Voraussetzung der Annahme einer Normalverteilung der einzelnen Körpermaße (93). Hierbei beziehen sich diese Daten ausschließlich auf Einlinge. Die Körperlänge wird nach der Geburt, wie auch in dieser Arbeit als die Scheitel-Fersen-Länge angegeben.

Suzue et al. (102) untersuchten in einer kleinen Kohorte die unterschiedlichen Angiotensinogenkonzentrationen im Urin von früh- und reifgeborenen Kindern und fanden hier eine deutlich höhere Angiotensinogen/Kreatinin-Ratio in Frühgeborenen. Sie sahen einen zunehmenden Abfall der Angiotensinogen/Kreatinin-Ratio bei Kindern mit zunehmendem Gestationsalter; dabei zeigte die Angiotensinogenkonzentration im Plasma jedoch keine Korrelation mit dem Gestationsalter (102).

In unseren Untersuchungen besteht keine Korrelation zwischen der plazentaren Angiotensinogenkonzentration und den unterschiedlichen Längen der Kinder oder deren Kopfumfängen (Abb. 27, 28, 29); ein signifikanter Zusammenhang ergab sich lediglich in Bezug auf das Körpergewicht, allerdings bei ausgeprägter Streuung in den Quartilen.

In Anbetracht der von Suzue et al. (102) publizierten Ergebnisse könnten die Unterschiede in der Angiotensinogenkonzentration tatsächlich ausschließlich durch das unterschiedliche Körpergewicht der Kinder entstehen, wenn man postuliert, dass Frühgeborene in der Regel leichter sind als reifgeborene Kinder. Zudem in unserer Analyse Kinder ab der 34. Schwangerschaftswoche berücksichtigt wurden und somit auch frühgeborene Kinder mit einbezogen wurden. Jedoch ist zu beachten, dass möglicherweise Unterschiede in der Angiotensinogenkonzentration im Urin und der plazentaren Konzentration besteht und dass eine direkte Verbindung somit nicht hergestellt werden kann.



### **4.3. Die Rolle der Plazenta in der fötalen Programmierung**

In der Schwangerschaft sind Mutter und Fötus nur über die Plazenta miteinander verbunden. Sie dient als endokrines Organ dem Mutter-Plazenta-Fötus Komplex zur Aufrechterhaltung der immunologischen Barriere (23). Des Weiteren reguliert sie den Transfer von Wasser, Elektrolyten, Nährstoffen, ist zuständig für den Gasaustausch und produziert eine Reihe von Hormonen und Zytokinen (24). Aufgrund ihrer entscheidenden Rolle in der fötalen Entwicklung ist die Vorstellung naheliegend, sie könne auch Einfluss auf die fötale Programmierung nehmen (23). Dabei ist die Aufrechterhaltung der intrauterinen Blutversorgung besonders wichtig (23).

Die Plazenta ist der Austauschort von Substanzen zwischen mütterlichem und fötalem Blutkreislauf, welcher erst am Ende des ersten Trimenon vollständig etabliert ist. Es zeigte sich im Tiermodell, dass beispielsweise die Gabe von Kortikosteroiden, Zytokinen oder die experimentelle Reduktion der intrauterinen Blutversorgung den Fötus schädigen (27-29). Somit kann sie der Entstehungsort vieler Schwangerschaftskomplikationen sein. Störungen der placentaren Blutzufuhr auf der mütterlichen Seite können ihre Funktion und Struktur verändern, nehmen Einfluss auf das intrauterine Milieu und so auch auf die fötale Programmierung (24). Bleibt der normale Anstieg der Blutzufuhr für die Plazenta aus, kann es zur placentaren Insuffizienz kommen. Die placentare Insuffizienz ist wahrscheinlich der häufigste Grund für einen intrauterinen Wachstumsstopp in der westlichen Gesellschaft (24). Es konnte im Tierexperiment sowie in klinischen Studien gezeigt werden, dass auch die Größe der Plazenta (Basalfläche und Gewicht) eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Fötus spielt. Das Volumen der Plazenta steht in Zusammenhang mit dem fötalen Wachstum und indirekt mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter (30-31).

Faktoren, welche die Plazentagröße beeinflussen, sind unter anderem ein mütterlicher Diabetes mellitus, eine Ernährungsumstellung während der Schwangerschaft oder eine reduzierte placentare Blutversorgung (30). Dabei führt die reduzierte Blutzufuhr oder mütterliche Unterernährung zur Atrophie der Plazenta und somit zum reduzierten fötalen Wachstum wohingegen der mütterliche Diabetes mellitus oder ein Gestationsdiabetes die Volumenzunahme der Plazenta und eine Zunahme des fötalen Gewichts bewirken. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen dem placentaren Volumen und der Größe des Fötus (30-31).

Der Zusammenhang zwischen Plazentagröße und mütterlicher Ernährung ist kompliziert. Aufzeichnungen aus der niederländischen Hungersnot während des zweiten Weltkrieges zeigten, dass eine eingeschränkte Kalorienzufuhr in der frühen Schwangerschaft kombiniert mit einer erhöhten Kalorienzufuhr in der zweiten Schwangerschaftshälfte in einer Volumenzunahme der Plazenta resultiert (32-33).

Im Modell sind plazentares und fötales Wachstum durch mütterliche Protein- und Kalorienrestriktion gehemmt (34-36). Dadurch, dass das plazentare Volumen und die fötale Größe in Zusammenhang miteinander stehen, beeinflusst die Plazenta indirekt die Entwicklung von Krankheiten wie den arteriellen Hypertonus und Diabetes mellitus Typ 2 des Erwachsenen (37).

Barker et al. (38, 40) beschrieben eine U-förmige Beziehung zwischen Plazenta und Geburtsgewicht und weiterführend zur Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit. Das Risiko im späteren Leben an kardialen Erkrankungen zu sterben war am geringsten, wenn das plazentare Gewicht gering unterhalb 20 % des fötalen Geburtsgewichtes lag, wohingegen das Risiko stieg, wenn diese Relation in beiderlei Richtung von den 20 % abwich (38, 40).

Risnes et al. erkannten, dass ein höheres Gewicht der Plazenta im Verhältnis zum Geburtsgewicht die koronare Sterblichkeit beeinflussen kann (39).

An zwei wichtigen Geburtskohorten aus Helsinki konnte die Beziehung zwischen der Plazentagröße und dem kardiovaskulären Risiko abgeleitet werden (38, 40). Es wurden Frauen und Männer, geboren zwischen 1933-1942, und eine jüngere Kohorte, geboren zwischen 1943-1944, untersucht. Daten über die Kohorten enthielten Geburtsgewicht, Plazentagewicht, Kinderwachstum und Gesundheit. Es stellte sich heraus, dass das Risiko für weibliche Individuen eine koronare Erkrankung zu entwickeln am größten war bei einem Geburtsgewicht von 2,5 kg und einer Geburtslänge von  $\leq 48$  cm. Bei männlichen Individuen hingegen ist das Risiko für ein im Verhältnis zur Körpergröße niedrigem Gewicht bei der Geburt erhöht. Dabei steht eine im Verhältnis zum Geburtsgewicht große Plazenta geschlechtsabhängig in Korrelation mit der Ausprägung von Erkrankungen im späteren Leben (38, 40). Problematisch ist in dieser Analyse der fehlende Bezug auf das Gestationsalter der Kinder.

Als der primäre Austauschort zwischen Mutter und Fötus ist die Plazenta entscheidend für die fötale Entwicklung (38). Die Betrachtung des Einflusses der Ernährung, Sauerstoffversorgung aber auch entzündlicher Prozesse oder oxidativen Stresses unter der Schwangerschaft auf die Entwicklung der Plazenta könnte der Schlüssel zum genaueren Verständnis der Risikoentwicklung für Erkrankungen des Neugeborenen in späteren Dekaden sein. Es ist

wichtig, plazentare Marker für die Ausprägung koronarer Herzerkrankung zu finden, um ein Konzept für die Intervention und Prävention für zukünftige Generationen zu entwickeln (38). In unseren Untersuchungen wollten wir evaluieren ob eventuell die plazentare Angiotensinogenkonzentration ein möglicher Marker sein könnte. Hinsichtlich des Gewichtes der Plazenta im Vergleich zur relativen plazentaren Angiotensinogenkonzentration zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied (Abb. 35), sodass in unseren Daten, nach der Bereinigung von Ausreißern (d.h. geborene Kinder vor der 34. Schwangerschaftswoche), keine Auswirkung zwischen dem Plazentagewicht und der darin gemessenen Angiotensinogenkonzentration besteht.

Da das reine Plazentagewicht jedoch nur eingeschränkt verwertbar ist, ist es besser den Plazentaquotienten zu betrachten. Dieser berechnet sich aus dem Bezug zwischen dem Plazentagewicht und dem Kindsgewicht. Doch auch hier zeigten unsere statistischen Auswertungen keinen signifikanten Zusammenhang (nicht gesondert aufgeführt), sodass anhand unserer Daten die Größe der Plazenta (gemessen als Gewicht) in Bezug auf die Größe des Kindes nicht mit ihrer Angiotensinogenkonzentration korreliert.

## **5. Limitationen der Arbeit**

Ziel der verwendeten Methode war die Quantifizierung von plazentarem Angiotensinogen und die Evaluation möglicher Zusammenhänge mit Parametern, die im Rahmen der Hypothese der fötalen Programmierung von Bedeutung sein könnten. Weitere Parameter wurden in einem systematischen Interview erhoben, welches mit den an der Studie teilnehmenden Müttern durchgeführt wurde. Durch die Verwendung humanen Materials, sowie durch die Erhebung des Interviews ergaben sich folgende Limitationen:

### **Systematisches Interview/Mutterpass**

Das Interview wurde von geschulten Doktoranden/innen der Arbeitsgruppe am ersten oder zweiten Tag nach der Entbindung durchgeführt. Die Angaben der Mütter sind dabei natürlich subjektiv und konnten häufig nicht bezüglich der Richtigkeit kontrolliert werden. So wurde das angegebene Rauchverhalten nicht mittels Cotinin-Kontrolle evaluiert. Im Bereich der Angaben in Sachen Gesundheitsverhalten liegt möglicherweise eine Tendenz zu sozial erwünschten Antworten vor. Aufgrund dessen ist die Auswertung dieser Daten, welche das Rauchverhalten vor und während der Schwangerschaft beinhalten, unter diesen Aspekten zu betrachten.

Zudem erfolgte nicht bei allen Parametern die Erhebung im Studienzentrum unter standardisierten Bedingungen. So wurden die Eintragungen aus dem Mutterpass durch den zuständigen Gynäkologen/Gynäkologin erhoben, wodurch beispielsweise keine einheitliche Blutdruckmessung bei den Müttern möglich war. Weiterhin geht hierbei nicht hervor, mit welcher Methode der Entbindungstermin berechnet wurde, da hierfür einerseits die Naegelsche Regel in Betracht kommt, jedoch auch eine Berechnung mittels Ultraschalldiagnostik möglich ist (91).

In der Datenbank wurden zahlreiche Parameter erfasst, jedoch wurde keine Medikamentenanamnese erhoben. Ob vor allem Antihypertensiva, wie beispielsweise ACE-Hemmer oder AT1-Blocker das RAAS beeinflussen und möglicherweise auch einen Einfluss auf das plazentare Angiotensinogen haben, konnte somit in dieser Arbeit nicht überprüft werden. Da es sich hierbei um teratotoxische Medikamente handelt, hätte es sich hier vor allem um die Berechnung bei einem Einsatz dieser Medikation vor der Schwangerschaft gehandelt.

## **Materialgewinnung**

Die Koryledonen wurden zwar jeweils aus der Mitte der Plazenten entnommen, es wurde jedoch nicht vorab evaluiert, ob die Angiotensinogenverteilung in den untersuchten Plazenten überall gleich ist. Lenz et al. (87) berichten über eine unterschiedliche Konzentration von HMrA, welches das am häufigsten vorkommende Angiotensinogen der Plazenta ist, in den verschiedenen Teilen des Chorions und im Amnion. Die höchste Konzentration des Angiotensinogens in der Plazenta liegt im Chorion laeve vor. Es wurde zwar auf makroskopisch gleiche Gewebestücke im Hinblick auf die Durchblutung geachtet, jedoch war dies stets eine subjektive Einschätzung ohne die Erhebung objektiver Parameter wie z.B. die Dichte des Kapillarnetzes. Des Weiteren ist trotz konstanter Versuchsdurchführung eine Variabilität der Gewebestruktur gegeben. Diese Fehlerquelle wurde durch die Homogenisierung mittels Gewebemörserns versucht zu reduzieren. Zudem handelt es sich um relative Proteinkonzentrationen, die aus den entnommenen Proben bestimmt wurde und wir arbeiteten in einem aufwändigen Verfahren stets mit einer Standardreihe.

Unklar bleibt, wie lange die Probe von der Entnahme bis zur Kühlung benötigte. Da hierbei sicherlich unterschiedliche Zeiten vorlagen, wäre es möglich dass hierdurch auch Schwankungen in der Angiotensinogenkonzentration vorliegen.

## **Datenanalyse**

Die intrauterine Entwicklung und das fetale Wachstum sind über Monate andauernde, dynamische Prozesse. Anhand von Analysen, durchgeführt an placentarem Gewebe nach Aborten, konnte gezeigt werden, dass die placentare Angiotensinogenkonzentration im Verlauf der Schwangerschaft schwankt (88). Hierbei bleibt unklar, ob dies auch für Plazenten gesunder Embryonen bzw. Föten gilt.

Da für die Quantifizierung des placentaren Angiotensinogens einer intakten Schwangerschaft in den unterschiedlichen Gestationsabschnitten eine Gewebeprobe benötigt würde, war es aus methodischen sowie ethischen Gründen nur möglich eine Messung der Konzentration am Ende der Schwangerschaft durchzuführen. Eine Bestimmung der Angiotensinogenkonzentration der Plazenta longitudinal über die Schwangerschaft hinweg war somit in dieser Arbeit nicht möglich.

Um diese Limitierung zu relativieren wurde der Vergleich der hier vorhandenen unterschiedlichen Gestationsalter untersucht. In der von uns untersuchten Kohorte ist die Gruppe der Frühgeborenen gering und die Daten erst ab der 28. Schwangerschaftswoche verfügbar.

Nach Daten von Tewksbury et al. sowie Irani et al. (44, 45, 46) bleibt die Konzentration des unter der Schwangerschaft dominanten Teil des HMrA in den letzten Wochen vor der Geburt konstant, weiterführend könnte hierdurch bedingt sein, dass bei unseren Proben ab einer Geburt in der 34. Schwangerschaftswoche keine Unterschiede mehr zu finden waren. Auffällig war, dass die Kinder, welche vor der 34. Schwangerschaftswoche geboren wurden, hier zwar statistische Ausreißer darstellten, weshalb diese nicht in unsere Ergebnisse mit einbezogen wurden; allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um ein separates Kollektiv handelt. Die Gruppe dieser Kinder ist jedoch zu klein (n=9), als dass hieraus weitere Untersuchungen hinsichtlich der Angiotensinogenkonzentration bei sehr früh geborenen im Vergleich zu reifer geborenen Kindern erfolgen konnten. Eine spezielle, darauf bezogene Untersuchung muss Gegenstand weiter Arbeiten bleiben.

### **Fötale Programmierung**

In dieser Arbeit werden die Zusammenhänge zwischen den mütterlichen, plazentaren und kindlichen Parametern peripartal betrachtet. Da die fötale Programmierung bereits mit Beginn der Schwangerschaft einsetzt und dabei zahlreiche Faktoren die Entwicklung des Fötus beeinflussen, sind diese Daten ein Bestandteil des Verständnisses der Prozesse der fötalen Programmierung. Limitierend ist jedoch das Fehlen von Daten der Kinder im Erwachsenenalter, sodass keine Aussage hinsichtlich der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bei denen in dieser Arbeit untersuchten Kindern getroffen werden kann. Jedoch ist bereits bekannt, dass die fötale Programmierung in Zusammenhang mit der Entwicklung von Erkrankungen im Erwachsenenalter wie zum Beispiel die Ausprägung eines metabolischen Syndroms stehen kann.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1. Literaturverzeichnis

- 1 Thronburg KL, O`Tiernes PF, Loures S. The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta*. 2010 March; 31(Suppl): 54-59.
- 2 Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJL. Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension. *Circulation Research*. 2007; 100: 520-526.
- 3 Barker DJP. The developmental origins of insulin resistance. *Horm. Res.* 2006; 64 (Suppl. 3): 2–7.
- 4 Osmond C, Barker DJP. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ. Health Persp.* 2000; 108: 545–553.
- 5 Barker DJP. The developmental origins of adult diseases. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23 (6 Suppl): 588-595.
- 6 Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995; 311:171– 174.
- 7 Barker DJP, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002; 31:1235–1239.
- 8 Hales CN, Barker DJP, Clark PMS et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *Br. Med. J.* 1991; 303: 1019–1022.
- 9 Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*. 1986; 327(8489): 1077–1081.
- 10 Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. 1989; *The Lancet* (2), Nr. 8663: 577-580.
- 11 Rich-Edwards JW, Stampfer MJ., Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC, Hennekens CH. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976, *BMJ* 1997 (Band 315), Nr. 7105: 396-400.
- 12 Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, Bleker OP. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine, *The Lancet* 1998 (351), Nr. 9097: 173-177.
- 13 Yajnik CS, Fall CH, Vaidya U, Pandit AN, Bavdekar A, Bhat DS, Osmond C, Hales CN, Barker DJ. Fetal growth and glucose and insulin metabolism in four-year-old Indian children, *Diabet.Med.* 1995; (12), Nr. 4: 330-336.

- 14 Law CM, Shiell AW. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature, *J.Hypertens.* 1996 (14), Nr. 8: 935-941.
- 15 Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth, *Pediatr. Res.* 1975(9), Nr. 3: 154-156.
- 16 Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity, *Arch Dis Child* 1994 (71), Nr. 4: 288-290.
- 17 Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J, eds. *The childhood environment and adult disease.* (CIBA Foundation Symposium 156.) Chichester: Wiley, 1991: 38-55.
- 18 Siffert WG. Protein  $\beta 3$  subunit 825T allele, hypertension obesity and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001(15): 1298-1306.
- 19 Hoher B, Slowinski T, Stolze T, Pleschka A, Neumayer HH, Halle H. Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight, *The Lancet* 2000 (355); Nr. 9211: 1241-1242.
- 20 Masuda K, Osada H, Iitsuka Y, Seki K, Sekiya S. Positive association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with reduced head circumference at birth, *Pediatr. Res.* 2002 (52), Nr. 5: 687-691.
- 21 Hoher B, Slowinski T, Bauer C, Halle H. The advanced fetal programming hypothesis, *Nephrol Dial Transplant.* 2001(16), Nr. 6: 1298-1299.
- 22 Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight, *JAMA* 2002; 287:195-202.
- 23 Gheorghe CP, Goyal R, Holweger JD, Longo LD. Placental Gene Expression Responses to Maternal Protein Restriction in the Mouse. *Placenta* 2009; 30 (5): 411-417.
- 24 Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential intervention approaches. *Clinical Science* 2007; 113: 1-13.
- 25 Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet JJ. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes* 1991; 40 (Suppl. 2): 115–120.
- 26 Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to low protein diets. *Clin Sci* 1994; 86: 217–222.



- 27 Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2174–2181.
- 28 Dahlgren J, Nilsson C, Jennische E. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E326–E334.
- 29 Jansson T, Lambert G. Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3– 4 months of age. *J. Hypertens.* 1999; 17: 1239–1248.
- 30 Jansson T, Thordstein M, Kjellmer I. Placental blood flow and fetal weight following uterine artery ligation. *Biol. Neonate*,1986; 49: 172–180.
- 31 Hafner E, Metzenbauer M, Hofinger D. Placental growth from the first to the second trimester of pregnancy in SGA-foetuses and preeclamptic pregnancies compared to normal foetuses. *Placenta* 2003; 24: 336–342.
- 32 Godfrey K, Robinson S, Barker D, Osmond C, Cox V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Br. Med. J.* 1996; 312: 410-4.
- 33 Lumey LH. Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. *Placenta* 1998; 19: 105–111.
- 34 Roberts CT, Sohlstrom A, Kind KL. Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig. *Placenta* 2001; 22: 177–185.
- 35 Dwyer CM, Madgwick AJ, Crook AR, Stickland NC. The effect of maternal undernutrition on the growth and development of the guinea pig placenta. *J. Dev. Physiol.* 1992; 18 : 295–302.
- 36 Jansson N, Pettersson J, Haafiz A. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J. Physiol.* 2006; 576: 935–946.
- 37 Godfrey KM. The role of the placenta in fetal programming. *Placenta* 2002; 23 (Suppl. A): S20–S27.
- 38 Thornburg KL, O`Tierney PF, Louey S. The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta* 2010; 31 (Suppl.): S54-9.

- 39 Risnes KR, Romundstad PR, Nilsen TI, Eskild A, Vatten LJ. Placental weight relative to birth weight and long-term cardiovascular mortality: findings from a cohort of 31,307 men and women. *Am.J.Epidemiol* 2009; 170: 622–631.
- 40 Barker DJ, Thornburg KL, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. The surface area of the placenta and hypertension in the offspring in later life. *Int J Dev Biol.* 2010; 54 (2-3): 525-30.
- 41 Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1993; 87: 1816-1828.
- 42 Tewksbury DA, Frome WL, Dumas ML. Characterization of Human Angiotensinogen. *The Journal of Biological Chemistry* 1978; Vol. 253, No 11: 3817-3820.
- 43 Morris BJ, Iwamoto HS, Reid IA. Localization of angiotensinogen in rat liver by immunocytochemistry. *Endocrinology* 1979; 105: 796-790.
- 44 Tewksbury DA. Quantitation of Five Forms of High Molecular Weight Angiotensinogen from Human Placenta. *Am J Hypertens* (1996); 10 Pt 1: 1029-34.
- 45 Tewksbury DA, Burrill RE, Tryon ES, et al. Study on high molecular weight angiotensinogen, in *Placental and Endometrial Proteins: Basic and Clinical Aspects.* VSP, Utrecht, 1988: 651-654.
- 46 Irani RA, Xia Y. Renin Angiotensin Signaling in Normal Pregnancy and Preeclamsia. *Semin Nephrol.* 2011 January; 31 (1): 47-58.
- 47 Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 1996; 271(3Pt 2): F659–69.
- 48 Chung O, Kuhl H, Stoll M, Unger T. Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int* 1998; 54(S67): S95–9.
- 49 Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 1997; 30(5): 1238–46.
- 50 Grishko V, Pastukh V, Solodushko V, Gillespie M, Azuma J, Schaffer S. Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(6): H2364–72.
- 51 Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102(3): 252–61.

- 52 Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19(3): 232–52.
- 53 Hodari AA, Smeby R, Bumpus FM. A renin-like substance in the human placenta. *Obstet Gynecol* 1967; 29(3): 313–7.
- 54 Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, et al. Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 1998; 101(2): 442–54.
- 55 Li C, Ansari R, Yu Z, Shah D. Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells. *Hypertension* 2000; 36(2): 159–64.
- 56 Morgan T, Craven C, Ward K. Human spiral artery renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998; 32(4): 683–7.
- 57 Irani RA, Xia Y, The Functional Role of the Renin–Angiotensin System in Pregnancy and Preeclampsia, *Placenta* 2008; 29(9): 763-71.
- 58 Hsueh WA, Luetscher JA, Carlson EJ, Grislis G, Frazee E, McHargue A. Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 54(5): 1010–6.
- 59 Brown MA, Gallery ED, Ross MR, Esber RP. Sodium excretion in normal and hypertensive pregnancy: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159(2): 297–307.
- 60 Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1–7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine* 2002; 18(3): 239–45.
- 61 Shibata E, Powers RW, Rajakumar A, et al. Angiotensin II decreases system A amino acid transporter activity in human placental villous fragments through AT1 receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291: E1009–16.
- 62 Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential intervention approaches. *Clinical Science* 2007; 113: 1-13.
- 63 Wang X, Zuckerman B, Coffman GA, Corwin MJ. Familial aggregation of low birth weight among whites and blacks in the United States. *N Engl J Med* 1995; 333: 1744-1749.
- 64 The Health Benefits of Smoking Cessation: A Report of the Surgeon General  
Rockville, Md: US Dept of Health and Human Services; 1990: 367-423.

- 65 Hellerstedt WL, Hirmes JH, Story M. The effects of cigarette smoking and gestational weight change on birth outcomes in obese and normal-weight woman. *Am J Public Health*. 1997; 87: 591-596.
- 66 Wang X, Tager IB, Van Vunakis H. Maternal smoking during pregnancy, urine cotinine concentrations, and birth outcomes. *Int J Epidemiol*. 1997; 26: 978-988.
- 67 Prada JA, Tsang RC. Biological mechanisms of environmentally induced causes of IUGR. *Eur J Clin Nutr*. 1998; 52(suppl 1): S21-28.
- 68 Meis PJ, Michieluette R, Peters TJ. Factor associated with term low birthweight in Cardiff, Wales. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1997; 11: 287-297.
- 69 Pollac H, Lantz PM, Frohna JG. Maternal smoking and adverse birth outcomes: singletons and twins. *Am J Public Health*. 2000; 90: 395-400.
- 70 Kramer MS. Socioeconomic determinants of intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr*. 1998; 52(suppl 1): S29-33.
- 71 Kramer MS. Intrauterine growth and gestational duration determinants. *Pediatrics*. 1987; 80: S502-511.
- 72 Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; 287 (2): 195-202.
- 73 Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; 49: 460-467.
- 74 Gheorghe C, Goyal R, Holweger JD, Longo LD. Placental gene expression responses to maternal protein restriction in the mouse. *Placenta* 2009, 30(5): 411-417.
- 75 Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential intervention approaches. *Clinical Science* 2007; 113: 1-13.
- 76 Knopik S, Maccani M, Francazio S, McGeary J. The epigenetics of maternal cigarette smoking during pregnancy and effects on child development. *Development and Psychopathology*, 24, 2012: 1377-1390.
- 77 Lambers DS, Clark KE. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Seminars in Perinatology* 1996; 20 (2): 115-126.
- 78 Stapel E. *Box-and-Whisker Plots: Interquartile Ranges and Outliers*.
- 79 Howell D. *Statistical Methods for Psychology*. Wadsworth; 2009.
- 80 Fox J. *Regression diagnostics*. Sage; 1991.
- 81 Chatterjee S, Hadi A. *Regression analysis by example*. Wiley-Interscience; 2006.

- 82 Hardin J, Hilbe J, Hilbe J. Generalized linear models and extensions. Stata Press; 2007.
- 83 Lumbers ER, Pringle K. Roles of the circulating renin-angiotensin-aldosterone system in human pregnancy. *Am J Physiol R Regul Integr Comp Physiol* 2014; 306: R91-R101.
- 84 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1): 76- 85.
- 85 Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988;175(1): 231-7.
- 86 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259): 680-5.
- 87 Lenz T, Sealey J et al. Regional distribution of the angiotensinogens in human placentae. *Placenta* 1993; 14 (6): 695-699.
- 88 Pringle KG, Tadros MA, Callister RJ, Lumbers ER. The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: Roles in trophoblast invasion and angiogenesis? *Placenta* 32 (2011): 956-962.
- 89 Remmele W. Pathologie 4; zweite neubearbeitete Auflage. Berlin: Springer; 1997.
- 90 Sadler TW. Medizinische Embryologie, 9. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1998.
- 91 Stauber M, Weyerstahl T. Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme; 2007.
- 92 Freitag L, von Kaisenberg C, Kreipe H. *Pathologe* (2014) 35: 77.  
<https://doi.org/10.1007/s00292-013-1858-y>
- 93 Voigt M, Fusch C, Olbertz D, Hartmann K, Rochow N, Renken C, Schneider KTM. Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland. *Geburtsh Frauenheilk* 2006; 66: 956-970.
- 94 Klinke R, Silbernagl S. Lehrbuch der Physiologie. 3. Auflage 2001.
- 95 Laule CF, Wing CR, Odean EJ, Wilcox JA, Gilbert JS, Regal JF. Effect of nicotine on placental ischemia-induced complement activation and hypertension in the rat. *Journal of Immunotoxicology* 2017; 14 (1): 235-240.
- 96 Freathy RM, Bennett AJ, Ring SM, Shields B, Groves CJ, Timpson NJ, Weedon MN et al. Type 2 diabetes risk alleles are associated with reduced size at birth. *Diabetes*. 2009 Jun; 58 (6): 1428-33.

- 97 Yilmaz Z, Yildirim T, Yilmaz R, Aybal-Kutlugun A, Altun B, Kucukozkan T, Erdem Y. Association between urinary angiotensinogen, hypertension and proteinuria in pregnant women with preeclampsia.. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015 Sep;16(3): 514-20.
- 98 Schneider H. et al. *Die Geburtshilfe.* Springer. 2. Auflage.
- 99 McLaughlin K, Zhang J, Lye SJ, Parker JD, Kingdom JC. Phenotypes of Pregnant Women Who Subsequently Develop Hypertension in Pregnancy. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7: e009595. DOI: 10.1161/JAHA.118.009595.
- 100 McCance DR. Diabetes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2015 Jul; 29(5): 685-99.
- 101 Kataria Y, Gaewsky L, Ellervik C. Prenatal smoking exposure and cardio-metabolic risk factors in adulthood: a general population study and a meta-analysis. *International Journal of Obesity (Lond)* 2018 Sep 19.
- 102 Suzue M, Urushihara M, Nakagawa R, Saijo T, Kagami S. Urinary angiotensinogen level is increased in preterm neonates. *Clin Exp Nephrol.* 2015 Apr.; 19 (2): 293-7.
- 103 Sealey J.E., Itskovitz-Eldor J., Rubattu S., James G.D., August P., Thaler I., Levron J., Laragh J.H. Estradiol- and progesterone-related increases in the renin-aldosterone system: studies during ovarian stimulation and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;79(1): 258–264.
- 104 Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent Overweight and Future Adult Coronary Heart Disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 2371-79.
- 105 Lee EY, Yoon KH. Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Front Med* 2018 Oct 2. Epub ahead of print.
- 106 Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. Fetal Programming and Cardiovascular Pathology. *Compr Physiol.* 2015 April; 5 (2): 997-1025.
- 107 Dominiak P., Heusch G. *AT1-Rezeptorblockade.* Springer 1999.
- 108 H. A. Wollmann. Zu klein bei Geburt (SGA). *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2004 (152): 528–535.
- 109 Laurière M. A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal Biochem.* 1993 Jul; 212 (1): 206-11.

- 110 Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry*. 2010; 401 (2): 318–320.
- 111 Tim Andermann. Zusammenhänge zwischen der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase in der humanen Plazenta und fetalen sowie maternalen Parametern. Dissertation Charité Berlin 2013.
- 112 Christoph Reichetzedler. Molekulare Mechanismen der fetalen Programmierung. Erste Einblicke in den Einfluss von placentarem Klotho auf mütterliche und kindliche biologische Parameter. Dissertation Charité Berlin 2012.
- 113 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal* (2018); 39: 3021-3104.
- 114 Einarson A, Riordan S. Smoking in pregnancy and lactation: a review of risks and cessation strategies. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009 Apr; 65 (4): 325-30.

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

---

Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
APGAR	Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe
AT-I	Angiotensin I
AT-II	Angiotensin II
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
CYP1A1	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1
Dpi	Dots per inch
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
g	Gramm
GNB3	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-3
GSTT1	Glutathion S Transferase T1
HCG	Humanes Chorion-Gonadotropin
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HMrA	High molecular weight angiotensinogen
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPL	Humanes Plazentalaktogen
IDV	Integrated density value
kDa	Kilodalton

---



---

kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzerkrankung
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LMrA	Low molecular weight angiotensinogen
mA	Milliampère
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
PAA	Polyacryl Säure
pH	Potentia hydrogenii
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Natriumdiacetat
SFL	Scheitel-Ferse-Länge
SGA	Small for Gestational Age
SS	Schwangerschaft
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

---

### 6.3. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Hocher et al. The advanced fetal programming hypothesis (19)	9
Abb. 2: Entwicklung des Plazentagewichtes und der Plazentabasalfläche im Verlauf der Schwangerschaft (92)	11
Abb. 3: Plazentaquotient im Verlauf der Schwangerschaft, 50. Perzentile (89)	11
Abb. 4: Anteile der Formen von HM $\alpha$ A in der humanen Plazenta bei normotensiven Schwangeren (nach Tewksbury et al (44))	15
Abb. 5: Plasmarer Angiotensinogengehalt über die Schwangerschaft (Lumbers et al, Am J Physiol 306, p R93), Angiotensinogengehalt +/- SE	16
Abb.6: Doppelt aufgetragene Eichgeradengemische von 20, 25, 30, 35 und 40 $\mu$ g Gesamtproteinkonzentration (eigene Darstellung, Auszug aus Gruppe 10b)	31
Abb.7: Doppelt aufgetragene Proben im Western Blot (eigene Darstellung, Auszug aus Gruppe 10b)	31
Abb.8: Fotofilm der Western Blots aus Plazentalysaten, Angiotensinogen und Aktin (eigene Darstellung, Auszug aus Gruppe 10 b)	31
Abb. 9: Referenzgrade zur Berechnung der Angiotensinogen-Konzentration	32
Abb. 10: Aufteilung der Anzahl der geborenen Kinder auf die Schwangerschaftswoche	36
Abb. 11: Korrelation zwischen plazentarer Angiotensinogenkonzentration und der SSW bei allen Kindern	37
Abb. 12: Korrelation zwischen Angiotensinogen und den ab der 34. SSW geborenen Kindern	38
Abb. 13: Alter der Mutter (Jahre)	40
Abb. 14: Body-Mass-Index zu Beginn der Schwangerschaft	41
Abb. 15 : Verteilung von arterieller Hypertonie vor und während der Schwangerschaft	42
Abb. 16: Geburtsgewicht des Kindes	43
Abb.17: Verteilung der Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht auf die Schwangerschaftswochen	44
Abb. 18: Angiotensinogen bei Frauen mit unterschiedlichem BMI am Anfang der Schwangerschaft	45
Abb. 19: Angiotensinogen bei unterschiedlichem Körpergewicht der Mutter als Beispiel hier im dritten Trimenon	47
Abb. 20: Angiotensinogenkonzentration bei Frauen ohne vs. mit arterieller Hypertonie in der Familienanamnese	48

Abb. 21: Angiotensinogenkonzentration bei Frauen mit unterschiedlichen Formen des Hypertonus	49
Abb. 22: Angiotensinogenkonzentration bei Frauen ohne vs. mit Diabetes mellitus während der Schwangerschaft	50
Abb.23: Vergleich der Angiotensinogenkonzentration bei Nichtrauchern vs. Rauchern	51
Abb. 24: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichen Packyears vor der Schwangerschaft	52
Abb. 25: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlicher Anzahl gerauchter Zigaretten während der Schwangerschaft	53
Abb. 26: Angiotensinogen bei unterschiedlichem Geburtsgewicht der Kinder	55
Abb. 27: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Ponderal-Index der Kinder	57
Abb. 28: Angiotensinogenkonzentration bei den unterschiedlichen Kopfumfängen der Kinder	59
Abb. 29: Angiotensinogenkonzentration abhängig von der Länge des Kindes	60
Abb. 30: APGAR nach 5 min. $\leq 8$ in Bezug zur Schwangerschaftswoche	61
Abb. 31: Angiotensinogenkonzentration bei Kindern mit unterschiedlichen APGAR-Werten nach 5 Minuten	62
Abb. 32: Angiotensinogenkonzentration bei Kindern mit unterschiedlichen APGAR-Werten nach 10 Minuten	62
Abb. 33: Angiotensinogenkonzentration in Bezug zum pH-Wert der Nabelarterie	63
Abb. 34: Angiotensinogen bei männlichen vs. weiblichen Kindern	64
Abb. 35: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Plazentagewicht	65

## 6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Quantitativer Anteil der HMrA-Formen in Plazenta und Plasma der normotensiven Schwangeren, Mittelwert $\pm$ SD (aus Tewksbury et al (44))	15
Tabelle 2: Datenerhebung der Studienteilnehmer, strukturiertes Interview	20
Tabelle 3: Datenerhebung aus dem Mutterpass sowie dem klinischen Verlauf	21
Tabelle 4: Chemikalien	22
Tabelle 5: Instrumente	26
Tabelle 6: Charakterisierung der Studienpopulation	35
Tabelle 7: Korrelation nach Spearman Rho für die Angiotensinogenkonzentration und die Schwangerschaftswoche	38
Tabelle 8: Probenverteilung	39
Tabelle 9: Statistik plazentare Angiotensinogenkonzentration und Körpergewicht der Mutter (BMI)	46
Tabelle 10: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Rauchverhalten	54
Tabelle 11: Statistik Angiotensinogenkonzentration und Geburtsgewicht des Kindes	56
Tabelle 12: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Geburtsgewicht der Kinder	56
Tabelle 13: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichen Ponderal Indices der Kinder	58
Tabelle 14: Angiotensinogenkonzentration bei unterschiedlichem Plazentagewicht	66

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Astrid Mersmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zusammenhang zwischen der plazentaren Angiotensinogen-Expression und Parametern der fötalen Programmierung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Es erfolgte eine statistische Beratung durch Frau Dr. Kottmann.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

23.06.2019

Astrid Mersmann

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird in der Online-Version der Lebenslauf nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, ihnen allen gebührt mein Dank.

Zunächst möchte ich Prof. B. Hoher für die Möglichkeit danken, in dieser Arbeitsgruppe mitzuarbeiten. Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die kollegiale Zusammenarbeit im Labor. Hierbei möchte ich besonders Herrn Dr. Christoph Reichetzer für die zahlreichen Korrekturen und Anmerkungen danken.

Mein weiterer Dank geht an meinen Kollegen Herrn Prof. Christoph Langer, der mich ermutigte diese Arbeit zum Abschluss zu bringen und für seine kritische Durchsicht der Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Kottmann für die geduldigen Erklärungen hinsichtlich sinnvoller statistischer Methoden und die Beratung bei der Umsetzung.

Mein besonderer Dank geht an Kirsten und Burkhard Krämer, die mich gerade in den letzten und wichtigsten Monaten dieser Arbeit sehr unterstützen und sicherlich meine strengsten und größten Kritiker waren.

Ich danke meinen Eltern (in Gedenken an meinen Vater), die mir stets durch Unterstützung in jeglicher Hinsicht beistanden und mir einen erfolgreichen Abschluss des Studiums und dieser Arbeit ermöglichten.

Dabei danke ich besonders meiner Mutter Brigitte Mersmann und meinem Onkel Ulrich Kulicke, die bis zum Schluss an die Fertigstellung dieser Dissertation glaubten.