

Aus der Arbeitsgruppe 'Experimentelle Geburtsmedizin'  
der Klinik für Geburtsmedizin, CVK,  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Experimentelle Untersuchungen zur Ätiopathogenese  
des 'small baby syndrome'  
an zwei Tiermodellen der Ratte**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Uta Neitzke  
aus Potsdam

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Plagemann  
2. Prof. Dr. med. E. Schleußner  
3. Prof. Dr. med. M. Radke

Datum der Promotion: 18.09.2009

## **Danksagung**

Mein ganz außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Andreas Plagemann, Leiter der Arbeitsgruppe 'Experimentelle Geburtsmedizin' der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, CVK, für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Möglichkeit der intensiven Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Unterstützung, die zahlreichen Ideen und Anregungen bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei ihm auch für seine Hartnäckigkeit und Ausdauer bedanken, ohne die eine Publikation der Daten kaum möglich gewesen wäre.

Nicht minder möchte ich ganz herzlich Herrn Dr. med. Thomas Harder, stellvertretender Leiter der Arbeitsgruppe 'Experimentelle Geburtsmedizin', für die sehr gute und kontinuierliche Betreuung sowie für Hilfestellungen und Anregungen bei der Durchführung und Auswertung der tierexperimentellen Versuche und der Metaanalyse danken.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dipl.-Vet. med. Kerstin Melchior und Herrn Dipl.-Biochem. Thomas Ziska, wissenschaftliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe 'Experimentelle Geburtsmedizin', für die Durchführung und Betreuung der tierexperimentellen und laborchemischen Untersuchungen.

Schließlich danke ich Frau Dipl.-Ernähr. Karen Schellong, Frau Dipl.-Biol. Katharina Roepke, Frau Dr. med. Elke Rodekamp, Frau Manon Wittrock-Staar und Herrn Matthias Brunn für die gute Zusammenarbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i> .....	3
<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	4
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	9
<b>I. Einleitung</b> .....	10
<b>1.1. Definition und Prävalenz des metabolischen Syndroms</b> .....	10
<b>1.2. Zur Beschreibung des 'small baby syndrome'</b> .....	12
<b>1.3. Zur Terminologie eines verringerten Geburtsgewichts</b> .....	13
<b>1.4. Zur Pathophysiologie des 'small baby syndrome'</b> .....	15
<b>1.5. Konzepte der fetalen und perinatalen Programmierung</b> .....	18
<b>1.6. Experimentalmodelle der fetalen und perinatalen Programmierung</b> .....	20
<b>1.7. Bedeutung der frühpostnatalen Ernährung und Körpergewichtsentwicklung         als Risikofaktoren für das metabolische Syndrom</b> .....	22
<b>1.8. Tierexperimentelle Untersuchungen des 'small baby syndrome'</b> .....	25
<b>II. Problemstellung</b> .....	28
<b>III. Modell der Arteria uterina Ligatur und Metaanalyse der internationalen Literatur</b> ....	29
<b>3.1. Fragestellung</b> .....	29
3.1.1. Modell der Arteria uterina Ligatur .....	29
3.1.2. Metaanalyse zum Modell der Arteria uterina Ligatur .....	30
<b>3.2. Material und Methoden</b> .....	32
3.2.1. Tierexperimentelle Studie .....	32
3.2.1.1. Tiermaterial und Tierhaltung.....	32
3.2.1.2. Tiermodell .....	32
3.2.1.3. Parameter (Zielgrößen).....	34
3.2.1.3.1. Fetale Resorptionsrate .....	34
3.2.1.3.2. Primärwurfgröße .....	34
3.2.1.3.3. Körpergewicht .....	34
3.2.1.3.4. Körperlänge .....	34
3.2.1.3.5. Relative Körpermasse .....	34
3.2.1.4. Laborchemische Bestimmungen im Blut .....	35
3.2.1.4.1. Blutglukose.....	35
3.2.1.4.2. Triglyceride .....	35
3.2.1.4.3. Plasmainsulin .....	35

3.2.1.4.4.	Plasmaleptin .....	36
3.2.1.5.	Statistische Auswertung .....	36
3.2.2.	Metaanalyse.....	37
3.2.2.1.	Suchstrategie .....	37
3.2.2.1.1.	Zeitraum .....	37
3.2.2.1.2.	Suchbegriffe .....	37
3.2.2.1.3.	Einschlusskriterien .....	38
3.2.2.2.	Datenextraktion .....	38
3.2.2.3.	Statistische Methoden der Metaanalyse .....	38
3.2.2.3.1.	Datentransformation.....	38
3.2.2.3.2.	Test auf Heterogenität .....	39
3.2.2.3.3.	Berechnung gepoolter Schätzer.....	39
3.2.2.3.4.	Metaregressionsanalyse.....	39
3.2.2.3.5.	Publication bias .....	39
3.2.2.3.6.	Software .....	39
<b>3.3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.3.1.	Eigene tierexperimentelle Untersuchungen am Modell der Arteria uterina Ligatur .....	40
3.3.1.1.	Mütterliche Mortalität .....	40
3.3.1.2.	Gestationsdauer .....	40
3.3.1.3.	Primärwurfgröße und fetale Resorptionsrate .....	40
3.3.1.4.	Geburtenzahl und fetale Mortalität .....	40
3.3.1.5.	Geburtsgewicht der Nachkommen .....	41
3.3.1.6.	Anteil von neugeborenen Ratten mit einer Wachstumsrestriktion.....	42
3.3.1.7.	Körpergewichtsentwicklung bis zum 21. LT .....	43
3.3.1.8.	Stoffwechselformparameter .....	44
3.3.2.	Metaanalyse der international publizierten Studien mit einer Arteria uterina Ligatur .....	46
3.3.2.1.	Studienselektion .....	46
3.3.2.2.	Datenextraktion .....	46
3.3.2.3.	Deskription der eingeschlossenen Studien.....	49
3.3.2.4.	Test auf Heterogenität .....	49
3.3.2.5.	Gepoolter Effektschätzer.....	50

3.3.2.6.	Auswirkungen der Gestationsdauer und des Operationszeitpunktes auf den Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Gruppen .....	50
3.3.2.7.	Langzeitoutcome in den Studien der Metaanalyse.....	52
3.3.2.8.	Publication bias .....	52
<b>3.4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
3.4.1.	Modell der Arteria uterina Ligatur und Metaanalyse der internationalen Literatur.....	55
3.4.2.	Zur Eignung des Modells der Arteria uterina Ligatur für die Erzeugung von Ratten mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion.....	56
3.4.3.	Auftreten von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei Nachkommen aus dem Arteria uterina Ligatur Modell .....	59
3.4.4.	Metaanalyse zur Eignung des Modells der Arteria uterina Ligatur für die Untersuchung des 'small baby syndrome' .....	62
<b>3.5.</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>66</b>
<b>IV.</b>	<b><i>Untersuchungen an einem genuinen Tiermodell für das 'small baby syndrome' zur Bedeutung einer frühpostnatalen Überernährung .....</i></b>	<b>69</b>
<b>4.1.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>72</b>
4.2.1.	Tiermaterial und Tierhaltung.....	72
4.2.2.	Tiermodell .....	72
4.2.3.	Parameter (Zielgrößen).....	75
4.2.3.1.	Primärwurfgröße .....	75
4.2.3.2.	Körpergewicht .....	75
4.2.3.3.	Körperlänge .....	75
4.2.3.4.	Relative Körpermasse .....	75
4.2.3.5.	Bauchumfang .....	75
4.2.3.6.	Futteraufnahme.....	75
4.2.3.7.	Laborchemische Bestimmungen im Blut .....	76
4.2.3.7.1.	Blutglukose.....	76
4.2.3.7.2.	Plasmainsulin .....	76
4.2.3.7.3.	Plasmaleptin .....	77
4.2.3.7.4.	Insulin/Blutglukose Ratio.....	77
4.2.3.7.5.	Glukosetoleranztest .....	77
4.2.3.8.	Blutdruckmessung .....	77

4.2.4.	Statistische Auswertung .....	79
<b>4.3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>80</b>
4.3.1.	Mortalität .....	80
4.3.1.1.	Neonatale Mortalität .....	80
4.3.1.2.	Mortalität bis zum 360. LT .....	80
4.3.2.	Anteil an Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht .....	80
4.3.3.	Geburtsgewicht .....	81
4.3.4.	Körpergewichtsentwicklung bis zum 360. LT .....	81
4.3.5.	Körperlänge bis zum 360. LT .....	84
4.3.6.	Relative Körpermasse bis zum 360. LT .....	84
4.3.7.	Bauchumfang am 360. LT .....	85
4.3.8.	Futtermaufnahme .....	85
4.3.8.1.	Futtermaufnahme im juvenilen Alter .....	85
4.3.8.2.	Futtermaufnahme im adulten Alter .....	86
4.3.9.	Stoffwechselfparameter .....	86
4.3.9.1.	Nüchternblutentnahme am 130. LT .....	86
4.3.9.2.	Glukosetoleranztest am 130. LT .....	87
4.3.9.3.	Nüchternblutentnahme am 360. LT .....	89
4.3.10.	Systolischer Blutdruck am 170. LT .....	90
4.3.11.	Entwicklung der VSGA-Tiere .....	91
4.3.11.1.	Relativer Anteil an VSGA-Tieren am Primärwurf .....	91
4.3.11.2.	Geburtsgewicht .....	91
4.3.11.3.	Körpergewichtsentwicklung bis zum 360. LT .....	92
4.3.11.4.	Körperlänge am 360. LT .....	93
4.3.11.5.	Relative Körpermasse am 360. LT .....	93
4.3.11.6.	Bauchumfang am 360. LT .....	94
4.3.11.7.	Futtermaufnahme .....	95
4.3.11.8.	Stoffwechselfparameter .....	95
4.3.11.8.1.	Nüchternblutentnahme am 130. LT .....	95
4.3.11.8.2.	Glukosetoleranztest am 130. LT .....	96
4.3.11.8.3.	Nüchternblutentnahme am 360. LT .....	98
4.3.11.9.	Systolischer Blutdruck am 170. LT .....	98
<b>4.4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>99</b>

4.4.1.	Untersuchungen an einem genuinen Tiermodell für das 'small baby syndrome' .....	99
4.4.2.	Zur Eignung dieses genuinen Tiermodells für die Erzeugung von Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht .....	100
4.4.3.	Die „kleinen Würfe“ als Modell für eine frühpostnatale Überernährung und der Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts bei SGA-Tieren.....	101
4.4.4.	Risiko für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei SGA-Neugeborenen nach frühpostnataler Überernährung.....	106
4.4.5.	Risiko für die Entwicklung eines Bluthochdrucks bei SGA-Neugeborenen nach frühpostnataler Überernährung.....	111
<b>4.5.</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>113</b>
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>137</b>
	<b>Publikationen, die Bestandteile der vorliegenden Dissertation enthalten .....</b>	<b>139</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>140</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGA	appropriate for gestational age
AGA-in-NW	Aufzucht der 'appropriate for gestational age' Tiere in normalen Würfen
ARC	Nucleus arcuatus hypothalami
AUC	area under the curve
BG	Blutglukose
BMI	body mass index
CI	Konfidenzintervall
GGW	Geburtsgewicht
GT	Gestationstag
IGF	insulin-like growth factor
IRI	Plasmainsulin
IRI/BG	Insulin/Blutglukose Ratio
IUGR	intrauterine growth restriction
k.A.	keine Angaben
KG	Körpergewicht
KL	Körperlänge
KMr	relative Körpermasse
KW	kleiner Wurf
LBW	low birth weight
LGA	large for gestational age
Lig	Ligatur
LT	Lebenstag
MW	Mittelwert
NW	normaler Wurf
PWG	Primärwurfgröße
SD	Standardabweichung
SGA	small for gestational age
SGA-in-KW	Aufzucht der 'small for gestational age' Tiere in kleinen Würfen/Nestern
SGA-in-NW	Aufzucht der 'small for gestational age' Tiere in normalen Würfen/Nestern
ShL	Scheinligatur
TG	Triglyceride
vs	versus
VSGA	very small for gestational age
VSGA-in-KW	Aufzucht der 'very small for gestational age' Tiere in kleinen Würfen/Nestern
VSGA-in-NW	Aufzucht der 'very small for gestational age' Tiere in normalen Würfen/Nestern
WHO	World Health Organisation
WMD	weighted mean difference (gewichtete mittlere Differenz)

# **I. Einleitung**

## **1.1. Definition und Prävalenz des metabolischen Syndroms**

Das metabolische Syndrom ist definiert als Symptomkombination vornehmlich bestehend aus Glukoseintoleranz, Bluthochdruck, Übergewicht und Dyslipidämie (Eckel et al. 2005). Ein umfassendes Konzept zum metabolischen Syndrom wurde bereits 1980 vorgestellt (Hanefeld und Leonhardt 1981). Reaven fasste die Symptome unter dem Syndrom X zusammen (Reaven 1988). Es existieren verschiedene Definitionen der WHO (1999), des 'National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults' (Adult Treatment Panel III – ATP III, 2001) und der 'European Group for the Study of Insulin Resistance' (EGIR, 1999), die sich nicht in der Zugehörigkeit der Einzelkomponenten unterscheiden, sondern lediglich in der Festlegung der Grenzwerte einzelner Parameter (Cameron et al. 2004, Eckel et al. 2005).

Weltweit ist ein Prävalenzanstieg von Erkrankungen des metabolischen Syndroms zu verzeichnen. Speziell bei der Adipositas kommt es sowohl bei Erwachsenen, aber auch zunehmend bei Kindern zu einem gesteigerten Auftreten. Unter der amerikanischen Bevölkerung betrug die Prävalenz der Adipositas im Jahr 2001 20,9 % und war im Vergleich zum Vorjahr um 5,9 % erhöht (Mokdad et al. 2003). Die Zahl an US-Amerikanern mit Übergewicht und Adipositas ist weiter zunehmend. Mittlerweile geht man von einer Prävalenz dieser Erkrankungen von ca. 60 % unter US-amerikanischen Erwachsenen aus (Wyatt et al. 2006). Der Anteil an übergewichtigen Jugendlichen zwischen 12 und 19 Jahren stieg in den USA von 10,5 % zwischen 1988 und 1994 auf 15,5 % in den Jahren 1999-2000 (Ogden et al. 2002). Auch in Deutschland ist eine zunehmende Häufigkeit von Übergewicht und Adipositas zu verzeichnen. Ca. 70 % der Männer und 50 % der Frauen galten im Jahr 2005 als übergewichtig oder adipös (Mensink et al. 2005). In einer aktuellen Studie wird die Prävalenz für Übergewicht schon bei 25jährigen Männern mit 50 % angegeben (Leyk et al. 2008). Eine umfassende Untersuchung innerhalb des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS) ergab, dass unter deutschen Kindern zwischen 3 und 17 Jahren 15 % mit ihrem Körpergewicht oberhalb der 90. Perzentile liegen und als übergewichtig gelten, während 6,3 % mit einem Körpergewicht oberhalb der 97. Perzentile als adipös einzustufen sind (Kurth und Schaffrath 2007).

Diese Entwicklung mit weltweit hohen Prävalenzraten zeigt sich auch beim metabolischen Syndrom (Cameron et al. 2004). Allein in den USA leiden 47 Millionen Menschen daran. Dabei steigt die Häufigkeit im höheren Lebensalter von 6,7 % zwischen 20 und 29 Jahren auf 43,5 %

zwischen 60 und 69 Jahren (Ford et al. 2002). Ebenso kommt es zunehmend zu einem Prävalenzanstieg des metabolischen Syndroms in jüngeren Altersgruppen, besonders bei Frauen zwischen 20 und 39 Jahren (Ford et al. 2004). Damit verbunden ist eine Zunahme an Folgeerkrankungen wie Typ 2 Diabetes mellitus (Resnick et al. 2003) und kardiovaskulären Erkrankungen (Lakka et al. 2002). Bei Vorhandensein von mindestens drei Kriterien des metabolischen Syndroms ist das Risiko für Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen auf das 1,5-2fache erhöht (Bray und Bellanger 2006). In Deutschland wird im Jahr 2010 mit 10 Millionen Diabetikern gerechnet (Danne und Reincke 2004). Weltweit erwartet man eine Erhöhung der Diabetesprävalenz von 4,0 % im Jahr 1995 auf 5,4 % im Jahr 2025 mit dem größten Anteil an Diabetikern aus den Entwicklungsländern, in denen die Zahl um 170 % von 84 auf 228 Millionen steigen wird (King et al. 1998). Ein Problem stellen nicht nur die steigenden Erkrankungszahlen, sondern auch die daraus resultierende erhöhte Mortalitätsrate an kardiovaskulären- und koronaren Herzerkrankungen sowie die allgemein gesteigerte Mortalitätsrate bei Patienten mit einem metabolischen Syndrom dar (Lakka et al. 2002, Malik et al. 2004).

Für das Erkranken an Symptomen des metabolischen Syndroms hat die Entwicklung von Übergewicht und Adipositas mit v.a. zentraler Fettverteilung eine besondere Bedeutung (Alberti et al. 2006, Carr et al. 2004, Grundy et al. 2005). Als eine mögliche Ursache wird die gesteigerte Synthese von z.B. freien Fettsäuren oder des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) diskutiert, die eine gestörte Insulinwirkung an den Skelettmuskelzellen verursachen sollen (Carr et al. 2004, Alberti et al. 2006). Es entwickelt sich eine Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie. Dabei ist die Hyperinsulinämie auch schon bei Ausprägung einzelner Symptome des metabolischen Syndroms nachweisbar (Reaven 1988, Grundy et al. 2005). Übergewicht, Adipositas und eine Insulinresistenz prädisponieren für die Entwicklung des metabolischen Syndroms mit einer gestörten Glukosetoleranz, Bluthochdruck und Fettstoffwechselstörungen (Alberti et al. 2006). Eine Erkrankung an diesen Symptomen wiederum steigert maßgeblich das Risiko für das Erkranken an kardiovaskulären Störungen und Typ 2 Diabetes mellitus (Alberti et al. 2006).

Verbunden mit dem Anstieg von Diabetes und seiner Folgeerkrankungen wie Gefäßveränderungen, Nephropathien und Polyneuropathien ist eine Zunahme der Gesundheitsausgaben. Nach Schätzungen der WHO werden zwischen 5-10 % der nationalen Gesundheitsbudgets für die Behandlung des Diabetes und seiner Folgeerkrankungen ausgegeben (Greiner et al. 2006). Allein die jährlichen Behandlungskosten für Diabetiker betragen weltweit über 150 Milliarden US-Dollar. Mit derzeit noch zunehmender Lebenserwartung und dem weltweiten Trend zum westlichen Lebensstil wird mit einem weiteren Anstieg der Erkrankten

und somit der Behandlungskosten gerechnet (Greiner et al. 2006). Die aus diesen Krankheiten wie Diabetes, Adipositas und kardiovaskulären Veränderungen resultierenden wachsenden Gesundheitskosten und Mortalitätszahlen zwingen dazu, gezielt nach Ursachen zu forschen bzw. Präventionsstrategien zu entwickeln. Anderenfalls wird es in Zukunft erstmals zu einer Verkürzung der Lebenserwartung und Verminderung der Lebensqualität durch die Auswirkungen von Erkrankungen des metabolischen Syndroms kommen (Danne und Reincke 2004). Aus diesem Grund besteht neben dem Erkennen von Risikofaktoren des metabolischen Syndroms und der Entwicklung von Behandlungsstrategien als Maßnahmen der Sekundärprävention von Folgeerkrankungen und früher Mortalität v.a. die Notwendigkeit zur Ermittlung von primärpräventiv beeinflussbaren Faktoren.

## **1.2. Zur Beschreibung des 'small baby syndrome'**

Seit Anfang der 90er Jahre wird dem Zusammenhang zwischen einem verminderten Geburtsgewicht und der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und Symptomen des metabolischen Syndroms im adulten Alter zunehmend Bedeutung beigemessen. Dieser Zusammenhang erlangte besonders durch die Arbeiten der Arbeitsgruppen um Hales und Barker weltweite Aufmerksamkeit und wurde unter dem Begriff des 'small baby syndrome' bzw. der 'thrifty phenotype hypothesis' bekannt (Hales et al. 1991, Hales und Barker 1992, Barker et al. 1993, Hales und Barker 2001). Barker et al. zeigten in den Studien aus Hertfordshire und Preston bei zwischen 1920 und 1943 geborenen Männern und Frauen, dass das Risiko einer koronaren Herzerkrankung, einer arteriellen Hypertonie und eines metabolischen Syndroms mit steigendem Geburtsgewicht sank. So hatten z.B. 22 % der 64jährigen Männer mit einem Geburtsgewicht unter 2,95 kg ein metabolisches Syndrom und damit ein mehr als 10fach erhöhtes Risiko als Männer mit einem Geburtsgewicht über 4,31 kg (Barker et al. 1989, Barker et al. 1990, Hales et al. 1991, Barker et al. 1993). Es folgten zahlreiche epidemiologische Studien, die diesen phänomenologischen Zusammenhang bestätigten. Im Speziellen wurde bei Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Glukosetoleranzstörung bzw. eines Typ 2 Diabetes mellitus (McCance et al. 1994, Lithell et al. 1996, Rich-Edwards et al. 1997, Dabelea et al. 1999, Forsén et al. 2000), von kardiovaskulären Veränderungen (Stein et al. 1996, Leon et al. 1998, Rich-Edwards et al. 1999, Tanis et al. 2005, Kajantie et al. 2005, Vos et al. 2006) sowie einer arteriellen Hypertonie (Nilsson et al. 1997, Bergvall et al. 2005) im Erwachsenenalter beschrieben. Weitere Studien zeigten bei Patienten mit einem verringerten Geburtsgewicht ein erhöhtes Risiko für mehrere Symptome des

metabolischen Syndroms, d.h. arterielle Hypertonie, gestörte Glukosetoleranz bzw. Typ 2 Diabetes mellitus sowie Fettstoffwechselstörungen (Curhan et al. 1996, Eriksson et al. 2004, Ramadhani et al. 2006, Tian et al. 2006). Besonders hoch war das spätere Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus bei Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, wenn sie im Erwachsenenalter eine gesteigerte abdominale Fettmasse aufwiesen (Tian et al. 2006). Weiterhin fand sich ein inverser Zusammenhang zwischen einem verringerten Geburtsgewicht und dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung sowie einer erhöhten Gefährdung für das Erleiden eines Schlaganfalls (Lawlor et al. 2005b). Als mögliche Ursache wurde ein gesteigertes Risiko einer Arteriosklerose der Arteria carotis bei den betroffenen Erwachsenen beschrieben (Martyn et al. 1998, Gale et al. 2002). In weiteren Untersuchungen zur Pathogenese der arteriellen Hypertonie bei Erwachsenen als Teil des 'small baby syndrome' fanden sich möglicherweise ursächliche Veränderungen an der Niere, wobei eine positive Korrelation zwischen dem Geburtsgewicht und der Anzahl an Glomeruli sowie ein inverser Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und der Größe einzelner Glomeruli in der Niere festgestellt wurden (Manalich et al. 2000, Luyckx und Brenner 2005, Gortner 2007).

Trotz dieser großen Anzahl epidemiologischer Studien, die den Zusammenhang zwischen einem verringerten Geburtsgewicht und dem späteren Risiko für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms beschreiben, bleibt die pathophysiologische Ursache des 'small baby syndrome' bislang ungeklärt. Aber gerade bei drastisch steigenden Zahlen an Erkrankungen des metabolischen Syndroms sind ätiopathogenetische Untersuchungen zur Entwicklung von Präventionsstrategien von größter Bedeutung.

### **1.3. Zur Terminologie eines verringerten Geburtsgewichts**

Bei der Beschreibung eines verringerten Geburtsgewichts unterscheidet man definitionsgemäß die Begriffe SGA (small for gestational age), IUGR (intrauterine growth restriction) und LBW (low birth weight), die nicht synonym verwendet werden können. Für die Zuordnung eines Neugeborenen als SGA ist das Vorliegen von Referenzdaten der gleichen ethnischen und geographischen Population erforderlich (Saenger et al. 2007). Mit dem Begriff SGA wird ein Neugeborenes bezeichnet, dessen Geburtsgewicht im Vergleich zur Referenzpopulation gleichen Gestationsalters unterhalb eines definierten Grenzwertes liegt (De Bernabé et al. 2004, Bryan und Hindmarsh 2006). Als häufig verwendete Grenzwerte werden ein Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile, der 3. Perzentile oder unterhalb von 2 Standardabweichungen vom Mittelwert Neugeborener gleichen Gestationsalters verwendet (De Bernabé et al. 2004, Bryan und

Hindmarsh 2006). Mit dem Begriff SGA wird lediglich das Geburtsgewicht beschrieben ohne Beachtung möglicher Ursachen. Dabei werden z.B. auch konstitutionell kleine Neugeborene als SGA erfasst (Lee et al. 2003, Bryan und Hindmarsh 2006). Die Bezeichnung 'low birth weight' wiederum wird für Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unterhalb von 2500 g, unabhängig von der Ursache und vom Gestationsalter angewandt (De Bernabé et al. 2004). Das Vorliegen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR) impliziert eine Verminderung des Gewichts aufgrund eines pathologischen Einflusses während der Gestation. Folglich kann der Fetus sein Wachstumspotential nicht voll ausschöpfen und das Geburtsgewicht ist vermindert (Bakketeig 1998, De Bernabé et al. 2004). Die Diagnosestellung IUGR erfordert mehrere Größen- und Gewichtsmessungen des Feten während der Gestation, so dass ein Abfallen des Perzentilenverlaufs in der Gewichtsentwicklung festgestellt werden kann (Saenger et al. 2007). Häufig ist eine genaue Zuordnung eines Neugeborenen als SGA oder IUGR zur Geburt nicht möglich, z.B. durch fehlende intrauterine Kontrolle des Wachstumsverlaufs. In den Beschreibungen der 'thrifty phenotype hypothesis' von Hales und Barker wird zur Charakterisierung der Neugeborenen ein niedriges Geburtsgewicht im Sinne eines 'low birth weight' und zum Teil ein geringer 'ponderal index' (GGW/Körperlänge<sup>3</sup>) verwendet, ohne Berücksichtigung möglicher genetischer, konstitutioneller oder pathologischer Ursachen (Barker 1995).

Insgesamt kommt es zu einer stetigen Zunahme des Anteils an Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht (LBW). In den USA lag er im Jahr 1984 bei 6,7 %, im Jahr 2002 bei 7,8 % (Arias et al. 2003) und im Jahr 2004 bereits bei 8,1 % (Hoyert et al. 2006). Ebenso war in Deutschland ein steigender Anteil an Neugeborenen mit einem verminderten Geburtsgewicht unter 2500 g zu verzeichnen, von 5,7 % im Jahr 1993 auf 6,5 % im Jahr 1999 (Rettwitz-Volk 2002). Zu den perinatalen Risiken und Folgen eines verringerten Geburtsgewichts bei reif geborenen Kindern zählen vermehrte postnatale Adaptationsstörungen mit häufigerer Notwendigkeit einer Intubation, eine gesteigerte Morbidität, z.B. einer Sepsis und eine 10fach erhöhte Mortalitätsrate (McIntire et al. 1999). Das Risiko einer infantilen Zerebralparese ist um das 4-6fache gegenüber den zur Geburt normalgewichtigen Kinder erhöht (Jarvis et al. 2003). Neben diesen perinatalen Risiken sind mögliche Langzeitfolgen beschrieben. So haben SGA-Kinder ein erhöhtes Risiko für Verzögerungen der kognitiven Entwicklung und für Verhaltensauffälligkeiten, was zu einem verminderten Erreichen eines Hochschulabschlusses führt (Pallotto und Kilbride 2006).

#### **1.4. Zur Pathophysiologie des 'small baby syndrome'**

Das 'small baby syndrome' beschreibt die Prädisposition von Kindern mit einem verminderten Geburtsgewicht für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms (Barker et al. 1993). Für die Erklärung dieses Zusammenhangs existieren mehrere Hypothesen. In der ursprünglich von den Arbeitsgruppen um Hales und Barker entwickelten 'thrifty phenotype hypothesis' wurde als zugrunde liegender Mechanismus ein verändertes Intrauterinmilieu, im Speziellen ein vermindertes Nährstoffangebot des Feten durch eine mütterliche Unterernährung während der Gestation, postuliert (Hales und Barker 1992, Barker et al. 1993, Hales und Barker 2001). Sie vermuteten, dass eine daraus resultierende Änderung des Phänotyps durch Wachstumsrestriktion des Feten insgesamt und im Besonderen durch eine gestörte Entwicklung einzelner Organe, wie z.B. des Pankreas, lebenslang anhaltende Stoffwechselveränderungen bewirkt, die zu einer besseren Anpassung des Feten an ein vermindertes Nahrungsangebot führen sollen (Hales und Barker 1992). Diese strukturellen Veränderungen in der Entwicklung von Leber, Pankreas, Niere, Gefäßen, usw. sollen aber auch für die Erkrankung an Symptomen des metabolischen Syndroms prädisponieren, z.B. eine verminderte  $\beta$ -Zellaktivität des Pankreas für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus. Bei zusätzlichem Auftreten von Adipositas, körperlicher Inaktivität und höherem Lebensalter wurde ein erhöhtes Erkrankungsrisiko an Symptomen des metabolischen Syndroms bei Neugeborenen mit diesem „sparsamen Phänotyp“ beschrieben (Hales und Barker 1992, Hales und Barker 2001).

Der Begriff 'thrifty phenotype' stellt eigentlich eine Modifikation eines Begriffs dar, den Neel im Jahr 1962 entwickelte, um die zunehmende Häufigkeit von Diabetes mellitus zu erklären. Er vermutete eine genetische Prädisposition für die Entwicklung eines Diabetes mellitus und verfasste die 'thrifty genotype hypothesis' (Neel 1962). Grundlage stellte seiner Meinung nach die während der Evolution entstandene Anpassung des Menschen an das Überleben bei verringertem und v.a. unregelmäßigem Nahrungsangebot mit häufigen Hungerphasen dar (Neel 1962). Durch eine niedrige Stoffwechselrate, sparsamen Salzverbrauch und eine schnelle Mobilisierung von Insulin nach Aufnahme von Kohlenhydraten kommt es zur Verminderung des Kohlenhydratverlustes und zur Speicherung von Energie für Zeiten des Hungers. Eine zivilisationsbedingte Änderung der Umweltbedingungen durch übermäßiges und v.a. regelmäßiges Nahrungsangebot wurde bei dieser genetischen Veranlagung mit rascher und vermehrter Insulinausschüttung für die Entwicklung von Übergewicht, Bluthochdruck und Typ 2 Diabetes mellitus verantwortlich gemacht (Neel 1962, Neel 1999, Sharma 1998, King und Roglic 1999).

Gluckman und Hanson entwickelten ein Modell, welches die beiden vorhergehenden Ansätze in Teilen beinhaltet (Gluckman und Hanson 2004). Inhalt ist die Anpassung des Feten an das intrauterine Milieu, das durch Nährstoffversorgung und Plazentafunktion vorgegeben wird. Dadurch kann es zu unmittelbaren Anpassungsvorgängen im Stoffwechsel, aber auch zu Störungen in der Organentwicklung mit Auswirkungen auf das spätere Leben kommen. Nach der Vorstellung von Gluckman und Hanson stellen die intrauterinen Bedingungen, z.B. die Nährstoffversorgung, ein Abbild der extrauterinen Bedingungen dar, die den Feten nach der Geburt erwarten und auf die er sich einstellt, um Überlebensvorteile in der postnatalen Phase zu haben (Gluckman und Hanson 2004). Kommt es zu einer Übereinstimmung der intrauterinen und postnatalen Bedingungen, so die Vorstellung, sollen die prädiktiven Veränderungen, z.B. von Stoffwechselfvorgängen des Feten, zu einem verringerten Krankheitsrisiko an Symptomen des metabolischen Syndroms führen. Kommt es allerdings zu einem 'mismatch' zwischen den vom Feten „erwarteten“ Milieu und den aktuellen Umweltbedingungen im späteren Leben, z.B. durch ein übermäßiges Nahrungsangebot, können je nach Ausmaß der Diskrepanz Krankheiten wie Adipositas oder Glukosetoleranzstörungen als Symptome des metabolischen Syndroms resultieren (Gluckman et al. 2005, Gluckman und Hanson 2006). Kritisch gegen die Verallgemeinerung dieser 'mismatch'-Theorie muss man aber z.B. das erhöhte Risiko bei Neugeborenen gestationsdiabetischer Mütter für das Erkranken an Adipositas und Glukosetoleranzstörungen bewerten. Obwohl diese Feten intrauterin an ein erhöhtes Nahrungsangebot durch eine Hyperglykämie gewöhnt waren, entwickeln sie postnatal trotz dem in den westlichen Industrieländern erhöhten Nahrungsangebot häufiger ein Übergewicht und Glukosetoleranzstörungen als Nachkommen nicht-gestationsdiabetischer Mütter (Plagemann et al. 1997). Bei Untersuchungen an Pima Indianern war das Erkrankungsrisiko für einen Diabetes mellitus sowohl bei den Kindern mit einem verringerten, als auch bei denen mit einem erhöhten Geburtsgewicht gesteigert und zeigte somit einen U-förmigen und keinen indirekten Zusammenhang zum Geburtsgewicht (McCance et al. 1994).

Während der Gestation wird die Ernährung des Feten zu einem großen Anteil durch Glukose als wichtigste Energiequelle sichergestellt, die aufgrund eines Konzentrationsgradienten vom mütterlichen Blut zum Fetus übertritt (Goodner und Thompson 1967, Holemans et al. 1998). Daneben stellt die Versorgung mit Aminosäuren eine wichtige Grundlage für den Zellaufbau dar. Bei einem Mangel an Glukose durch mütterliche Unterernährung kommt es zu einer vermehrten Verwendung von Aminosäuren zur Energiegewinnung (Battaglia und Meschia 1978). Aus dem gesteigerten Verbrauch von Aminosäuren und Laktat zur Energiegewinnung resultiert ein verminderter Muskel- und Fettzuwachs während der Gestation (Eriksson 1996). Normalerweise



ist es ab der zweiten Hälfte der Schwangerschaft möglich, dass in den Fettzellen Triglyceride zur Energiespeicherung synthetisiert werden. Bei Neugeborenen mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion zeigen sich spezielle Veränderungen dahingehend, dass sich neben dem Körpergewicht auch die Gesamtkörperfettmasse, die Hautfaltendicke, die Körperfettmasse als prozentualer Anteil vom Körpergewicht und das Fettzellgewicht vermindert (Enzi et al. 1981). Die prozentuale fettfreie Körpermasse ist im Gegenzug relativ erhöht (Petersen et al. 1988). Die Wachstumsrestriktion bei intrauterin mangelversorgten Feten betrifft nicht alle Organe gleichermaßen. So ist das Gewicht des Gehirns prozentual weniger betroffen als jenes anderer Organe wie z.B. der Leber. Diese asymmetrische Wachstumsrestriktion wird auch als 'brain sparing' bei IUGR-Feten bezeichnet und wurde am Tiermodell der Ratte untersucht (Evans et al. 1983). Ein von der Wachstumsrestriktion betroffenes Organ stellt das Pankreas dar. Bei der perinatalen Entwicklung des Pankreas werden drei Phasen unterschieden (Aerts und Van Assche 1981). Die fetale Anlage bei der Ratte erfolgt am 11. GT (Pictet et al. 1972). Das weitere Wachstum und die Zellzunahme setzen gegen Ende der Gestation und in einer zweiten Phase nach dem Absetzen vom Muttertier ein, wenn die kohlenhydratreiche Labordiät zugeführt wird. Während der Ernährung durch Muttermilch besteht normalerweise eine Ruhephase in der Pankreasentwicklung, da die Milch relativ kohlenhydratarm ist (Aerts und Van Assche 1981). Bei der physiologischen Entwicklung stellt die Glukose einen wichtigen Stimulationsfaktor bei der Replikation der  $\beta$ -Zellen des Pankreas dar (Hellerström und Swenne 1991). In den letzten zwei Tagen der Gestation kommt es dabei zu einer Verdopplung der fetalen  $\beta$ -Zellmasse (Eriksson und Swenne 1982). Auch das Angebot an Proteinen und Aminosäuren hat einen Einfluss auf die Entwicklung des Pankreas. Bei einem verminderten Angebot resultieren eine reduzierte Proliferationsrate und eine gesteigerte Apoptoserate der Inselzellen. Somit können sowohl ein Mangel an Glukose als auch an Aminosäuren, wie es bei Feten mit intrauteriner Wachstumsrestriktion zutreffen kann, zu einer Reduktion des endokrinen Pankreasgewebes und der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas führen (Fowden et al. 2005, De Prins und Van Assche 1982). Die verminderte Stimulation des fetalen Pankreas durch eine intrauterine Mangelernährung bedingt eine Hypoplasie des Pankreas, einen verminderten Insulingehalt und eine veränderte Insulinantwort auf Glukosestimuli und führt zu einem Auftreten einer fetalen Hypoinsulinämie (Holemans et al. 1998). Diese Beobachtung wurde auch bei humanen Neugeborenen gemacht, die z.B. durch vaskuläre Veränderungen der Plazenta bei mütterlicher Hypertonie während der Gestation eine intrauterine Wachstumsrestriktion aufweisen. Auch hier sind die Langerhansinseln des Pankreas klein und der Anteil Insulin-produzierender  $\beta$ -Zellen vermindert (Van Assche et al. 1977).

Als Antwort des Feten auf ein vermindertes intrauterines Nahrungsangebot kommt es zu einer Anpassung des fetalen Metabolismus, erkennbar an Veränderungen der Konzentration fetaler und plazentarer Hormone. Ein vermindertes Nahrungsangebot führt zu einem Absinken anabol wirkender Hormone wie Insulin oder IGF-I und zu einem Anstieg katabol wirkender Hormone wie z.B. von Glukokortikoiden (Phillips 1996). Neben einer Hypoglykämie kann auch eine Hypoxämie und Hypotension Stress für den Feten bedeuten, woraus eine erhöhte basale- und Stress-induzierte Glukokortikoidkonzentration während der Gestation resultiert. Diese erhöhten basalen Kortisolkonzentrationen wie auch eine gesteigerte Antwort auf ACTH in den Nebennieren waren im Erwachsenenalter bei ehemals wachstumsretardierten Neugeborenen nachweisbar (Fowden et al. 2005) und wurden als mögliche Ursache einer Prädisposition von Neugeborenen mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion für eine arterielle Hypertonie im höheren Lebensalter verantwortlich gemacht (Seckl und Meaney 2004).

Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung der Entwicklung einer Adipositas bzw. eines Übergewichts im Zusammenhang mit dem 'small baby syndrome'. Es wurde gezeigt, dass Adipositas und Übergewicht das Erkrankungsrisiko an einem metabolischen Syndrom maßgeblich steigern (Alberti et al. 2006, Tian et al. 2006). Bisher konnte allerdings noch in keiner Studie, auch unter Verwendung eines systematischen Reviews, ein unabhängiger Einfluss eines verringerten Geburtsgewichts auf das spätere Adipositasrisiko gezeigt werden (Harder et al. 2007b). Trotz dieser zahlreichen Untersuchungen und Hinweise auf mögliche Pathomechanismen für die Entstehung von Symptomen des metabolischen Syndroms bei Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, bleibt die genaue Pathophysiologie des 'small baby syndrome' bisher ungeklärt.

### **1.5. Konzepte der fetalen und perinatalen Programmierung**

Unter dem Begriff der Programmierung werden Veränderungen in der Entwicklung des Organismus bzw. von Organsystemen verstanden, die durch verschiedene Einflussfaktoren während kritischer Entwicklungsphasen sowohl pränatal als auch peri- und frühpostnatal entstehen und dauerhafte Veränderungen der Organe, der Funktion von Organsystemen sowie Störungen von Regelmechanismen, wie etwa von Stoffwechselfvorgängen, bedingen (Dörner 1974a, Dörner 1974b, Plagemann 2004, Harder et al. 2007a, McMillen und Robinson 2005). Es findet mittlerweile breite Akzeptanz, dass Alterationen des intrauterinen oder frühpostnatalen Milieus, wie z.B. die Ernährung sowie metabolische und hormonelle Umgebungsbedingungen,

zu lebenslang anhaltenden Veränderungen von Stoffwechselfvorgängen und einer erhöhten Prädisposition von Erkrankungen im späteren Leben führen können (Plagemann 2004).

Im Jahr 1966 entwickelte Dubos das Konzept eines „biologischen Freudianismus“ und bezeichnete damit den lebenslang anhaltenden Einfluss eines veränderten perinatalen und frühpostnatalen Milieus auf die Körpergewichtsentwicklung bei Mäusen. Eine veränderte Ernährung der Mutter während der Laktation durch spezielle Diäten, z.B. einer Glutendiät, oder auch eine subklinische Infektion von neugeborenen Mäusen am 2. Lebenstag bedingt eine anhaltende Reduktion des Körpergewichts bis in das adulte Alter (Dubos et al. 1966).

Es folgten Arbeiten von Dörner, der den Begriff der „prä- und neonatalen Programmierung“ einführte und damit dauerhafte Störungen von Reproduktions- und Stoffwechselfvorgängen sowie der Informationsverarbeitung, verursacht durch eine fetale Exposition gegenüber einem alterierten Intrauterinmilieu, beschrieb (Dörner 1974a, Dörner 1974b, Dörner 1975a, Dörner 1975b). Eine Erweiterung erfuhr das Konzept durch die Arbeiten von Freinkel und Metzger, die den Einfluss einer veränderten Nährstoffversorgung am Beispiel eines Gestationsdiabetes und die Auswirkungen auf die fetale Entwicklung untersuchten (Freinkel und Metzger 1979, Freinkel 1980).

Besonders die Arbeiten von Hales und Barker Anfang der 90iger Jahre mit dem Postulat eines 'small baby syndrome' führten zu einer breiten Akzeptanz des Konzeptes einer fetalen Programmierung. Dabei wurde die Prädisposition von Kindern mit einem verringerten Geburtsgewicht durch intrauterine Mangelversorgung für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms wie Glukosetoleranzstörung, Bluthochdruck und Hyperlipidämie beschrieben (Hales et al. 1991, Hales und Barker 1992, Barker et al. 1993). Bei Auftreten dieser Stoffwechselstörungen weisen die betroffenen Personen ebenfalls einen höheren BMI im Erwachsenenalter auf (Hales et al. 1991, Barker et al. 1993).

Zur Beschreibung und näheren Untersuchung von Mechanismen einer intrauterinen Programmierung wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen weitere Begriffe wie z.B. 'functional neuroteratology' (Swaab et al. 1988), 'nutritional programming' (Lucas 1991) sowie das 'metabolic imprinting' (Waterland und Garza 1999) eingeführt, denen allen die Grundlage einer umweltabhängigen, prä- und frühpostnatalen Prägung grundlegender Lebensprozesse gemein ist (Plagemann 2005a).

## **1.6. Experimentalmodelle der fetalen und perinatalen Programmierung**

Als wichtiges Konzept der perinatalen Programmierung entwickelte Dörner die funktionelle Teratologie. Diese beschreibt als Grundlage der Regulation sämtlicher Lebensprozesse das Neuro-Endokrino-Immun-System. Als bedeutsamer Mittler sowohl im Zusammenspiel dieser einzelnen Systeme untereinander als auch zwischen Umwelt und genetischem Material dienen Hormone (Dörner 1975a, Dörner 1975b). Abnorme Hormonkonzentrationen, denen ein Fetus während kritischer neuroendokriner Differenzierungs- und Entwicklungsphasen ausgesetzt ist, können zu einer lebenslangen Fehlorganisation und Fehlfunktion in der Regulation lebenswichtiger Prozesse, etwa des Stoffwechsels, führen (Plagemann 2005a). Beispielsweise stellt bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme und Körpergewichtsregulation der Hypothalamus mit seinen Kernen, wie z.B. dem Nucleus arcuatus (ARC), ein bedeutendes zentrales Steuerungsorgan dar, welches aus einem Netzwerk von Neuronen besteht, die orexigene, d.h. die Nahrungsaufnahme und den Appetit steigernde Peptide und anorexigene, d.h. die Nahrungsaufnahme hemmende Peptide, synthetisieren (Kalra et al. 1999). Die Freisetzung und Regulation dieser Peptide wird u.a. durch periphere Signale wie Leptin und Insulin gesteuert. Veränderungen der physiologischen Leptin- und Insulinkonzentrationen während kritischer Entwicklungsphasen des ARC bewirken dauerhafte Störungen in der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Körpergewichtsregulation (Plagemann et al. 1992a, Plagemann 2006).

Eine wesentliche Ursache für hormonelle Veränderungen stellt der Gestationsdiabetes dar, wobei die Feten einem erhöhten mütterlichen Blutglukosespiegel ausgesetzt sind. Die Entwicklung eines Tiermodells an der Ratte ermöglichte zahlreiche Untersuchungen zu den Auswirkungen eines Schwangerschaftsdiabetes (Aerts und Van Assche 1977, Aerts und Van Assche 1979). So finden sich z.B. strukturelle Veränderungen des Pankreas, insbesondere eine Inselzellhypertrophie bei neugeborenen Ratten von Müttern mit einem Gestationsdiabetes (Aerts und Van Assche 1977, Aerts und Van Assche 1981). Zahlreiche Studien unserer Arbeitsgruppe beschrieben Auswirkungen eines Gestationsdiabetes bei Ratten auf die Entwicklung von Übergewicht und diabetogenen Stoffwechselstörungen bei den Nachkommen. Bereits am 1. LT ist eine signifikante Hyperinsulinämie und erhöhte Insulinkonzentration im Hypothalamus nachweisbar (Plagemann et al. 1998). Die unphysiologische Erhöhung hypothalamischer Konzentrationen an Insulin während kritischer Entwicklungsphasen des Hypothalamus führt zu einer Hyperphagie, Hyperinsulinämie, gestörten Glukosetoleranz und Übergewicht bei den Nachkommen im adulten Alter, wobei histologisch signifikant erhöhte Zahlen orexigener

Neurone im Nucleus arcuatus nachweisbar sind (Plagemann et al. 1998, Plagemann et al. 1999a). Diese neuronalen Veränderungen lassen sich allerdings vermeiden, wenn eine Behandlung des Gestationsdiabetes bei trächtigen Ratten durch eine Inselzelltransplantation während der Gestation erfolgt (Harder et al. 2001, Harder et al. 2003, Franke et al. 2005).

Neben dem Schwangerschaftsdiabetes wurden auch die Auswirkungen einer diätetischen Manipulation bei der Rattenmutter während der Gestation auf die Nachkommen untersucht. Veränderungen der maternalen Ernährung beinhalteten zum einen eine Überernährung, die z.B. durch einen erhöhten Fettanteil mit gesättigten Fettsäuren der Nahrung realisiert wurde. Nachkommen der betroffenen Rattenweibchen weisen Zeichen einer Insulinresistenz, einen gestörten Fettstoffwechsel und einen erhöhten Blutdruck im adulten Alter auf (Bertram und Hanson 2001, Armitage et al. 2004, Khan et al. 2005). Eine Überernährung von neugeborenen Ratten wurde durch Aufzucht in kleinen Würfen erreicht, in denen die Tierzahl pro Mutter vom 3.-21. LT auf 3 Tiere reduziert wurde. Nachkommen aus diesem Modell weisen im juvenilen und adulten Alter ein erhöhtes Körpergewicht, eine Hyperinsulinämie, gestörte Glukosetoleranz, eine Hypertriglyceridämie und einen erhöhten systolischen Blutdruck auf (Plagemann et al. 1999c, Plagemann et al. 1999d, Plagemann 2005b, Boullu-Ciocca et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurden vielfach die Auswirkungen einer mütterlichen Mangelernährung während der Gestation untersucht. Dabei unterscheidet man eine insgesamt verminderte Nahrungszufuhr (Garofano et al. 1999, Holemans et al. 1999) von einer selektiven Verminderung einzelner Nahrungsbestandteile wie z.B. einer 'low protein' Diät (Dahri et al. 1991, Muaku et al. 1996). Nachkommen von Rattenmüttern, die während der Gestation einer Mangelernährung ausgesetzt waren, haben ein verringertes Geburtsgewicht (Muaku et al. 1996, Garofano et al. 1999), zeigen aber in der weiteren Entwicklung keine Hinweise für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms, so dass keine Übereinstimmung zum 'small baby syndrome' besteht (Plagemann 2001, siehe auch unter 1.8., S. 25).

Als weiteres Beispiel einer fetalen Programmierung wurde in einem Modell an der Ratte der Einfluss einer erhöhten fetalen Exposition von Glukokortikoiden untersucht, die durch direkte Applikation während der Gestation oder durch pränatalen Stress erreicht wurde. Betroffene Nachkommen entwickeln im adulten Alter einen erhöhten Blutdruck, erhöhte Blutzuckerspiegel sowie Zeichen einer Insulinresistenz (Cleasby et al. 2003, Lesage et al. 2004, O'Regan et al. 2004). Auch weisen neugeborene Ratten, die während der frühpostnatalen Phase durch eine tägliche Separation von der Mutter Stress ausgesetzt sind, im späteren Leben eine gesteigerte Hypophysen-Nebennieren Aktivität nach akuten Stresssituationen auf (Plotsky und Meaney 1993, Liu et al. 2000, Meaney 2001). Dabei fand sich als mögliche Ursache eine gestörte

negative Feedbackregulation durch eine Verminderung zentraler Glukokortikoidrezeptoren (Ladd et al. 2004, Meaney et al. 1996).

Innerhalb der verschiedenen tierexperimentellen Ansätze konnten mögliche Mechanismen einer fetalen und perinatalen Programmierung aufgezeigt werden. Dennoch bleibt gerade im Zusammenhang mit dem 'small baby syndrome' die Ätiopathogenese unklar. Aus den bisherigen tierexperimentellen Ansätzen resultierten oft widersprüchliche Ergebnisse und die Tiere weisen im adulten Alter oftmals keine Hinweise auf Symptome des metabolischen Syndroms auf.

### **1.7. Bedeutung der frühpostnatalen Ernährung und Körpergewichtsentwicklung als Risikofaktoren für das metabolische Syndrom**

In mehreren Arbeiten von Dörner wurde die Bedeutung der perinatalen Ernährungssituation bei der Prävalenz des Diabetes mellitus und der Adipositas im adulten Alter diskutiert (Dörner et al. 1984, Dörner et al. 1985). So zeigten Nachkommen aus relativ kalorienarmen Geburtsjahrgängen während und nach dem 2. Weltkrieg eine geringere Prävalenz eines Diabetes mellitus und einer Adipositas im adulten Alter als Nachkommen aus kalorienreichen Geburtsjahrgängen zu Zeiten des Friedens (Dörner 1973, Dörner und Mohnike 1977, Dörner et al. 1984, Dörner et al. 1985, Dörner und Plagemann 1994). Auch Ravelli und Mitarbeiter beschrieben diesen Zusammenhang bei Männern, die zwischen 1944-45 zur Zeit der Hungersnot in den Niederlanden geboren wurden (Ravelli et al. 1976). Das Auftreten einer Adipositas bei den 19jährigen Männern war signifikant verringert, wenn die Mütter während des letzten Trimesters der Schwangerschaft oder in den ersten Monaten nach der Geburt von der Hungersnot betroffen waren. Dagegen zeigten die Männer ein signifikant erhöhtes Risiko einer Adipositas, wenn die Mütter in der ersten Hälfte der Schwangerschaft an Hunger litten und im weiteren Verlauf eine vergleichsweise kalorienreichere Ernährungssituation vorlag (Ravelli et al. 1976).

In weiteren Untersuchungen von Dörner und Mohnike fand sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Gewichtszunahme in den ersten drei Lebensmonaten und dem Risiko eines erhöhten Körpergewichts mit 6 und 15 Jahren (Dörner und Mohnike 1977). Es folgten Studien, die den Zusammenhang einer gesteigerten frühpostnatalen bzw. frühkindlichen Gewichtszunahme bis zum 2. Lebensjahr und dem später erhöhten Risiko eines Übergewichts und einer gesteigerten Körperfettmasse bestätigten (Ong et al. 2000, Stettler et al. 2002, Stettler et al. 2003, Cameron et al. 2003, Baird et al. 2005, Ekelund et al. 2006, Karaolis-Danckert et al.

2006). Neben dem Risiko für die Entwicklung eines Übergewichts wiesen Neugeborene nach einer gesteigerten frühkindlichen Gewichtszunahme auch eine erhöhte Disposition für die Erkrankung an Symptomen des metabolischen Syndroms und ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko im Erwachsenenalter auf (Eriksson et al. 1999, Ekelund et al. 2007).

Für die Beurteilung des Wachstums Neugeborener und Kinder dienen populations- und geschlechtsbezogene Perzentilenkurven (Robson et al. 1975, WHO Multicentre growth reference study group 2006, Kromeyer 1994), wobei sich ein normales Wachstum entlang einer bestimmten Perzentilenkurve vollzieht (Wit und Boersma 2002). Bei der Beschreibung eines gesteigerten frühpostnatalen Wachstums unterscheidet man ein 'catch-up growth' von einem 'rapid neonatal weight gain' (Weaver 2006). Mit 'catch-up growth' wird eine während einer bestimmten Wachstumsphase gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit, z.B. ein Wert mehr als zwei Standardabweichungen oberhalb des Mittelwertes oder ein Wert oberhalb des alters- und geschlechtsbezogenen Medians, bezeichnet (Wit und Boersma 2002, Saenger et al. 2007). Es tritt nach einer Periode des gehemmten Wachstums auf, z.B. nach einer intrauterinen Wachstumsrestriktion oder auch nach einer postnatalen Phase der Mangelernährung, und führt im Idealfall zum Erreichen der ursprünglichen Perzentilenkurve (Wit und Boersma 2002, Weaver 2006). Normalerweise ist sowohl das Längenwachstum, als auch die Zunahme von Muskel- und Fettgewebe betroffen, was sich in einem die Perzentilen nach oben durchschneidenden Wachstum zeigt (Weaver 2006).

Ein 'rapid weight gain' oder auch akzeleriertes Wachstum kann zu jedem Zeitpunkt auftreten und wird hauptsächlich durch eine gesteigerte Energiezufuhr verursacht, woraus eine vermehrte Anlage von Fettgewebe ohne gesteigertes Längenwachstum resultiert (Weaver 2006). Auch hierbei kommt es zu einem Durchschneiden der Gewichtszentilen nach oben. Eine häufig angewendete Definition für 'rapid neonatal weight gain' beinhaltet eine Änderung des Gewichts von mindestens 0,67 Standardabweichungen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes, z.B. des frühen Kindesalters, was einem Sprung auf die nächst höhere Perzentile entspricht (Bsp. 2., 10., 25., 50., 75., 90., 98. Perzentile) (Ong und Loos 2006).

Frühpostnatales Aufholwachstum bzw. 'catch-up growth' ist bei ca. 90 % der Neugeborenen mit einer Wachstumsrestriktion nachweisbar. Es findet meist in den ersten beiden Lebensjahren statt und führt zum Erreichen einer Endgröße  $>-2SD$  der mittleren Größe der Referenzpopulation (Karlberg und Albertsson-Wikland 1995, Albertsson-Wikland und Karlberg 1997). Es wurden zahlreiche Vorteile beschrieben. So ist ein 'catch-up growth' bei SGA-Neugeborenen verbunden mit einer verringerten Morbidität und Mortalität im Kindesalter (Victora et al. 2001, Weaver 2006). Es gibt ebenfalls Hinweise, dass sich ein Aufholwachstum bis zum zweiten Lebensjahr

positiv auf die neurokognitive Entwicklung auswirkt, was mit einem höheren Entwicklungs- und Intelligenzquotienten korreliert (Brandt et al. 2003, Latal-Hajnal et al. 2003, Lundgren et al. 2001, Yeung 2006).

Dagegen wurde aber auch in mehreren Studien, sowohl bei Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht als auch bei AGA-Neugeborenen, ein positiver Zusammenhang zwischen einer erhöhten Gewichtszunahme im frühen Kindesalter bis zu 2 Jahren, d.h. von einem 'rapid neonatal weight gain', und dem späteren Risiko für die Entwicklung eines Übergewichts sowie von Symptomen des metabolischen Syndroms und kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Crowther et al. 1998, Eriksson et al. 1999, Forsén et al. 1999, Hyppönen et al. 2003, Stettler et al. 2003, Fagerberg et al. 2004, Ong et al. 2000). Jaquet und Mitarbeiter wiesen bei Neugeborenen mit intrauteriner Wachstumsrestriktion das Auftreten von erhöhten Nüchterninsulinwerten als Zeichen einer verminderten Insulinsensitivität im adulten Alter nach. Diese Anzeichen einer Insulinresistenz korrelierten positiv mit der Gewichtszunahme, die sich in einer Zunahme des BMI bis zum 22. Lebensjahr zeigte, und waren unabhängig vom BMI im Erwachsenenalter (Jaquet et al. 2005). Auch andere Arbeitsgruppen fanden bei SGA-Neugeborenen nach einer starken frühkindlichen Gewichtszunahme Zeichen einer Insulinresistenz (Crowther et al. 2000, Fewtrell et al. 2000, Soto et al. 2003, Ibáñez et al. 2006). Als eine mögliche Ursache wird eine bei der Zunahme der Fettmasse sich ausbildende Umverteilung mit v.a. zentraler Fetttanklagerung diskutiert (Ong et al. 2000, Ong und Dunger 2004, De Zegher et al. 2005, Ibáñez et al. 2006, Ong 2006, Tappy 2006). Allgemein gelten eine gesteigerte Fettmasse und eine v.a. zentrale Fettverteilung als Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus (Wajchenberg 2000).

Die frühpostnatale Gewichtsentwicklung bei Neugeborenen wird v.a. durch die Ernährung bestimmt. Die natürliche Form der Säuglingsernährung stellt das Stillen dar, das von nationalen und internationalen Fachorganisationen explizit empfohlen wird (WHO, UNICEF 2003, American Academy of Pediatrics 2005, Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 2006, Nationale Stillkommission am BfR 2004). Neben den positiven Effekten des Stillens auf die Förderung der Mutter-Kind Beziehung (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 2006), senkt das Stillen auch das Risiko für akute Erkrankungen, z.B. der Otitis media, Atemwegsinfekten und Gastroenteritiden, chronischen Erkrankungen, wie z.B. das atopische Ekzem und Typ 2 Diabetes mellitus (Ip et al. 2007, American Academy of Pediatrics 2005) sowie das Risiko der Entwicklung von Übergewicht und Adipositas im juvenilen und adulten Alter (Kramer 1981, Gillman et al. 2001, Arenz et al. 2004, Grummer-Strawn und Mei 2004, Owen et al. 2005a, Owen et al. 2005b, Harder et al. 2005, Plagemann und Harder 2005a).



Weitere Studien fanden einen positiven Effekt des Stillens auf die Reduktion des systolischen Blutdrucks bei den Nachkommen im juvenilen Alter (Martin et al. 2004, Lawlor et al. 2005a) sowie Hinweise auf ein vermindertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Rich-Edwards et al. 2004) und weitere Symptome des metabolischen Syndroms (Plagemann und Harder 2005a, Singhal 2006). Schließlich hat das Stillen auch Auswirkungen auf die kognitive Entwicklung. So zeigen gestillte Neugeborene eine bessere kognitive Entwicklung bis zum Schulalter (Rao et al. 2002, Slykerman et al. 2005). Als eine mögliche Ursache wird die Zusammensetzung der Muttermilch mit dem Anteil an Hormonen und langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren gesehen (Lucas 1998, Birch et al. 2000). Diese Tatsache konnte auch bei SGA-Neugeborenen nachgewiesen werden, die von einer Stilldauer von 24 Wochen hinsichtlich ihrer kognitiven Entwicklung profitierten (Rao et al. 2002, Morley et al. 2004). Allerdings gibt es bisher keine Studie, die einen Einfluss des Stillens auf die Entstehung von Symptomen des metabolischen Syndroms explizit bei SGA-Neugeborenen untersuchte (Clayton et al. 2007).

### **1.8. Tierexperimentelle Untersuchungen des 'small baby syndrome'**

Die Ursachen eines verminderten fetalen Wachstums und eines resultierenden verminderten Geburtsgewichts lassen sich einteilen in fetale (z.B. chromosomale oder genetische Veränderungen), maternale (z.B. Alter, akute und chronische Erkrankungen, Einnahme teratogener Noxen) und plazentare Störungen (z.B. vaskuläre Veränderungen). Am häufigsten kommt es aber durch ein Zusammenspiel aller Einzelfaktoren zu einem gestörten mütterlich-plazentare-fetalen Stofftransport mit resultierender fetaler Unterversorgung (Bernstein und Divon 1997, Lee et al. 2003, De Bernabé et al. 2004). Bei ca. 40 % der Neugeborenen mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion ist die Ursache bekannt und wird bedingt z.B. durch Infektionen, teratogene Noxen, mütterliche Erkrankungen oder mütterliche Unterernährung (Ghidini 1996).

Zur Untersuchung von Mechanismen einer fetalen und perinatalen Programmierung in Zusammenhang mit dem 'small baby syndrome' wurden diverse Tiermodelle entwickelt, die durch verschiedene Einflussfaktoren während der Gestation zu einer intrauterinen Wachstumsrestriktion der Feten führen sollten. Das mit am meisten verwendete Modell stellt die mütterliche Mangelernährung während der Gestation dar, die entweder durch eine verringerte Kalorienzufuhr oder durch eine Proteinrestriktion erreicht wird (Garofano et al. 1999, Holemans et al. 1999, Dahri et al. 1991, Muaku et al. 1996). Betroffene Nachkommen nach einer mütterlichen Mangelernährung während der Gestation weisen ein verringertes Geburtsgewicht

auf (Muaku et al. 1996, Garofano et al. 1999). Dennoch konnten an Langzeituntersuchungen dieser Tiere keine konsistenten Übereinstimmungen zu Beobachtungen aus epidemiologischen Studien zum 'small baby syndrome' mit Entstehung von Symptomen des metabolischen Syndroms bei Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht gezeigt werden (Plagemann 2001). So fand sich in der späteren Entwicklung von neugeborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht eine anhaltende Verminderung des Körpergewichts (Holemans et al. 1999, Muaku et al. 1996, Ozanne et al. 1999, Plagemann 2001), eine anhaltend verminderte Nahrungsaufnahme (Petry et al. 1997, Plagemann 2001) und eine normale Glukosetoleranz im Alter von 3 Monaten bzw. 1 Jahr (Petry et al. 1997, Garofano et al. 1999). Des Weiteren wiesen die Nachkommen nach mütterlicher Mangelernährung keine Unterschiede im systolischen Blutdruck und der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe im adulten Alter auf (Holemans et al. 1999, Plagemann 2001). Schließlich zeigten diese Tiere sogar eine höhere Lebenserwartung unter der Voraussetzung, dass das Körpergewicht auch im adulten Alter verringert war (Ozanne und Hales 2004, Langley-Evans und Sculley 2006).

Während die Mangelernährung in den Entwicklungsländern ein bedeutsames Problem darstellt, hat sie als Ursache der intrauterinen Wachstumsrestriktion in den industrialisierten Ländern nur eine untergeordnete Bedeutung. Hier nimmt v.a. eine reduzierte uteroplazentare Perfusion, verursacht durch eine vaskuläre Insuffizienz mit assoziiertem verminderten placentaren Stofftransport und fetaler Hypoxie, z.B. durch mütterliche Hypertonie oder Nikotinabusus, als Risikofaktor der Wachstumsverzögerung einen großen Stellenwert ein (Huizinga et al. 2004, Gagnon 2003). Über viele Jahrzehnte war das Modell der Arteria uterina Ligatur bei Ratten der am meisten verwendete tierexperimentelle Ansatz zur Untersuchung einer intrauterinen Wachstumsrestriktion durch uteroplazentare Insuffizienz (Evans et al 1983). Entwickelt wurde dieses Modell von Wigglesworth, der eine einseitige Ligatur der Arteria uterina an der trächtigen Ratte im letzten Drittel der Schwangerschaft durchführte, um durch Reduzierung der placentaren Durchblutung Nachkommen mit einer Wachstumsrestriktion zu erzeugen (Wigglesworth 1964). Zahlreiche Arbeitsgruppen verwendeten dieses Modell in den folgenden Jahren, z.T. nach Abwandlung zu einer beidseitigen Ligatur, zur Untersuchung des 'small baby syndrome' (Simmons et al. 2001, Styruud et al. 2005).

Im Gegensatz zu den operativen Methoden wurde in anderen Modellen der Sauerstoffgehalt der Raumluft reduziert (Tapanainen et al. 1994) oder eine Stressbelastung (Lesage et al. 2004) bzw. Hyperthermie (Hensleigh und Johnson 1971) während der Gestation untersucht. Als weitere bedeutende Ursache für ein vermindertes Geburtsgewicht bei Neugeborenen gilt das Rauchen während der Schwangerschaft (Hoyert et al. 2006). Der Anteil an rauchenden Frauen während

der Gestation betrug in den USA im Jahr 2004 ca. 10 % (Hoyert et al. 2006). Die tierexperimentelle Untersuchung des Einflusses einer intrauterinen Nikotinexposition auf die Feten ergab allerdings unterschiedliche Auswirkungen auf das Geburtsgewicht der Nachkommen. Einige Studien fanden keine Unterschiede im Geburtsgewicht der neugeborenen Ratten (Birnbaum et al. 1994, Witschi et al. 1994). Dagegen war bei anderen Arbeitsgruppen das Körpergewicht der betroffenen Nachkommen zur Geburt vermindert, was aber auch mit einer reduzierten Nahrungsaufnahme der trächtigen Rattenweibchen während der Gestation unter Nikotineinfluss verbunden war (Bassi et al. 1984, Leichter 1995).

Der aktuell diskutierte Einfluss der frühpostnatalen Ernährung und insbesondere der Überernährung wurde ebenfalls unter Zuhilfenahme von Tiermodellen untersucht. Ein geeignetes Tiermodell stellt das Modell der kleinen Würfe dar, in dem durch Verringerung der Primärwurfgröße bei Ratten ein Überangebot an Muttermilch bei den Neugeborenen erzeugt wird (Babický et al. 1973, Fiorotto et al. 1991). Durch Verkleinerung des Rattenwurfes kommt es neben dem relativ gesteigerten Angebot an Muttermilch für jedes einzelne Tier auch zu einer qualitativen Änderung der Milchzusammensetzung durch eine Erhöhung der Fettkonzentration (Fiorotto et al. 1991). In zahlreichen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine Aufzucht von zur Geburt normalgewichtigen Ratten vom 3.-21. LT in diesen kleinen Würfen/Nestern zu einer Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms führt. Die Nachkommen weisen eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und vermehrte Fettakkumulation auf, haben ein erhöhtes Körpergewicht, eine Hyperinsulinämie, gestörte Glukosetoleranz, eine Hypertriglyceridämie und einen erhöhten systolischen Blutdruck (Plagemann et al. 1992b, Plagemann et al. 1999b, Plagemann et al. 1999c, Plagemann et al. 1999d). Dagegen entwickeln zur Geburt normalgewichtige Ratten unter einer relativen Unterernährung durch Aufzucht in großen Würfen mit 18 Tieren pro Mutter ein Untergewicht und haben verminderte Serumkonzentrationen an Leptin und Insulin am 21. LT (Plagemann et al. 1999d).

Die bisherigen Untersuchungen zum 'small baby syndrome' lieferten zahlreiche Hinweise für mögliche pathophysiologische Ursachen. Ein Kritikpunkt an den bestehenden Tiermodellen besteht allerdings darin, dass bei den betroffenen Tieren jeweils nur Teilsymptome des metabolischen Syndroms nachweisbar sind und es zu keiner Manifestation des vollständigen Symptomkomplexes kommt (Bertram und Hanson 2001). Auch aus diesem Grund sind weitere tierexperimentelle Untersuchungen dringend notwendig, um ätiopathogenetische Faktoren des 'small baby syndrome' zu ermitteln und daraus mögliche Präventionsmaßnahmen zu entwickeln.

## II. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Ätiopathogenese des 'small baby syndrome' dargestellt. Wir führten diese in zwei tierexperimentellen Studien und einer Metaanalyse durch und untersuchten speziell den Einfluss eines verringerten Geburtsgewichts und den Einfluss einer frühpostnatalen Überernährung auf das Risiko für die Entwicklung von Übergewicht, Stoffwechselstörungen und Bluthochdruck im Sinne des metabolischen Syndroms.

- 1) Epidemiologisch wurde ein Zusammenhang zwischen einem verringerten Geburtsgewicht und dem später erhöhten Risiko für Stoffwechselerkrankungen im Sinne des metabolischen Syndroms gezeigt. Tierexperimentelle Untersuchungen stützen sich v.a. auf das Modell der Arteria uterina Ligatur bei Ratten. Trotz der vielfachen Anwendung wurde dieses Modell bisher allerdings noch nicht auf seine Eignung zur Untersuchung dieses Zusammenhangs geprüft. Wir untersuchten Nachkommen aus diesem Tiermodell bis zum Absetzen vom Muttertier am 21. LT hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichts und von Stoffwechselfparametern wie Blutglukose, Triglyceride, Insulin, Insulin/Blutglukoseratio und Leptin, um die Entstehung von diabetogenen und/oder Fettstoffwechselstörungen zu erfassen.

Zur weiteren Validierung dieses Tiermodells erfolgte zusätzlich eine systematische Literatursuche und eine Metaanalyse der international veröffentlichten Studien an diesem Modell der Arteria uterina Ligatur.

- 2) Neben einem verringerten Geburtsgewicht an sich wird zunehmend die Bedeutung der frühpostnatalen Ernährung als wichtiger Einflussfaktor auf die spätere Entwicklung des Körpergewichts und von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms diskutiert. Es ist bekannt, dass eine frühpostnatale Überernährung bei Ratten das spätere Risiko für die Entwicklung von Übergewicht, diabetogenen Stoffwechselstörungen und Bluthochdruck steigert. Die Ausbildung eines Übergewichts bzw. einer Adipositas gilt als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von diabetogenen Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms. Wir untersuchten deshalb die Bedeutung einer frühpostnatalen Überernährung bei neugeborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht. Dabei verwendeten wir erstmals Ratten aus einem genuinen Tiermodell, d.h. ohne Manipulation während der Gestation, und untersuchten die Nachkommen hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichts, der Stoffwechselfparameter und des Blutdrucks bis in das adulte Alter von 360 Tagen.

### **III. Modell der Arteria uterina Ligatur und Metaanalyse der internationalen Literatur**

#### **3.1. Fragestellung**

##### **3.1.1. Modell der Arteria uterina Ligatur**

Zur Untersuchung pathophysiologischer Ursachen des 'small baby syndrome' finden zahlreiche tierexperimentelle Modelle ihre Anwendung (Holemans et al. 2003). Zu den in diesem Zusammenhang am häufigsten verwendeten Tiermodellen zählt das Modell der Arteria uterina Ligatur, welches ursprünglich von Wigglesworth entwickelt wurde (Wigglesworth 1964). Die Ratte gehört zu den Tieren mit einem Uterus bicornus. Die Blutversorgung wird durch die Arteria uterina aus der Arteria iliaca interna und durch die Arteria ovarica aus der Aorta gewährleistet, die beidseits eine Anastomose bilden (Even et al. 1994). Ziel einer einseitigen Ligatur der Arteria uterina war eine verminderte fetale Blutversorgung, die aus der alleinigen Versorgung aller Feten des betroffenen Uterushorns aus der Arteria ovarica resultierte (Wigglesworth 1964). In diesem ursprünglichen Modell wurden einseitig eine doppelte Ligatur der Arteria uterina nahe am Abgang von der Arteria iliaca interna sowie eine dritte Ligatur im Mesometrium am 17. GT durchgeführt und die Nachkommen zwischen dem 21. und 22. Gestationstag per sectio und Tötung der Mutterratten geboren. Nach der Geburt per sectio wiesen die Nachkommen aus dem uterinen Horn mit einer Arteria uterina Ligatur allerdings ein deutlich vermindertes Überleben, v.a. durch eine gestörte Respiration, auf (Wigglesworth 1964). In unserem tierexperimentellen Ansatz war die postnatale Untersuchung der Neugeborenen geplant und somit ein Überleben der Feten nach der Geburt notwendig. Aus diesem Grund wurde eine beidseitige Arteria uterina Ligatur durchgeführt. Damit waren alle Feten einer Rattenmutter derselben Gruppe zugehörig und es war eine Spontangeburt möglich, die zum einen den natürlichen Geburtsmodus darstellt und auch das sofortige Säugen der neugeborenen Ratten durch das Muttertier eher gewährleistet als nach Durchführung einer Sectio bei der Mutterratte. Die Nachkommen wurden bis zum 21. LT hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichts sowie auf mögliche Veränderungen von Stoffwechselfparametern, die auf die Entstehung eines metabolischen Syndroms hinweisen könnten, untersucht. Die Aufzucht erfolgte unter Normalbedingungen, d.h. in einer festgelegten Wurfgröße von 10 Tieren pro Mutter und ohne äußere Manipulation bis zum Absetzen der Tiere am 21. LT.

Wir untersuchten folgende Fragestellungen:

1. Wie verhält sich das mittlere Geburtsgewicht der Nachkommen nach Arteria uterina Ligatur im Vergleich zur Kontrollgruppe?
2. Wie hoch ist der Anteil wachstumsretardierter Tiere im Gesamtwurf?
3. Gibt es Geschlechtsunterschiede bei der Ausprägung einer intrauterinen Wachstumsrestriktion nach Arteria uterina Ligatur?
4. Wie verhalten sich die Nachkommen in Bezug auf die Entwicklung des Körpergewichts bis zum Absetzen von der Mutter am 21. LT?
5. Bestehen Unterschiede bei Stoffwechselfparametern am 21. LT als Hinweis auf die Entwicklung bzw. „Programmierung“ von Symptomen des metabolischen Syndroms?

### **3.1.2. Metaanalyse zum Modell der Arteria uterina Ligatur**

Die tierexperimentelle Forschung dient neben der Untersuchung pathophysiologischer Zusammenhänge auch der Entwicklung von Präventions- und Behandlungsstrategien mit dem Ziel der Umsetzung in die klinische Medizin. Die gewissenhafte Übertragung in die klinische Medizin erfordert v.a. valide Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien. Es wäre fatal, Schlüsse zur Pathogenese und folglich zu Behandlungsstrategien bestimmter phänomenologischer Zusammenhänge aus mangelhaft evaluierten Experimentalansätzen zu ziehen. Die Anwendung eines tierexperimentellen Ansatzes über viele Jahre allein bietet keine ausreichende Begründung für ein funktionierendes Tiermodell (Pound et al. 2004). Viele Arbeitsgruppen führten ihre Untersuchungen zum 'small baby syndrome' am Modell der Arteria uterina Ligatur durch. Trotz häufiger Anwendung wurde dieser Ansatz bisher aber noch nicht auf seine grundsätzliche Eignung für die Untersuchung des 'small baby syndrome' systematisch überprüft.

Eine Möglichkeit zur Beurteilung der Validität von Tiermodellen bieten systematische Reviews und Metaanalysen. Metaanalysen ermöglichen eine quantitative Zusammenfassung von Ergebnissen verschiedener Studien eines Forschungsgebietes. Dabei wird ermittelt, ob über alle Studien zusammen ein Effekt bei den Untersuchungen vorliegt und wie groß dieser ist (Moher et al. 2007). Eine verstärkte Anwendung von Metaanalysen gewährleistet eine Verbesserung der Modelle und das Erkennen nicht valider Ansätze, was gerade bei tierexperimentellen Versuchen auch einer Vermeidung von unnötigem Tierverbrauch dienen würde (Pound 2004). Wenn sie

auch gängige Methoden zur Einschätzung klinischer und epidemiologischer Studien sind, so haben systematische Reviews und Metaanalysen bei der Beurteilung tierexperimenteller Studien bisher nur eine sehr geringe Bedeutung. Sie sind aber durchaus sinnvoll, da sie Hinweise auf die Validität tierexperimenteller Studien geben und somit eine wichtige Grundlage für die Übertragung von Ergebnissen tierexperimenteller Studien in die klinische Medizin darstellen (Pound et al. 2004). Ein weiterer Vorteil von Metaanalysen liegt im Erkennen von 'publication bias'. Dieser beschreibt eine Verzerrung des in der Metaanalyse ermittelten Effektschätzers durch eine selektive Veröffentlichung von z.B. kleinen Studien mit signifikanten Ergebnissen (Dickersin, 1992), was zu einem Überwiegen falsch positiver Ergebnisse in der Literatur führen kann (Begg und Berlin 1989).

Zur Einordnung unserer eigenen Ergebnisse sowie zur Validierung des Tiermodells der Arteria uterina Ligatur bezüglich der Eignung für die Erzeugung neugeborener Ratten mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion führten wir deshalb eine Metaanalyse durch. Diese beinhaltet in der Literatur veröffentlichte Arbeiten, die dieses Modell zur Erzeugung von Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht verwendeten.

Bei der Durchführung der Metaanalyse standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Zeigen die bisher veröffentlichten Studien zum Modell der Arteria uterina Ligatur eine Verringerung des mittleren Geburtsgewichts bei Nachkommen dieser Gruppe?
2. Wie verhält sich der Anteil an neugeborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht in der Gruppe der Arteria uterina Ligatur im Vergleich zur Kontrollgruppe?
3. Besteht über alle publizierten Studien ein Zusammenhang zwischen einem verminderten Geburtsgewicht und dem späteren Risiko für Übergewicht, eine Glukosetoleranzstörung und/oder Bluthochdruck im Sinne des metabolischen Syndroms?
4. Welche Faktoren bzw. Confounder sind für mögliche Unterschiede zwischen den Studienergebnissen verantwortlich?
5. Welche Bedeutung kommt gegebenenfalls einem 'publication bias' zu?

## **3.2. Material und Methoden**

### **3.2.1. Tierexperimentelle Studie**

#### **3.2.1.1. Tiermaterial und Tierhaltung**

In den Experimentalansätzen wurden Wistar-Ratten (CrI: WI; Charles River Deutschland, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tierhaltung erfolgte unter Standardbedingungen in einem inversen Lichtrhythmus, d.h. mit einer Dunkelphase von 6.30 Uhr bis 18.30 Uhr sowie unter klimatisierten Bedingungen (Raumluft 22-26 °C). Die Tiere hatten freien Zugang zu einer Standardpelletdiät (Altromin 1310; Altromin, Lage, Deutschland; Energiegehalt: 3,0 kcal/g) und Trinkwasser, die ad libitum verabreicht wurden.

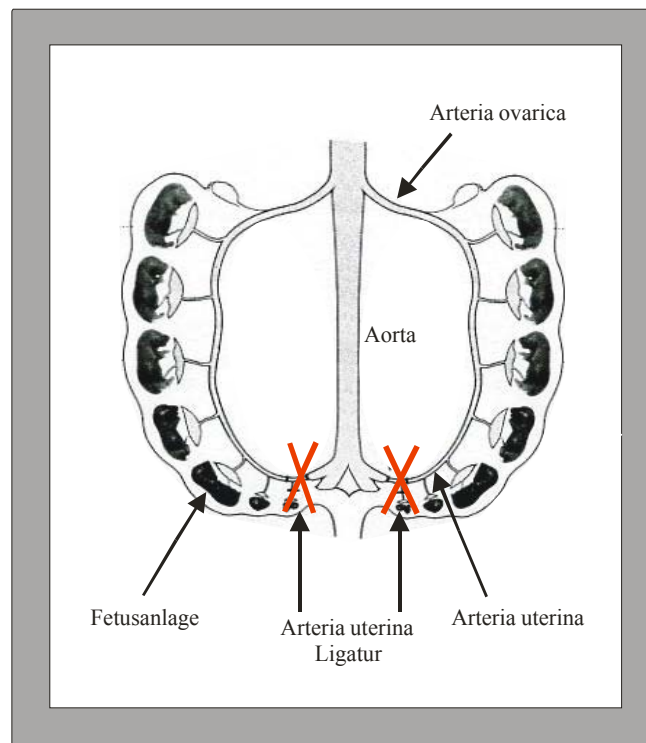
Das Tierversuchsvorhaben wurde durch die zuständige Landesbehörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Genehmigungsnummer G0093/02 vom 30.05.2002).

#### **3.2.1.2. Tiermodell**

Zur Anpaarung wurden jeweils zwei Weibchen (n=68) mit einem Gewicht von 200-250 g und zwei Männchen zusammengesetzt. Der Tag des Spermiennachweises im täglich durchgeführten vaginalen Abstrich oder das Vorhandensein eines sichtbaren vaginalen Spermienpfropfes galt als 1. Gestationstag (GT). Danach wurden die Mütter in Einzelkäfigen gehalten. Am Vormittag des 17. GT erfolgte die Operation nach einem abgewandelten Ligaturmodell nach Wigglesworth (Wigglesworth 1964). Wir führten eine beidseitige doppelte Arteria uterina Ligatur mit dem Ziel durch, eine Wachstumsrestriktion aller Nachkommen zu erreichen. Dafür bekamen die trächtigen Ratten eine intraperitoneale Kombinationsnarkose (Xylazin 4 mg/kg, Ketamin 50 mg/kg and Atropin 0,2 mg/kg), die nach wenigen Minuten einsetzte. Vor Beginn der Operation erfolgte eine randomisierte Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen der Scheinligatur (ShL; n=15) und der Ligatur (Lig; n=53). Nach Eintritt der Narkose und Rasieren des Bauches wurde dieser durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Es folgte die Herausverlagerung der Uterushörner, die genaue Dokumentation der Fetusanlagen jeder Seite und anschließend bei den Tieren der Ligaturgruppe die doppelte Unterbindung der Arteria uterina jeder Seite nahe am Abgang von der Arteria iliaca interna (Abb. 1). Nach Ausschluss einer Blutung wurden die Uterushörner in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Bauchdecke mit einer Peritoneal- und Hautnaht verschlossen. Die Behandlung der Kontrolltiere aus der Scheinligaturgruppe fand in gleicher operativer Weise mit Ausnahme der Gefäßligaturen statt. Nach einer Operationsdauer von ca. 20



Minuten erholten sich die Mutterratten innerhalb von ca. 2 Stunden aus der Narkose. Bis zu diesem Zeitpunkt schützte eine Rotlichtlampe vor Wärmeverlust. Die trächtigen Weibchen wurden bis zum Ende der Gestation in Einzelkäfigen gehalten und konnten vom 22.-24. GT spontan werfen (ShL n=12; Lig n=39).



**Abb. 1: Arteria uterina Ligatur, schematische in situ Darstellung des Operationsverfahrens in abgewandelter Form nach Wigglesworth (Wigglesworth 1964). Beidseitige Ligatur der Arteria uterina (rote Kreuze) nahe am Abgang von der Arteria iliaca interna.**

Die Anzahl der pro Mutter lebend geborenen Feten galt als Primärwurfgröße. Die Nachkommen wurden innerhalb der ersten 12 Lebensstunden markiert sowie ihr Geschlecht und das Geburtsgewicht aufgenommen. Dabei galten diejenigen Ratten als intrauterin wachstumsretardiert, deren Geburtsgewicht unterhalb von 2 Standardabweichungen des mittleren Geburtsgewichts der Kontrolltiere gleichen Geschlechts lag (IUGR: GGW < MW - 2SD) (Huizinga et al. 2004). Entsprechend wurden Tiere als normalgewichtig bzw. 'appropriate for gestational age' (AGA) definiert, deren Geburtsgewicht sich innerhalb von zwei Standardabweichungen des mittleren Geburtsgewichts der Kontrolltiere befand (AGA: GGW innerhalb MW  $\pm$  2SD), und als makrosom bzw. 'large for gestational age' (LGA) bei einem Geburtsgewicht größer als zwei Standardabweichungen vom mittleren Geburtsgewicht der neugeborenen Kontrolltiere gleichen Geschlechts (LGA: GGW > MW + 2SD). Am 3. Lebenstag

erfolgte die Bildung der Sekundärwürfe durch Angleichung der Wurfgröße auf 10 Nachkommen pro Muttertier. Im Alter von 21 Tagen, dem Zeitpunkt des Absetzens von der Mutter, wurden alle Nachkommen durch rasche Dekapitation getötet.

### **3.2.1.3. Parameter (Zielgrößen)**

#### **3.2.1.3.1. Fetale Resorptionsrate**

Die fetale Resorptionsrate beschreibt die Differenz zwischen der Anzahl an Feten in utero am 17. GT und der Anzahl lebend geborener Feten derselben Rattenmutter in Prozent.

#### **3.2.1.3.2. Primärwurfgröße**

Als Primärwurfgröße wird die Anzahl aller Nachkommen einer Mutter zum Zeitpunkt der Geburt bezeichnet.

#### **3.2.1.3.3. Körpergewicht**

Die Messung des Körpergewichts der Nachkommen fand am 1., 3., 7., 14., 20. und 21. postnatalen Tag mit einer Genauigkeit von 0,1 g unter Verwendung einer elektronischen Präzisionswaage statt (Sartorius MC 1, Laboratory LC 6200, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

#### **3.2.1.3.4. Körperlänge**

Am 20. LT erfolgte die Messung der Körperlänge mit einer Genauigkeit von 0,5 cm. Dabei wurden die Tiere in kurzzeitiger Ethernarkose vollständig relaxiert und der Nasoanalabstand in Rückenlage mit Hilfe eines Maßbandes aufgenommen.

#### **3.2.1.3.5. Relative Körpermasse**

Zur Bestimmung der relativen Körpermasse berechneten wir den Quotienten aus Körpergewicht und Körperlänge (g/cm).

#### **3.2.1.4. Laborchemische Bestimmungen im Blut**

Das nach der Dekapitation am 21. LT gewonnene Trunkalblut einer randomisiert ausgewählten Stichprobe von Tieren jeder Gruppe diente nach dem Auffangen in heparinisierten 10 ml Eppendorf Gefäßen zur Ermittlung laborchemischer Parameter.

##### **3.2.1.4.1. Blutglukose**

Die Bestimmung der Blutglukose erfolgte durch photometrische Messungen an enteweißten Vollblutproben mit Hilfe der Glukoseoxidase – Peroxidase (GOD-PAP) Methode (Barham und Trinder 1972) unter Verwendung des Testbestecks LCN 400 und des Autoanalysers LP 400 (beide Dr. Lange GmbH, Berlin, Deutschland). Der Messbereich der Methode betrug 0-27,8 mmol/l. Der Variationskoeffizient lag bei <3 %.

##### **3.2.1.4.2. Triglyceride**

Das nach Zentrifugation gewonnene Blutplasma diente zur Ermittlung der Triglyceridkonzentration unter Verwendung der Glycerin-3-phosphatoxidase-Peroxidase (GPO-PAP) – Methode (Fossati und Prencipe 1982). Zur Messung wurde das Testbesteck LCN 351 und der Autoanalyser LP 400 verwendet (beide Dr. Lange GmbH, Berlin, Deutschland). Der Messbereich betrug 0-9,12 mmol/l und der Variationskoeffizient lag bei <5 %.

##### **3.2.1.4.3. Plasmainsulin**

Nach der Blutentnahme und der Gewinnung von Blutplasma durch Zentrifugation wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Insulinkonzentration im Blutplasma erfolgte unter Anwendung eines Radioimmunoassays (Adaltis, Freiburg, Deutschland). Dabei wurden 50 µl eines Standards (2,66-340,8 mIE/l) bzw. der unbekannt Probe, die unmarkiertes Antigen enthielten, mit jeweils 50 µl Antiinsulin-Antikörper (Meerschweinchen) und Tracer (<sup>125</sup>I-markiertes Insulin) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20-22 Stunden bei Raumtemperatur, notwendig für die Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes, erfolgte die Zugabe von 25 µl Diluent sowie 500 µl Präzipitationsreagenz (20 % Polyethylenglykol 6000 in Phosphatpuffer), das eine Trennung von freiem und gebundenem Antigen bewirkte. Nach dem Mischen und erneuter Inkubation der Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte im Anschluss eine 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und

3000 g. Der Überstand mit dem freien Antigen wurde abgesaugt und die Radioaktivität des verbleibenden Präzipitates für 2 min im Gammacounter (1470 Wizard, Wallac - Perkin Elmer, Freiburg, Deutschland) gemessen. Je weniger radioaktiv markiertes Antigen sich in der Messung zeigte, desto größer war die Konzentration von unmarkiertem Insulin. Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm Multi - CALC (Wallac – Perkin Elmer). Als Standardpräparation diente Ratteninsulin (Novo Nordisk Biolabs, Kopenhagen, Dänemark) mit einer biologischen Potenz von 21,3 IE/mg. Der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 4,5-7,4 % im Konzentrationsbereich 9,2-94,2 mIE/l (n=10). Der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 4,5-8,0 % innerhalb des Konzentrationsbereichs 8,8-95,2 mIE/l (n=10). Die Kreuzreaktivität mit humanem Proinsulin betrug 14 %, mit Schweine- und Rinderproinsulin 1,3 % und mit C-Peptid <0,0002 %.

#### **3.2.1.4.4. Plasmaleptin**

Die Leptinbestimmung im Blutplasma erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Radioimmunoassays (Ratten Leptin RIA kit, Linco, Missouri, USA). Dabei wurden 50 µl eines Standards (0,25-50 ng/l) bzw. der unbekannt Probe, die das unmarkierte Antigen enthielten, mit 50 µl Antileptin-Antikörper (Meerschweinchen) für 20-24 Stunden inkubiert. Nach Zugabe des Tracers (<sup>125</sup>I-markiertes Leptin) und erneuter Inkubation von 22-24 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 500 µl Präzipitationsreagenz (Anti-Meerschwein-IgG der Ziege) zur Trennung von gebundenem und freiem markierten Antigen. Nach dem Mischen wurden die Proben für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend für 25 Minuten bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Der Überstand mit dem freien Antigen wurde abgesaugt und die Radioaktivität des Präzipitates für 2 Minuten im Gammacounter (1470 Wizard, Wallac - Perkin Elmer, Freiburg, Deutschland) gemessen. Die Auswertung der Testergebnisse fand unter Mithilfe des Computerprogramms RIA-CALC (Wallac – Perkin Elmer) statt. Als Standardpräparation diente rekombinantes Rattenleptin (Linco). Der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei 2.4-4.6 % und der Interassay-Variationskoeffizient 4,8-5,7 % im Konzentrationsbereich 1.6-11.6 µg/l (n=5).

#### **3.2.1.5. Statistische Auswertung**

Innerhalb der Gruppen wurden die arithmetischen Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet und sind dementsprechend auch in den Tabellen und Abbildungen in dieser Form

zusammen mit der Tierzahl (n) dargestellt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurden die Werte für die Auswertung einer log-Transformation unterzogen.

Bei den vorhandenen Daten handelte es sich um eine hierarchische Datenstruktur, d.h. dass die Daten der einzelnen Nachkommen keine unabhängigen Messpunkte darstellten, da sie als Datencluster eines Muttertiers interpretiert werden mussten. Aus diesem Grund wurde für die Datenanalyse eine 'mixed model' (multilevel) Analyse verwendet. Hierbei wurde die Zugehörigkeit zur Versuchsgruppe als Level 1 und die Zugehörigkeit zum Muttertier als Level 2 definiert. Da sich, wie unten gezeigt, die primäre Wurfgröße zwischen den Gruppen signifikant voneinander unterschied und zwischen der Wurfgröße und dem Geburtsgewicht ein negativer Zusammenhang besteht (Barr et al. 1970, McLaren und Michie 1960), wurden alle Analysen auf die primäre Wurfgröße adjustiert. Die gemischten linearen bzw. logistischen Modelle wurden für beide Geschlechter getrennt unter Verwendung der GLLAM Prozedur berechnet (STATA 8.0, Stata Corp., College Station, TX, USA).

Die Auswertung von Kreuztabellen erfolgte mit dem Chi-Quadrat Test.

Mit einer oberen Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % galt ein  $p < 0,05$  als signifikanter Unterschied.

### **3.2.2. Metaanalyse**

#### **3.2.2.1. Suchstrategie**

##### **3.2.2.1.1. Zeitraum**

Die Literaturrecherche über Medline (PubMed) umfasste den Zeitraum von 1966 bis Juni 2005.

##### **3.2.2.1.2. Suchbegriffe**

Die Suche erfolgte mit den Schlagworten:

1. rats
2. IUGR (intrauterine growth restriction)
3. uterine artery ligation
4. „2“ OR „3“
5. „1“ AND „4“

### **3.2.2.1.3. Einschlusskriterien**

Die mit der Suchstrategie ermittelten Arbeiten wurden auf das Vorliegen folgender Kriterien untersucht:

1. Tiermodell Ratte
2. Zeitpunkt der Ligatur bzw. Scheinligatur im 3. Trimester der Schwangerschaft
3. Vergleich einer beidseitigen Arteria uterina Ligatur mit einer Scheinligatur
4. Spontangeburt der neugeborenen Ratten
5. Verfügbarkeit vom Mittelwert des Geburtsgewichts jeder Gruppe, Angabe von SE oder SD sowie der verwendeten Tierzahlen der Nachkommen
6. Arbeit in englischer oder deutscher Sprache

Nur wenn die Arbeit alle 6 Kriterien erfüllte, wurde sie in die Auswertung eingeschlossen.

### **3.2.2.2. Datenextraktion**

Aus den Arbeiten, die die Einschlusskriterien erfüllten, erfolgte die Extraktion folgender Studiendaten: Erstautor, Publikationsjahr, Tierstamm, Operationszeitpunkt (Gestationstag), gesamte Gestationsdauer, Anzahl der Gestationstage, die die Feten einer Ligatur bzw. Scheinligatur exponiert waren, Anzahl der verwendeten Rattenmütter getrennt nach den Versuchsgruppen, Angaben zu maternaler oder fetaler Mortalität, Primärwurfgröße, Anzahl und mittleres Geburtsgewicht der Nachkommen aus der Scheinligatur- bzw. der Ligaturgruppe mit Angabe der Standardabweichung bzw. des Standardfehlers.

### **3.2.2.3. Statistische Methoden der Metaanalyse**

#### **3.2.2.3.1. Datentransformation**

Die für die Auswertung notwendigen Standardabweichungen der Geburtsgewichte jeder Versuchsgruppe wurden, soweit nicht in den Publikationen angegeben, aus den jeweils vorliegenden Studienergebnissen berechnet. Bei Angabe des Geburtsgewichts innerhalb der Gruppen getrennt nach dem Geschlecht erfolgte die Auswertung unter Berücksichtigung der Daten der Männchen. Sobald die Geburtsgewichte in der Ligaturgruppe nach dem Grad der Wachstumsrestriktion differenziert dargestellt wurden, fand die Auswertung unter Einbeziehung der Geburtsgewichte der leicht retardierten Tiere statt.

#### **3.2.2.3.2. Test auf Heterogenität**

Zur Überprüfung der Effektschätzer der eingeschlossenen Studien auf Heterogenität diente der Chi-Quadrat-Test nach Woolf.

#### **3.2.2.3.3. Berechnung gepoolter Schätzer**

Die Berechnung der gepoolten mittleren Differenz des Geburtsgewichts zwischen der Ligatur- und der Scheinligaturgruppe aller Studien erfolgte mittels 'random effects model', da eine signifikante Heterogenität zwischen den einzelnen Studienschätzern bestand ( $p < 0,01$ , Chi-Quadrat-Test). Die graphische Darstellung erfolgte mittels 'forest plot'.

#### **3.2.2.3.4. Metaregressionsanalyse**

Zur Untersuchung des Einflusses der Dauer der Exposition gegenüber einer Arteria uterina Ligatur sowie der Gestationslänge auf den Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Gruppen führten wir eine Metaregressionsanalyse durch ('random effects model', 'restricted maximum likelihood'). Es wurden beide Parameter für die einzelnen Studien berechnet und als unabhängige Variable in das Metaregressionsmodell einbezogen.

#### **3.2.2.3.5. Publication bias**

Die Überprüfung auf das Vorliegen von 'publication bias' erfolgte mittels eines 'funnel plots', in dem die Effektschätzer der einzelnen Veröffentlichungen auf der Abszisse gegen ein Maß für die Studiengröße (n) auf der Ordinate aufgetragen werden. Eine 'funnel plot' Asymmetrie kann auf das Vorliegen von 'publication bias' hinweisen (Sterne et al. 2001). Zum anderen kann die Darstellung in einem 'Begg's funnel plot' Hinweise auf 'publication bias' liefern. Dabei werden die Standardfehler der gewichteten mittleren Differenz gegen den gewichteten Studieneffekt aufgetragen. Die formale Erfassung einer 'funnel plot' Asymmetrie erfolgt mittels linearer Regressionsanalyse nach Egger mit Testung des Studieneffekts gegen dessen Standardfehler.

#### **3.2.2.3.6. Software**

Die Analysen erfolgten unter Anwendung des Softwarepaketes Stata 8.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

### **3.3. Ergebnisse**

#### **3.3.1. Eigene tierexperimentelle Untersuchungen am Modell der Arteria uterina Ligatur**

##### **3.3.1.1. Mütterliche Mortalität**

Die 68 primär angepaarten Weibchen wurden am Operationstag randomisiert den Gruppen der Scheinligatur (n=15) und der Ligatur (n=53) zugeordnet. Perioperativ verstarben zwei Rattenmütter jeder Gruppe (ShL: 2/15; Lig: 2/53; p=0,21). Die verbliebenen Ratten warfen spontan vom 22.-24. GT (ShL: n=12; Lig: n=39). Die Differenz zu den am 17. GT operierten Tieren erklärt sich aus einer zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant verschiedenen fetalen Resorptionsrate von 100 % in einem Teil der Tiere (ShL: 1/13; Lig: 12/51; p=0,27).

##### **3.3.1.2. Gestationsdauer**

Zwischen den Versuchsgruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Gestationsdauer (ShL:  $23,2 \pm 0,62$  GT; Lig:  $23,6 \pm 0,57$  GT; p=0,13).

##### **3.3.1.3. Primärwurfgröße und fetale Resorptionsrate**

Die Ligatur der Arteria uterina führte zu einer signifikant erhöhten fetalen Resorptionsrate (ShL: 9,9 % (0-90 %), n=12; Lig: 51,3 % (0-94 %), n=39; p<0,001) und einer daraus resultierenden signifikanten Verringerung der Primärwurfgröße (ShL:  $13 \pm 4$ , n=12; Lig:  $6 \pm 3$ , n=39; p<0,001).

##### **3.3.1.4. Geburtenzahl und fetale Mortalität**

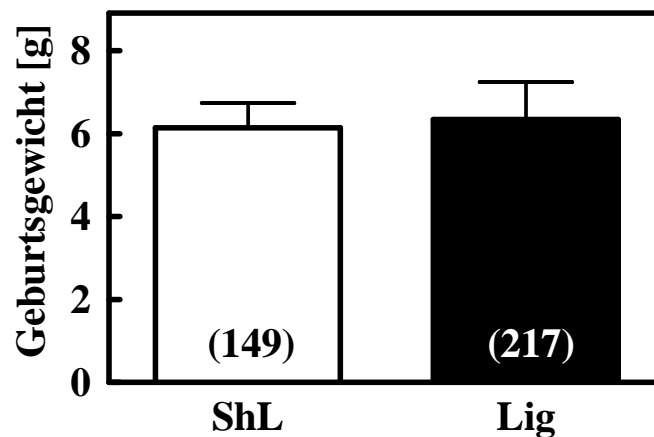
Es wurden insgesamt 369 Ratten geworfen, davon 151 von Müttern mit einer Scheinligatur und 218 von Ratten mit einer bilateralen Arteria uterina Ligatur. Es gab keine Unterschiede in der Anzahl der Totgeburten (ShL: 2/151; Lig: 1/218; p=0,57) und in der neonatalen Mortalität bis zum 21. LT (ShL: 4/149; Lig: 10/217; p=0,42) zwischen den Gruppen.

Bei der Wurfbildung am 3. LT mit Angleichung der Wurfgröße auf 10 Tiere pro Mutter wurden überzählige neugeborene Ratten zufällig ausgewählt und durch rasche Dekapitation getötet (ShL: n=38, Lig: n=10).



### 3.3.1.5. Geburtsgewicht der Nachkommen

Das mittlere Geburtsgewicht zeigte keine Verminderung bei den Nachkommen von Müttern mit einer bilateralen Arteria uterina Ligatur, sondern unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (unadjustierte mittlere Geburtsgewichte: ShL:  $6,14 \pm 0,60$  g,  $n=149$ ; Lig:  $6,34 \pm 0,90$  g,  $n=217$ ; adjustierter Gruppenunterschied:  $0,07 \pm 0,25$  g,  $p=0,76$ ; Abb. 2).



**Abb. 2:** Mittleres Geburtsgewicht aller Nachkommen von scheinligierten Mutterratten (ShL - weißer Balken) im Vergleich zu bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten (Lig - schwarzer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Es bestand kein signifikanter Gruppenunterschied unter Verwendung gemischter linearer Modelle und Adjustierung auf die Primärwurfgröße.

Ein Vergleich der Gruppen getrennt nach dem Geschlecht ergab bei den Männchen keinen Unterschied im Geburtsgewicht zwischen den Gruppen (unadjustierte mittlere Geburtsgewichte: ShL:  $6,27 \pm 0,64$  g,  $n=69$ ; Lig:  $6,61 \pm 0,86$  g,  $n=102$ ; adjustierter Gruppenunterschied:  $0,21 \pm 0,24$  g,  $p=0,38$ ; Abb. 3A). Ebenso war das adjustierte Geburtsgewicht bei den Weibchen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (unadjustierte mittlere Geburtsgewichte: ShL:  $6,03 \pm 0,55$  g,  $n=80$ ; Lig:  $6,11 \pm 0,87$  g,  $n=115$ ; adjustierter Gruppenunterschied:  $0,03 \pm 0,29$  g,  $p=0,92$ ; Abb. 3B).

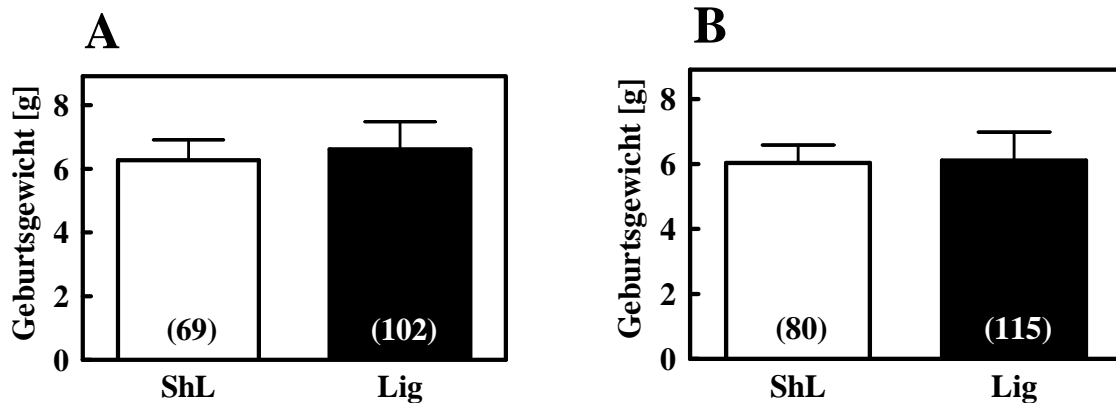


Abb. 3: Mittleres Geburtsgewicht aller Nachkommen von scheinligierten Mutterratten (ShL - weißer Balken) bzw. von bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten (Lig - schwarzer Balken) getrennt nach dem Geschlecht; A - Männchen, B - Weibchen, (MW  $\pm$  SD (n)). Es gab ebenfalls keine signifikanten Gruppenunterschiede unter Verwendung gemischter linearer Modelle und Adjustierung auf die Primärwurfgröße.

### 3.3.1.6. Anteil von neugeborenen Ratten mit einer Wachstumsrestriktion

Nach Durchführung einer beidseitigen Arteria uterina Ligatur am 17. GT war der Anteil an neugeborenen Ratten mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion (IUGR: GGW < MW - 2SD) in den Primärwürfen nicht erhöht (alle Tiere: p=0,99; Männchen: p=0,21; Weibchen p=0,45; Abb. 4A,B). Ebenso gab es keine Unterschiede im Anteil makrosomer neugeborener Ratten in den Primärwürfen zwischen den Gruppen (alle Tiere: p=0,23; Männchen: p=0,91; Weibchen p=0,20; Abb. 4A,B).

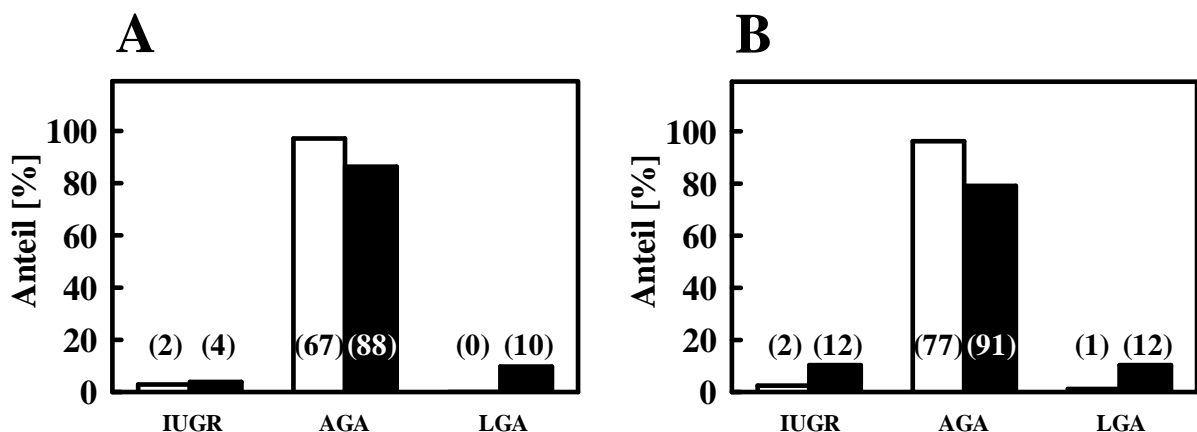


Abb. 4: Prozentualer Anteil von neugeborenen Ratten mit intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR), Normalgewicht (AGA) und Makrosomie (LGA) zur Geburt in den Primärwürfen von scheinligierten Mutterratten (ShL - weißer Balken) im Vergleich zu bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten (Lig - schwarzer Balken) getrennt nach dem Geschlecht, A - Männchen, B - Weibchen, (n). Keine signifikanten Gruppenunterschiede im Anteil intrauterin wachstumsretardierter bzw. makrosomer neugeborener Ratten.

### 3.3.1.7. Körpergewichtsentwicklung bis zum 21. LT

Bei der Bestimmung des Körpergewichts am 21. LT gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (unadjustierte mittlere Körpergewichte: ShL:  $50,8 \pm 4,16$  g,  $n=107$ ; Lig:  $55,0 \pm 6,20$  g,  $n=197$ ; adjustierter Gruppenunterschied:  $2,37 \pm 3,12$  g,  $p=0,45$ ; Abb. 5).

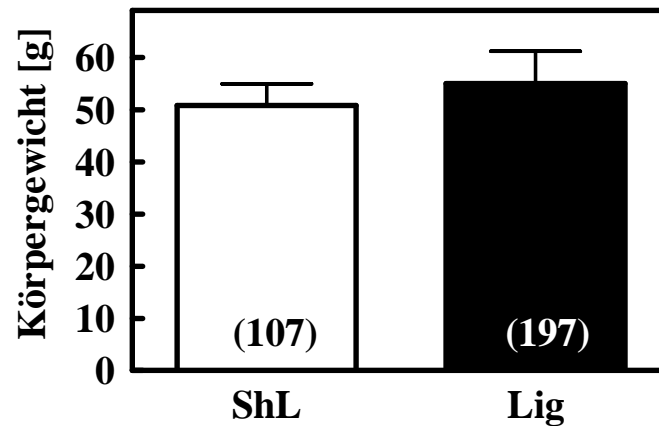


Abb. 5: Mittleres Körpergewicht der Nachkommen von scheinligierten Mutterratten (ShL - weißer Balken) im Vergleich zu Nachkommen von bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten (Lig - schwarzer Balken) am 21. Lebenstag, (MW  $\pm$  SD (n)). Kein Nachweis eines signifikanten Gruppenunterschiedes unter Verwendung gemischter linearer Modelle und Adjustierung auf die Primärwurflgröße.

Eine differenzierte Betrachtung der Körpergewichtsentwicklung bis zum 21. LT getrennt nach dem Geschlecht ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, weder bei männlichen noch bei weiblichen Nachkommen beider Gruppen (Abb. 6A,B).

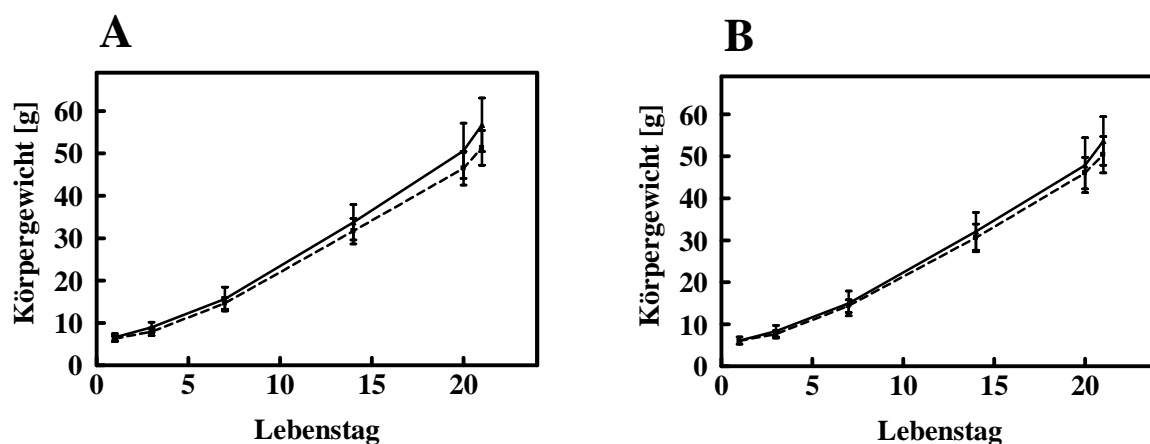


Abb. 6: Körpergewichtsentwicklung der Nachkommen von Mutterratten mit Scheinligatur (ShL - gestrichelte Linie) im Vergleich zu Nachkommen von Mutterratten mit Arteria uterina Ligatur (Lig - durchgezogene Linie) vom 1.-21. Lebenstag getrennt nach dem Geschlecht; A - Männchen, B - Weibchen, (MW  $\pm$  SD). Kein Nachweis von signifikanten Gruppenunterschieden unter Verwendung gemischter linearer Modelle und Adjustierung auf die Primärwurflgröße.

Bei ausschließlicher Betrachtung der zur Geburt wachstumsretardierten Tiere aus der Ligaturgruppe (IUGR: GGW < MW - 2SD) im Vergleich zu allen Tieren der Scheinligaturgruppe zeigte sich kein 'catch-up growth', weder in Körpergewicht, Körperlänge oder relativer Körpermasse. Diese zur Geburt wachstumsretardierten Tiere wiesen anstatt einer gesteigerten frühpostnatalen Gewichtszunahme eher einen verminderten Zuwachs des Körpergewichts auf und waren im Vergleich zu den Tieren der Scheinligaturgruppe am 21. LT signifikant leichter (adjustierter Gruppenunterschied:  $-11,4 \pm 3,83$  g;  $p=0,003$ ).

### 3.3.1.8. Stoffwechselfparameter

Die Werte für Blutglukose, Triglyceride, Insulin, Leptin und auch für die Insulin/Blutglukose Ratio unterschieden sich nicht zwischen den Nachkommen der Scheinligatur- und der Ligaturgruppe (Abb. 7).

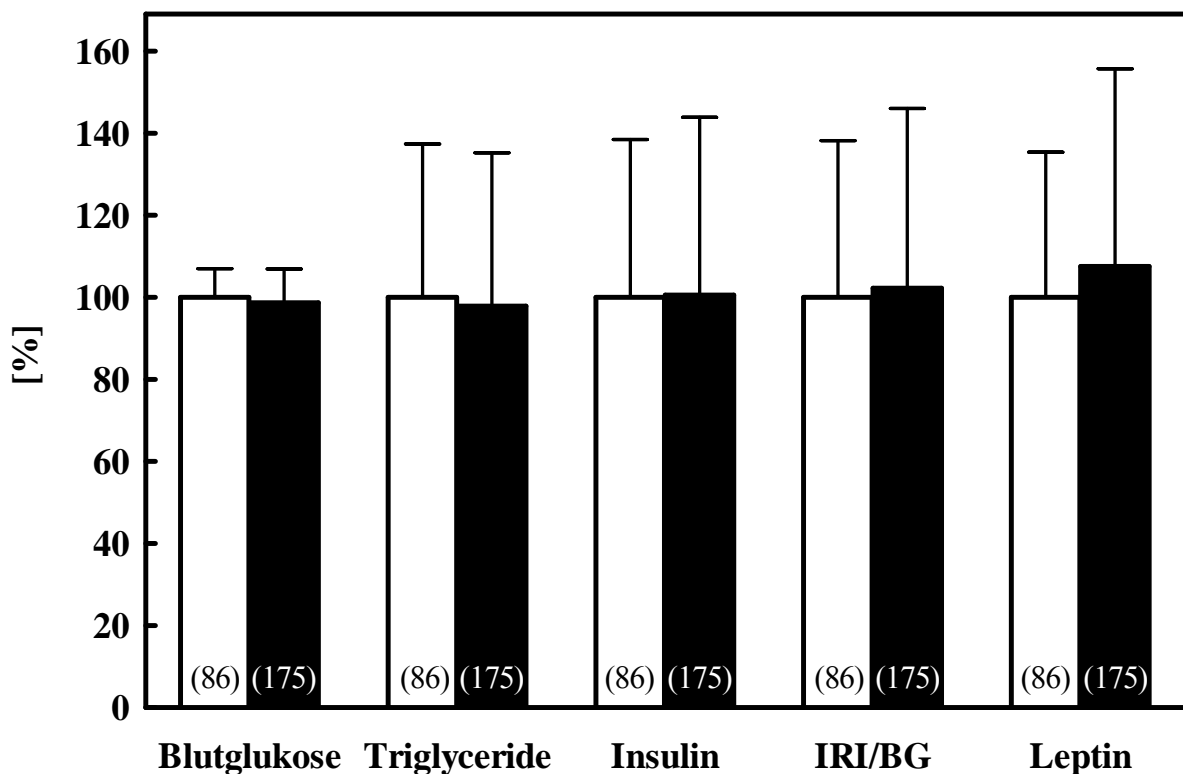


Abb. 7: Stoffwechselfparameter am 21. Lebenstag. Blutglukose, Triglyceride, Insulin, Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bei den Nachkommen von Rattenmüttern mit Scheinligatur (ShL - weißer Balken) im Vergleich zu Nachkommen von Rattenmüttern mit bilateraler Arteria uterina Ligatur (Lig - schwarzer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Darstellung der Werte der Ligaturgruppe als Prozent von den Werten der Scheinligaturgruppe. Kein Nachweis von signifikanten Gruppenunterschieden unter Verwendung gemischter linearer Modelle und Adjustierung auf die Primärwurffgröße.

Eine detaillierte Auswertung von Stoffwechselfparametern am 21. LT bei den Tieren aus der Ligaturgruppe mit Differenzierung anhand des Retardierungsgrades bei Geburt ergab, dass bei den zur Geburt wachstumsretardierten Tieren dieser Gruppe ( $GGW < MW - 2SD$ ) sowohl die Konzentrationen von Glukose, Triglyceriden, Insulin als auch die Insulin/Blutglukose Ratio im Vergleich zu den bei Geburt normalgewichtigen bzw. makrosomen Ratten der Ligaturgruppe vermindert waren. Das Serumleptin war bei den zur Geburt wachstumsretardierten Tieren sogar signifikant verringert im Vergleich zu den bei Geburt normalgewichtigen bzw. makrosomen Tieren der Ligaturgruppe (Abb. 8).

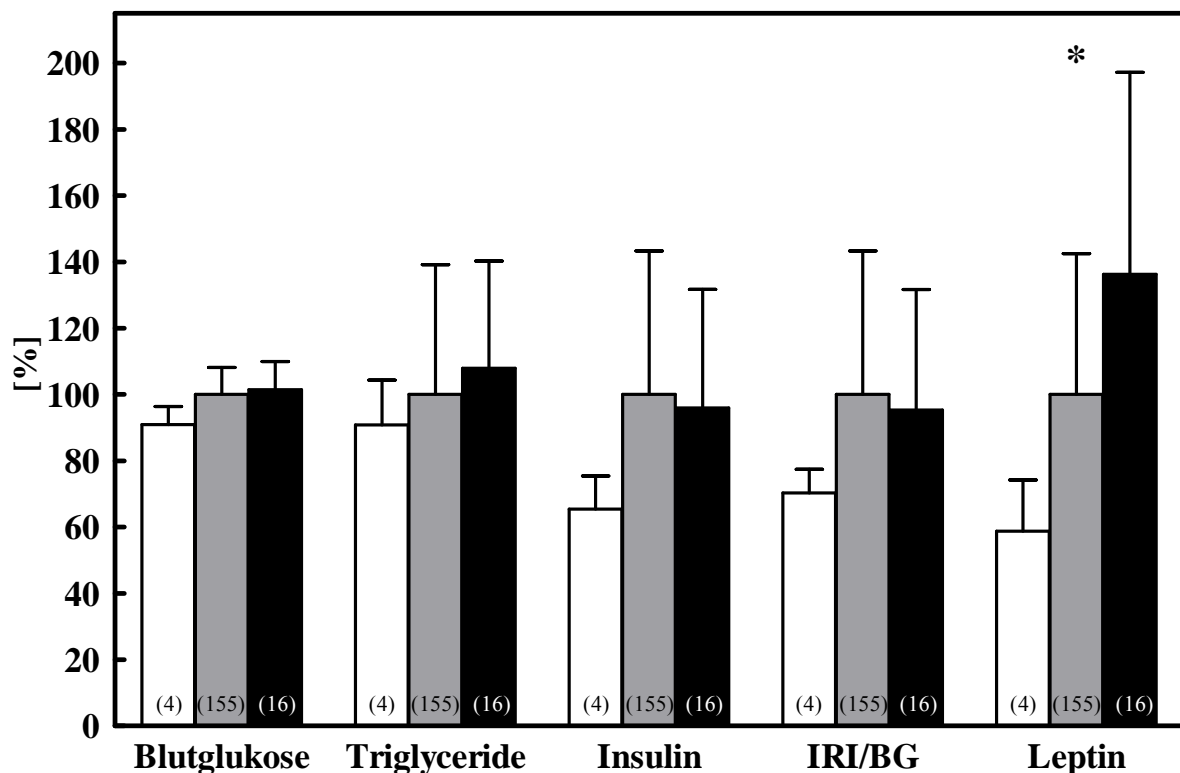


Abb. 8: Stoffwechselfparameter am 21. Lebenstag. Blutglukose, Triglyceride, Insulin, Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bei den Nachkommen der Rattenmütter mit bilateraler Arteria uterina Ligatur getrennt nach dem Grad der Wachstumsrestriktion bei Geburt (IUGR (intrauterine Wachstumsrestriktion): Geburtsgewicht ( $GGW < MW - 2SD$ ) - weiße Balken, AGA (normalgewichtige Ratten):  $GGW$  innerhalb  $MW \pm 2SD$  - graue Balken, LGA (makrosome Ratten):  $GGW > MW + 2SD$  - schwarze Balken). Darstellung der Werte als Prozent von den Werten der bei Geburt normalgewichtigen Ratten (AGA), ( $MW \pm SD$  (n)), \* $p < 0,01$  ('mixed linear model', adjustiert auf die Wurfgröße).

### **3.3.2. Metaanalyse der international publizierten Studien mit einer Arteria uterina Ligatur**

#### **3.3.2.1. Studienselektion**

Die nach der oben genannten Suchwortkombination (siehe 3.2.2.1.2., S. 37) durchgeführte Literaturrecherche erbrachte 652 Einträge. Von diesen waren 138 Originalarbeiten mit Verwendung des Arteria uterina Ligaturmodells. Die Untersuchung bezüglich der Einschlusskriterien führte zum Ausschluss weiterer 125 Arbeiten. Die verbliebenen 13 Studien konnten in die Metaanalyse eingeschlossen werden. Der Ablauf der Studienselektion ist in Abbildung 9 (S. 47) dargestellt.

#### **3.3.2.2. Datenextraktion**

Die für die Durchführung der Metaanalyse notwendigen Daten wurden wie unter 3.2.2.2. (S. 38) beschrieben aus den ausgewählten Arbeiten extrahiert und in die Auswertung aufgenommen (Tab.1, S. 48).

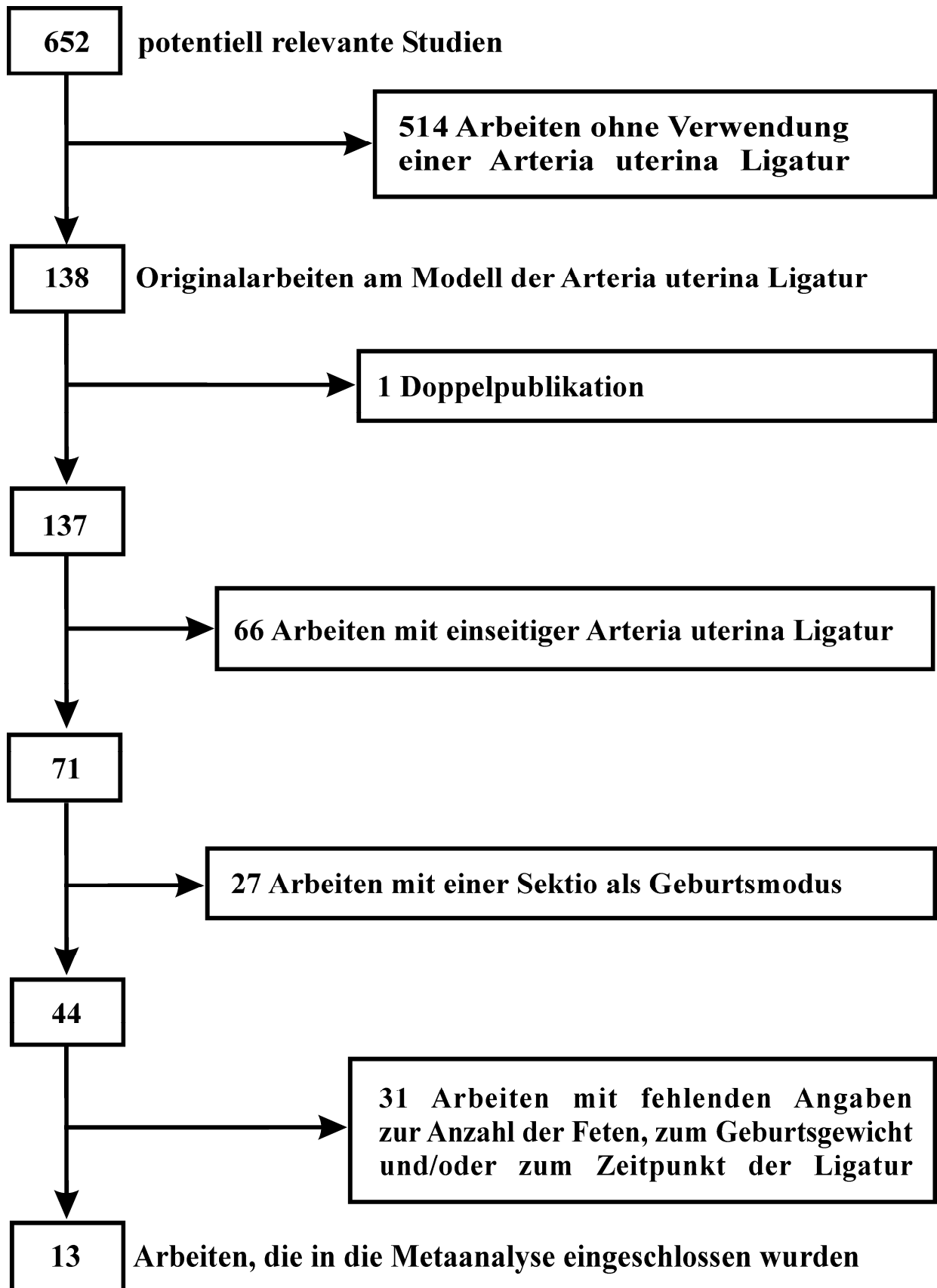


Abb. 9: Auswahl der 13 in die Metaanalyse eingeschlossenen Arbeiten am Arteria uterina Ligatur Modell anhand der Einschlusskriterien.

Tab. 1: **Studien, die die Einschlusskriterien erfüllten und in die Metaanalyse eingeschlossen wurden.** Angabe von Autor, Tierstamm, Operationszeitpunkt (Gestationstag-GT), Gestationsdauer in Tagen (d), Dauer der fetalen Exposition gegenüber einer Ligatur (Lig) bzw. Scheinligatur (ShL) in Tagen (d), Anzahl der verwendeten Rattenmütter, mütterlicher und fetaler Mortalität, Primärwurfgröße, Anzahl (n) und Geburtsgewicht (GGW) der Nachkommen der Gruppe mit Scheinligatur (ShL) bzw. mit bilateraler Arteria uterina Ligatur (Lig) bei den Mutterratten in MW ± SD, k.A. bei fehlenden Angaben durch den Autor. \* Der angegebene Mittelwert des Geburtsgewichts ist nicht der Mittelwert aller geborenen Ratten von Müttern der Ligaturgruppe, sondern beinhaltet nur die Tiere, die nach Angaben der Autoren in die Auswertung eingegangen sind. In fünf der Studien (Houdijk et al. 2000, Shaul et al. 1989, Cha und Oh 1986, Cha et al. 1987, Ogata et al. 1985) beschrieben die Autoren eine aktive Selektion der Nachkommen anhand eines reduzierten GGW.

Quelle	Tierstamm	Op-Tag (GT)	Dauer der Gestation (d)	Dauer der Exposition gegenüber Lig bzw. ShL (d)	Anzahl der Rattenmütter (ShL/Lig)	Mortalität (mütterliche; fetale)	Primärwurfgröße (MW ± SD)	Nachkommen der ShL-Gruppe		Nachkommen der Lig-Gruppe*	
								n	GGW (g) (MW ± SD)	n	GGW (g) (MW ± SD)
Boloker et al. 2002	Sprague-Dawley	19	21,5	2,5	3 / 3	k.A.	k.A.	6	6,76 ± 0,10	6	5,26 ± 0,17
Cha und Oh 1986	Sprague-Dawley	17	k.A.	k.A.	15 / 15	k.A.	k.A.	143	5,88 ± 0,74	85	5,18 ± 0,11
Cha et al. 1987	Sprague-Dawley	17	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	24	5,64 ± 0,33	11	5,00 ± 0,29
Houdijk et al. 2000	Wistar	17	22	5	7 / 34	fetal: ShL 3 %; Lig 59 %	k.A.	16	6,6 ± 0,004	14	4,9 ± 0,004
Ogata et al. 1985	Sprague-Dawley	18	21	3	k.A.	k.A.	k.A.	36	4,96 ± 0,66	36	4,20 ± 0,72
Peterside et al. 2003	Sprague-Dawley	19	22	3	k.A.	k.A.	k.A.	7	6,64 ± 1,50	7	5,32 ± 0,80
Pollak et al. 1979	Sprague-Dawley	17	22	5	5 / 8	k.A.	k.A.	39	6,22 ± 0,37	47	5,32 ± 0,82
Sadiq et al. 1998	Sprague-Dawley	19	22-23	3-4	k.A.	fetal: ShL 3 %; Lig 30 %	k.A.	6	6,66 ± 0,96	10	5,60 ± 0,54
Sanders et al. 2004	Wistar	17	22	5	16 / 22	k.A.	ShL: 11 ± 4,0 Lig: 5,0 ± 4,7	204	5,35 ± 0,57	137	5,03 ± 0,59
Shaul et al. 1989	Sprague-Dawley	18	22-23	4-5	10 / 38	fetal: ShL 26 %; Lig 66 %	k.A.	74	6,18 ± 0,44	69	4,46 ± 0,50
Simmons et al. 2001	Sprague-Dawley	19	21,5	2,5	k.A.	k.A.	k.A.	55	7,00 ± 0,89	55	5,96 ± 0,68
Styrud et al. 2005	Sprague-Dawley	16	22	6	7 / 7	k.A.	ShL: 10 ± 0,9 Lig: 5,8 ± 1,3	71	6,13 ± 0,59	41	5,50 ± 0,70
Wrutniak und Cabello 1983	Wistar	17	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	8	6,06 ± 0,31	7	5,03 ± 1,11



### 3.3.2.3. Deskription der eingeschlossenen Studien

Die in die Metaanalyse eingeschlossenen Arbeiten erfüllten grundlegende Qualitätsstandards der Veröffentlichung von Experimentaldaten bezüglich der Reproduzierbarkeit sowie die genannten Einschlusskriterien (siehe auch 3.2.2.1.3., S. 38 und Tab.1, S. 48). Alle 13 Arbeiten beschrieben eine Verringerung des Geburtsgewichts bei den Tieren der Ligaturgruppe im Vergleich zur Scheinligaturgruppe. In 12 Veröffentlichungen war dieser Gruppenunterschied signifikant, während in einer Arbeit Aussagen darüber fehlten (Cha und Oh 1986). Nur eine Arbeitsgruppe berechnete das mittlere Geburtsgewicht getrennt nach dem Geschlecht (Houdijk et al. 2000).

Die genaue Anzahl der verwendeten Rattenmütter in den einzelnen Versuchsgruppen wurde in 7 von 13 Arbeiten genannt (siehe Tab. 1). Dabei überstieg in der Mehrzahl dieser Arbeiten die Anzahl der verwendeten Rattenmütter in der Gruppe der Arteria uterina Ligatur die Zahl derer, die einer Scheinligatur unterzogen wurden. In der Auswertung der neugeborenen Ratten allerdings war die Anzahl der Nachkommen in der Ligaturgruppe im Vergleich zur Anzahl in der Scheinligaturgruppe gleich oder sogar vermindert. Lediglich drei Studien machten Angaben zur fetalen Mortalität, die diese Diskrepanz erklären würden (Houdijk et al. 2000, Sadiq et al. 1998, Shaul et al. 1989; Tab.1). In 5 der 13 Arbeiten beschrieben die Arbeitsgruppen eine Auswahl von Tieren aus der Ligaturgruppe anhand des Geburtsgewichts (Ogata et al. 1985, Houdijk et al. 2000, Shaul et al. 1989, Cha und Oh 1986, Cha et al. 1987). Dabei gingen nur diejenigen Tiere aus der Ligaturgruppe in die Auswertung ein, die bei Geburt eine Wachstumsrestriktion aufwiesen. In 4 dieser 5 Veröffentlichungen wurde ein signifikanter Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Gruppen beschrieben und in einer Arbeit fehlte die Angabe zur Signifikanz (Cha und Oh 1986). In weiteren 3 der 13 Untersuchungen konnte von einer Selektion ausgegangen werden, da nicht alle geborenen und aufgeführten Feten in die Berechnung des Geburtsgewichts eingingen (Sadiq et al. 1998, Wrutniak und Cabello 1983, Boloker et al. 2002). Auch in diesen 3 Untersuchungen waren die angegebenen Unterschiede im Geburtsgewicht signifikant. Keine der 13 Arbeiten beschrieb einen erhöhten Anteil an wachstumsretardierten neugeborenen Ratten innerhalb der Primärwürfe der Ligaturgruppe im Vergleich zur Gruppe mit einer Scheinligatur.

### 3.3.2.4. Test auf Heterogenität

Die Testung der Effektschätzer der eingeschlossenen Studien mit dem Chi-Quadrat-Test lieferte eine signifikante Heterogenität der Studienschätzer ( $p < 0,001$ ). Aufgrund dieses Ergebnisses erfolgte die Anwendung des 'random effects model' bei der weiteren Analyse.

### 3.3.2.5. Gepoolter Effektschätzer

Nachdem eine signifikante Heterogenität der Studienschätzer mit dem Chi-Quadrat-Test festgestellt wurde, erfolgte die Berechnung der gepoolten mittleren Differenz und des 95 % Konfidenzintervalls des Geburtsgewichts mittels 'random effects model' aus den gewichteten mittleren Differenzen der einzelnen Studien. In Abb. 10 (S. 51) sind der 'forest plot' mit den Schätzern der eingeschlossenen 13 Studien, die 95 % Konfidenzintervalle und die Gewichtung jeder einzelnen Studie an der gepoolten mittleren Differenz dargestellt. Alle Studien zeigen eine Verringerung des Geburtsgewichts bei den Nachkommen der Ligaturgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Scheinligatur. Der gepoolte Punktschätzer beträgt -1,02 g mit einem 95 % Konfidenzintervall von -1,39 - -0,64. Das bedeutet, dass über alle Arbeiten zusammen das Geburtsgewicht bei den Tieren der Ligaturgruppe im Mittel um 1,02 g im Vergleich zu den Tieren der Scheinligaturgruppe reduziert ist.

### 3.3.2.6. Auswirkungen der Gestationsdauer und des Operationszeitpunktes auf den Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Gruppen

Mit Hilfe einer gewichteten Metaregression wurde der Einfluss der Gestationsdauer bzw. der Zeitdauer, welche die Feten einem veränderten placentaren Blutfluss durch die Arteria uterina Ligatur exponiert waren, auf den mittleren Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Versuchsgruppen bestimmt. Dabei fanden nur Studien Berücksichtigung, die keine Selektion der Nachkommen anhand des Geburtsgewichts angaben (n=7). Weder die gesamte Gestationsdauer (Regressionskoeffizient 0,22; 95 % CI: -0,04 - 0,48; p=0,10) noch die Dauer, welche die Feten einer Arteria uterina Ligatur ausgesetzt waren (Regressionskoeffizient 0,04; 95 %CI: -1,18 - 1,27; p=0,94), zeigten einen signifikanten Einfluss auf den Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Gruppen.

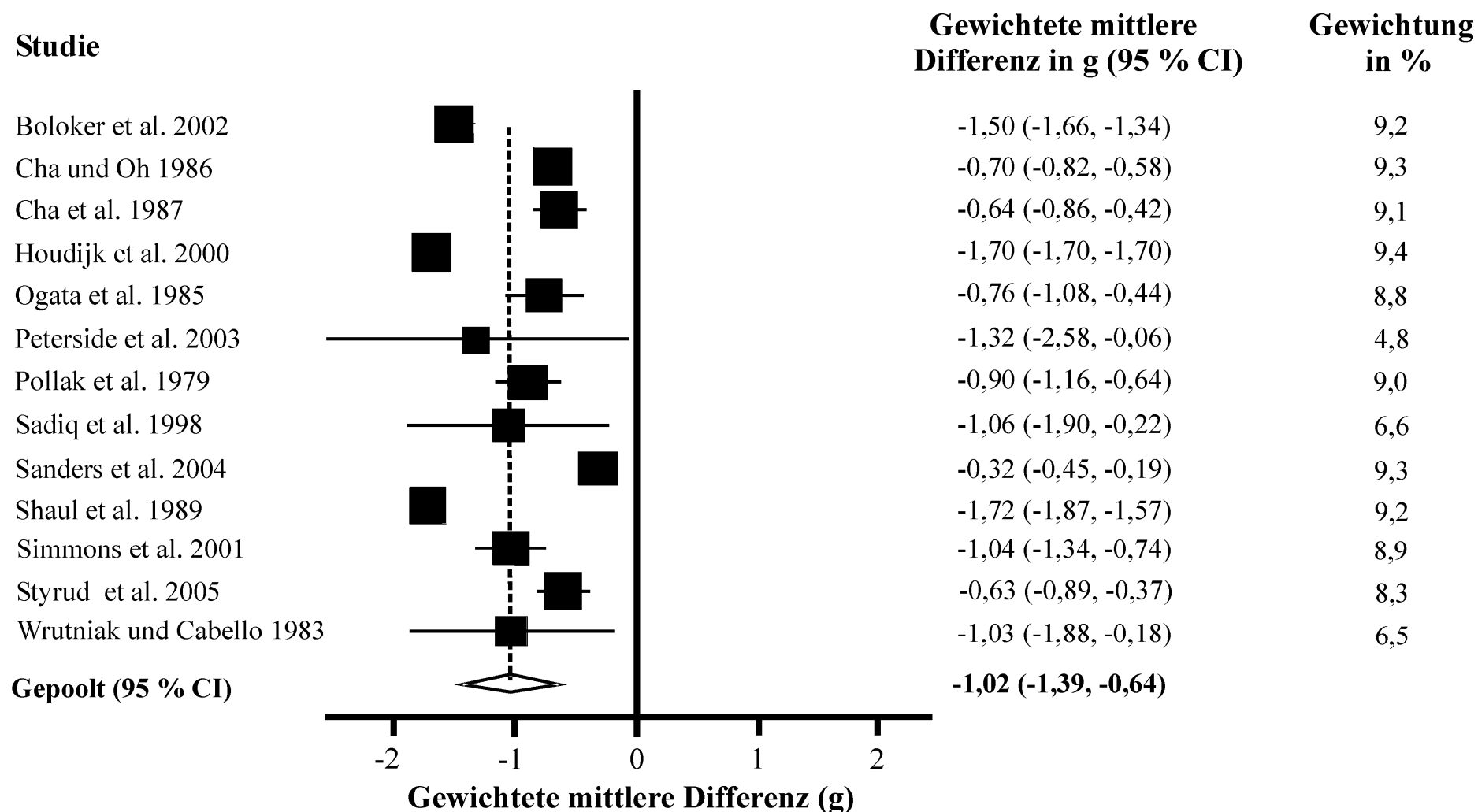


Abb. 10: 'Forest plot' der in die Metaanalyse eingegangenen Studien mit bilateraler Arteria uterina Ligatur. Angabe der gewichteten mittleren Differenz (g) des Geburtsgewichts der Nachkommen aus der Scheinligatur- und Ligaturgruppe mit dem 95 % Konfidenzintervall (95 % CI), der jeweiligen prozentualen Gewichtung (%) der einzelnen Studien sowie der gepoolten mittleren Differenz über alle Studien.

### **3.3.2.7. Langzeitoutcome in den Studien der Metaanalyse**

Die Studien der Metaanalyse wurden hinsichtlich des Langzeitoutcome der Tiere aus der Ligaturgruppe bezüglich der Körpergewichtsentwicklung und der Entwicklung von Stoffwechselstörungen als Hinweis auf die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms untersucht. In 5 der 13 Studien, die nach Selektion in ihrer Auswertung ausschließlich wachstumsretardierte Tiere verwendeten, wurden weder eine gesteigerte neonatale Gewichtszunahme noch das Vorliegen eines catch-up growth beschrieben (Ogata et al. 1985, Houdijk et al. 2000, Shaul et al. 1989, Cha und Oh 1986, Cha et al. 1987).

Die Bestimmung von Stoffwechselfparametern erfolgte in 5 der 13 Arbeiten (Boloker et al. 2002, Simmons et al. 2001, Styrud et al. 2005, Ogata et al. 1985, Peterside et al. 2003). Eine dieser Studien beschrieb die Entwicklung einer diabetogenen Stoffwechselstörung (Gestationsdiabetes) bei ehemals wachstumsretardierten Ratten der Ligaturgruppe (Boloker et al. 2002). Die anderen 4 Studien verwendeten gemäß der Definition von Huizinga für eine Wachstumsrestriktion zur Geburt ( $GGW < MW - 2SD$ ; Huizinga et al. 2004) keine wachstumsretardierten Tiere. Eine dieser Studien beschrieb bei den Tieren der Ligaturgruppe die Entwicklung einer Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, gestörten Glukosetoleranz zusammen mit einem gesteigerten Körpergewicht als Hinweis auf die Entwicklung einer Insulinresistenz im adulten Alter (Simmons et al. 2001). In allen anderen Studien bestanden keine Unterschiede in der Glukosetoleranz im späteren Leben (Styrud et al. 2005, Ogata et al. 1985, Peterside et al. 2003). Zusammengefasst beschrieben nur 2 der 13 Veröffentlichungen Symptome einer diabetogenen Stoffwechselstörung (Boloker et al. 2002, Simmons et al. 2001), wobei in nur einer dieser beiden Arbeiten definitionsgemäß wachstumsretardierte Nachkommen aus der Ligaturgruppe verwendet wurden (Boloker et al. 2002).

### **3.3.2.8. Publication bias**

Zum Nachweis eines möglichen 'publication bias' fanden der 'funnel plot' sowie der lineare Regressionstest nach Egger Verwendung. Im 'funnel plot' wurden die Effektschätzer, d.h. die mittleren Differenzen des Geburtsgewichts zwischen den Versuchsgruppen, gegen die dazugehörige Studiengröße, die der eingeschlossenen Tierzahl entspricht, aufgetragen. In Abb. 11A ist ein fiktiver, idealer 'funnel plot' ohne 'publication bias' dargestellt. In diesem bildet die Punktwolke einen symmetrischen Trichter, wobei die häufigeren kleinen Studien mit einer größeren Variabilität um den mittleren Effekt streuen als die selteneren großen Studien. In dem 'funnel plot' mit den Studien der Metaanalyse wurden die Effektschätzer der 13

eingeschlossenen Studien, ergänzt durch unsere eigene tierexperimentelle Studie (umrandeter Punkt), gegen die Studiengröße aufgetragen (Abb. 11B). Die entstandene Punktwolke bildet sich als schiefer Trichter ab. Die schon optisch erkennbare Asymmetrie deutet auf ein Fehlen von Studien an der rechten Basis des Trichters hin, was Studien mit einer kleinen Tierzahl und einem erhöhten Geburtsgewicht bei den Nachkommen der Ligaturgruppe entspricht.

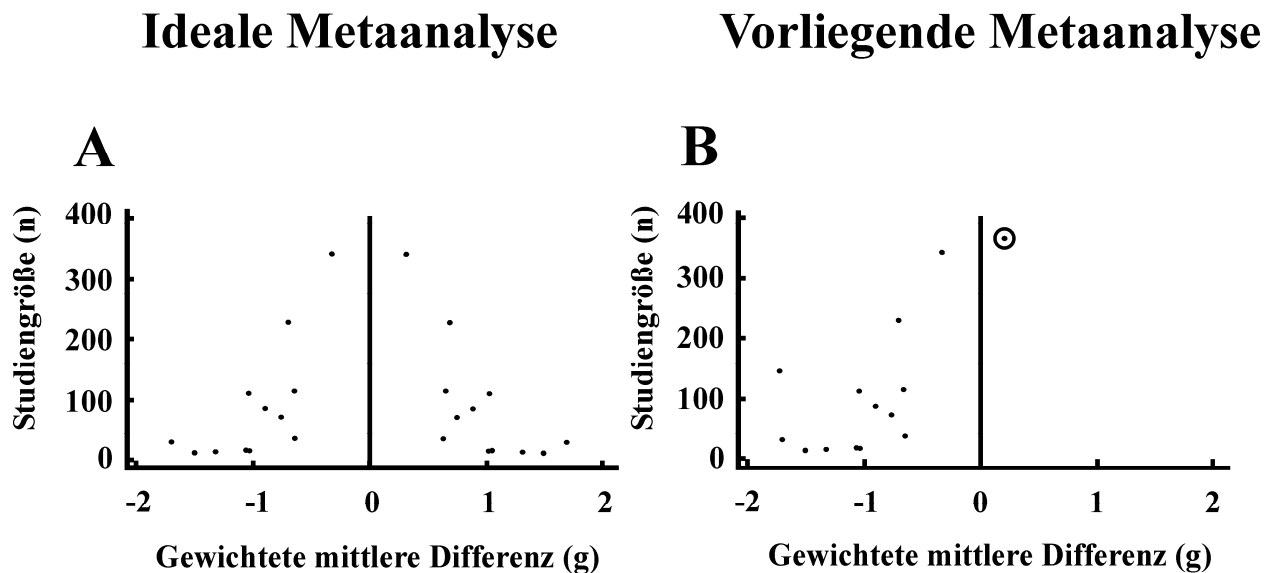


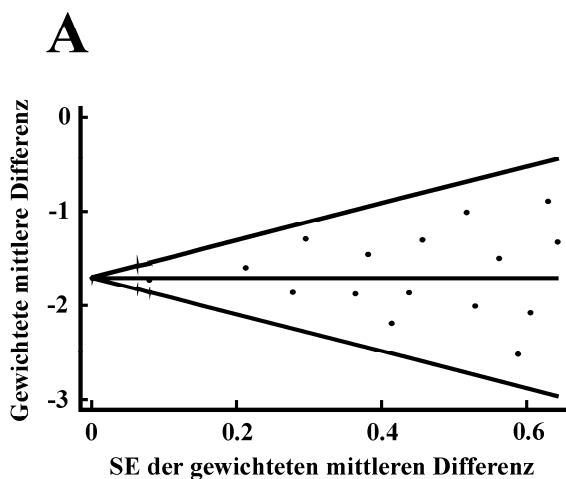
Abb. 11: A - Idealer 'funnel plot', B - Darstellung des 'funnel plots' mit den Studien der vorliegenden Metaanalyse, Wert der eigenen tierexperimentellen Studie eingekreist. Auftragung der gewichteten mittleren Differenz des Geburtsgewichts (g) zwischen den Nachkommen der Ligatur- und der Scheinligaturgruppe jeder einzelnen Studie gegenüber der zugehörigen Studiengröße (eingeschlossene Tierzahl, n).

Diese Verteilung verdeutlicht, dass sich der postulierte Unterschied im Geburtsgewicht zwischen der Ligatur- und der Scheinligaturgruppe mit Zunahme der Studiengröße verringerte. Dieser Eindruck verstärkte sich durch das Hinzufügen unseres eigenen Ergebnisses mit positivem Geburtsgewichtsunterschied (Abb. 11B). Daraufhin wurde der 'funnel plot' auf Asymmetrie mit Hilfe des 'linear regression test' nach Egger getestet. Das signifikante Ergebnis ( $p=0,007$ ) unterstützt das Vorliegen von 'publication bias'. Durch die selektive Veröffentlichung von Studien mit verringertem Geburtsgewicht bei den Nachkommen der Gruppe mit Arteria uterina Ligatur kommt es zu einem Überwiegen dieser Studien und somit zu einer asymmetrischen Darstellung des 'funnel plots'.

Diese Annahme findet ebenfalls durch 'Begg's funnel plot' Unterstützung (Abb. 12), der eine deutliche Asymmetrie in der Verteilung der einzelnen Studien zeigt. Dabei wurden die Standardfehler der gewichteten mittleren Differenzen (SE WMD) der eingeschlossenen Studien gegen den gewichteten Studieneffekt (WMD) aufgetragen. Die horizontale Linie beschreibt den Schätzwert der Studien. Die schrägen Linien zeigen den Verlauf des 95 % Konfidenzintervalls

für einen vorgegebenen Standardfehler. In einem idealen 'Begg's funnel plot' verteilen sich die Studien gleichmäßig um den Schätzwert aller Studien innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls (Abb. 12A). Bei der Auswertung mit den Studien der vorliegenden Metaanalyse liegt die Punktwolke zum großen Teil außerhalb des Pseudo-95 % Konfidenzintervalls und verteilt sich nicht gleichmäßig um die horizontale Linie des Schätzwertes (Abb. 12B).

## Ideale Metaanalyse



## Vorliegende Metaanalyse

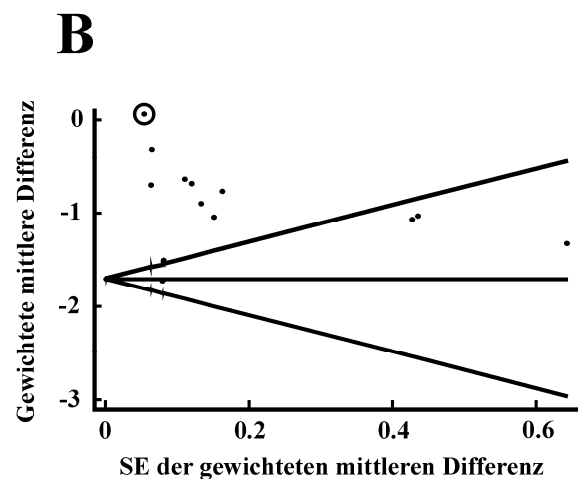


Abb. 12: 'Begg's funnel plot'; A - Idealer 'funnel plot', B - Darstellung mit den Studien der Metaanalyse, Wert der eigenen tierexperimentellen Studie eingekreist. Auftragung des Standardfehlers (SE) der gewichteten mittleren Differenz gegenüber der zugehörigen gewichteten mittleren Differenz des Geburtsgewichts zwischen den Nachkommen der Ligatur- und der Scheinligaturgruppe. Als Hilfslinien markiert sind der Schätzwert der Studien (horizontale Linie) und das 95 % Konfidenzintervall für einen vorgegebenen Standardfehler (schräge Linien).

### **3.4. Diskussion**

#### **3.4.1. Modell der Arteria uterina Ligatur und Metaanalyse der internationalen Literatur**

Das 'small baby syndrome' beschreibt den Zusammenhang zwischen einem verminderten Geburtsgewicht und dem später erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes, Bluthochdrucks und einer Dyslipidämie im Sinne des metabolischen Syndroms (Hales et al. 1991, Hales und Barker 1992, Barker et al. 1993). In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde dieser phänomenologische Zusammenhang bestätigt (Rich-Edwards et al. 1997, Eriksson et al. 2004, Tian et al. 2006). Der Nachweis dieses Zusammenhangs ist gerade bei steigenden Inzidenzen eines verringerten Geburtsgewichts (Martin et al. 2003) und den stetig wachsenden Zahlen von Übergewicht, Diabetes und Bluthochdruck (Ford et al. 2004) von Bedeutung, um mögliche präventive Maßnahmen zur Verhinderung des metabolischen Syndroms zu entwickeln. Weltweit betrachtet stellt die Hauptursache eines verminderten Geburtsgewichts die maternale Mangelernährung dar. In den industrialisierten westlichen Ländern allerdings, in denen auch die epidemieartige Zunahme an Stoffwechselkrankheiten im Sinne des metabolischen Syndroms zu verzeichnen ist, ist weniger die mütterliche Mangelernährung, sondern vielmehr die Verminderung des uteroplazentaren Blutflusses von Bedeutung (Ghidini 1996, Resnik 2002). Das über Jahrzehnte bedeutsamste und zur Untersuchung einer uteroplazentaren Insuffizienz am häufigsten verwendete Tiermodell stellt das von Wigglesworth entwickelte Modell der Arteria uterina Ligatur dar. Dabei soll durch diese Ligatur im letzten Schwangerschaftsdrittel der trächtigen Ratte eine Verminderung des uteroplazentaren Blutflusses und damit ein vermindertes Geburtsgewicht der Feten hervorgerufen werden (Wigglesworth 1964).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen allerdings, dass bei spontan geborenen Ratten von Müttern, bei denen die Arteria uterina am 17. GT ligiert wurde, kein vermindertes Geburtsgewicht vorliegt. Des Weiteren ist weder der Anteil an wachstumsretardierten Tieren bei den Nachkommen erhöht, noch weisen die Tiere eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme auf. Ebenso sind bei den Tieren, zumindest zum Zeitpunkt des Absetzens am 21. LT, keine Hinweise auf diabetogene und adipogene Stoffwechselstörungen bzw. Indikatoren für eine Entwicklung im Sinne des metabolischen Syndroms nachweisbar. Eine Metaanalyse der bisher in der Literatur veröffentlichten Studien, die das Modell der Arteria uterina Ligatur verwendeten, erbrachte deutliche Hinweise auf das Vorliegen von 'publication bias'. Dabei wurden überwiegend Studien mit kleinen Tierzahlen veröffentlicht, die eine Verringerung des mittleren Geburtsgewichts bei den Tieren der Ligaturgruppe durch aktive Selektion von

neugeborenen Ratten mit einem niedrigen Geburtsgewicht unklarer Genese erreichten. Nach Auswertung der experimentellen Daten und auch der Ergebnisse der Metaanalyse muss das Modell der Arteria uterina Ligatur als geeignetes Modell zur Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen des 'small baby syndrome' in Frage gestellt werden.

### **3.4.2. Zur Eignung des Modells der Arteria uterina Ligatur für die Erzeugung von Ratten mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion**

Das Modell beruht auf Untersuchungen von Wigglesworth, der eine einseitige Arteria uterina Ligatur am 17. GT bei Ratten durchführte (Wigglesworth 1964). In diesem ursprünglichen Modell wurden die Tiere per sectio und Tötung der Mutterratten zwischen dem 21. und 22. Gestationstag (GT) geboren, wodurch eine genaue Zuordnung der einzelnen Feten zu dem jeweiligen Uterushorn und damit zu den Gruppen möglich war. In seinen Untersuchungen war die postnatale respiratorische Adaptation der Nachkommen nach einer Sectio erschwert und so wies nur die Hälfte der Tiere nach einer Arteria uterina Ligatur eine Spontanatmung auf (Wigglesworth 1964). Zudem wurde nachgewiesen, dass es nach einseitiger Ligatur der Arteria uterina zu einer Hyperperfusion der Gegenseite mit gesteigertem Wachstum der Kontrolltiere kommt (Wigglesworth 1964, Kollée et al. 1979). Aus diesen Gründen setzte sich zunehmend die Durchführung einer beidseitigen Arteria uterina Ligatur zur Untersuchung einer uteroplazentaren Insuffizienz durch (Kollée et al. 1979, Ogata et al. 1985, Simmons et al. 2001, Nüsken et al. 2008), wie es auch in unserem Experiment durchgeführt wurde. Durch diese Abwandlung des Tiermodells zu einer beidseitigen Arteria uterina Ligatur ist eine Spontangeburt der Ratten möglich, da keine Zuordnung der Feten zu den einzelnen Uterushörnern erfolgen muss. Auch beim Menschen stellt die Spontangeburt den grundsätzlich natürlichsten und damit den paradigmatisch relevanten Geburtsmodus dar.

Bei seinen Untersuchungen beobachtete Wigglesworth eine drastisch gesteigerte intrauterine Mortalität bei den Feten des uterinen Horns mit einer Arteria uterina Ligatur. Auch in der vorliegenden Studie war die intrauterine Mortalität der Feten aus der Ligaturgruppe stark erhöht, was sich in einer signifikant verringerten Primärwurfgröße zeigte. Bei fehlender Spontangeburt trächtiger Ratten eröffneten wir das Abdomen der Tiere drei Tage nach dem berechneten Geburtstermin und fanden resorbierte bzw. in Resorption befindliche fetale Anlagen. Die Zahl der totalen fetalen Resorption lag in gleicher Rate vor, wie es bereits im Jahr 1964 von Wigglesworth beschrieben wurde (12/53 vs. 2/10;  $p=1,0$ ).



In unserer Studie weisen die neugeborenen Ratten von Müttern mit einer Arteria uterina Ligatur keine Verringerung des mittleren Geburtsgewichts auf. Die Tiere der Ligaturgruppe sind im Mittel tendenziell sogar schwerer als die Kontrolltiere der Scheinligaturgruppe. Der Anteil an Tieren mit einem verringerten Geburtsgewicht ist gering. Bei den Männchen der Ligaturgruppe beträgt der Anteil nur 3,9 % und bei den Weibchen 10,4 %. In beiden Fällen unterscheidet er sich nicht signifikant von dem in der Scheinligaturgruppe. Wie aus Tabelle 1 (S. 48) ersichtlich, ergab der Vergleich unserer Daten zu den in der Literatur veröffentlichten Studien mit einer Arteria uterina Ligatur, dass sich die veröffentlichten Geburtsgewichte der Tiere aus der Scheinligaturgruppe nicht wesentlich von denen aus unserer Studie unterscheiden. Dennoch bleibt die Frage, warum das Geburtsgewicht bei den Nachkommen der Ligaturgruppe nicht verringert ist. Möglicherweise führt das intrauterine Absterben von Feten infolge der Ligatur der Arteria uterina zu einer ausreichenden oder sogar verbesserten Blutversorgung der verbleibenden Feten, was sich in der Folge in einer tendenziellen Erhöhung des mittleren Geburtsgewichts bei den Nachkommen der Ligaturgruppe zeigt. Tatsächlich ist der Anteil an makrosomen neugeborenen Weibchen und Männchen in den Primärwürfen der Ligaturgruppe tendenziell eher erhöht als vermindert. Van Marthens und Zamenhof beschrieben bereits 1969, dass eine operative Reduktion der intrauterinen Tierzahl bei Ratten durch Ligatur eines uterinen Horns vor der Anpaarung zu einem höheren Geburtsgewicht der verbleibenden Feten führt (Van Marthens und Zamenhof 1969). Die Autoren vermuteten eine verbesserte Blut- und Nährstoffversorgung der Feten in utero, die ein gesteigertes Wachstum bewirkt. Dagegen war das Geburtsgewicht von Tieren aus einem natürlich entstandenen kleinen Primärwurf, d.h. ohne äußere Manipulation, nicht erhöht. Es wurde vermutet, dass eine Rattenmutter mit einem natürlich entstandenen kleinen Primärwurf ein geringeres Potential für die pränatale Versorgung einer großen Anzahl an Feten hat, während eine Rattenmutter, bei der ein uterines Horn einseitig ligiert wurde, die grundsätzliche Fähigkeit für die ausreichende Versorgung der doppelten Anzahl an Feten besitzt. Bei letzteren kommt es aber nach einer experimentellen Verringerung der intrauterinen Anzahl an Feten zu einer verbesserten Versorgung der verbleibenden Feten mit resultierender Erhöhung des mittleren Geburtsgewichts (Van Marthens und Zamenhof 1969). Ogata et al. beschrieben, das durch selektives Abbinden der placentaren Blutversorgung einzelner Embryonen das Absterben dieser Embryonen herbeigeführt wird und sich das Geburtsgewicht der verbleibenden Feten erhöht (Ogata und Finley 1988). Auch werden nach Ligatur einer Arteria uterina Kompensationsmechanismen beschrieben, die zu einer vermehrten Durchblutung durch die Arteria ovarica und andere Kollateralen entstehen (Wigglesworth 1964, Nüsken et al. 2007). Feten, die entfernt von der Ligatur liegen, könnten damit eine verbesserte Blutversorgung

erfahren. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, Feten aus diesem Modell, die nahe der Arteria uterina Ligatur liegen, intrauterin zu markieren, um diese auch nach der Geburt identifizieren zu können (Nüsken et al. 2007).

Es gibt weitere Studien zu diesem Modell, die den Einfluss des Operationszeitpunktes auf das Geburtsgewicht und auf die Verringerung der Primärwurfgröße untersuchten. In einer Arbeit wurde der Operationszeitpunkt im mittleren Gestationsdrittel am 13. GT mit einem Operationszeitpunkt im letzten Gestationsdrittel am 17. GT verglichen. Dabei zeigte sich, dass eine Ligatur am 13. GT zu einer erhöhten Resorptionsrate und zu einem gesteigerten Geburtsgewicht bei den Nachkommen der Ligaturgruppe führt, während eine Ligatur an einem späteren Gestationstag (17. GT) neben einer Verringerung der Wurfgröße auch eine Verringerung des Geburtsgewichts verursacht (Sanders et al. 2004). Besonders im letzten Schwangerschaftsdrittel erfahren Rattenfeten einen starken Wachstumsschub, verbunden mit einem erhöhten Plazentawachstum und einer vermehrten uteroplazentaren Durchblutung, die durch eine Verminderung des totalen peripheren Widerstands bedingt ist (Dowell und Kauer 1997). Manniello et al. untersuchten den Einfluss des Operationszeitpunktes zwischen dem 17. - 19. GT, wobei der Tag des Spermiennachweises nicht wie bei uns als 1. Tag, sondern als 0. Tag der Gestation festgelegt wurde. Dabei zeigten sie, dass eine Ligatur der Arteria uterina bei jedem dieser drei Operationszeitpunkte vom 17. - 19. GT zu einer erhöhten Anzahl an neugeborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht führt, wobei der Anteil an retardierten Ratten nach einer Ligatur am 19. GT am höchsten war (Manniello et al. 1977). Möglicherweise bewirkt die Ligatur im zweiten Drittel der Schwangerschaft ein Ausbleiben des starken fetalen und plazentaren Wachstums und in der Folge ein Absterben der Feten mit Resorption der fetalen Anlagen, während das Abbinden der Blutversorgung im letzten Drittel der Gestation nach Einsetzen der starken Größenzunahme mit Erreichen einer zum Überleben kritischen Größe lediglich zu einer Wachstumsrestriktion führt. Unter Berücksichtigung dieser Studien wählten wir den Operationszeitpunkt ebenfalls im letzten Drittel der Gestation. Im Vergleich zu den Studien der Metaanalyse (Tab. 1; S. 48) unterschied sich die Dauer, die die Feten in unserem Experimentalansatz einer Ligatur bzw. Scheinligatur ausgesetzt waren nicht wesentlich von den Studien anderer Arbeitsgruppen. Dabei wurde in ca. der Hälfte der Studien der Metaanalyse als Operationszeitpunkt ebenfalls der 17. GT gewählt. Über alle Studien der Metaanalyse konnte keine Abhängigkeit eines verringerten Geburtsgewichts vom Zeitpunkt der Ligatur im dritten Trimester festgestellt werden. Möglicherweise hat die fetale Expositionsdauer gegenüber einer Arteria uterina Ligatur im letzten Trimester nur noch einen sehr geringen Einfluss auf das Geburtsgewicht. Alternativ könnte vermutet werden, dass zahlreiche Studienergebnisse zu

diesem Modell, die eine Abhängigkeit der Geburtsgewichtsverringering vom Operationszeitpunkt gezeigt hätten, nicht veröffentlicht wurden, was ebenfalls ein Hinweis für das Vorliegen von 'publication bias' wäre (siehe auch unter 3.4.4., S. 62).

Einen weiteren Einflussfaktor auf die Anzahl neugeborener Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht in der Ligaturgruppe stellt möglicherweise der Geburtsmodus dar. Bei Manniello et al., die in ihren Studien einen Anteil an wachstumsretardierten Ratten bis zu 39 % beobachteten, erfolgte keine Spontangeburt, sondern sie führten eine Sectio durch (Manniello et al. 1977). Möglicherweise wäre in unserer Studie bei Durchführung einer Sectio zum Geburtstermin der Anteil an retardierten Feten größer, die durch eine Spontangeburt nicht geboren wurden. Wir können also nicht sicher ausschließen, dass das Modell nach Durchführung einer Sectio eine größere Anzahl an Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht hervorgebracht hätte und damit das mittlere Geburtsgewicht reduziert wäre. Angesichts der in unserer Studie vorliegenden erhöhten Makrosomierate und des eher erhöhten Geburtsgewichts bei den Nachkommen der Ligaturgruppe, scheint das aber als sehr unwahrscheinlich.

Nach den vorliegenden Ergebnissen muss deshalb davon ausgegangen werden, dass es durch die Ligatur der Arteria uterina primär zu einem intrauterinen Absterben von Feten kam, was sich in der Verringerung der Primärwurfgröße zeigt. Daraus resultierte eine gleich bleibende oder sogar verbesserte Blut- und Nährstoffversorgung der verbleibenden Feten, die ein normales oder sogar leicht erhöhtes Geburtsgewicht aufweisen. Damit ist einerseits das Hauptkriterium des 'small baby syndrome', nämlich ein verringertes Geburtsgewicht, nicht erfüllt. Andererseits wird das Auftreten eines verringerten Geburtsgewichts in den entwickelten Industrieländern hauptsächlich durch eine intrauterine Mangelperfusion bedingt, so dass die Anwendung dieses Modells, in dem es nach der Arteria uterina Ligatur möglicherweise sogar zu einer Hyperperfusion der verbleibenden Feten kommt, zur Untersuchung des 'small baby syndrome' kritisch in Frage gestellt werden muss. Es stellt unserer Meinung nach kein geeignetes Tiermodell hierfür dar, da eine reproduzierbare Sicherstellung der zentralen Experimentalanforderungen, nämlich des verminderten Geburtsgewichts, nicht gewährleistet ist.

### **3.4.3. Auftreten von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei Nachkommen aus dem Arteria uterina Ligatur Modell**

Nachkommen von Müttern mit Arteria uterina Ligatur waren zur Geburt nicht leichter als die Kontrolltiere. Auch am 21. LT gab es keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Gruppen. Zum Zeitpunkt des Absetzens vom Muttertier am 21. LT wiesen die Nachkommen von

Müttern mit einer Arteria uterina Ligatur keine Hinweise auf die Entwicklung von adipogenen oder diabetogenen Stoffwechselstörungen auf. Die Bestimmung der Blutglukose, Triglyceride, von Insulin, Leptin und der Insulin/Blutglukose Ratio ergab keine Gruppenunterschiede. Vielmehr hatten die wenigen Ratten der Ligaturgruppe, die zur Geburt ein vermindertes Körpergewicht aufwiesen, am 21. LT sogar geringere Werte für Blutglukose, Insulin, Triglyceride, die Insulin/Blutglukose Ratio und auch für Leptin im Vergleich zu den zur Geburt normalgewichtigen oder makrosomen Ratten der Ligaturgruppe. Bei der Entwicklung des Körpergewichts wiesen die Tiere der Ligaturgruppe ein gleiches oder tendenziell sogar erhöhtes Körpergewicht bis zum 21. LT im Vergleich zu den Tieren der Scheinligaturgruppe auf. Es liegt die Vermutung nahe, dass es durch die Arteria uterina Ligatur zum Absterben der kleinsten und schwächsten Feten kam, während die stärksten und schwersten Feten mit dem größeren Wachstumspotential überlebten. Eine Arbeit von Bruce zeigte, dass eine Arteria uterina Ligatur nur eine kurzzeitige Reduktion des uterinen Blutflusses erzeugt und sich dieser schnell wieder auf vergleichbare Werte zur Kontrollgruppe normalisiert (Bruce 1977). Durch diese kurzzeitige Reduktion der uterinen Perfusion könnte es zum Absterben der schwächsten Feten gekommen sein, während sich im Folgenden die überlebenden größeren und kräftigeren Feten unter einer normalen oder reaktiv sogar verbesserten uterinen Perfusion weiterentwickelten.

In unserem Versuch wurden die Wurfgrößen ab dem 3. Lebenstag adjustiert, so dass alle Tiere unter gleichen Voraussetzungen aufgezogen wurden. Dennoch kam es tendenziell sogar zu einer Erhöhung des Körpergewichts bei den Tieren der Ligaturgruppe. Möglicherweise haben Nachkommen von Müttern mit Arteria uterina Ligatur, da sie ein tendenziell höheres mittleres Geburtsgewicht aufwiesen, die Laktation der Rattenmutter stärker stimuliert, so dass im weiteren Verlauf eine relativ größere Muttermilchmenge zur Verfügung stand. Gerade wenn die Tiere mit dem größten Wachstumspotential intrauterin überlebten, resultierte daraus bei einem frühpostnatal guten Milch- und Nahrungsangebot eine stärkere Gewichtszunahme.

Aus diesen Beobachtungen ließe sich vermuten, dass nicht ein verringertes sondern eher ein übermäßiges prä- und perinatales Nahrungsangebot das in der Literatur beschriebene erhöhte Erkrankungsrisiko an Symptomen des metabolischen Syndroms bei Tieren nach Arteria uterina Ligatur bewirkt. Ergebnisse aus anderen Experimentalansätzen zeigen, dass ein erhöhtes Geburts- bzw. Körpergewicht durch eine pränatale oder frühpostnatale Überernährung bzw. die gesteigerte neonatale Gewichtszunahme und gesteigerte Körperfettmenge positiv mit dem späteren Risiko für Übergewicht und Diabetes korrelieren (Plagemann et al. 1999c, Plagemann 2004). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe fand sich auch, dass normalgewichtige neugeborene Ratten, die bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen aufgezogen

wurden, im adulten Alter ein Übergewicht, eine Hyperphagie, Hyperleptinämie, Hyperinsulinämie, gestörte Glukosetoleranz und einen gesteigerten systolischen Blutdruck als Symptome eines metabolischen Syndroms aufweisen (Plagemann et al. 1999c, Plagemann et al. 1999d).

Ebenso gibt es zahlreiche epidemiologische Studien zum Einfluss einer frühpostnatalen gesteigerten Gewichtszunahme auf das spätere Risiko für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms. Kinder mit einem verringerten Geburtsgewicht haben nach einer gesteigerten Gewichtszunahme im frühen Kindesalter höhere Nüchterninsulinwerte als die Kontrollgruppe als Zeichen einer beginnenden Insulinresistenz (Crowther et al. 1998, Soto et al. 2003). In weiteren Untersuchungen fand sich ein positiver Zusammenhang zwischen einer frühpostnatalen starken Gewichtszunahme und dem Risiko eines erhöhten Körpergewichts im späten Kindes- und frühen Erwachsenenalter auch unabhängig vom Geburtsgewicht (Dörner und Mohnike 1977, Stettler et al. 2002, Stettler et al. 2003). In Auswertungen von Daten unserer Arbeitsgruppe bestand auch eine signifikant positive Korrelation zwischen einer gesteigerten frühpostnatalen Gewichtszunahme und dem systolischen Blutdruck im juvenilen Alter (Harder und Plagemann 2002). Zusammenfassend gilt eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme bei der Entstehung von Symptomen des metabolischen Syndroms als bedeutsamer Risikofaktor (Dörner und Plagemann 1994, Stettler et al. 2002, Soto et al. 2003, Plagemann und Harder 2004). In unserem Experiment hingegen wiesen Nachkommen von bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten mit einem verringerten Geburtsgewicht kein 'rapid neonatal weight gain' und kein neonatales 'catch-up growth' auf, ebenso wie die SGA-Tiere der Kontrollgruppe mit Scheinligatur. SGA-Tiere beider Gruppen hatten bis zum 21. LT ein im Vergleich zu den anderen Tieren der jeweiligen Gruppe verringertes Körpergewicht.

In einer anderen Studie konnten bei Nachkommen von bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten Störungen der Glukosetoleranz und des Fettstoffwechsels sowie eine gesteigerte Körperfettmasse festgestellt werden, die aber erst im Alter von 15 Wochen nachweisbar waren (Nüsken et al. 2008). In dieser Studie fanden sich die Störungen des Fettstoffwechsels mit gesteigerter Körperfettmasse, Triglyceriden, Cholesterinwerten und Leptinwerten allerdings auch bei den Nachkommen der Scheinligaturgruppe. Die Autoren führten die Veränderungen des Fettstoffwechsels auf Faktoren während der Operation bzw. postoperativen Phase zurück und nicht auf die Auswirkungen einer Minderdurchblutung nach einer Arteria uterina Ligatur (Nüsken et al. 2008). Innerhalb der Studien der von uns durchgeführten Metaanalyse beschrieben nur 2 von 13 Studien die Entwicklung von diabetogenen Stoffwechselstörungen bei

Nachkommen von Müttern mit einer Arteria uterina Ligatur (Boloker et al. 2002, Simmons et al. 2001). Allerdings untersuchte nur eine dieser beiden Studien zur Geburt tatsächlich wachstumsretardierte Tiere (Boloker et al. 2002). Bezüglich der Entwicklung eines Bluthochdrucks als mögliches Symptom des metabolischen Syndroms konnte in Langzeituntersuchungen bei Nachkommen aus dem Arteria uterina Ligatur Modell kein Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und einem Bluthochdruck im Alter von 3-4 Monaten gefunden werden (Jansson und Lambert 1999).

Zusammenfassend konnte bei den SGA-Tieren der Ligaturgruppe weder die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms noch eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme als aktuell diskutierter möglicher Schlüsselfaktor beim 'small baby syndrome' bis zum 21. LT beobachtet werden. Es gibt also keinerlei Übereinstimmungen zu klinischen Beobachtungen an neugeborenen Kindern, die ein verringertes Geburtsgewicht aufweisen und im späteren Leben Symptome des metabolischen Syndroms entwickeln. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass es bei den SGA-Tieren aus der Gruppe mit Arteria uterina Ligatur im späteren Leben zu einer Entwicklung von adipogenen oder diabetogenen Stoffwechselstörungen gekommen wäre. Die orientierenden Untersuchungen bis zum 21. LT allerdings gaben keinen Hinweis auf eine Prädisposition für diese Erkrankungen.

#### **3.4.4. Metaanalyse zur Eignung des Modells der Arteria uterina Ligatur für die Untersuchung des 'small baby syndrome'**

Metaanalysen und systematische Reviews sind geeignete Hilfsmittel, die zur Untersuchung der Validität von Studienergebnissen dienen (Moher et al. 2007). Diese finden v.a. in der Epidemiologie, jüngst aber auch bei der Auswertung tierexperimenteller Daten ihre Anwendung (Pound 2004).

Im Zusammenhang mit dem 'small baby syndrome' haben besonders die Metaanalysen von Huxley et al. große Bedeutung, die zeigten, dass der maßgeblich von den Arbeitsgruppen von Hales und Barker publizierte Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Geburtsgewicht und dem später erhöhten Blutdruck bzw. Bluthochdruckspiegel vor allem auf das Vorliegen von 'publication bias' zurückzuführen ist (Huxley et al. 2002, Huxley et al. 2004). Das bedeutet, dass der epidemiologisch gezeigte Zusammenhang zwischen einem verringerten Geburtsgewicht und dem späteren Risiko für die Erkrankung an Bluthochdruck und einer Hypercholesterinämie v.a. auf die selektive Veröffentlichung kleinerer Studien zurückzuführen ist, in denen ein größerer

Effekt beschrieben wurde. Diese Verzerrung des wahren Ergebnisses in der Literatur wird auch als 'publication bias' bezeichnet (Begg und Berlin 1989, Dickersin et al. 1992).

Die von uns durchgeführte systematische Literaturrecherche zum Modell der Arteria uterina Ligatur lieferte 13 Studien, die die Einschlusskriterien erfüllten. Die Berechnung der gepoolten mittleren Differenz des Geburtsgewichts mittels 'random effects model' aus diesen 13 Studien ergab eine Reduktion des Geburtsgewichts bei Nachkommen von bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten von 1,02 g. Es bestand damit eine deutliche Diskrepanz zu den Ergebnissen unserer eigenen tierexperimentellen Studie. Das mittlere Geburtsgewicht bei den Tieren der Ligaturgruppe zeigte in unserer Studie keine Verminderung, sondern war tendenziell sogar erhöht. Als mögliche Ursache dieser Diskrepanz vermuteten wir das Vorliegen von 'publication bias', das eine Verzerrung des Effektschätzers durch eine selektive Veröffentlichung bestimmter Studien beschreibt. Es erfolgte dahingehend eine Untersuchung durch die Anwendung von 'funnel plots'. Dabei wurde die Studiengröße gegen den Effektschätzer jeder einzelnen Studie aufgetragen. In Abwesenheit von 'publication bias' stellt sich der 'funnel plot' als ein symmetrischer, umgekehrter Trichter dar, da die häufiger vorkommenden kleineren Studien mit einer größeren Variabilität um den mittleren Effekt streuen als große Studien (Higgins und Thompson 2002, Sterne und Egger 2001). Die Spitze dieses Trichters bilden die nah am mittleren Effekt gelegenen Untersuchungen mit einem großen Stichprobenumfang, da sich mit Zunahme der Studiengröße der zufällige Fehler vermindert und somit die Genauigkeit erhöht wird (Egger und Smith 1998). Das selektive Fehlen kleiner Studien mit nicht signifikanten bzw. negativen Ergebnissen auf einer Seite an der breiten Basis des Trichters stellt sich in einer 'funnel plot' Asymmetrie dar, welche auf das Vorliegen von 'publication bias' hinweist (Sterne et al. 2001). In dem von uns angelegten 'funnel plot' der vorliegenden Metaanalyse war deutlich zu erkennen, dass der größte Geburtsgewichtsunterschied zwischen den Versuchsgruppen in den kleinsten Studien beobachtet wurde. Mit steigender Studiengröße verringerte sich die Differenz und tendierte in den größten Studien sogar gegen null. Das Hinzufügen der Ergebnisse unserer eigenen tierexperimentellen Studie, die die größte Tierzahl umfasste, in den 'funnel plot' verstärkte diese Tendenz. Dagegen fehlten in der Darstellung kleinere Studien mit erhöhtem Geburtsgewicht bei Nachkommen von Müttern mit einer Arteria uterina Ligatur komplett, was zu der asymmetrischen Abbildung der Punktwolke führte. Auch die Anwendung des Egger Tests als statistische Methode zur formalen Erfassung einer 'funnel plot' Asymmetrie, besonders bei Metaanalysen mit einer kleinen Studienanzahl (Sterne et al. 2001), lieferte ein signifikantes Ergebnis als Hinweis auf das Vorliegen von 'publication bias'. Ebenso zeigte die Darstellung der Ergebnisse der 13 in der Metaanalyse eingeschlossenen

Arbeiten im 'Begg's funnel plot' eine asymmetrische Verteilung der Studien als Hinweis für 'publication bias'. Eine Erklärung für diese selektive Publikation einzelner Studien liegt in der Tatsache, dass Studien, die signifikante Ergebnisse aufweisen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit publiziert werden als Studien ohne ein solches Resultat (Dickersin 1992). Dies kann zu einem Überwiegen falsch positiver Ergebnisse in der Literatur führen (Begg und Berlin 1989). Bei Studien mit einer großen Tier- oder Teilnehmerzahl allerdings kommt es durch den höheren zeitlichen und finanziellen Aufwand häufig auch dann zu einer Publikation, wenn keine signifikanten oder sogar negative Ergebnisse vorliegen (Sterne et al. 2001).

Neben diesen deutlichen Hinweisen auf 'publication bias' war die Qualität der publizierten Daten oft mangelhaft. Es ist bekannt, dass Studien mit geringerer Qualität die größeren Unterschiede im Ergebnis liefern (Egger und Smith 1998). Bei den in der Metaanalyse eingeschlossenen Arbeiten wurde in der Hälfte der Studien keine genaue Anzahl der verwendeten Rattenmütter bzw. keine genaue Größe der Primärwürfe angegeben. In den verbleibenden Studien, in denen die Daten vorlagen, war die Anzahl der Muttertiere in der Ligaturgruppe oft größer als die der Scheinligaturgruppe, bei allerdings annähernden oder gleichen angegebenen Tierzahlen der Nachkommen beider Gruppen, die in die Auswertung eingingen (z.B. Houdijk et al. 2000, Shaul et al. 1989). Ursächlich war offenbar eine nachweisliche Selektion von Nachkommen mit reduziertem Geburtsgewicht aus den Primärwürfen (Ogata et al. 1985, Houdijk et al. 2000, Shaul et al. 1989, Cha und Oh 1986, Cha et al. 1987). In weiteren Studien ist von einem derartigen Selektionsprozess auszugehen, da nicht alle bei den Primärwürfen angegebenen Tiere in die Berechnung des Geburtsgewichts eingingen (Sadiq et al. 1998, Wrutniak und Cabello 1983, Boloker et al. 2002). Damit war das mittlere Geburtsgewicht bei den Tieren der Ligaturgruppe offenbar nicht vermindert, da ein solcher Selektionsprozess der Tiere für die Auswertung sonst wohl nicht notwendig gewesen wäre. Zudem spricht die asymmetrische Darstellung der Studienergebnisse im 'funnel plot' gegen eine randomisierte Auswahl der Tiere aus den Primärwürfen. Keine der 13 Studien beschrieb einen gesteigerten Anteil an retardierten Tieren in den Primärwürfen der Ligaturgruppe verglichen mit den Kontrolltieren. Es muss daraus geschlussfolgert werden, dass die Durchführung einer Arteria uterina Ligatur im letzten Drittel der Gestation bei trächtigen Ratten keine Reduktion des mittleren Geburtsgewichts der Nachkommen durch Verminderung der uterinen Blutversorgung erzeugt. Bei den wenigen selektierten Nachkommen, die in die Auswertungen eingingen, muss man somit eine Verringerung des Geburtsgewichts unklarer Ursache annehmen. Eine aktuelle Arbeit an diesem Modell zeigt, dass nur die nahe an der Ligatur gelegenen Tiere von der uteroplazentaren Minderperfusion betroffen sind und eine Verringerung des Körpergewichts



erfahren. Entfernt von der Ligatur gelegene Feten sind eher einer kompensatorischen Hyperperfusion v.a. durch die Arteria ovarica ausgesetzt und haben sogar ein höheres Körpergewicht als Tiere der Scheinligaturgruppe gleicher Position (Nüsken et al. 2007).

Ein Großteil der primär in der Literaturrecherche ermittelten Arbeiten am Modell der Arteria uterina Ligatur ging nicht in die Auswertung ein, da kein Geburtsgewicht, sondern erst das Gewicht am 2. LT aufgeführt war. Aktuelle Studien kritisieren diese Selektion von Nachkommen anhand des Körpergewichts am 2. LT, da während der ersten beiden postnatalen Tage auch andere Faktoren wie z.B. die Wurfgröße für die weitere Gewichtsentwicklung von Bedeutung sind und zu einem Gewichtsstillstand, aber auch zu einer starken Gewichtszunahme führen können (Nüsken et al. 2007). Es besteht somit keine direkte Korrelation des Körpergewichts am 2. LT zum Geburtsgewicht.

Zur weiteren Einschätzung der Eignung des Modells der Arteria uterina Ligatur für die Untersuchung des 'small baby syndrome' wurden die Studien der Metaanalyse auf mögliche Hinweise für die Entstehung von Symptomen des metabolischen Syndroms bei den Nachkommen von bilateral Arteria uterina ligierten Mutterratten untersucht. Keine der Studien, deren Auswertung Nachkommen mit einem verringerten Geburtsgewicht beinhaltete, wies eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme bzw. ein 'catch-up growth' bei diesen Tieren nach. In 5 Studien wurden Stoffwechselfparameter, die Hinweise für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms geben könnten, bestimmt (Boloker et al. 2002, Simmons et al. 2001, Styrud et al. 2005, Ogata et al. 1985, Peterside et al. 2003). Dabei wurde in 2 Arbeiten eine gestörte Glukosetoleranz bei Nachkommen von Müttern mit Arteria uterina Ligatur festgestellt (Boloker et al. 2002, Simmons et al. 2001), wobei allerdings nur in einer dieser beiden Studien definitionsgemäß wachstumsretardierte Tiere verwendet wurden (Boloker et al. 2002). Weitere 2 Studien fanden keine metabolischen, adipogenen oder kardiovaskulären Veränderungen bei den Tieren der Ligaturgruppe im juvenilen oder Erwachsenenalter (Ogata et al. 1985, Peterside et al. 2003), während die letzte der 5 Arbeiten uneinheitliche Ergebnisse beschrieb (Styrud et al. 2005). Es fand sich eine Reduktion der  $\beta$ -Zellmasse des Pankreas sowie eine Verringerung des Insulingehalts des Pankreas bei Nachkommen aus der Ligaturgruppe. Die Seruminsulinkonzentrationen während des Glukosetoleranztests allerdings waren bei den männlichen Nachkommen der Ligaturgruppe nach 60 und 120 Minuten erhöht. Bei den Weibchen wiederum bestand eine Verringerung der Seruminsulinkonzentration während des Tests nach 30 Minuten im Vergleich zu den Kontrolltieren der Scheinligaturgruppe. Die Bestimmung der Blutglukose während des Tests ergab bei den Männchen keine Unterschiede

und bei den Weibchen eine leichte Erhöhung der Blutglukose nach 120 Minuten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Styrud et al. 2005).

Zusammenfassend konnten trotz des aktiven Selektionsprozesses von Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht aus den Primärwürfen nach einer Arteria uterina Ligatur in nur einer Studie Merkmale des metabolischen Syndroms bei SGA-Ratten gezeigt werden (Boloher et al. 2002), während keine der Studien eine gesteigerte Gewichtszunahme bzw. ein 'catch-up growth' beschrieb. Aus diesem Grund muss das Modell der Arteria uterina Ligatur neben seiner mangelnden Eignung, reproduzierbar neugeborene Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht zu erzeugen, auch hinsichtlich der fehlenden Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms als Tiermodell zur Untersuchung des 'small baby syndrome' grundsätzlich in Frage gestellt werden.

### **3.5. Fazit**

In epidemiologischen Studien wurde der phänomenologische Zusammenhang zwischen einem verringerten Geburtsgewicht und dem später erhöhten Risiko für Erkrankungen wie Typ 2 Diabetes, Adipositas, Fettstoffwechselstörungen und Bluthochdruck mehrfach gezeigt und als 'small baby syndrome' bekannt (Hales et al. 1991, Hales und Barker 1992, Barker et al. 1993, Hales und Barker 2001, Eriksson et al. 2004, Ramadhani et al. 2006, Tian et al. 2006). Zur Untersuchung pathophysiologischer Ursachen dieses Zusammenhangs dienen tierexperimentelle Untersuchungen. Die Hauptursache einer intrauterinen Wachstumsrestriktion in den westlichen Industrieländern, in denen eine epidemieartige Zunahme von Adipositas, Diabetes und kardiovaskulären Störungen zu verzeichnen ist, stellt die intrauterine Minderperfusion dar (Resnik 2002, Gagnon 2003). Das bisher am häufigsten verwendete Modell zur Untersuchung einer uteroplazentaren Minderperfusion ist das Modell der Arteria uterina Ligatur. Aus unseren Untersuchungen muss allerdings geschlossen werden, dass eine Arteria uterina Ligatur im letzten Drittel der Gestation bei Ratten nicht zu einer intrauterinen Wachstumsrestriktion der Nachkommen mit Verringerung des mittleren Geburtsgewichts führt. Nachkommen aus diesem Modell zeigen zudem keine Hinweise auf die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms. Die Auswertung der Metaanalyse offenbart, dass die bisherige Annahme einer Reduktion des Geburtsgewichts durch eine Arteria uterina Ligatur hervorgerufen wurde durch das selektive Veröffentlichen von kleinen Studien, die für ihre Auswertung einzelne Tiere anhand eines verringerten Geburtsgewichts aus den Primärwürfen auswählten. Selbst bei diesen selektierten Tieren mit einem verringerten Geburtsgewicht unklarer Ursache fanden sich

in nur einer der 13 Arbeiten Hinweise auf die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus im höheren Lebensalter (Boloker et al. 2002).

Weitere bislang verwendete Tiermodelle zur Untersuchung des 'small baby syndrome' beinhalteten eine veränderte Ernährung der Rattenmutter während der Gestation. Dabei wurde die Reduktion des Geburtsgewichts der Nachkommen durch eine mütterliche Proteinmangelernährung (low protein) oder durch eine allgemeine Reduktion der aufgenommenen Nahrungsmenge (semistarvation) verursacht. Bei der mütterlichen 'low protein' Diät während der Gestation kommt es zu einer schweren fetalen Wachstumsrestriktion, die mit hohen Mortalitätsraten verbunden ist. Allerdings bleibt das Körpergewicht auch in der weiteren Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert (Muaku et al. 1996). Die wachstumsretardierten Tiere aus diesem Modell zeigen zudem eine normale Glukosetoleranz (Wilson und Hughes 1997, Petry et al. 1997, Garofano et al. 1999) bzw. weisen erst Stoffwechselstörungen nach diätetischer Provokation im juvenilen und Erwachsenenalter auf (Wilson und Hughes 1997). Bei den Tieren liegt keine Hyperinsulinämie als Zeichen einer Insulinresistenz, sondern eher eine verminderte Insulinsekretion vor (Moura et al. 1997, Petry et al. 1997, De Souza Caldeira Filho und Moura 2000). Zudem zeigen Nachkommen aus diesem Modell sogar eine verlängerte Überlebensdauer, sofern die Tiere keine gesteigerte Gewichtszunahme innerhalb der ersten 6 Wochen aufweisen, d.h. wenn sie insbesondere keiner frühpostnatalen Überernährung ausgesetzt waren (Ozanne und Hales 2004, Langley-Evans und Sculley 2006). Eine verminderte uteroplazentare Durchblutung als Hauptursache einer intrauterinen Wachstumsrestriktion in westlichen Industrieländern hat in diesen Modellen allerdings eine untergeordnete oder keine pathophysiologische Bedeutung.

Das häufigste Modell an Nicht-Nagern zur Untersuchung des 'small baby syndrome' ist das Schaf-Modell. Das Schaf weist jedoch eine epitheliochoriale Plazenta auf. Diese unterscheidet sich von der hämochorialen Plazenta des Menschen und der Nager dahingehend, dass bestimmte Nahrungsstoffe, wie z.B. Fettsäuren, nicht transportiert werden können (Père 2003). Somit besteht auch hier eine verminderte Vergleichbarkeit und die Aussagekraft zu pathophysiologischen Ursachen in Bezug auf das 'small baby syndrome' ist deutlich eingeschränkt.

Zusammenfassend stellt das Modell der Arteria uterina Ligatur kein geeignetes Tiermodell dar, um spontan geborene Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht zu erzeugen und daran pathophysiologische Ursachen des 'small baby syndrome' zu untersuchen. Die in der Literatur dominierenden Arbeiten an diesem Modell sind geprägt von aktiver Selektion einzelner Tiere

aus den Primärwürfen mit einem verringerten Geburtsgewicht unklarer Genese. Dennoch konnte auch an diesen selektierten SGA-Tieren keine eindeutige Prädisposition für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms gefunden werden. In anderen Studien fanden sich auftretende Stoffwechselstörungen sowohl bei den Nachkommen der Ligatur- als auch der Scheinligaturgruppe. Weitere Tiermodelle, die durch eine veränderte maternale Ernährung während der Gestation eine Wachstumsrestriktion der Nachkommen erreichten, sind aufgrund der fehlenden Bedeutung einer maternalen Unterernährung in den westlichen Industrieländern als nur bedingt relevant einzustufen.

Somit muss geschlossen werden, dass es bisher kein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung des Risikos für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms nach einer intrauterinen Wachstumsrestriktion aufgrund einer uteroplazentaren Minderperfusion, im Sinne der Hypothese des 'small baby syndrome', gibt.

## **IV. Untersuchungen an einem genuinen Tiermodell für das 'small baby syndrome' zur Bedeutung einer frühpostnatalen Überernährung**

### **4.1. Fragestellung**

Zur tierexperimentellen Untersuchung des 'small baby syndrome' wurden verschiedene Modelle mit dem Ziel entwickelt, neugeborene Tiere mit einer intrauterinen Wachstumsrestriktion zu erzeugen. In den industrialisierten westlichen Ländern stellt die verminderte uteroplazentare Perfusion als Risikofaktor der intrauterinen Wachstumsverzögerung eine Hauptursache dar (Huizinga et al. 2004, Ghidini 1996, Gagnon 2003). Über viele Jahrzehnte war das Modell der Arteria uterina Ligatur bei Ratten das am meisten verwendete Modell zur Untersuchung einer intrauterinen Wachstumsrestriktion nach uteroplazentarer Insuffizienz (Evans et al 1983) und jüngst auch der Hypothese im Sinne des 'small baby syndrome' (Simmons et al. 2001, Styrod et al. 2005). Aus den im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Experimentaldaten und aus der Metaanalyse ist erkennbar, dass dieses Modell jedoch keine reproduzierbare Eignung zur Untersuchung pathophysiologischer Ursachen des 'small baby syndrome' besitzt, da es weder zu einer Reduktion des mittleren Geburtsgewichts noch zu einem Anstieg des Anteils Neugeborener mit einem verringerten Geburtsgewicht bei den Nachkommen von Müttern mit einer Arteria uterina Ligatur führt. Zudem fanden sich in der Mehrzahl der Studien der Metaanalyse keine Hinweise auf die Entwicklung von Symptomen eines metabolischen Syndroms bei den Nachkommen.

Die Ratte gehört zu den mehrgebärenden Tieren. Wie bereits unter 3.1.1. (S. 29) beschrieben, hat sie einen Uterus bicornus, dessen Blutversorgung durch die Arteria uterina aus der Arteria iliaca interna und durch die Arteria ovarica aus der Aorta mit jeweiliger Anastomose gewährleistet wird (Even et al. 1994). Die physiologische plazentare und fetale Perfusion der einzelnen fetalen Anlagen ist auch abhängig von der Lage innerhalb des Uterushorns. Dabei erfahren die Plazentae im mittleren Teil des uterinen Horns den geringsten Perfusionsdruck (McLaren und Michie 1960). Ein weiterer Einfluss auf die Blutversorgung wird durch die Anzahl der fetalen Anlagen innerhalb eines Uterushorns bedingt. Mit steigender Anzahl sinkt der Perfusionsdruck und damit auch die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung jedes Einzelnen (Even et al. 1994). Das zeigt sich u.a. auch in einem inversen Verhältnis zwischen dem Geburtsgewicht und der primären Wurfgröße. Je kleiner die Wurfgröße, desto größer ist das mittlere Geburtsgewicht der Nachkommen (Zamenhof und Van Marthens 1984). Somit führt z.B. bei der Ratte mit normalen

Wurfgrößen zwischen 10 und 16 Tieren allein die große Tierzahl eines Primärwurfes dazu, dass einzelne Tiere durch die Menge der fetalen Anlagen bzw. durch eine periphere Lage im Uterushorn eine Minderdurchblutung erfahren und sich nicht optimal entwickeln können. Diese Beobachtungen bildeten die Grundlage für die Entwicklung eines neuen genuinen Tiermodells zur Untersuchung von neugeborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht. Die neugeborenen Ratten wurden nach der Geburt als SGA (small for gestational age) definiert, wenn ihr Geburtsgewicht unterhalb einer festgelegten Grenze des mittleren Geburtsgewichts desselben Wurfes lag. Dieser Ansatz ist als genuines Tiermodell zu bezeichnen, da es bei den Nachkommen ohne aktive äußere Manipulation während der Gestation zu einer Verminderung des Geburtsgewichts kommt. Damit zeigt es Übereinstimmung zu klinischen Beobachtungen, da eine Wachstumsrestriktion bei humanen Neugeborenen in 60 % der Fälle ebenfalls ohne erkennbare Ursachen auftritt (Ghidini 1996).

Bei dem epidemiologisch gezeigten Zusammenhang zwischen einem verminderten Geburtsgewicht und dem späteren Risiko für die Erkrankung an Symptomen des metabolischen Syndroms erlangte in aktuellen Diskussionen der Einfluss der frühpostnatalen Ernährung große Bedeutung. So fand sich ein positiver Zusammenhang bei Neugeborenen mit einem verminderten Geburtsgewicht zwischen einer erhöhten Gewichtszunahme im frühen Kindesalter und dem späteren Risiko für die Entwicklung eines Übergewichts und von Symptomen des metabolischen Syndroms (Crowther et al. 1998, Eriksson et al. 1999, Forsén et al. 1999, Ong et al. 2000, Hyppönen et al. 2003, Fagerberg et al. 2004).

Eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme kann durch eine Überernährung verursacht sein. Die Untersuchung einer frühpostnatalen Überernährung wurde am Tiermodell der „kleinen Würfe/Nester“ vielfach durchgeführt. Dabei kommt es durch Reduktion der Primärwurfgröße einer Rattenmutter einerseits zu einem Überangebot an Muttermilch für die verbleibenden Nachkommen und andererseits auch zu einer qualitativen Änderung durch Erhöhung der Fettkonzentration in der Milch (Babický et al. 1973, Fiorotto et al. 1991). Zahlreiche Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am Tiermodell der „kleinen Würfe“ zeigten, dass eine Aufzucht von zur Geburt normalgewichtigen Ratten vom 3.-21. LT bei einer Überernährung in diesen „kleinen Würfen“ zur Entwicklung eines erhöhten Körpergewichts, einer gesteigerten Fettakkumulation, Hyperinsulinämie, gestörten Glukosetoleranz, Hypertriglyceridämie und eines erhöhten systolischen Blutdrucks führt (Plagemann et al. 1992b, Plagemann et al. 1999b, Plagemann et al. 1999c, Plagemann et al. 1999d).

Diesen tierexperimentellen Ansatz verwendeten wir daher bei der Untersuchung des Einflusses einer frühpostnatalen Überernährung auf neugeborene Ratten mit einem verminderten

Geburtsgewicht. Dafür wurden die Tiere in Wurfgrößen von 12 Tieren pro Mutter als Korrelat einer Normalernährung oder in Würfen mit 3 Tieren pro Mutter entsprechend einer frühpostnatalen Überernährung aufgezogen. Als Kontrollgruppe dienten zur Geburt normalgewichtige Tiere, die in Rattenwürfen mit 12 Tieren pro Mutter bei einer Normalernährung aufgezogen wurden. Zur Untersuchung des 'small baby syndrome' erfolgten an den Tieren mit einem verringerten Geburtsgewicht (SGA) im Vergleich zu Ratten mit einem normalen Geburtsgewicht (AGA) Langzeituntersuchungen im Hinblick auf die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms. Dafür wurden Daten des Körpergewichts, der Nahrungsaufnahme, von Stoffwechselfparametern wie z.B. Insulin, Leptin und Glukose und des systolischen Blutdrucks aufgenommen und ausgewertet. Die Untersuchungen an der Ratte wurden bis in das adulte Alter von 360 Tagen durchgeführt, um einen möglichen Beginn von Körpergewichts- und Stoffwechseleränderungen im Sinne des metabolischen Syndroms zu erfassen. Wir untersuchten folgende Fragestellungen:

1. Wie unterscheidet sich die Körpergewichtsentwicklung bis zum 21. LT bei Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht nach frühpostnataler Überernährung im Vergleich zu neugeborenen Ratten mit einem verringerten bzw. normalen Geburtsgewicht bei Normalernährung?
2. Gibt es Langzeitunterschiede im Körpergewicht zwischen den drei Gruppen?
3. Zeigt sich die Entwicklung eines Übergewichts bei Neugeborenen mit vermindertem Geburtsgewicht nach frühpostnataler Überernährung im juvenilen oder adulten Alter?
4. Bestehen Unterschiede in der Menge der aufgenommenen Nahrung bzw. Kalorien im juvenilen bzw. adulten Alter zwischen den drei Gruppen?
5. Zeigen sich bei den Tieren Alterationen von Glukosetoleranz, Insulin- und/oder Leptinsekretion im adulten Alter?
6. Gibt es Unterschiede im systolischen Blutdruck zwischen den Gruppen im adulten Alter?

## 4.2. Material und Methoden

### 4.2.1. Tiermaterial und Tierhaltung

Für den vorliegenden Experimentalansatz wurden Wistar-Ratten (CrI: WI; Charles River Deutschland, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Es erfolgte eine Tierhaltung unter Standardbedingungen, d.h. inverser Lichtrhythmus, klimatisierte Bedingungen sowie freier Zugang zu einer Standardpelletdiät und Trinkwasser, die ad libitum verabreicht wurden. Für genauere Beschreibungen siehe auch 3.2.1.1., S. 32.

Das Tierversuchsvorhaben wurde durch die zuständige Landesbehörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Genehmigungsnummer G0093/02 vom 30.05.2002).

### 4.2.2. Tiermodell

Der tierexperimentelle Ansatz setzte sich aus zwei Teilversuchen zusammen, die aus logistischen Gründen im Abstand von einem halben Jahr unter gleichen Bedingungen und im gleichen zeitlichen Ablauf stattfanden. Weibliche Wistar-Ratten, mit einem Gewicht von 200-250 g (n=40), wurden mit normalen Wistar-Männchen angepaart und konnten spontan werfen.

Innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt wurden die Nachkommen gewogen und markiert. Für jeden einzelnen Primärwurf erfolgte die Bestimmung des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts (GGW) getrennt nach dem Geschlecht. Daraufhin wurden die Tiere anhand ihres Geburtsgewichts als SGA, AGA oder LGA folgendermaßen definiert:

**SGA (small for gestational age)**

Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes

**AGA (appropriate for gestational age)**

Geburtsgewicht innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW der Tiere gleichen Geschlechts desselben Wurfes

**LGA (large for gestational age)**

Geburtsgewicht oberhalb der Obergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes

In einem zweiten Teil der Auswertung wurde die Grenze für ein verringertes Geburtsgewicht anhand der Grenzen des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts festgelegt und



die nach diesen Kriterien wachstumsretardierten Tiere als VSGA (very small for gestational age) definiert:

**VSGA (very small for gestational age)**

Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes

Alle Tiere wurden vom 1.-3. LT innerhalb der Primärwürfe gehalten. Am 3. LT erfolgte die Bildung der Sekundärwürfe für die Aufzucht bis zum 21. LT (Abb. 13). Die Sekundärwürfe bestanden zum einen aus Würfen/Nestern mit 12 Tieren pro Mutter, um Nachkommen bei Normalernährung aufzuziehen (NW). Demgegenüber bildeten wir kleine Würfe/Nester mit nur 3 Tieren pro Mutter (KW), wodurch diese Tiere einer frühpostnatalen Überernährung ausgesetzt waren. Sowohl in den normalen Würfen als auch in den kleinen Würfen befanden sich Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht (SGA-Tiere). Der Anteil dieser SGA-Tiere betrug im normalen Wurf ein bis zwei von zwölf Tieren (SGA-in-NW) und im kleinen Wurf ein von insgesamt drei Tieren (SGA-in-KW). Als Kontrolltiere dienten zur Geburt normalgewichtige Tiere in normalen Würfen (AGA-in-NW).

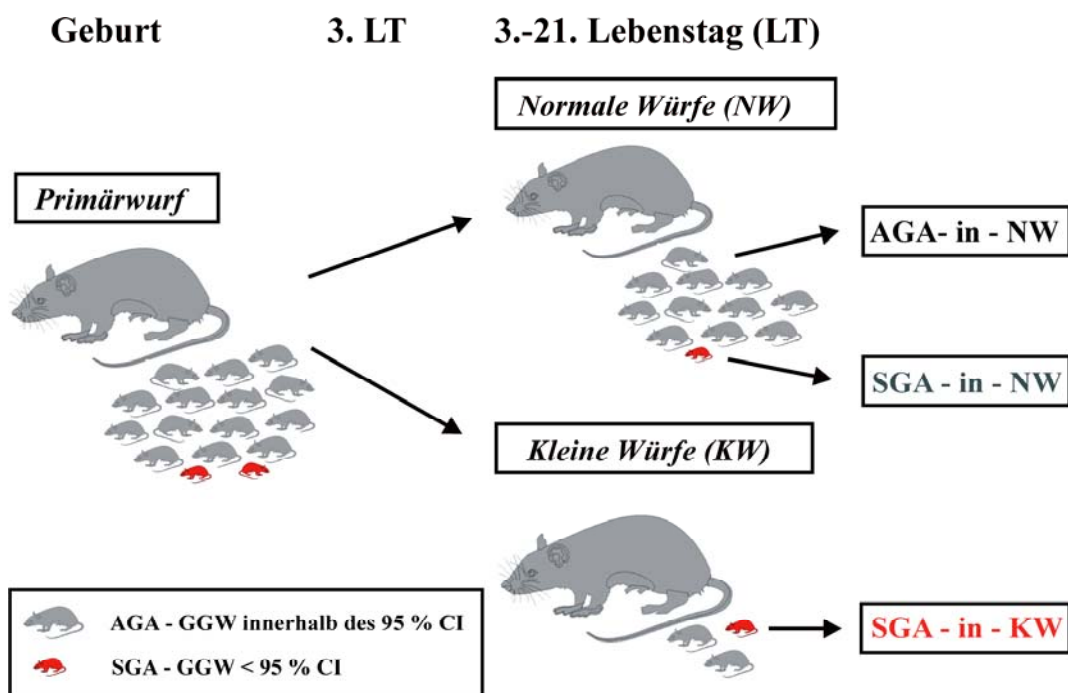
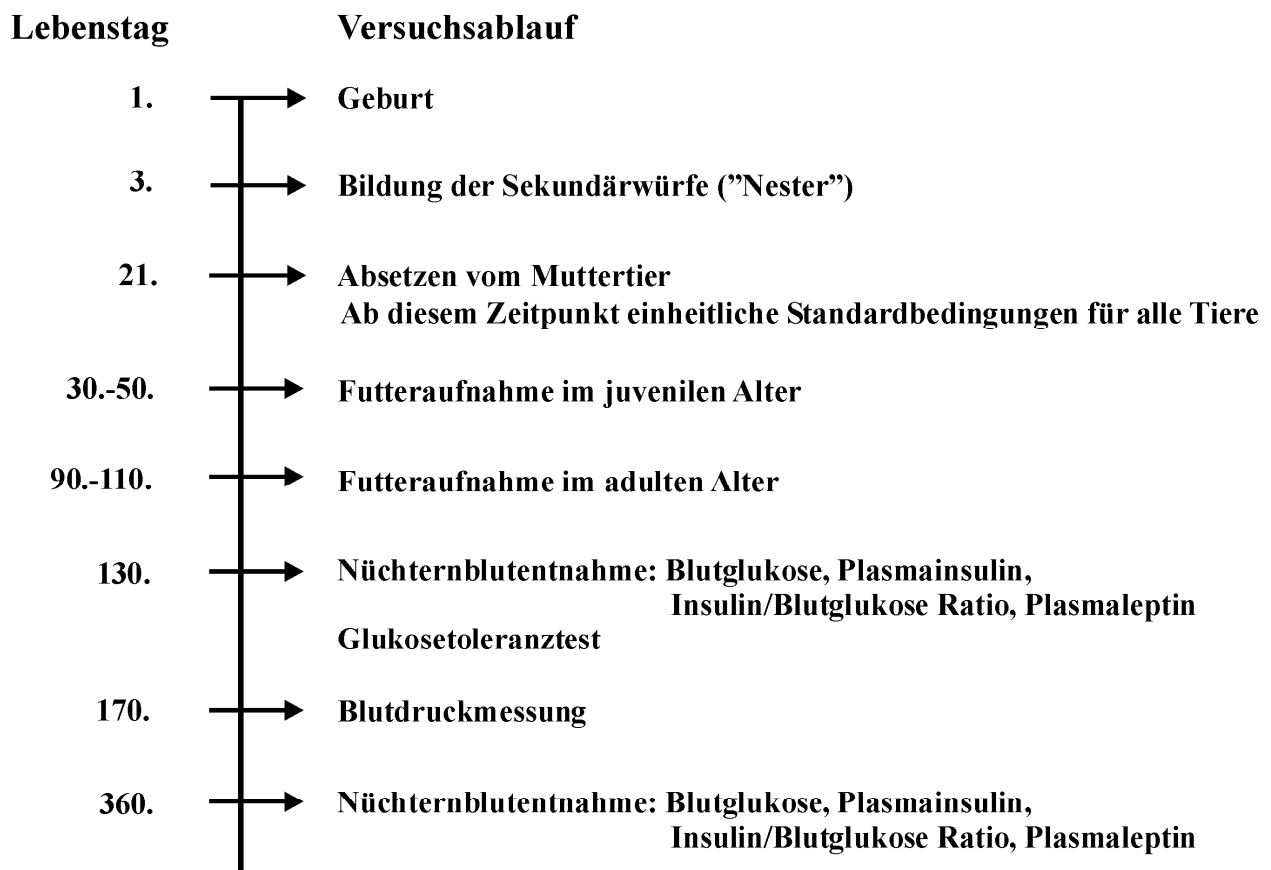


Abb. 13: Schematische Darstellung der Bildung der Sekundärwürfe am 3. Lebensstag (LT). Bildung von normalen Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (NW), bzw. kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (KW). Aufzucht von SGA-Tieren (Geburtsgewicht (GGW) < 95 % Konfidenzintervall (CI) des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes) in NW bzw. in KW. Als Kontrolltiere dienten AGA-Tiere (GGW innerhalb 95 % CI des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes) in NW. Sekundärwürfe bestanden vom 3. LT bis zum Absetzen vom Muttertier am 21. LT.

Soweit ausreichend weibliche neugeborene Ratten zur Verfügung standen, wurden die Würfe ausschließlich mit weiblichen Nachkommen gebildet und bei Bedarf mit Männchen aufgefüllt. Die Auswertung beinhaltet nur die Weibchen, die nach der Bildung der Sekundärwürfe am 3. LT in den kleinen bzw. normalen Würfen aufgezogen wurden. Die neugeborenen Ratten mit einem Geburtsgewicht oberhalb des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts (LGA-large for gestational age) wurden von der Auswertung ebenfalls ausgeschlossen, da sie keinen thematischen Inhalt der aktuellen Untersuchungen darstellten.

Nach dem Absetzen der Nachkommen von der Mutter am 21. LT fand eine Aufzucht der Tiere in Käfigen mit jeweils 4 Tieren statt. Eine Ausnahme bildete der Zeitraum während der Messung der Futteraufnahme, die eine Einzel- bzw. Paarhaltung erforderte. Die Untersuchung der Tiere erfolgte bis in das adulte Alter von 360 Lebenstagen (Abb. 14).



**Messung von Körpergewicht und Körperlänge lebenslang**

Abb. 14: Übersicht des zeitlichen Versuchsablaufs der Untersuchungen an einem genuinen Tiermodell für das 'small baby syndrome'. Angabe der jeweiligen Untersuchung mit dem Zeitpunkt (Lebenstag) der Messung.

### **4.2.3. Parameter (Zielgrößen)**

#### **4.2.3.1. Primärwurfgröße**

Als Primärwurfgröße wurde die Anzahl aller geborenen Feten einer Mutter bezeichnet.

#### **4.2.3.2. Körpergewicht**

Die Körpergewichte der Nachkommen wurden am 1., 3., 7., 14., 18., 21. und 30. postnatalen Tag und im weiteren Verlauf im Abstand von 30 Tagen bis zum 360. LT aufgenommen. Die Messung erfolgte mit einer Genauigkeit von 0,1 g unter Verwendung einer elektronischen Präzisionswaage (Sartorius MC 1, Laboratory LC 6200, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

#### **4.2.3.3. Körperlänge**

Die Messungen erfolgten am 21. und 30. LT und im weiteren Verlauf im Abstand von 30 Tagen bis zum 240. LT und danach letztmalig am 360. LT. Zur Relaxation während der Messung wurden die Tiere einer kurzzeitigen Ethernarkose ausgesetzt und im Folgenden der Nasoanalabstand in Rückenlage mit Hilfe eines Maßbandes und mit einer Genauigkeit von 0,5 cm aufgenommen.

#### **4.2.3.4. Relative Körpermasse**

Aus dem Körpergewicht und der jeweiligen Körperlänge berechneten wir die relative Körpermasse als Körpergewicht pro Körperlänge (g/cm).

#### **4.2.3.5. Bauchumfang**

Der Bauchumfang wurde am 360. LT mit einer Genauigkeit von 0,5 cm gemessen. Dabei wurden die Tiere durch eine kurzzeitige Ethernarkose relaxiert und der Umfang bei Rückenlage des Tieres in Höhe des 4. Zitzenpaares aufgenommen.

#### **4.2.3.6. Futteraufnahme**

Die täglich aufgenommene Futtermenge wurde für insgesamt 40 Tage bestimmt, aufgeteilt in 2 Einzelversuche. Ein erster Versuch erstreckte sich vom 30.-50. LT, wobei die Tiere vom 30.-

40. LT zum Zweck der Eingewöhnung zu zweit saßen und erst im zweiten Abschnitt dieses Versuches allein gehalten wurden. Ein zweiter Versuch begann am 90. LT und endete am 110. LT. Dabei wurden die Tiere über die gesamte Dauer einzeln gehalten. Die Menge des pro Tag aufgenommenen Futters (g/d) wurde durch tägliche Futterrückwaage bestimmt.

Zusätzlich berechneten wir die aufgenommene Kalorienmenge pro Tag aus der täglichen Futtermenge multipliziert mit dem Energiegehalt der Standardpelletdiät (Altromin 1310; Energiegehalt: 3,0 kcal/g).

#### **4.2.3.7. Laborchemische Bestimmungen im Blut**

Zur Ermittlung von Stoffwechselfparametern im Blut führten wir Blutentnahmen durch, nachdem die Tiere jeweils 18 h nüchtern gehalten worden waren. Nach Punktion von ca. 0,5-1 ml Blut aus dem Retroorbitalplexus mit Hilfe einer heparinisierten Glaspipette (Riley 1960) wurde die gewonnene Blutprobe in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und entsprechend den unten beschriebenen Bestimmungen behandelt.

##### **4.2.3.7.1. Blutglukose**

Die Blutglukose wurde an enteweißten Vollblutproben mittels der Glukoseoxidase-Peroxidase (GOD-PAP) Methode bestimmt (Barham und Trinder 1972; Details siehe 3.2.1.4.1., S. 35)

##### **4.2.3.7.2. Plasmainsulin**

Die Insulinkonzentration im Blutplasma wurde mittels eines Radioimmunoassays (Adaltis, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Nach dem Mischen des Standards bzw. der unbekannt Probe, die unmarkiertes Antigen enthielten, mit dem Antiinsulin-Antikörper (Meerschweinchen) und Tracer (<sup>125</sup>I-markiertes Insulin) wurden die Proben inkubiert und darauf folgend mit Diluent und dem Präzipitationsreagenz versetzt. Nach erneuter Inkubation und sich anschließender Zentrifugation wurde der Überstand mit dem freien Antigen abgesaugt und wir bestimmten die Radioaktivität des verbleibenden Präzipitates für 2 Minuten im Gammacounter. Die Auswertung erfolgte mittels des Computerprogramms Multi-CALC (Details siehe 3.2.1.4.3., S. 35)

#### **4.2.3.7.3. Plasmaleptin**

Zur Leptinbestimmung im Blutplasma fand ein kommerzieller Radioimmunoassay (Ratten Leptin RIA kit, Linco, Missouri, USA) Anwendung. Wir mischten den Standard bzw. die unbekannte Probe, die das unmarkierte Antigen enthielten, mit dem Antileptin-Antikörper (Meerschweinchen). Es erfolgte eine Inkubation und darauf die Zugabe des Tracers (<sup>125</sup>I-markiertes Leptin) sowie erneute Inkubation. Nach Zugabe der Präzipitationsreagenz und Inkubation wurde die Probe zentrifugiert. Wir saugten den Überstand ab und maßen die Radioaktivität des Präzipitates im Gammacounter. Die Auswertung erfolgte computergestützt (Details siehe 3.2.1.4.4., S. 36)

#### **4.2.3.7.4. Insulin/Blutglukose Ratio**

Die Nüchtern Insulin/Blutglukose Ratio wurde durch die Bildung des Quotienten aus Insulin und Glukose als orientierender Parameter einer möglichen Insulinresistenz berechnet (Legido et al. 1987).

#### **4.2.3.7.5. Glukosetoleranztest**

Im Alter von 130 Lebenstagen führten wir bei den Tieren einen Glukosetoleranztest durch. Nach einer Nüchternphase von 18 Stunden erfolgte die erste Blutentnahme zur Bestimmung des Nüchternblutzuckers. Danach wurde den Tieren eine 20 %ige Glukoselösung (0,75 ml/100 g Körpergewicht = 1,5 g Glukose/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Nach der Glukosegabe folgten Blutabnahmen aus dem Retroorbitalplexus nach 15, 30 und 90 Minuten. Aus den einzelnen Blutproben bestimmten wir die Blutglukose und berechneten die Fläche unter der Glukosekurve (area under the curve of glucose - AUCG) (Cederholm und Wibell 1985, Plagemann et al. 1999c).

#### **4.2.3.8. Blutdruckmessung**

Die Messung des Blutdrucks erfolgte im Alter von 170 Tagen an wachen, nicht narkotisierten Tieren. Zur Bestimmung des mittleren systolischen Blutdrucks fand eine modifizierte Riva-Rocci-Methode (Bunag und Teräväinen et al. 1991) unter Verwendung des vollautomatischen TSE Blutdruck-Monitors 9000 (TSE, Bad Homburg, Deutschland) Anwendung. Während der Messung saßen die Ratten in zylindrischen Käfigen und es wurde eine Schwanzmanschette

sowie ein piezoelektrischer Pulsaufnehmer ca. 1 cm distal der Schwanzwurzel platziert (Abb. 15).



**Abb. 15: Blutdruckmessung an wachen, nicht narkotisierten Ratten in zylindrischen Messkäfigen innerhalb einer Wärmebox. Platzierung einer Schwanzmanschette, sowie eines piezoelektrischen Pulsaufnehmers distal der Schwanzwurzel.**

Über die Schwanzmanschette erfolgte die automatische Inflation bzw. Deflation und somit die Okklusion bzw. Wiedereröffnung der Schwanzarterie. Über den Pulsaufnehmer wurde das Sistieren bzw. Einsetzen einer Pulsation registriert und als mittlerer systolischer Blutdruck abgeleitet. Während dieser Untersuchung befanden sich die Ratten in ihren Blutdruck-Messkäfigen innerhalb einer vorgeheizten Wärmebox (TSE-Wärmebox 21000, TSE, Bad Homburg, Deutschland), die eine gleich bleibende Temperatur von 38 °C gewährleistete. Nach einer Eingewöhnungsphase von 3 Tagen mit täglicher Steigerung der Messdauer war eine Adaptation an die Messbedingungen gewährleistet. Die eigentliche Messung fand an den 5 folgenden Tagen alternierend am Vormittag und am Nachmittag statt, um mögliche Tagesschwankungen zu berücksichtigen. Nach einer 15minütigen Vorwärmung der Tiere erfolgten 5 Blutdruckmessungen innerhalb von 10 Minuten. Aus den Einzelwerten wurde ein Tagesmittelwert gebildet, der wiederum in die Berechnung des Gesamtmittelwertes eines Tieres über die Messdauer von 5 Tagen einging.

#### **4.2.4. Statistische Auswertung**

Innerhalb einer Gruppe wurden die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet und zusammen mit der Tierzahl (n) auch in dieser Form in den Tabellen und Abbildungen dargestellt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurden die Werte für die Auswertung einer log-Transformation unterzogen. Wir führten die Mehrgruppenvergleiche des Mittelwertes mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) und dem post-hoc-t-Test (Bonferroni) durch. Die Auswertung von Kreuztabellen erfolgte mit dem Chi-Quadrat Test.

Die obere Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit war mit 5 % gewählt, somit zeigte ein  $p < 0,05$  einen signifikanten Unterschied.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Programmpakete SPSS 12.0 (SPSS Software, München, Deutschland), Graph Pad InStat 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) und Graph Pad Prism 4 for Windows (GraphPad Software).

## **4.3. Ergebnisse**

### **4.3.1. Mortalität**

#### **4.3.1.1. Neonatale Mortalität**

In keiner der drei Gruppen verstarben Ratten im Zeitraum vom 1. LT bis zum Absetzen vom Muttertier am 21. LT.

#### **4.3.1.2. Mortalität bis zum 360. LT**

Während der Versuchsdauer bis zum 360. LT verstarben drei Tiere bzw. mussten bei schweren akuten Krankheitszeichen unklarer Genese getötet werden. Die Tiere stammten aus der Gruppe der Kontrolltiere (AGA-in-NW, 1/71) und aus der Gruppe der SGA-Neugeborenen in kleinen Würfen (SGA-in-KW, 2/16). Somit waren die Gruppenstärken am 360. LT in diesen beiden Gruppen um die jeweilige Anzahl reduziert (AGA-in-NW: n=70; SGA-in-KW: n=14).

### **4.3.2. Anteil an Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht**

Von den initial 40 angepaarten Rattenweibchen warfen 33 Ratten. Die Gesamtzahl der neugeborenen Ratten betrug 385 Tiere (191 Männchen, 194 Weibchen). Bei 30 der weiblichen Neugeborenen lag das Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts der Weibchen aus dem gleichen Wurf. Diese 30 Tiere wurden entweder in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (SGA-in-NW, n=14) oder in Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (SGA-in-KW, n=16) aufgezogen. Weitere 23 Weibchen hatten ein Geburtsgewicht oberhalb der Obergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts der gleichgeschlechtlichen Tiere desselben Wurfs und wurden als LGA-Tiere von der Auswertung ausgeschlossen, da sie nicht Gegenstand der aktuellen Untersuchung waren. Die übrigen 141 Weibchen, deren Geburtsgewichte innerhalb des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts lagen (AGA), gingen entweder als Kontrolltiere in die Auswertung ein (AGA-in-NW, n=71), dienten zur Auffüllung der kleinen Würfe ohne in die Auswertung einzugehen (n=32) oder wurden nach Bildung der Sekundärwürfe am 3. LT getötet (n=38).



### 4.3.3. Geburtsgewicht

Neugeborene Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht (SGA-in-NW und SGA-in-KW) waren am 1. LT signifikant leichter als die Kontrolltiere (AGA-in-NW), während sich SGA-Tiere beider Gruppen untereinander nicht im Geburtsgewicht unterschieden ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ) (Abb. 16).

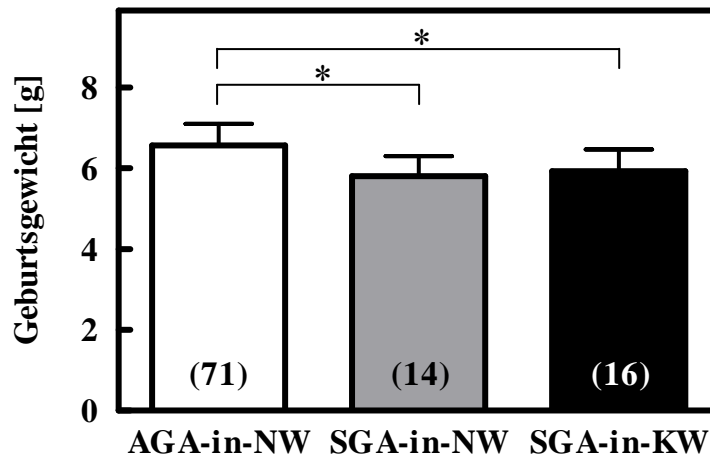


Abb. 16: Geburtsgewicht aller Nachkommen. Darstellung der bei Geburt normalgewichtigen Tiere, die ab dem 3. Lebenstag (LT) in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - weißer Balken) und von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, die ab dem 3. LT entweder in normalen Würfen (SGA-in-NW - grauer Balken) oder in kleinen Würfen (SGA-in-KW - schwarzer Balken) aufgezogen wurden, (MW  $\pm$  SD (n)). Vergleich der Gruppen mittels ANOVA, Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): \*  $p < 0,05$ .

Dieser Unterschied zwischen den SGA-Tieren beider Gruppen und den Kontrolltieren blieb bis zur Bildung der Sekundärwürfe am 3. LT bestehen (AGA-in-NW:  $8,39 \pm 0,99$  g,  $n=71$ ; SGA-in-NW:  $7,21 \pm 1,00$  g,  $n=14$ ; SGA-in-KW:  $7,63 \pm 1,11$  g,  $n=16$ ;  $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ , Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): SGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p < 0,001$ , SGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p < 0,05$ , SGA-in-NW vs. SGA-in-KW  $p=0,79$ ).

### 4.3.4. Körpergewichtsentwicklung bis zum 360. LT

Nach Bildung der Sekundärwürfe am 3. LT und einer Aufzucht der SGA-Tiere bei einer Überernährung in kleinen Würfen (SGA-in-KW) holten diese ihr Gewichtsdefizit zu den Kontrolltieren (AGA-in-NW) bis zum 7. LT auf und unterschieden sich ab diesem Tag nicht mehr signifikant von den Kontrolltieren. Zu diesem Zeitpunkt (7. LT) waren die SGA-Tiere in normalen Würfen (SGA-in-NW) noch signifikant leichter als die Kontrolltiere (AGA-in-NW:  $14,10 \pm 1,44$  g,  $n=71$ ; SGA-in-NW:  $12,35 \pm 1,64$  g,  $n=14$ ; SGA-in-KW:  $13,83 \pm 2,84$  g,  $n=16$ ;

$p(\text{ANOVA})=0,004$ , Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): SGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p<0,01$ , SGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p=1,0$ , SGA-in-NW vs. SGA-in-KW  $p=0,07$ ).

Bereits am 14. LT waren die SGA-Tiere nach frühpostnataler Überernährung (SGA-in-KW) signifikant schwerer als SGA-Tiere in normalen Würfen (SGA-in-NW) (Abb. 17), während sich die SGA-in-KW-Tiere nicht von den Kontrolltieren unterschieden (AGA-in-NW:  $28,17 \pm 2,24$  g,  $n=71$ ; SGA-in-NW:  $25,24 \pm 4,23$  g,  $n=14$ ; SGA-in-KW:  $29,68 \pm 6,61$  g,  $n=16$ ;  $p(\text{ANOVA})=0,003$ , Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): SGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p<0,05$ , SGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p=0,39$ , SGA-in-NW vs. SGA-in-KW  $p<0,01$ ).



**Abb. 17: Vergleich zweier Ratten am 10. Lebenstag, die beide zur Geburt ein vermindertes Körpergewicht aufwiesen (SGA) und die entweder bei Normalernährung in Würfen/Nestern mit 12 Tieren pro Mutter (SGA-in-NW, linke Ratte) oder bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen/Nestern mit 3 Tieren pro Mutter (SGA-in-KW, rechte Ratte) aufgezogen wurden.**

Ratten, die zur Geburt ein vermindertes Körpergewicht aufwiesen und in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter entsprechend einer Normalernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW), zeigten keine derartig rasche frühpostnatale Gewichtszunahme wie die SGA-in-KW-Tiere. Auch am 21. LT waren die SGA-in-NW-Tiere signifikant leichter als die SGA-in-KW- und die AGA-in-NW-Tiere ( $p(\text{ANOVA})=0,001$ , Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): SGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p<0,01$ , SGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p=1,00$ , SGA-in-NW vs. SGA-in-KW  $p<0,01$ ) (Abb. 18).

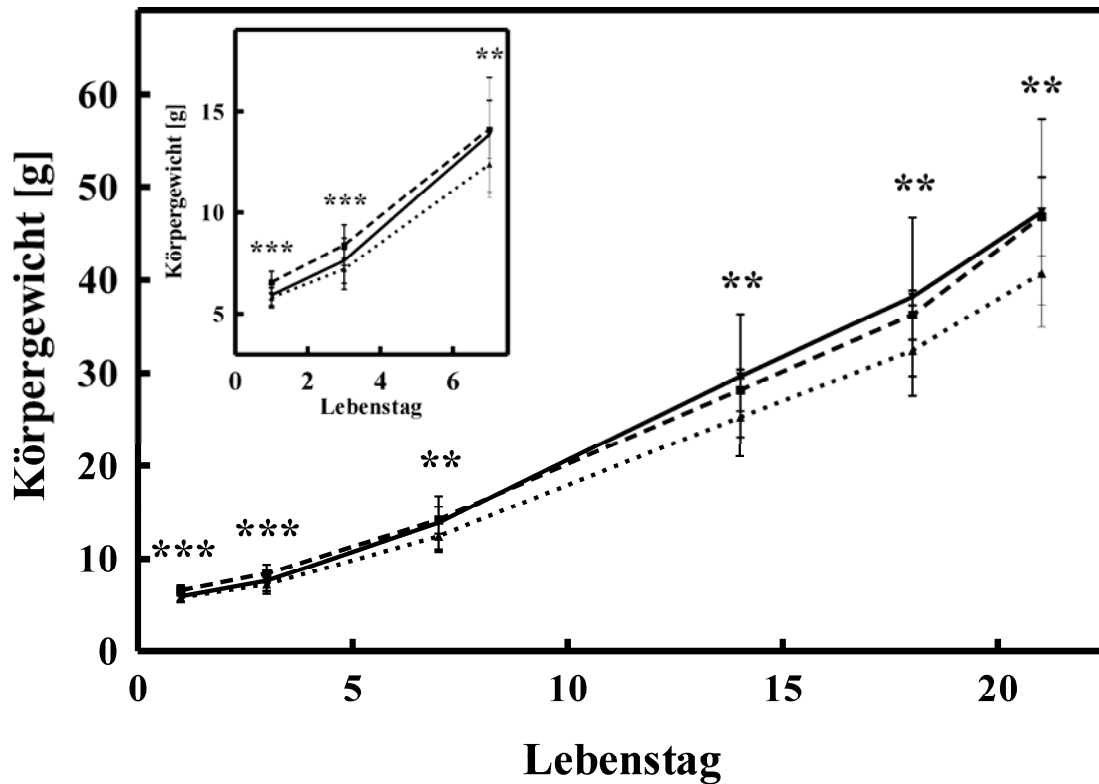


Abb. 18: Körpergewichtsentwicklung vom 1.-21. Lebenstag (LT) sowie im linken oberen Fenster vom 1.-7. LT. Darstellung der bei Geburt normalgewichtigen Tiere, die vom 3.-21. LT bei Normalernährung in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - gestrichelte Linie, n=71) und von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, die vom 3.-21. LT entweder in normalen Würfen (SGA-in-NW - gepunktete Linie, n=14) oder bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen (SGA-in-KW - durchgezogene Linie, n=16) aufgezogen wurden, (MW  $\pm$  SD). Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA, \*\* p(ANOVA)<0,01, \*\*\* p(ANOVA)<0,001.

Die SGA-Tiere, die bei Normalernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW), holten ihr Körpergewichtsdefizit erst bis zum 60. LT auf. Von diesem Zeitpunkt bis zum 360. LT gab es keine signifikanten Unterschiede mehr im Körpergewicht zwischen den Gruppen (Tab. 2).

Tab. 2: Körpergewicht vom 21.–360. Lebenstag (LT). Vergleich des Körpergewichts (KG in g) von zur Geburt normalgewichtigen Ratten in normalen Würfen (AGA-in-NW) mit Ratten, die ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen und in normalen Würfen (SGA-in-NW) bzw. kleinen Würfen (SGA-in-KW) aufgezogen wurden, mittels ANOVA. Einzelgruppenvergleich mittels post-hoc-t-Test: <sup>a</sup> p<0,05 im Vergleich zur Gruppe AGA-in-NW, <sup>b</sup> p<0,05 im Vergleich zur Gruppe SGA-in-NW, <sup>c</sup> p<0,05 im Vergleich zur Gruppe SGA-in-KW, (MW ± SD (n)).

KG (g)	AGA-in-NW	SGA-in-NW	SGA-in-KW	p (ANOVA)
21. LT	46,8 ± 4,3 <sup>b</sup> (71)	40,7 ± 5,8 <sup>a,c</sup> (14)	47,3 ± 10,0 <sup>b</sup> (16)	0,001
60. LT	207,7 ± 23,4 (71)	207,9 ± 19,9 (14)	205,6 ± 33,9 (16)	0,95
120. LT	285,0 ± 26,9 (71)	282,3 ± 24,2 (14)	284,4 ± 43,5 (16)	0,95
240. LT	340,7 ± 32,9 (71)	339,6 ± 34,4 (14)	333,5 ± 55,0 (16)	0,78
360. LT	361,0 ± 33,1 (70)	362,7 ± 53,8 (14)	361,6 ± 65,2 (14)	0,99

#### 4.3.5. Körperlänge bis zum 360. LT

Die Körperlänge unterschied sich ab dem 21. LT zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen den Gruppen (Tab. 3).

Tab. 3: Körperlänge vom 21.–360. Lebenstag (LT). Vergleich der Körperlänge (KL in cm) von zur Geburt normalgewichtigen Ratten in normalen Würfen (AGA-in-NW) mit Ratten, die ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen und in normalen Würfen (SGA-in-NW) bzw. kleinen Würfen (SGA-in-KW) aufgezogen wurden, mittels ANOVA, (MW ± SD (n)).

KL (cm)	AGA-in-NW	SGA-in-NW	SGA-in-KW	p (ANOVA)
21. LT	10,1 ± 0,3 (71)	9,9 ± 0,5 (14)	10,3 ± 1,1 (16)	0,11
60. LT	18,7 ± 0,5 (71)	18,5 ± 0,6 (14)	18,4 ± 1,0 (16)	0,26
120. LT	20,9 ± 0,5 (71)	20,7 ± 0,5 (14)	20,6 ± 0,9 (16)	0,15
240. LT	21,8 ± 0,6 (71)	21,7 ± 0,7 (14)	21,5 ± 0,9 (16)	0,25
360. LT	22,3 ± 0,6 (70)	22,4 ± 0,6 (14)	22,2 ± 0,9 (14)	0,59

#### 4.3.6. Relative Körpermasse bis zum 360. LT

Ratten, die zur Geburt ein verringertes Körpergewicht aufwiesen und die bei einer Normalernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW) hatten am 21. LT eine signifikant geringere relative Körpermasse sowohl im Vergleich zu den Kontrolltieren als auch im Vergleich zu den

SGA-in-KW-Tieren. Zu späteren Zeitpunkten gab es keine signifikanten Unterschiede in der relativen Körpermasse zwischen den Gruppen (Tab. 4).

Tab. 4: Relative Körpermasse vom 21.-360. Lebenstag (LT). Vergleich der relativen Körpermasse (KMr in g/cm) von zur Geburt normalgewichtigen Ratten in normalen Würfen (AGA-in-NW) mit Ratten, die ein vermindertes Geburtsgewicht aufwiesen und in normalen Würfen (SGA-in-NW) bzw. kleinen Würfen (SGA-in-KW) aufgezogen wurden, mittels ANOVA. Einzelgruppenvergleich mittels post-hoc-t-Test: <sup>a</sup> p<0,05 im Vergleich zur Gruppe AGA-in-NW, <sup>b</sup> p<0,05 im Vergleich zur Gruppe SGA-in-NW, <sup>c</sup> p<0,05 im Vergleich zur Gruppe SGA-in-KW, (MW ± SD (n)).

KMr (g/cm)	AGA-in-NW	SGA-in-NW	SGA-in-KW	p (ANOVA)
21. LT	4,62 ± 0,38 <sup>b</sup> (71)	4,09 ± 0,47 <sup>a,c</sup> (14)	4,54 ± 0,62 <sup>b</sup> (16)	<0,001
60. LT	11,13 ± 1,13 (71)	11,20 ± 0,78 (14)	11,12 ± 1,34 (16)	0,98
120. LT	13,65 ± 1,10 (71)	13,62 ± 0,98 (14)	13,79 ± 1,67 (16)	0,90
240. LT	15,62 ± 1,30 (71)	15,61 ± 1,20 (14)	15,45 ± 2,08 (16)	0,90
360. LT	16,18 ± 1,24 (70)	16,14 ± 2,07 (14)	16,25 ± 2,44 (14)	0,98

#### 4.3.7. Bauchumfang am 360. LT

Die Messung des Bauchumfangs ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (AGA-in-NW: 17,99 ± 1,27 cm, n=70; SGA-in-NW: 18,18 ± 1,49 cm, n=14; SGA-in-KW: 18,46 ± 2,61 cm, n=14; p(ANOVA)=0,56).

#### 4.3.8. Futteraufnahme

##### 4.3.8.1. Futteraufnahme im juvenilen Alter

Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme, gemessen bei juvenilen Ratten vom 30.-50. LT, unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (AGA-in-NW: 18,28 ± 1,20 g/d, n=71; SGA-in-NW: 17,68 ± 1,60 g/d, n=14; SGA-in-KW: 18,14 ± 1,32 g/d, n=16; p(ANOVA)=0,28).

Die Berechnung der täglich aufgenommenen Kalorienmenge ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen (AGA-in-NW: 55,62 ± 3,63 kcal/d, n=71; SGA-in-NW: 53,76 ± 4,94 kcal/d, n=14; SGA-in-KW: 55,12 ± 4,00 kcal/d, n=16; p(ANOVA)=0,26).

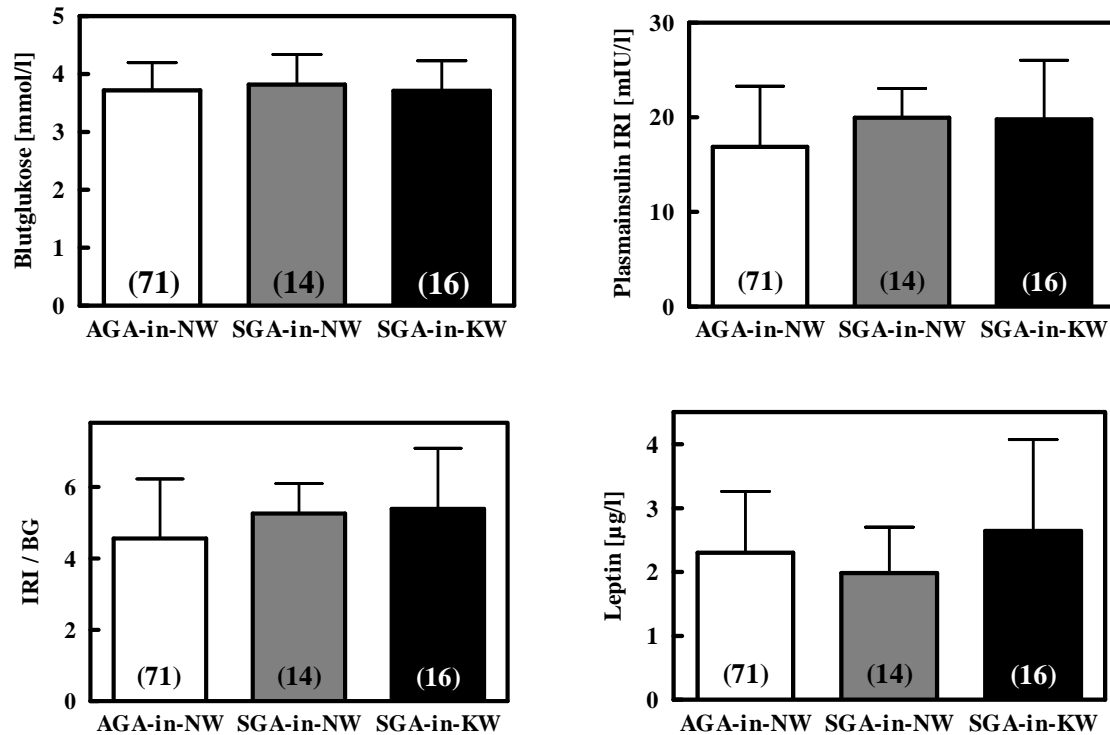
#### **4.3.8.2. Futteraufnahme im adulten Alter**

Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme der Ratten im adulten Alter (90.-110. LT) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (AGA-in-NW:  $21,06 \pm 1,96$  g/d, n=71; SGA-in-NW:  $20,75 \pm 2,11$  g/d, n=14; SGA-in-KW:  $20,10 \pm 2,05$  g/d, n=16; p(ANOVA)=0,22). Ebenfalls ergab die Berechnung der durchschnittlich aufgenommenen Kalorienmenge pro Tag keine signifikanten Gruppenunterschiede (AGA-in-NW:  $63,17 \pm 5,89$  kcal/d, n=71; SGA-in-NW:  $62,24 \pm 6,32$  kcal/d, n=14; SGA-in-KW:  $60,29 \pm 6,14$  kcal/d, n=16; p(ANOVA)=0,22).

#### **4.3.9. Stoffwechselfparameter**

##### **4.3.9.1. Nüchternblutentnahme am 130. LT**

Bei der Nüchternblutentnahme am 130. LT wurden Blutglukose, Plasmainsulin, Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bestimmt. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei der Bestimmung der Blutglukose (p(ANOVA)=0,75). Auch Plasmainsulin und die Insulin/Blutglukose Ratio unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, obwohl eine tendenzielle Erhöhung der Werte bei den SGA-Tieren, die bei neonataler Normalernährung oder bei Überernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW und SGA-in-KW), im Vergleich zu den Kontrolltieren (AGA-in-NW) erkennbar war (Plasmainsulin: p(ANOVA)=0,08; IRI/BG: p(ANOVA)=0,09). Auch die Werte von Leptin unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (p(ANOVA)=0,21). Allerdings hatten die SGA-Tiere, die bei Normalernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW), tendenziell verminderte Werte im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (Abb. 19).



**Abb. 19: Stoffwechselfparameter Blutglukose, Plasmainsulin (IRI), Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bei der Nüchternblutentnahme am 130. Lebenstag (LT). Darstellung der bei Geburt normalgewichtigen Tiere, die vom 3.-21. LT in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - weißer Balken) und von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, die vom 3.-21. LT entweder bei Normalernährung in normalen Würfen (SGA-in-NW - grauer Balken) oder bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen (SGA-in-KW - schwarzer Balken) aufgezogen wurden, (MW  $\pm$  SD (n)). Keine Unterschiede beim Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA.**

#### 4.3.9.2. Glukosetoleranztest am 130. LT

Im Glukosetoleranztest am 130. LT fanden sich keine Unterschiede bei den Blutglukosewerten nach 15 Minuten ( $p(\text{ANOVA})=0,32$ ) und 30 Minuten ( $p(\text{ANOVA})=0,22$ ). Allerdings wiesen frühpostnatal überernährte SGA-Tiere (SGA-in-KW) einen signifikant höheren Blutglukosewert nach 90 Minuten im Vergleich zur Kontrollgruppe (AGA-in-NW) auf. Auch die Werte der SGA-in-NW-Tiere zeigten eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante, Erhöhung der Blutglukosewerte nach 90 Minuten im Vergleich zur Kontrollgruppe (AGA-in-NW) ( $p(\text{ANOVA})<0,01$ ; Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): SGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p=0,05$ , SGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p=0,03$ , SGA-in-NW vs. SGA-in-KW  $p=1,0$ ) (Abb. 20).

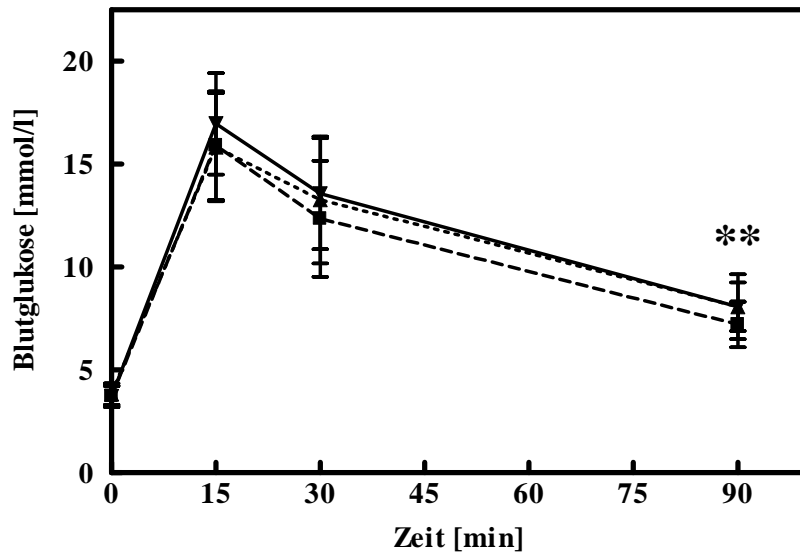


Abb. 20: Glukosetoleranztest am 130. Lebenstag (LT). Blutglukosekonzentrationen nach 0, 15, 30, 90 Minuten von zur Geburt normalgewichtigen Tieren, die vom 3.-21. LT in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - gestrichelte Linie, n=70) im Vergleich zu Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, die vom 3.-21. LT entweder in normalen Würfen (SGA-in-NW - gepunktete Linie, n=13) oder in kleinen Würfen (SGA-in-KW - durchgezogene Linie, n=16) aufgezogen wurden, (MW  $\pm$  SD). Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA, \*\* p(ANOVA)<0,01.

Bei der 'area under the curve' (AUC) der Glukose bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen (p(ANOVA)=0,10) (Abb. 21).

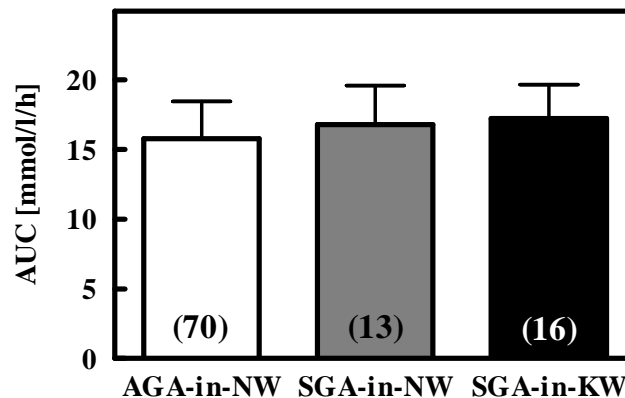


Abb. 21: 'Area under the curve' (AUC) der Glukose beim Glukosetoleranztest am 130. Lebenstag (LT). Vergleich von zur Geburt normalgewichtigen Tieren, die vom 3.-21. LT in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - weißer Balken) und von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, die vom 3.-21. LT entweder bei Normalernährung in normalen Würfen (SGA-in-NW - grauer Balken) oder bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen (SGA-in-KW - schwarzer Balken) aufgezogen wurden, (MW  $\pm$  SD (n)). Kein Unterschied beim Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA.



#### 4.3.9.3. Nüchternblutentnahme am 360. LT

Es wurden die Stoffwechselfparameter Blutglukose, Plasmainsulin, Insulin/Blutglukose Ratio und Plasmaleptin bestimmt (Abb. 22). Dabei zeigten frühpostnatal normal ernährte SGA-Tiere (SGA-in-NW) tendenziell verminderte Nüchternblutzuckerwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe (AGA-in-NW), was jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ( $p(\text{ANOVA})=0,05$ ). Die tendenzielle Erhöhung des Plasmainsulins und der Insulin/Blutglukose Ratio am 130. LT bei den frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) verstärkte sich bei der Nüchternblutentnahme am 360. LT. Die Werte unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe (Plasmainsulin:  $p(\text{ANOVA})<0,01$ , Insulin/Blutglukose Ratio:  $p(\text{ANOVA})<0,01$ ). Die Leptinwerte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen ( $p(\text{ANOVA})=0,38$ ). Allerdings bestand eine im Vergleich zum 130. LT weiter zunehmende Tendenz in der Erhöhung der Leptinwerte bei den frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) sowie weiterhin eine leichte Verringerung der Werte bei den SGA-Tieren nach frühpostnataler Normalernährung (SGA-in-NW).

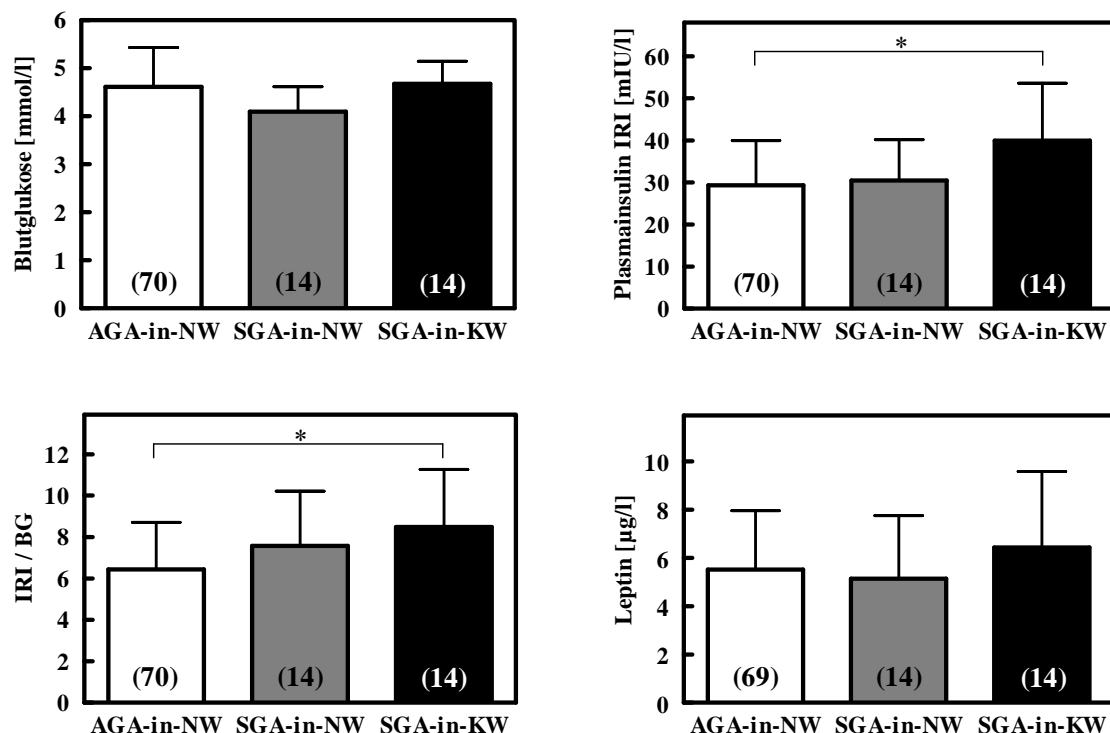


Abb. 22: Stoffwechselfparameter Blutglukose, Plasmainsulin (IRI), Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bei der Nüchternblutentnahme am 360. Lebenstag (LT). Vergleich von zur Geburt normalgewichtigen Tieren nach Aufzucht vom 3.-21. LT in normalen Würfen (AGA-in-NW - weißer Balken) und von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht nach Aufzucht vom 3.-21. LT entweder bei Normalernährung in normalen Würfen (SGA-in-NW - grauer Balken) oder bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen (SGA-in-KW - schwarzer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Vergleich der Gruppen mittels ANOVA. Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): \*  $p<0,05$ .

#### 4.3.10. Systolischer Blutdruck am 170. LT

Die Blutdruckmessung am 170. LT ergab keine signifikanten Unterschiede im systolischen Blutdruck zwischen den Gruppen ( $p(\text{ANOVA})=0,51$ ) (Abb. 23).

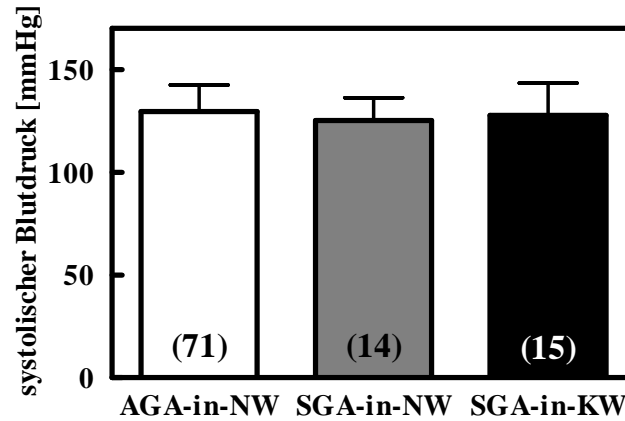


Abb. 23: Systolischer Blutdruck am 170. Lebenstag (LT). Vergleich von zur Geburt normalgewichtigen Tieren, die vom 3.-21. LT in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - weißer Balken) und von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht, die vom 3.-21. LT entweder in normalen Würfen (SGA-in-NW - grauer Balken) oder in kleinen Würfen (SGA-in-KW - schwarzer Balken) aufgezogen wurden, (MW  $\pm$  SD (n)). Kein Unterschied beim Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA.

### 4.3.11. Entwicklung der VSGA-Tiere

#### 4.3.11.1. Relativer Anteil an VSGA-Tieren am Primärwurf

Von den insgesamt 194 geborenen Weibchen lag bei 11 Weibchen das Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts aller Weibchen desselben Wurfs, so dass sie als VSGA-Tiere (very small for gestational age) definiert wurden. Die VSGA-Tiere verteilten sich auf die VSGA-in-NW-Gruppe mit 4 Tieren und auf die VSGA-in-KW-Gruppe mit 7 Tieren.

#### 4.3.11.2. Geburtsgewicht

VSGA-Tiere, die in normalen bzw. in kleinen Würfen/Nestern aufgezogen wurden (VSGA-in-NW und VSGA-in-KW), unterschieden sich untereinander nicht im Geburtsgewicht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (AGA-in-NW) aber waren die VSGA-Tiere beider Gruppen signifikant leichter ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ) (Abb. 24).

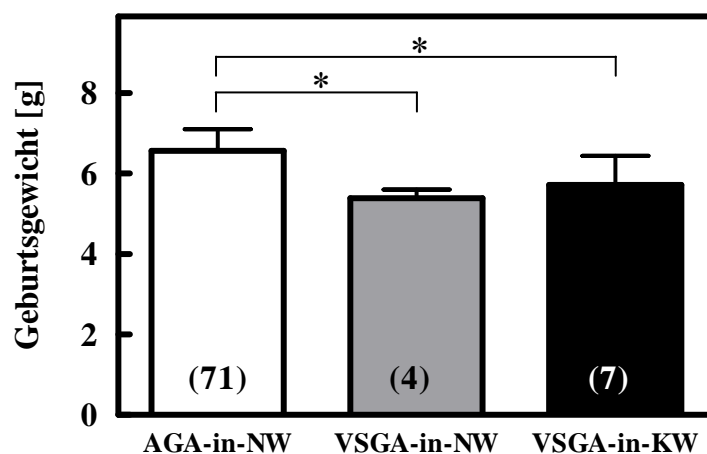


Abb. 24: Geburtsgewicht der VSGA-Tiere, deren Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfs lag und die bei Normalernährung in normalen Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - grauer Balken) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - schwarzer Balken) aufgezogen wurden, im Vergleich zu den zur Geburt normalgewichtigen Kontrolltieren in normalen Würfen (AGA-in-NW - weißer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Vergleich der Gruppen mittels ANOVA, Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): \*  $p < 0,05$ .

Auch am 3. LT gab es bei den VSGA-Tieren beider Gruppen untereinander keine Unterschiede im Körpergewicht, während sie im Vergleich zur Kontrollgruppe jeweils signifikant leichter waren (AGA-in-NW:  $8,39 \pm 0,99$  g,  $n=71$ ; VSGA-in-NW:  $6,28 \pm 0,46$  g,  $n=4$ ; VSGA-in-KW:

$7,26 \pm 1,61$  g,  $n=7$ ;  $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ , Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): VSGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p < 0,001$ , VSGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p < 0,05$ , VSGA-in-NW vs. VSGA-in-KW  $p = 0,41$ ).

#### 4.3.11.3. Körpergewichtsentwicklung bis zum 360. LT

Die Aufzucht der VSGA-Tiere bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen führte zu einer raschen Gewichtszunahme, in deren Folge sich diese Tiere ab dem 7. LT nicht mehr von den Kontrolltieren unterschieden (Abb. 25).

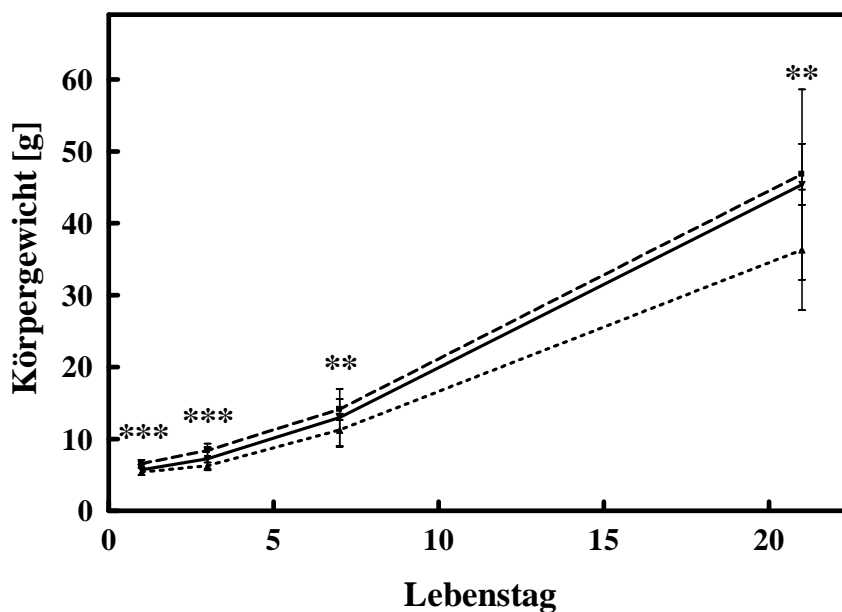


Abb. 25: Körpergewichtsentwicklung vom 1.-21. Lebenstag (LT). Vergleich der VSGA-Tiere, deren Geburtsgewicht (GGW) unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag und die vom 3.-21. LT bei Normalernährung in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - gepunktete Linie,  $n=4$ ) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - durchgezogene Linie,  $n=7$ ) aufgezogen wurden, mit den zur Geburt normalgewichtigen Tieren in normalen Würfen (AGA-in-NW - gestrichelte Linie,  $n=71$ ), ( $MW \pm SD$ ). Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA, \*\*  $p(\text{ANOVA}) < 0,01$ , \*\*\*  $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ .

In der weiteren Entwicklung bis zum 360. LT zeigte sich eine anhaltend erhöhte Gewichtszunahme bei den frühpostnatal überernährten VSGA-Tieren in kleinen Würfen (VSGA-in-KW). Am 360. LT waren diese signifikant schwerer als die frühpostnatal normal ernährten VSGA-Tiere (VSGA-in-NW) und die Kontrolltiere (AGA-in-NW) ( $p(\text{ANOVA}) < 0,01$ , Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): VSGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p = 0,13$ , VSGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p < 0,05$ , VSGA-in-NW vs. VSGA-in-KW  $p < 0,01$ ) (Abb. 26). Diese

Entwicklung der gesteigerten Gewichtszunahme bei den VSGA-in-KW-Tieren im Vergleich zu den VSGA-in-NW-Tieren war auch makroskopisch erkennbar, wie exemplarisch in Abb. 27 (S. 94) dargestellt. Die VSGA-Tiere, die vom 3.-21. LT in normalen Würfen aufgezogen wurden (VSGA-in-NW), blieben, wenn auch nicht signifikant, die leichtesten Tiere.

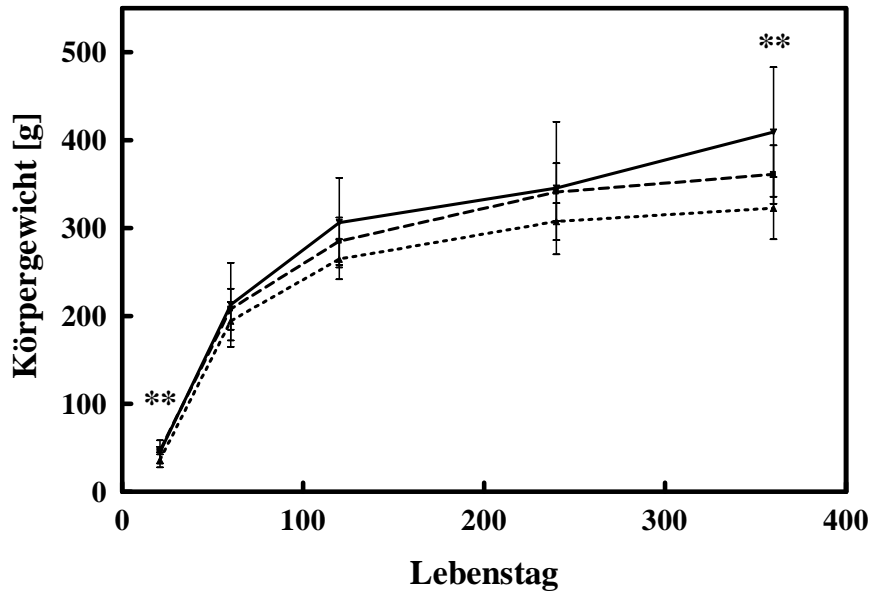


Abb. 26: Körpergewichtsentwicklung vom 21.-360. Lebenstag (LT). Vergleich der VSGA-Tiere, deren Geburtsgewicht (GGW) unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag und die vom 3.-21. LT bei Normalernährung in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - gepunktete Linie, n=4) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - durchgezogene Linie, n=7) aufgezogen wurden, mit den zur Geburt normalgewichtigen Tieren in normalen Würfen (AGA-in-NW - gestrichelte Linie, n=71), (MW  $\pm$  SD). Vergleich der drei Gruppen mittels ANOVA, \*\* p(ANOVA)<0,01.

#### 4.3.11.4. Körperlänge am 360. LT

Das gleiche Verhältnis zeigt sich auch in der Körperlänge am 360. LT, wobei die VSGA-in-KW-Tiere signifikant am längsten waren (AGA-in-NW:  $22,29 \pm 0,58$  cm, n=70; VSGA-in-NW:  $22,00 \pm 0,41$  cm, n=4; VSGA-in-KW:  $23,10 \pm 0,22$  cm, n=5; p(ANOVA)<0,01; Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): VSGA-in-NW vs. AGA-in-NW p=0,94, VSGA-in-KW vs. AGA-in-NW p<0,01, VSGA-in-NW vs. VSGA-in-KW p<0,05).

#### 4.3.11.5. Relative Körpermasse am 360. LT

Ebenso verhielt es sich bei der relativen Körpermasse am 360. LT mit den höchsten Werten bei den VSGA-in-KW-Tieren (AGA-in-NW:  $16,18 \pm 1,24$  g/cm, n=70; VSGA-in-NW:

$14,66 \pm 1,55$  g/cm,  $n=4$ ; VSGA-in-KW:  $17,71 \pm 3,17$  g/cm,  $n=5$ ;  $p(\text{ANOVA}) < 0,01$ ;  
Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): VSGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p=0,12$ , VSGA-in-  
KW vs. AGA-in-NW  $p=0,07$ , VSGA-in-NW vs. VSGA-in-KW  $p < 0,01$ ).



**Abb. 27:** Zwei Ratten am 360. Lebenstag (LT), deren Geburtsgewicht (GGW) unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag, nach Aufzucht vom 3.-21. LT bei einer Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW, linke Ratte) im Vergleich zur Aufzucht bei Normalernährung vom 3.-21. LT in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW, rechte Ratte).

#### **4.3.11.6. Bauchumfang am 360. LT**

Die VSGA-Tiere, die bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen aufgezogen wurden (VSGA-in-KW), hatten am 360. LT den größten Bauchumfang (AGA-in-NW:  $17,99 \pm 1,27$  cm,  $n=70$ ; VSGA-in-NW:  $17,75 \pm 0,87$  cm,  $n=4$ ; VSGA-in-KW:  $20,00 \pm 2,94$  cm,  $n=5$ ;  $p(\text{ANOVA}) < 0,01$ ; Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): VSGA-in-NW vs. AGA-in-NW  $p=1,0$ , VSGA-in-KW vs. AGA-in-NW  $p < 0,01$ , VSGA-in-NW vs. VSGA-in-KW  $p=0,06$ ).

#### **4.3.11.7. Futteraufnahme**

Die tägliche Futteraufnahme unterschied sich weder im juvenilen Alter vom 30.-50. LT (AGA-in-NW:  $18,28 \pm 1,20$  g,  $n=71$ ; VSGA-in-NW:  $16,63 \pm 1,23$  g,  $n=4$ ; VSGA-in-KW:  $17,91 \pm 2,95$  g,  $n=7$ ;  $p(\text{ANOVA})=0,07$ ) noch im adulten Alter vom 90.-110. LT (AGA-in-NW:  $21,06 \pm 1,96$  g,  $n=71$ ; VSGA-in-NW:  $19,75 \pm 1,17$  g,  $n=4$ ; VSGA-in-KW:  $19,92 \pm 3,54$  g,  $n=7$ ;  $p(\text{ANOVA})=0,22$ ) zwischen den Gruppen.

#### **4.3.11.8. Stoffwechselfparameter**

##### **4.3.11.8.1. Nüchternblutentnahme am 130. LT**

Die Trends, die sich bei der Auswertung mit den SGA-Tieren, die anhand des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts ausgewählt wurden, bei der Nüchternblutentnahme am 130. LT zeigten (siehe 4.3.9.1., S. 86), waren bei der Auswertung mit den VSGA-Tieren verstärkt. VSGA-Tiere, deren Geburtsgewichte unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lagen und die vom 3.-21. LT bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen aufgezogen wurden (VSGA-in-KW), hatten bereits am 130. LT signifikant höhere Werte für Plasmainsulin ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ), Insulin/Blutglukose Ratio ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ) und Plasmaleptin ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ). Bei der Bestimmung des Plasmaleptins hatten die frühpostnatal normal ernährten VSGA-Tiere (VSGA-in-NW), tendenziell die geringsten Werte. Das war die gleiche Tendenz, die sich auch schon bei den SGA-in-NW-Tieren, die anhand des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes ausgewählt wurden, am 130. LT zeigte (siehe 4.3.9.1., S. 86). Die Nüchternblutglukose unterschied sich nicht zwischen den Gruppen ( $p(\text{ANOVA})=0,89$ ) (Abb. 28).

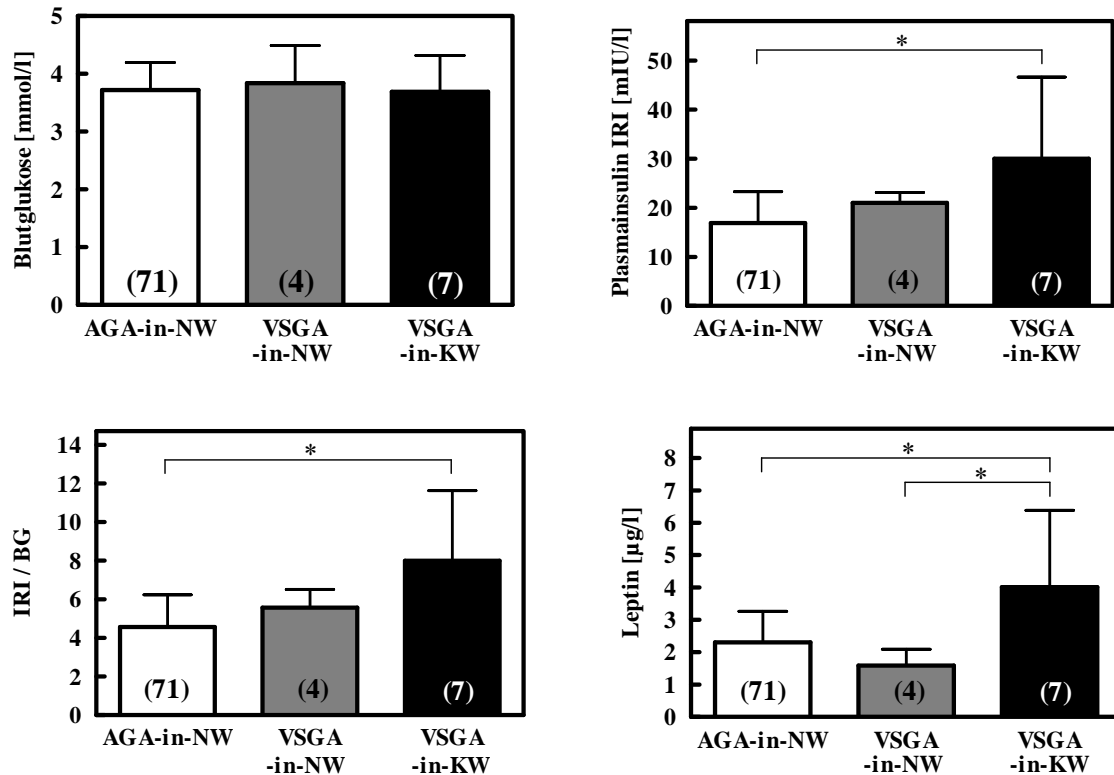


Abb. 28: Stoffwechselformparameter Blutglukose, Plasmainsulin (IRI), Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bei der Nüchternblutentnahme am 130. Lebenstag (LT). Darstellung der VSGA-Tiere, deren Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag und die vom 3.-21. LT bei Normalernährung in normalen Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - grauer Balken) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - schwarzer Balken) aufgezogen wurden, im Vergleich zu den zur Geburt normalgewichtigen Kontrolltieren in normalen Würfen (AGA-in-NW - weißer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Vergleich der Gruppen mittels ANOVA, Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.11.8.2. Glukosetoleranztest am 130. LT

Im Glukosetoleranztest am 130. LT gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 29). Auffällig war aber die tendenzielle Erhöhung der Blutglukose bei den VSGA-in-NW- und den VSGA-in-KW-Tieren nach 30 Minuten (Abb. 29).



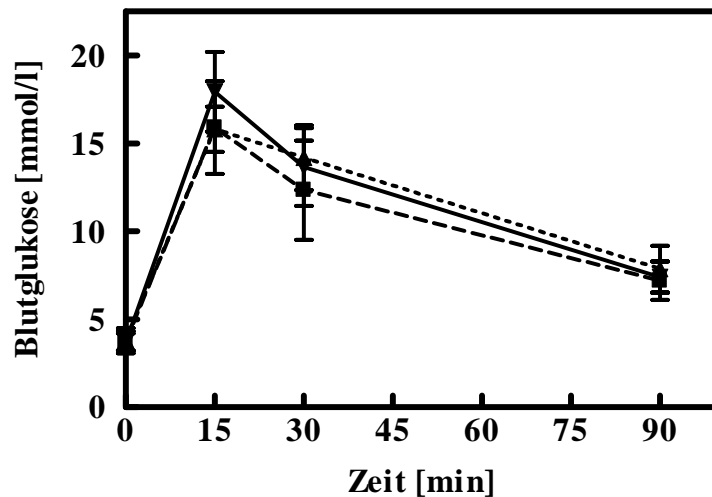


Abb. 29: Glukosetoleranztest am 130. Lebenstag (LT). Blutglukosekonzentrationen nach 0, 15, 30, 90 Minuten. Vergleich der Tiere mit einem Geburtsgewicht (GGW) unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes und nach Aufzucht vom 3.-21. LT bei einer Normalernährung in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - gepunktete Linie, n=4) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - durchgezogene Linie, n=7), mit den zur Geburt normalgewichtigen Tieren in normalen Würfen (AGA-in-NW - gestrichelte Linie, n=70), (MW  $\pm$  SD). Kein Gruppenunterschied beim Vergleich mittels ANOVA.

Auch bei der 'area under the curve' der Glukose gab es keine Gruppenunterschiede (Abb. 30).

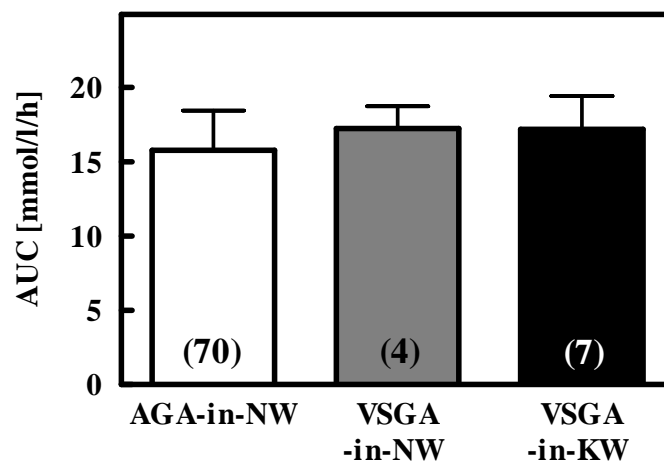


Abb. 30: 'Area under the curve' (AUC) der Glukose beim Glukosetoleranztest am 130. Lebenstag (LT). Vergleich der Ratten mit einem Geburtsgewicht (GGW) unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes und nach Aufzucht vom 3.-21. LT in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - grauer Balken) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - schwarzer Balken), mit den zur Geburt normalgewichtigen Tieren, die in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - weißer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Kein Gruppenunterschied beim Vergleich mittels ANOVA.

#### 4.3.11.8.3. Nüchternblutentnahme am 360. LT

Bei der Nüchternblutentnahme am 360. LT zeigten sich, wie auch am 130. LT (siehe 4.3.11.8.1.) bei den frühpostnatal überernährten VSGA-Tieren (VSGA-in-KW) signifikant erhöhte Werte für Plasmainsulin ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ), die Insulin/Blutglukose Ratio ( $p(\text{ANOVA}) < 0,001$ ) sowie Leptin ( $p(\text{ANOVA}) < 0,01$ ) (Abb. 31). Dagegen hatten die frühpostnatal normal ernährten VSGA-Tiere (VSGA-in-NW) bei der Blutglukose und beim Leptin die geringsten Werte (Abb. 31).

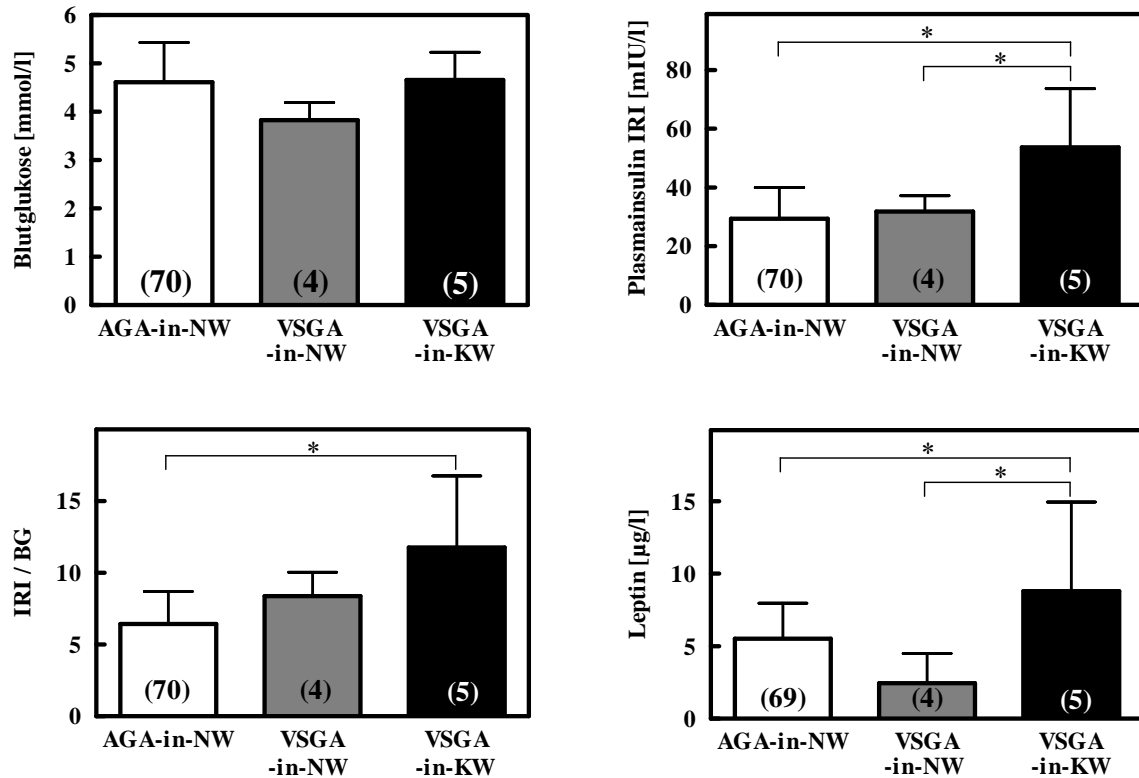


Abb. 31: Stoffwechselformparameter Blutglukose, Plasmainsulin (IRI), Insulin/Blutglukose Ratio (IRI/BG) und Leptin bei der Nüchternblutentnahme am 360. Lebensstag (LT). Vergleich der Ratten mit einem Geburtsgewicht (GGW) unterhalb der Untergrenze des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren GGW gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes und nach Aufzucht vom 3.-21. LT bei Normalernährung in Würfen mit 12 Tieren pro Mutter (VSGA-in-NW - grauer Balken) bzw. bei frühpostnataler Überernährung in kleinen Würfen mit 3 Tieren pro Mutter (VSGA-in-KW - schwarzer Balken) mit den zur Geburt normalgewichtigen Tieren, die in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW - weißer Balken), (MW  $\pm$  SD (n)). Vergleich der Gruppen mittels ANOVA, Einzelgruppenvergleich (post-hoc-t-Test): \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.11.9. Systolischer Blutdruck am 170. LT

Die Blutdruckmessung am 170. LT ergab keine signifikanten Unterschiede im systolischen Blutdruck zwischen den Gruppen (AGA-in-NW:  $129,54 \pm 12,85$  mmHg,  $n=71$ ; VSGA-in-NW:  $123,32 \pm 3,61$  mmHg,  $n=4$ ; VSGA-in-KW:  $120,17 \pm 16,03$  mmHg,  $n=7$ ;  $p(\text{ANOVA})=0,14$ ).

## 4.4. Diskussion

### 4.4.1. Untersuchungen an einem genuinen Tiermodell für das 'small baby syndrome'

In epidemiologischen Studien wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen einer neonatalen Überernährung bzw. einer gesteigerten frühkindlichen Gewichtszunahme und dem späteren Risiko für die Erkrankung an Symptomen des metabolischen Syndroms gezeigt (Dörner und Mohnike 1977, Dörner et al. 1984, Eriksson et al. 1999, Ekelund et al. 2007). Bezüglich der Untersuchung des 'small baby syndrome' entwickelten wir ein genuines Tiermodell, in dem erstmals der Einfluss einer frühpostnatalen Überernährung mit folglich gesteigerter frühpostnataler Gewichtszunahme als Risikofaktor für die Entstehung von adipogenen und diabetogenen Stoffwechselstörungen sowie eines Bluthochdrucks bei spontan geborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht untersucht wurde. Dafür erfolgte eine Auswahl der Tiere anhand des Geburtsgewichts aus den Primärwürfen als SGA, d.h. als 'small for gestational age', wenn ihr Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag. An diesen Tieren untersuchten wir den Einfluss einer frühpostnatalen Überernährung auf die Entwicklung des Körpergewichts, Blutdrucks und von Stoffwechselfparametern durch Aufzucht der SGA-Tiere in kleinen Würfen/Nestern mit nur 3 Tieren pro Mutter als Korrelat einer Überernährung im Vergleich zu einer Aufzucht in normalen Würfen mit 12 Tieren pro Mutter entsprechend einer Normalernährung. Die frühpostnatale Überernährung von SGA-Tieren führte zu einer gesteigerten Körpergewichtszunahme bis zum 7. LT, während SGA-Tiere bei frühpostnataler Normalernährung dieses Körpergewichtsdefizit erst bis zum 60. LT aufholten. Ab diesem Zeitpunkt gab es keine Unterschiede im Körpergewicht, der Körperlänge oder der relativen Körpermasse zwischen den Gruppen bis zum 360. LT. Die Bestimmung der Stoffwechselfparameter ergab deutliche Hinweise auf die Entwicklung einer Insulinresistenz und eines gesteigerten Körperfettanteils bei den frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) am 360. LT, während bei SGA-Tieren, die bei frühpostnataler Normalernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW), keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe bestanden. An diesem genuinen Tiermodell konnten somit Stoffwechseleränderungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei neugeborenen Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht gezeigt werden. Diese Veränderungen traten allerdings nur dann ein, wenn die SGA-Tiere der modellhaften frühpostnatalen Überernährung durch Aufzucht in kleinen Würfen/Nestern ausgesetzt waren.

#### **4.4.2. Zur Eignung dieses genuinen Tiermodells für die Erzeugung von Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht**

Grundlage des Versuchsansatzes bildeten spontan geborene Primärwürfe von Rattenmüttern, die vor und während der Gestation keinerlei Manipulationen unterzogen wurden. Von den neugeborenen Ratten wurden diejenigen als SGA definiert, deren Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls gleichgeschlechtlicher Tiere eines Wurfes lag (Poore und Fowden 2004). Die Auswahl von Tieren mit einem verringerten Geburtsgewicht aus einem Primärwurf wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen angewendet. So galt bei Woods und Weeks eine neugeborene Ratte mit einem um mindestens 10 % verringerten Geburtsgewicht im Vergleich zum mittleren Geburtsgewicht des Primärwurfes als SGA (Woods und Weeks 2004), während Poore und Fowden bei Schweinen die Grenze für ein SGA-Neugeborenes unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts eines Wurfes festlegten (Poore und Fowden 2004).

Es ist bekannt, dass männliche Feten in utero und auch zur Geburt ein höheres Körpergewicht aufweisen (Buelke-Sam et al. 1982, Ward et al. 1977). Aus diesem Grund war eine Auswertung getrennt nach dem Geschlecht notwendig. Bei unseren Untersuchungen unterschied sich die Anzahl der Weibchen in den Primärwürfen nicht signifikant von der Anzahl der Männchen. Bei allerdings leichter Tendenz für einen erhöhten Anteil an Weibchen entschieden wir uns aufgrund der etwas größeren Tierzahl für die ausschließliche Auswertung der Weibchen. Die Tiere, die ein verringertes Geburtsgewicht aufwiesen, waren bei Geburt und am 3. LT signifikant leichter als die Kontrolltiere. Die Ursachen dieser Verminderung des Geburtsgewichts sind nicht genau bekannt. Mögliche Umwelteinflüsse betrafen alle trächtigen Rattenweibchen und Feten auf die gleiche Weise. Vielmehr führten intrauterine Faktoren zu einer Wachstumsrestriktion der Feten. Ein Grund könnte die natürliche fetale Lage innerhalb der Uterushörner gewesen sein, die eine physiologisch verminderte Blutversorgung von Feten in den mittleren Abschnitten beider Uterushörner bedingt (Even et al. 1994). Des Weiteren ist die Anzahl der Feten des Primärwurfes eine bedeutende Einflussgröße. Es besteht ein inverses Verhältnis zwischen der Primärwurfgröße und dem Geburtsgewicht (Zamenhof und Van Marthens 1984). Auch in unserer Studie stammten die Ratten, die zur Geburt ein verringertes Körpergewicht aufwiesen, aus signifikant größeren Würfen als AGA-Tiere. Frühere Untersuchungen zeigten, dass bei zunehmender Anzahl der fetalen Anlagen der Perfusionsdruck jedes Einzelnen sinkt (Even et al. 1994). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Verringerung des Geburtsgewichts durch eine intrauterine Wachstumsrestriktion nach intrauteriner Minderperfusion erzeugt wurde. Der Vorteil dieses Modells im Vergleich zur Arteria uterina Ligatur liegt in der fehlenden Manipulation

während der Gestation. Durch die Ligatur im zuvor verwendeten Alternativmodell wurden Kompensationsmechanismen und Kollateralkreisläufe aktiviert, die eine genaue Aussage über die intrauterine Durchblutung der Feten nicht mehr zuließen. Man musste davon ausgehen, dass ein gewisser Teil der Feten eine verbesserte intrauterine Versorgung erfuhr. Es wurde z.B. auch gezeigt, dass Feten, die fern der Ligatur liegen, ein höheres Geburtsgewicht aufweisen als Feten gleicher Position im uterinen Horn mit einer Scheinligatur (Nüsken et al. 2007). Außerdem konnte bei Nachkommen aus dem Arteria uterina Ligatur Modell kein eindeutiger Hinweis auf die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms festgestellt werden.

In anderen Tiermodellen, z.B. bei der mütterlichen Mangelernährung während der Gestation, wurde eine deutliche Reduktion des Geburtsgewichts von Ratten erreicht. Allerdings wiesen diese Tiere in Langzeituntersuchungen ebenfalls keine Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms auf, sondern hatten ein anhaltend vermindertes Körpergewicht (Holemans et al. 1999, Muaku et al. 1996, Ozanne et al. 1999) und sogar eine verbesserte Stoffwechsellage (Petry et al. 1997, Garofano et al. 1999, Ozanne et al. 1999).

Dagegen konnten wir mit dem dargestellten genuinen Modell neugeborene Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht erzeugen, ohne dass eine Manipulation während der Gestation erfolgte. Damit wurden Einflussfaktoren ausgeschlossen, wie sie z.B. mit einer Hyperperfusion nach Arteria uterina Ligatur in Betracht gezogen werden müssen oder wie sie im Falle spezifischer diätetischer Manipulation vorliegen. Es ist wahrscheinlich, dass die Verminderung des Geburtsgewichts in diesem genuinen Modell durch eine natürlich bedingte Minderperfusion, z.B. aufgrund der Lage oder der Anzahl an Feten innerhalb des uterinen Horns, entsteht. Diese Tatsache prädisponiert dieses Modell als geeignet zur Untersuchung der Hauptursache einer intrauterinen Wachstumsrestriktion in westlichen Industrieländern, nämlich der fetalen Minderversorgung durch uteroplazentare Insuffizienz.

#### **4.4.3. Die „kleinen Würfe“ als Modell für eine frühpostnatale Überernährung und der Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts bei SGA-Tieren**

Die epidemieartige Zunahme von Übergewicht und Adipositas gilt als Hauptursache für die steigende Prävalenz des metabolischen Syndroms (Alberti et al. 2006). Im Zusammenhang mit dem 'small baby syndrome' gibt es bisher aber keine Studie, die einen unabhängigen Einfluss eines erniedrigten Geburtsgewichts auf das spätere Risiko für die Entwicklung eines Übergewichts zeigt (Harder et al. 2007b). Aus diesem Grund wird nach weiteren Ursachen für den epidemiologisch vielfach bestätigten Zusammenhang des 'small baby syndrome' gesucht. In

mehreren epidemiologischen Studien fand sich ein positiver Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Gewichtszunahme im frühen Säuglings- und Kleinkindalter und dem späteren Risiko eines erhöhten Körpergewichts bzw. einer gesteigerten Körperfettmasse (Dörner und Mohnike 1977, Ong et al. 2000, Cameron et al. 2003, Baird et al. 2005, Ekelund et al. 2006, Karaolis-Danckert et al. 2006). Dieser Zusammenhang war auch unabhängig vom Geburtsgewicht nachweisbar (Stettler et al. 2002).

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich bei Ratten mit einem normalen Geburtsgewicht nach Aufzucht in kleinen Würfen die Entstehung eines Übergewichts bereits am 21. LT und in der weiteren Entwicklung das Auftreten einer Hyperphagie, Hyperinsulinämie, gestörten Glukosetoleranz, von erhöhten Triglyceridwerten und einem gesteigerten systolischen Blutdruck (Plagemann et al. 1999c, Plagemann et al. 1999d), also ein Symptomkomplex im Sinne des metabolischen Syndroms, wie er als Folge von einem verringerten Geburtsgewicht (SGA) postuliert wird.

Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht ca. 90 % ihr Defizit in Körpergewicht und –länge bis zum 2. Lebensjahr aufholen, während ca. 50 % der SGA-Kinder, die kein 'catch-up growth' im frühen Kindesalter aufweisen, auch im Erwachsenenalter kleiner bleiben (Karlberg und Albertsson-Wikland 1995, Albertsson-Wikland und Karlberg 1997). Aus diesem Grund scheint eine relative Überernährung gerade bei SGA-Neugeborenen im klinischen Alltag wahrscheinlich, um ihnen ein optimales Wachstum zu ermöglichen.

Deshalb verwendeten wir dieses Modell der kleinen Würfe hier erstmals für die Aufzucht von neugeborenen Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht, um die Bedeutung einer frühpostnatalen Überernährung in Bezug auf die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms zu untersuchen. Die SGA-Tiere waren vom 1.-3. LT signifikant leichter als die Kontrolltiere. Die Primärwürfe wurden bei allen Rattenmüttern vom 1.-3. LT in ihrer natürlichen Größe belassen, um die volle Laktationsleistung der Rattenmutter anzuregen. Am dritten Lebenstag erfolgte die Bildung der Sekundärwürfe, wobei Nester mit 12 Tieren (normale Würfe/Nester) bzw. mit 3 Tieren (kleine Würfe/Nester) pro Mutter gebildet wurden. Es ist bekannt, dass sich die Milchezusammensetzung bei Ratten je nach der Wurf- bzw. Nestgröße ändert, allerdings erst nach dem 4. LT (Fiorotto et al. 1991). Die frühpostnatale Überernährung wird dadurch erreicht, dass bei Aufzucht in kleinen Würfen mit nur drei Tieren pro Mutter jedem einzelnen Tier eine größere Milchmenge zur Verfügung steht (Babický et al. 1973). Des Weiteren hat die Muttermilch von Rattenmüttern kleiner Würfe einen höheren Fettanteil und einen höheren Kaloriengehalt bei gleichem Laktosegehalt (Fiorotto et al. 1991). Diese erhöhte

Energiezufuhr führte zu einer gesteigerten frühpostnatalen Gewichtszunahme und zu einem 'catch-up growth' bei den in kleinen Würfen aufgezogenen SGA-Tieren (SGA-in-KW), so dass sie sich ab dem 7. LT nicht mehr von den Kontrolltieren unterschieden. Die Aufzucht der SGA-Tiere bei frühpostnataler Normalernährung führte ebenfalls zu einem 'catch-up growth'. Allerdings bestand erst ab dem 60. LT kein Unterschied mehr im Körpergewicht zu den Kontrolltieren, so dass keine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme wie bei den SGA-in-KW-Tieren vorlag. Gerade diese gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme aber wird verantwortlich gemacht für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms. Die Regulation der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichts und Stoffwechsels wird u.a. gesteuert durch exprimierte Neuropeptide aus hypothalamischen Kerngebieten. Störungen während der sensiblen peri- und frühpostnatalen Phase der Entwicklung und Ausreifung dieser zentralen Kerngebiete und Steuerungskreise werden verantwortlich gemacht, Ursache dauerhafter Fehlorganisation und Fehlfunktion z.B. in der Regulation des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme zu sein (Plagemann 2005a, Plagemann 2005b).

Die Körpergewichtsentwicklung bei den SGA-Tieren aus unserem Experimentalansatz zeigt Übereinstimmung mit epidemiologischen Untersuchungen an neugeborenen Kindern mit einem verringerten Geburtsgewicht, in denen ca. 90 % dieser Kinder die Defizite in Körpergewicht und –länge bis zum 2. Lebensjahr aufholen und auch in der weiteren Entwicklung eine Endgröße von  $> -2SD$  der mittleren Größe der Referenzpopulation erreichen (Karlberg und Albertsson-Wikland 1995, Albertsson-Wikland und Karlberg 1997). Dagegen wurde in anderen Tiermodellen, die Nachkommen mit einem verringerten Geburtsgewicht untersuchten, diese Entwicklung nicht beobachtet. Nachkommen von Rattenmüttern, die während der Gestation einer Mangelernährung ausgesetzt waren, hatten ein verringertes Geburtsgewicht, wiesen aber in der späteren Entwicklung kein Aufholwachstum, sondern eine anhaltende Verminderung des Körpergewichts auf (Holemans et al. 1999, Muaku et al. 1996, Ozanne et al. 1999). Ebenso zeigten die wenigen SGA-Nachkommen aus unseren Untersuchungen am Modell der Arteria uterina Ligatur eine anhaltende Verringerung des Körpergewichts bis zum 21. LT, so dass keine Übereinstimmung zu klinischen Beobachtungen im Sinne des 'small baby syndrome' bestand.

Auch bei Auswahl der SGA-Tiere anhand des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts in unserem genuinen Tiermodell wiesen die Tiere sowohl nach Aufzucht in kleinen als auch in normalen Würfen ein 'catch-up growth' auf und waren am 360. LT nicht signifikant leichter oder kürzer als die Kontrolltiere. Allerdings hatten die frühpostnatal normal ernährten VSGA-Tiere (VSGA-in-NW) tendenziell ein geringeres Körpergewicht und –länge im

Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch in epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass SGA-Neugeborene mit höherer Wahrscheinlichkeit die erwartete Zielgröße und Körperstatur im Kindes- und Erwachsenenalter nicht erreichen (Karlberg und Albertsson-Wikland 1995, Hediger et al. 1998, Hediger et al. 1999). Dabei bleiben ca. 50 % der SGA-Kinder, die kein 'catch-up growth' im frühen Kindesalter aufweisen, auch im Erwachsenenalter kleiner (Karlberg und Albertsson-Wikland 1995).

Die SGA-Nachkommen, ob nach frühpostnataler Aufzucht in kleinen oder in normalen Würfen, zeigten ein 'catch-up growth', da sie sich im adulten Alter weder in Körpergewicht noch in Körperlänge signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden. Bei den frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) lag aber eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme vor, so dass sich die Tiere bereits ab dem 7. LT nicht mehr von der Kontrollgruppe unterschieden. Diese gesteigerte Gewichtszunahme wurde verursacht durch eine übermäßige Energiezufuhr durch die Aufzucht in kleinen Würfen und führte zu einer erhöhten relativen Körpermasse als Ausdruck einer erhöhten Fettdeposition bei den SGA-in-KW-Tieren am 21. LT im Vergleich zu den SGA-in-NW-Tieren. Gerade diese rasche frühpostnatale Gewichtszunahme wird bei SGA-Neugeborenen als Risikofaktor für die Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms diskutiert. Epidemiologische Studien zeigten, dass humane SGA-Neugeborene nach einer erhöhten Gewichtszunahme im frühen Kindesalter ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer zentralen Adipositas und Insulinresistenz (Fagerberg et al. 2004, Ibáñez et al. 2006) sowie einer gestörten Glukosetoleranz (Crowther et al. 1998) und eines Diabetes mellitus Typ 2 (Hyppönen et al. 2003) aufweisen. Des Weiteren ist das Risiko für eine koronare Herzerkrankung bei ehemaligen SGA-Neugeborenen besonders dann erhöht, wenn sie nach einer starken Gewichtszunahme bis zum 7. Lebensjahr ein gesteigertes Körpergewicht ab dem 7. Lebensjahr haben (Eriksson et al. 1999, Forsén et al. 1999).

Untersuchungen an termingerecht geborenen Kindern mit einem verringerten Geburtsgewicht ergaben, dass diese zur Geburt eine prozentual erhöhte fettfreie Körpermasse und einen verringerten Fettanteil im Vergleich zu AGA-Neugeborenen aufweisen. Dagegen gibt es bei dem Vergleich von zu früh geborenen SGA- und AGA-Feten gleichen Gestationsalters keine Unterschiede im Anteil der fettfreien Körpermasse (Enzi et al. 1981, Petersen et al. 1988, Lapillonne et al. 1997). Während der Gestation kommt es v.a. in den letzten drei Monaten zu einer rapiden Anlagerung von subkutanem Fettgewebe und folglich zu einer relativen Abnahme der fettfreien Körpermasse, was bei SGA-Neugeborenen z.B. durch eine intrauterine Mangelversorgung gestört sein kann (Petersen et al. 1988). Bei Auftreten eines 'rapid neonatal weight gain' nach der Geburt zeigen SGA-Neugeborene im Vergleich zu AGA-Neugeborenen



eine relativ erhöhte Zunahme von Fettgewebe mit v.a. gesteigerter abdominaler Fettanlagerung (Ong et al. 2000, De Zegher et al. 2005, Ibáñez et al. 2006). Diese Entwicklung muss nicht zwingend mit einem erhöhten Relativgewicht im Sinne des BMI im Erwachsenenalter korrelieren (Jaquet et al. 2005). Auch in unserem Tierexperiment gab es keine Unterschiede in der relativen Körpermasse zwischen den Gruppen am 360. LT. Dennoch weisen die signifikant erhöhten Leptinwerte bei den frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) auf einen gesteigerten Körperfettanteil hin. Bei Auswahl der SGA-Tiere anhand des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts (VSGA-Tiere) war ebenfalls eine gesteigerte Gewichtszunahme nach frühpostnataler Überernährung nachweisbar, so dass sich die Tiere ab dem 7. LT nicht mehr von den Kontrolltieren unterschieden. Allerdings hielt die gesteigerte Gewichtszunahme an und die Tiere waren am 360. LT signifikant schwerer als die Kontrolltiere und hatten zudem einen signifikant größeren Bauchumfang. Bei signifikant erhöhten Leptinwerten ist eine gesteigerte Körperfettmasse mit v.a. zentraler Fettverteilung zu vermuten, die sich in der Erhöhung des Bauchumfangs zeigte. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass eine vermehrte Fettanlagerung mit v.a. zentralem Fettverteilungsmuster das Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz und eines Diabetes mellitus sowie das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen steigert (Wajchenberg 2000, Després et al. 2000). Die Beobachtungen an unseren Tieren sind als Hinweise für die Entwicklung einer Adipositas zu werten. Dass sich dieser Phänotyp gerade bei den VSGA-Tieren so deutlich entwickelte, ist möglicherweise auf das relativ verstärkte Ausmaß der frühpostnatalen Gewichtszunahme während der sensiblen Phase der Ausbildung zentraler Regelmechanismen der Nahrungsaufnahme und Körpergewichtsregulation zurückzuführen. Die Aufzucht von VSGA-Tieren in normalen Würfen führte wie bei den SGA-Tieren, die anhand des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts ausgewählt und in normalen Würfen aufgezogen wurden (SGA-in-NW), zu einem 'catch-up growth' bis zum 60. LT. In der weiteren Entwicklung bis zum 360. LT waren die VSGA-in-NW-Tiere aber tendenziell sogar eher leichter als die Kontrolltiere.

Die Gewichtszunahme bei humanen Neugeborenen wird v.a. durch die Säuglingsernährung bestimmt. Die von führenden Fachorganisationen empfohlene Ernährung des Neugeborenen und Säuglings in den ersten 4-6 Monaten stellt das Stillen dar (WHO, UNICEF 2003; American Academy of Pediatrics 2005, Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 2006; Nationale Stillkommission am BfR 2004). Vorteile des Stillens sind neben der Reduktion akuter und chronischer Erkrankungen (Ip et al. 2007, American Academy of Pediatrics 2005) die Förderung der Mutter-Kind Beziehung (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin

2006), die Minderung des Risikos für Übergewicht und Adipositas im späteren juvenilen und adulten Alter (Kramer 1981, Gillman et al. 2001, Arenz et al. 2004, Grummer-Strawn und Mei 2004, Owen et al. 2005a, Owen et al. 2005b, Harder et al. 2005, Plagemann und Harder 2005a) sowie die Reduktion des systolischen Blutdrucks bei den Nachkommen im juvenilen Alter (Martin et al. 2004, Lawlor et al. 2005a). Weiterhin gibt es Hinweise auf ein vermindertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Rich-Edwards et al. 2004) und weitere Symptome des metabolischen Syndroms im späteren Leben (Plagemann und Harder 2005a, Singhal 2006). Eine mögliche Erklärung des verminderten Risikos für die Erkrankung an Symptomen des metabolischen Syndroms bei AGA-Neugeborenen, die Muttermilch erhalten, im Vergleich zu AGA-Neugeborenen mit Formula-Ernährung, stellt die langsamere Gewichtszunahme innerhalb des ersten Lebensjahres dar (Heinig et al. 1993, Ong et al. 2002, Kramer et al. 2004). Bei Ernährung des Säuglings mit Formula-Ernährung ist dieser im Vergleich zur Ernährung mit Muttermilch einem höheren Anteil an Proteinen und Energie ausgesetzt, was für die verstärkte Gewichtszunahme im ersten Lebensjahr verantwortlich sein kann (Heinig et al. 1993, Premji et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass eine höhere Proteinaufnahme in der Neonatalperiode und in der Säuglingszeit bis zum ersten Lebensjahr mit einem später erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Adipositas assoziiert ist (Scaglioni et al. 2000). Dabei lässt sich bei Neugeborenen mit Formula-Ernährung im postprandialen Zustand eine höhere Seruminsulinkonzentration feststellen als bei Muttermilch ernährten Neugeborenen (Lucas et al. 1981).

Bisher gibt es allerdings noch keine Studie, die den protektiven Einfluss der Muttermilchernährung auf die Entwicklung eines Übergewichts auch explizit bei SGA-Neugeborenen zeigt. Aufgrund der bisher vorliegenden Befunde aber wird eine kalorienangereicherte Nahrung bei SGA-Neugeborenen zunehmend zurückhaltend bewertet (Clayton et al. 2007).

#### **4.4.4. Risiko für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei SGA-Neugeborenen nach frühpostnataler Überernährung**

Das 'small baby syndrome' beschreibt das erhöhte Risiko von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht für die Entstehung von Übergewicht und Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms, wie z.B. eines Diabetes mellitus Typ 2 oder einer Hyperlipidämie (Barker et al. 1993). Eine gestörte Glukosetoleranz bzw. ein Diabetes mellitus Typ 2 sind komplexe Störungen, die entweder durch eine veränderte Insulinsekretion oder durch

eine Verminderung der Insulinwirkung an den Zielzellen bedingt sein können (Matthaei et al. 2000). Ein Hauptwirkort des Insulins ist neben dem Muskel- und Lebergewebe das Fettgewebe. Im Vergleich zu den Muskelzellen besteht die Insulinwirkung aber weniger in der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme in die Zellen, sondern v.a. in der Hemmung der Lipolyse mit Verminderung der Freisetzung von Glycerol und freien Fettsäuren (Matthaei et al. 2000). Glycerol wiederum dient als Substrat der Glukoneogenese und kann sich bei vermehrter Freisetzung negativ auf die Glukosehomeostase auswirken (Nurjhan et al. 1992). Bei adipösen Menschen besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Fettmasse und dem Nüchternblutzucker, dem Insulin und C-Peptid sowie der 'area under the curve' von Glukose und Insulin während eines Glukosetoleranztests (Wajchenberg 2000). Bei Zunahme des abdominalen Fettgewebes konnte der negative Einfluss auf die Glukosetoleranz auch unabhängig von der gesamten Körperfettmenge gezeigt werden (Wajchenberg 2000).

Als mögliche bedeutsame Faktoren für die Entwicklung eines Übergewichts, einer Insulinresistenz und weiterer Symptome des metabolischen Syndroms werden die intrauterine und frühpostnatale Überernährung diskutiert. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine Aufzucht von zur Geburt normalgewichtigen Ratten vom 3.-21. LT bei einer Überernährung in kleinen Würfen zu einer Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms mit Hyperinsulinämie, gesteigerter Nahrungsaufnahme, gestörten Glukosetoleranz und gesteigerten Triglyceridwerten führt (Plagemann et al. 1999c, Plagemann et al. 1999d).

Bei den Tieren der aktuellen Studie aus dem genuinen Tiermodell erfolgten Bestimmungen der Nüchternblutglukose, Insulin, Leptin sowie ein Glukosetoleranztest. Am 130. LT fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Nüchternblutglukose, im Insulin und bei der Insulin/Blutglukose Ratio zwischen den Gruppen. Tendenziell waren jedoch die Werte für Insulin und die Insulin/Blutglukose Ratio bei den SGA-in-KW- und SGA-in-NW-Tieren am höchsten. Im Glukosetoleranztest hatten frühpostnatal überernährte SGA-Tiere (SGA-in-KW) nach 90 min einen signifikant erhöhten Blutglukosewert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Befunde sprechen für eine möglicherweise beginnende Insulinresistenz, die sich erst während der weiteren Entwicklung im höheren Alter ausbildet. Es ist bekannt, dass die Veränderungen des metabolischen Syndroms verstärkt im höheren Lebensalter auftreten (Alexander et al. 2008). Die tendenziellen Veränderungen vom 130. LT verstärkten sich tatsächlich im höheren adulten Alter und so fanden sich bei der Bestimmung der Stoffwechselfparameter am 360. LT signifikant erhöhte Plasmainsulinwerte und eine signifikant erhöhte Insulin/Blutglukose Ratio bei den

frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) im Vergleich zu den Kontrolltieren (AGA-in-NW) als Hinweis auf eine Insulinresistenz bei den SGA-in-KW-Tieren.

Hofman et al. zeigten bei Neugeborenen mit einem verminderten Geburtsgewicht, seien sie termingerecht geborene 'small for gestational age'-Kinder oder aber 'appropriate for gestational age'-Frühgeborene, eine verminderte Insulinsensitivität als möglichen Hinweis auf die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus (Hofman et al. 2004). Diese Beobachtung, dass Frühgeborene mit einer normalen Gewichtsentwicklung bis zum Zeitpunkt der Geburt (AGA) das gleiche Risiko wie zu klein aber termingerecht geborene Kinder (SGA) für die Entwicklung einer Insulinresistenz haben, ist ein Hinweis darauf, dass nicht die intrauterine Mangelernährung bzw. Unterversorgung bei SGA- bzw. IUGR-Neugeborenen für diesen Zusammenhang verantwortlich sein kann. Schlussfolgernd kann man vermuten, dass eher das frühpostnatale Milieu, geprägt durch die frühpostnatale Ernährung eines Neugeborenen mit einem verminderten Geburtsgewicht, sei es ein SGA-Termingeborenes oder ein AGA-Frühgeborenes, von Bedeutung für das Outcome untergewichtiger Neugeborener ist (Plagemann und Harder 2005b).

Eine mögliche Erklärung für die Entwicklung einer Insulinresistenz bei SGA-Neugeborenen beschrieben Ibáñez et al., die bei Kindern mit einem verminderten Geburtsgewicht einen Zusammenhang zwischen der Gewichtszunahme in den ersten beiden Lebensjahren und dem Anteil der Körperfettmasse mit v.a. abdominaler Beteiligung feststellten. SGA-Kinder mit einem Aufholwachstum in den ersten beiden Lebensjahren entwickeln eine erhöhte Körperfettmasse, obwohl sie sich nicht in Körpergewicht, Körperlänge und BMI von den Kontrollkindern im Alter von 2-4 Jahren unterscheiden (Ibáñez et al. 2006). Gerade die Zunahme des viszeralen Fettgewebes ist verbunden mit der Entwicklung einer Insulinresistenz (Wajchenberg 2000). Weitere Untersuchungen an SGA-Kindern zeigten zudem eine Verminderung bestimmter Signalproteine an Muskelzellen, die die Insulinwirkung vermitteln und somit möglicherweise teilweise verantwortlich sind für eine verminderte Glukosetoleranz (Ozanne et al. 2005, Vaag et al. 2006).

Frühpostnatal überernährte SGA-Tiere (SGA-in-KW) aus unserem Modell wiesen zum einen erhöhte basale Insulinkonzentrationen und zum anderen, wenn auch nicht signifikant, erhöhte Leptinwerte am 360. LT auf. Leptin ist ein hauptsächlich von Fettzellen sezerniertes Proteohormon (Ahima und Flier 2000), dessen Serumkonzentration mit der Körperfettmasse korreliert (Caro et al. 1996b, Maffei et al. 1995). Leptin dient als wichtiger Botenstoff des Fettgewebes, der durch negative Rückkopplung und Wirkung am zentralen Nervensystem die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch steuert (Caro et al. 1996b). Dabei ist es als wichtiges Sättigungssignal ein bedeutsamer Faktor bei der Regulierung des Körpergewichts und

der Körperfettmasse (Wajchenberg 2000). Wenn über alle Gruppen auch kein Unterschied im Körpergewicht ab dem 60. LT nachweisbar war, so weisen die tendenziell erhöhten Leptinwerte bei den SGA-Tieren, die bei frühpostnataler Überernährung aufgezogen wurden (SGA-in-KW) auf eine gesteigerte Körperfettmasse hin, die Ursache der beginnenden Insulinresistenz sein kann (Larsson et al. 1996, Boden 1997). Sowohl die Plasmainsulinkonzentration als auch die Insulin/Blutglukose Ratio waren bei den SGA-in-KW-Tieren als Hinweis auf eine Insulinresistenz im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, was am 360. LT auch eine statistische Signifikanz erreichte. In epidemiologischen Studien wurden Personen mit diesem Phänotyp, d.h. ohne Erhöhung des BMI, aber mit dem Nachweis von Stoffwechselstörungen wie z.B. einer Hyperinsulinämie und Insulinresistenz als 'metabolically obese' bezeichnet (Ruderman et al. 1998).

Bei den SGA-Tieren, die bei frühpostnataler Normalernährung aufgezogen wurden (SGA-in-NW) bestanden dagegen keine signifikanten Unterschiede bei Bestimmung des Insulins und der Insulin/Blutglukose Ratio im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wenn die Werte auch am 130. LT im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöht waren, glichen sich besonders die Plasmainsulinwerte in der weiteren Entwicklung bis zum 360. LT den Werten der Kontrollgruppe an. Diese Tatsache zeigt, dass das Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz bei Neugeborenen mit einem verminderten Geburtsgewicht maßgeblich durch die frühpostnatale Ernährung bzw. Überernährung mit gesteigerter frühpostnataler Gewichtszunahme geprägt wird. Eine deutliche Verstärkung der Unterschiede fand sich bei Auswertung der Tiere aus unserem genuinen Tiermodell, wenn diejenigen neugeborenen Ratten als 'small for gestational age' definiert wurden, deren Geburtsgewicht unterhalb des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag (VSGA-Tiere). Dabei waren bei den frühpostnatal überernährten VSGA-Tieren (VSGA-in-KW) das Insulin, die Insulin/Blutglukose Ratio und auch das Leptin sowohl am 130. LT als auch am 360. LT im Vergleich zu den Kontrolltieren und auch zu den frühpostnatal normal ernährten VSGA-Tieren (VSGA-in-NW) signifikant erhöht. Ebenso wiesen die VSGA-in-KW-Tiere am 360. LT ein signifikant höheres Körpergewicht als die Tiere der anderen beiden Gruppen auf. Auch in einer epidemiologischen Studie wurde gezeigt, dass die Kinder, die zur Geburt im kleinsten Tertil des Geburtsgewichts liegen und sich im Kindesalter durch rasche Gewichtszunahme im oberen Drittel des BMI bewegen, das höchste Risiko für Stoffwechselstörungen wie z.B. einer Insulinresistenz aufweisen (Bavdekar et al. 1999). In unserem Experimentalansatz wiesen die erhöhten Leptinwerte bei den VSGA-in-KW-Tieren auf eine deutliche Erhöhung des Körperfettgewebes nach der frühpostnatalen Überernährung hin.

Die unphysiologisch hohe Freisetzung von Leptin gerade in dem sensiblen Zeitraum der frühpostnatalen Entwicklung kann durch die Entwicklung einer Leptinresistenz zu einer Fehlentwicklung von neuroendokrinen Regulationsmechanismen der Gewichtsregulation führen. Physiologischerweise führt der Anstieg von Leptin und Insulin zu einer verminderten zentralen Freisetzung von orexigenen, d.h. die Nahrungsaufnahme stimulierenden Neurohormonen im Hypothalamus wie z.B. NPY (Kalra et al. 1999, Porte et al. 1998). In einer experimentellen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte aber bei Ratten, die in kleinen Würfen aufgezogen wurden, die Entwicklung eines Übergewichts verbunden mit einer Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine erhöhte Zahl NPY-positiver Neurone und auch eine erhöhte NPY-Konzentration in hypothalamischen Kerngebieten nachgewiesen. Diese Befunde waren auch im adulten Alter nachweisbar und sind als neonatal erworbene Resistenz gegenüber peripheren Sättigungssignalen wie Leptin und Insulin zu werten (Plagemann et al. 1999a, Plagemann et al. 1999b, Plagemann 2006). Als mögliche Ursache einer zentralen Leptinresistenz wurde auch die Möglichkeit eines verminderten Transports von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke diskutiert, die durch eine Sättigung des Transportsystems bei einem Überangebot an Leptin entsteht (Caro et al. 1996a).

Die SGA-Tiere in unserem genuinen Tiermodell wiesen allerdings zu keinem Zeitpunkt eine gesteigerte Nahrungsaufnahme auf. Die Futteraufnahme unterschied sich weder vom 30.-50. LT noch vom 90.-110. LT zwischen den Gruppen, sowohl bei der Auswahl der SGA-Tiere nach dem 95 % als auch nach dem 99 % Konfidenzintervall des mittleren Geburtsgewichts. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am Modell der kleinen Würfe entwickelten zur Geburt normalgewichtige Ratten nach Aufzucht bei einer frühpostnatalen Überernährung eine anhaltende Hyperphagie und ein anhaltendes Übergewicht im adulten Alter (Plagemann et al. 1999c). In dem aktuellen genuinen Tiermodell konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Hyperphagie bei den SGA-in-KW-Tieren nachgewiesen werden. Die Menge der aufgenommenen Nahrung der SGA-Ratten glich sich sowohl nach Aufzucht in kleinen als auch in normalen Würfen verglichen mit der Kontrollgruppe an und zeigte keine signifikanten Unterschiede im juvenilen und adulten Alter. Allerdings kam es bei den SGA-in-KW-Tieren trotz fehlender Hyperphagie zu einer gesteigerten Fettanlagerung. Eine mögliche Ursache kann eine positive Energiebilanz durch verringerten Energieverbrauch z.B. durch Reduktion der Thermogenese sein (Dulloo 2006).

Zusammenfassend zeigten SGA-Tiere aus diesem genuinen Tiermodell im adulten Alter Hinweise für die Entwicklung einer Insulinresistenz und einer gesteigerten Körperfettmasse als Hauptfaktoren des metabolischen Syndroms. Diese Störungen traten allerdings nur dann auf,

wenn die Tiere einer frühpostnatalen Überernährung ausgesetzt waren und eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme aufwiesen. SGA-Tiere, die bei frühpostnataler Normalernährung in normalen Würfen aufgezogen wurden, entwickelten ein langsames 'catch-up growth' bis zum 60. LT und zeigten keine signifikanten Unterschiede bei den Stoffwechselfparametern im adulten Alter im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### **4.4.5. Risiko für die Entwicklung eines Bluthochdrucks bei SGA-Neugeborenen nach frühpostnataler Überernährung**

Das 'small baby syndrome' beschreibt neben dem erhöhten Risiko von Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms auch das erhöhte Risiko für die Entwicklung eines Bluthochdrucks im adulten Alter (Barker et al. 1993). Huxley et al. zeigten allerdings in einer Metaanalyse zum Zusammenhang zwischen einem verringerten Geburtsgewicht und dem später erhöhten systolischen Blutdruck, dass auch dieser Zusammenhang v.a. durch das Vorliegen von 'publication bias' zu erklären ist. In deren Metaanalyse verminderte sich der nachgewiesene Unterschied im Blutdruck zwischen den Gruppen mit zunehmender Studiengröße (Huxley et al. 2002). Außerdem erfolgte in den Studien dieser Metaanalyse häufig eine Adjustierung des Blutdrucks auf das aktuelle Körpergewicht im adulten Alter. Bei nachweislich positivem Zusammenhang zwischen dem aktuellen Körpergewicht und dem systolischen Blutdruck kann dies bei Neugeborenen mit einem verringerten Geburtsgewicht nach gesteigerter Gewichtszunahme bis zum adulten Alter zu einer Vortäuschung eines Zusammenhangs zwischen dem Geburtsgewicht und aktuellem Blutdruck führen (Huxley et al. 2002, Tu et al. 2005). Zudem stammten die meisten kleineren Studien mit den größten Gruppenunterschieden im systolischen Blutdruck von der Arbeitsgruppe, die die 'fetal origins hypothesis' ursprünglich veröffentlichte. Aus dieser Metaanalyse musste geschlossen werden, dass das Geburtsgewicht keinen unabhängigen Einflussfaktor auf den Blutdruck im adulten Alter darstellt (Huxley et al. 2002).

Die Entwicklung eines Bluthochdrucks im adulten Alter wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst. Unter anderem besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem aktuellen Körpergewicht und dem Blutdruck (Poirier et al. 2006, Stamler et al. 1978). Andererseits steigert eine verstärkte Gewichtszunahme im Kindesalter das Risiko für die Entwicklung eines Übergewichts im adulten Alter (Stettler et al. 2002). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte an Kindern von Müttern mit einem Gestationsdiabetes gezeigt werden, dass ein positiver

Zusammenhang zwischen einer gesteigerten frühpostnatalen Gewichtszunahme und dem systolischen Blutdruck im 6. Lebensjahr besteht (Harder und Plagemann 2002). Auch in tierexperimentellen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass zur Geburt normalgewichtige Ratten, die bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen aufgezogen wurden, einen gesteigerten systolischen Blutdruck im adulten Alter entwickeln. Diese Tiere zeigten auch ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren (Plagemann et al. 1999c).

Die Tiere aus unserem genuinen Tiermodell wiesen aber im adulten Alter weder Unterschiede im systolischen Blutdruck noch im Körpergewicht auf. Auch bei Betrachtung der frühpostnatal überernährten VSGA-Tiere (VSGA-in-KW), die im adulten Alter ein gesteigertes Körpergewicht entwickelten, gab es keine Unterschiede im systolischen Blutdruck zwischen den Gruppen am 170. LT. Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie im höheren Lebensalter besteht (Alexander et al. 2008). Aussagen zum höheren Lebensalter sind bei unseren Tieren nicht möglich, da zu einem späteren Zeitpunkt keine Messungen durchgeführt wurden.

Neben der Bedeutung einer starken Gewichtszunahme wird auch eine perinatale Stressdisposition für die Entwicklung eines Bluthochdrucks diskutiert. Beispielsweise bedeuten eine intrauterine Mangelernährung und/oder Mangel durchblutung Stress für den Feten. Daneben sind auch eine Hypoglykämie, Hypoxämie oder Hypotension mögliche Ursachen für fetalen Stress. Als Reaktion kommt es zu einer veränderten Konzentration fetaler und plazentarer Hormone in deren Konsequenz ein Anstieg der basalen- und Stress-induzierten Glukokortikoidkonzentration resultiert (Phillips 1996, Gortner 2007). In Untersuchungen an ehemals wachstumsretardierten Neugeborenen waren auch im adulten Alter noch erhöhte basale Kortisolkonzentrationen wie auch eine gesteigerte Antwort auf ACTH in den Nebennieren nachweisbar (Fowden et al. 2005). Als Ursache wird eine fetale Programmierung mit verminderter zentraler Feedbackregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse von Glukokortikoiden verantwortlich gemacht, in deren Konsequenz es zu dauerhaft erhöhten Glukokortikoidspiegeln kommt, die für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie im höheren Lebensalter prädisponieren (Seckl und Meaney 2004).

In anderen tierexperimentellen Modellen zur Untersuchung des 'small baby syndrome' bezüglich der Entwicklung eines Bluthochdrucks bei SGA-Neugeborenen fanden sich widersprüchliche Ergebnisse. Holemans et al. untersuchten die Entwicklung des systolischen Blutdrucks bei Nachkommen des 'low protein' Modells im adulten Alter, ohne dass eine Erhöhung bei Nachkommen mit einem verringerten Geburtsgewicht festgestellt werden konnte (Holemans et



al. 1999). In anderen Studien wiederum wurde eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks bei Nachkommen von Müttern, die während der Gestation einer 'low protein' Diät ausgesetzt waren, gemessen (Langley und Jackson 1994). Diese widersprüchlichen Ergebnisse beschrieben auch McMillen und Robinson, die weniger die 'low protein' Diät an sich, sondern eher die Zusammensetzung der 'low protein' Diät mit unterschiedlichem Anteil bestimmter Aminosäuren als Einflussfaktor auf die Entwicklung eines erhöhten systolischen Blutdrucks verantwortlich machten (McMillen und Robinson 2005). Bei Nachkommen aus dem Modell der Arteria uterina Ligatur zeigten sich ebenfalls keine Blutdruckunterschiede zwischen den Gruppen gemessen im Alter von 3-4 Monaten (Jansson und Lambert 1999).

#### **4.5. Fazit**

Mit dem hier vorgestellten genuinen Tiermodell wurden erstmals neugeborene Ratten mit einem verringerten Geburtsgewicht untersucht, die nicht durch eine äußere Manipulation während der Gestation entstanden sind. Die Tiere, die zur Geburt ein Körpergewicht unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes aufwiesen, hatten bis zum 3. LT ein signifikant verringertes Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach der Aufzucht bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen zeigten diese SGA-in-KW-Tiere ein 'catch-up growth' bis zum 7. LT, während SGA-Tiere bei Normalernährung (SGA-in-NW) ihr Körpergewichtsdefizit erst bis zum 60. LT aufholten. Bis zum 360. LT gab es keine weiteren Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Gruppen. Es fanden sich aber Hinweise auf die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei adulten SGA-Tieren. Die Tiere wiesen eine gestörte Glukosetoleranz, erhöhte Plasmainsulinwerte und eine erhöhte Insulin/Blutglukose Ratio als Hinweis auf die Entwicklung einer Insulinresistenz auf. Diese Störungen waren allerdings nur dann nachweisbar, wenn die SGA-Tiere einer frühpostnatalen Überernährung durch Aufzucht in kleinen Würfen ausgesetzt waren. Ebenso waren die Leptinwerte bei diesen SGA-in-KW-Tieren tendenziell erhöht als Hinweis auf eine gesteigerte Körperfettmasse. Der Blutdruck unterschied sich nicht zwischen den Gruppen.

Bei Auswahl der SGA-Tiere anhand des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes (VSGA-Tiere) waren diese Befunde noch verstärkt zu beobachten. So waren die VSGA-Tiere vom 1.-3. LT signifikant leichter als die Kontrolltiere. Nach Aufzucht bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen zeigten die Tiere ebenfalls ein 'catch-up growth' bis zum 7. LT. Zudem kam es auch im

weiteren Verlauf zu einer starken Körpergewichtszunahme, so dass diese VSGA-in-KW-Tiere am 360. LT signifikant schwerer waren als die frühpostnatal normal ernährten VSGA-Tiere (VSGA-in-NW) und die Kontrolltiere (AGA-in-NW). Neben der Entwicklung eines Übergewichts kam es zur Ausbildung von Stoffwechselstörungen. Sowohl das Plasmainsulin als auch die Insulin/Blutglukose Ratio waren bei den VSGA-in-KW-Tieren als Merkmale für eine Insulinresistenz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Als mögliche Ursache ist die Ausbildung einer vermehrten Körperfettmasse anzusehen. Hinweisend dafür waren die signifikant erhöhten Plasmaleptinwerte bei den VSGA-in-KW-Tieren. Dagegen zeigten VSGA-Tiere, die bei frühpostnataler Normalernährung aufgezogen wurden, keine derartigen Stoffwechseleränderungen und waren bis in das adulte Alter die leichtesten Tiere.

Aus epidemiologischen Studien an neugeborenen Kindern mit einem verringerten Geburtsgewicht ist bekannt, dass diese nach einer erhöhten Gewichtszunahme im frühen Kindesalter ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz und einer gestörten Glukosetoleranz aufweisen (Fagerberg et al. 2004, Ibáñez et al. 2006, Crowther et al. 1998). Dabei ist bei diesen Kindern nach einem 'rapid neonatal weight gain' ein relativ erhöhter Anteil an Körperfettgewebe mit v.a. zentraler Fettverteilung nachweisbar (Ong et al. 2000, De Zegher et al. 2005, Ibáñez et al. 2006), selbst wenn kein erhöhter BMI resultiert (Jaquet et al. 2005).

Die SGA-Tiere aus unserem Experimentalansatz hatten nach frühpostnataler Überernährung signifikant erhöhte Leptinwerte als Hinweis auf eine gesteigerte Körperfettmasse. Bei den frühpostnatal überernährten VSGA-Tieren (VSGA-in-KW) fand sich zudem ein vergrößerter Bauchumfang, der auf eine zentrale Fettverteilung hindeutet. Gerade diese gesteigerte Fettmasse mit v.a. zentraler Fettverteilung gilt als Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz (Dulloo et al. 2002, Dulloo 2006). Aus diesen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass das Vorliegen eines verringerten Geburtsgewichts allein keinen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms im Experimentalmodell darstellt. Vielmehr ist eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme durch frühpostnatale Überernährung bei neugeborenen Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht von entscheidender Bedeutung.

## V. Zusammenfassung

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einem verminderten Geburtsgewicht und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus und assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen im Sinne des metabolischen Syndroms im adulten Alter beschrieben. Ursachen dieses Zusammenhangs, der auch als 'small baby syndrome' bezeichnet wird, sind bisher nicht bekannt, so dass eine weitere Erforschung an validen Tiermodellen dringend erforderlich ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, an zwei Tiermodellen mögliche Pathomechanismen des 'small baby syndrome' zu untersuchen.

Die Hauptursache eines verringerten Geburtsgewichts in den westlichen Industrieländern stellt die uteroplazentare Minderperfusion bzw. Insuffizienz dar. Das Modell der Arteria uterina Ligatur zählt zu den am häufigsten verwendeten Tiermodellen zur Erzeugung von Nachkommen mit einem verringerten Geburtsgewicht durch uteroplazentare Insuffizienz, ohne dass es bisher umfassend auf seine Eignung als Modell für das 'small baby syndrome' geprüft wurde. Wir führten hierzu die bis dato größte tierexperimentelle Studie und zusätzlich eine Metaanalyse mit den bisher veröffentlichten Studien, die dieses Modell verwendeten, durch. In der tierexperimentellen Studie wurden die Nachkommen von Rattenmüttern mit beidseitiger Ligatur der Arteria uterina im letzten Drittel der Gestation von der Geburt bis zum Absetzen vom Muttertier am 21. Lebenstag (LT) im Vergleich zu Nachkommen von Rattenmüttern mit einer Scheinligatur untersucht und folgende Ergebnisse erhoben:

1. Nachkommen von Müttern mit bilateraler Arteria uterina Ligatur zeigten keine Verminderung des mittleren Geburtsgewichts und keine erhöhte Häufigkeit eines verminderten Geburtsgewichts.
2. Die bilaterale Ligatur der Arteria uterina führte zu einer Reduktion der Primärwurfgröße und damit möglicherweise zum Überleben der kräftigeren und schwereren Feten.
3. Im weiteren Verlauf vom 1.-21. LT gab es keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Gruppen und es fanden sich keine Hinweise für eine gesteigerte frühpostnatale Gewichtszunahme bzw. die Entwicklung eines Übergewichts bei den Nachkommen von Müttern mit bilateraler Arteria uterina Ligatur.
4. Die Bestimmung der Stoffwechselfparameter (Blutglukose, Insulin, Insulin/Blutglukose Ratio, Leptin und Triglyceride) am 21. LT lieferte ebenfalls keine Hinweise für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms bei Nachkommen von Müttern mit bilateraler Arteria uterina Ligatur.

5. Die Durchführung eines systematischen Literatur-Reviews und einer Metaanalyse mit den bisher veröffentlichten Studien, die das Modell der bilateralen Arteria uterina Ligatur verwendeten, zeigt deutlich, dass die Ergebnisse aus diesem Modell durch das Vorliegen von 'publication bias' geprägt sind. Das heißt, dass der in der Literatur veröffentlichte Unterschied im Geburtsgewicht zwischen den Versuchsgruppen vor allem durch eine selektive Publikation von kleinen Studien bedingt ist, die in ihrer Auswertung wenige und anhand eines verringerten Geburtsgewichts unklarer Genese selektierte Ratten aus den Primärwürfen verwendeten. Die deutlich schiefe Verteilung im 'funnel plot' zeigt die größten Gruppenunterschiede im Geburtsgewicht in Studien mit kleinerer Tierzahl. Je größer die Studie, desto kleiner war die nachgewiesene Differenz im Geburtsgewicht zwischen den Versuchsgruppen. Diese Tendenz konnten wir in unserer eigenen Studie mit sehr großer Tierzahl bestätigen, wobei keine Reduktion, sondern tendenziell sogar eine Erhöhung des mittleren Geburtsgewichts bei den Tieren der Ligaturgruppe vorlag.
6. In den Studien der Metaanalyse, die in ihrer Auswertung ausschließlich wachstumsretardierte Tiere verwendeten, größtenteils durch Selektion anhand des Geburtsgewichts, traten keine erhöhte neonatale Gewichtszunahme und kein 'catch-up growth' bei den Nachkommen von Müttern mit bilateraler Arteria uterina Ligatur auf und in nur einer der 13 Studien wurden Symptome des metabolischen Syndroms bei Nachkommen der Ligaturgruppe im späteren Leben beobachtet.

Zusammenfassend muss geschlussfolgert werden, dass das in der Literatur beschriebene und vielfach verwendete Tiermodell der bilateralen Arteria uterina Ligatur während des letzten Drittels der Gestation kein geeignetes reproduzierbares Modell zur Erzeugung intrauterin wachstumsretardierter Ratten darstellt und damit zur Untersuchung des Einflusses einer intrauterinen Wachstumsrestriktion auf das spätere Risiko für die Entwicklung von Übergewicht, Stoffwechselstörungen und Bluthochdruck im Sinne des 'small baby syndrome' ungeeignet erscheint.

Bei der Entwicklung von Symptomen des metabolischen Syndroms im adulten Alter wird neben einem verringerten Geburtsgewicht vor allem die Bedeutung der frühpostnatalen Gewichtszunahme diskutiert. Kinder mit einer gesteigerten postnatalen Gewichtszunahme weisen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Übergewicht, Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms und für kardiovaskuläre Erkrankungen auf. Basierend auf diesen Beobachtungen führten wir deshalb weitere Untersuchungen an einem genuinen Tiermodell ohne Manipulation der Rattenmütter während der Gestation durch. Grundlage dieses Modells ist die

Beobachtung, dass es bei Ratten als mehrgebärende Tiere allein durch die Lage und die hohe Anzahl an Feten innerhalb eines Uterushorns zu einer intrauterinen Minderdurchblutung bzw. Minderversorgung einzelner Feten kommt. Neugeborene Ratten wurden als 'small for gestational age' (SGA) definiert, wenn ihr Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere des zugehörigen Wurfes lag. Zur Untersuchung des Einflusses einer gesteigerten frühpostnatalen Gewichtszunahme in Bezug auf die Entstehung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms erfolgte die Aufzucht dieser SGA-Tiere vom 3.-21. LT bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen/Nestern mit nur 3 Tieren pro Mutter (SGA-in-KW) im Vergleich zu einer frühpostnatalen Normalernährung in Würfen/Nestern mit 12 Tieren pro Mutter (SGA-in-NW). Als Kontrolltiere dienten zur Geburt normalgewichtige Tiere (AGA - 'appropriate for gestational age'), die in normalen Würfen aufgezogen wurden (AGA-in-NW). Es fanden sich folgende Ergebnisse:

1. SGA-Tiere beider Gruppen waren vom 1.-3. LT signifikant leichter als die Kontrolltiere.
2. Eine Aufzucht der SGA-Tiere in kleinen Würfen (SGA-in-KW) führte zu einer gesteigerten frühpostnatalen Gewichtszunahme, so dass sich die Tiere bereits ab dem 7. LT nicht mehr von den Kontrolltieren (AGA-in-NW) unterschieden.
3. SGA-Tiere, die in normalen Würfen aufgezogen wurden (SGA-in-NW), holten dieses Geburtsgewichtsdefizit erst bis zum 60. LT auf und waren bis zu diesem Zeitpunkt signifikant leichter als die Kontrolltiere (AGA-in-NW).
4. Die weitere Körpergewichtsentwicklung bis zum 360. LT unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.
5. Bei der Bestimmung des systolischen Blutdrucks am 170. LT gab es keine signifikanten Gruppenunterschiede.
6. Adulte, frühpostnatal überernährte SGA-Tiere (SGA-in-KW) wiesen im Glukosetoleranztest am 130. LT einen signifikant erhöhten Glukosewert nach 90 min und bei weiteren Untersuchungen am 360. LT einen signifikant erhöhten basalen Plasmainsulinwert und eine signifikant erhöhte Insulin/Blutglukose Ratio als Zeichen einer Insulinresistenz im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Auch waren die Plasmaleptinwerte als Hinweis auf eine gesteigerte Körperfettmasse bei den frühpostnatal überernährten SGA-Tieren (SGA-in-KW) tendenziell erhöht.
7. Eine weitere Verstärkung der Stoffwechseleränderungen am 360. LT mit signifikanter Erhöhung des Plasmainsulins, der Insulin/Blutglukose Ratio und des Plasmaleptins zeigte sich bei Auswertung derjenigen Tiere, deren Geburtsgewicht unterhalb der Untergrenze

des 99 % Konfidenzintervalls des mittleren Geburtsgewichts gleichgeschlechtlicher Tiere desselben Wurfes lag und die bei einer frühpostnatalen Überernährung in kleinen Würfen aufgezogen wurden (VSGA-in-KW).

8. Dagegen unterschieden sich die Stoffwechselfparameter derjenigen SGA-Tiere, die in normalen Würfen aufgezogen wurden (SGA-in-NW), nicht von denen der Kontrolltiere.

Die in diesem genuinen Tiermodell für das 'small baby syndrome' erhobenen Daten verdeutlichen, dass das alleinige Vorliegen eines verringerten Geburtsgewichts kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms darstellt. Bei neugeborenen Ratten mit einem verminderten Geburtsgewicht (SGA-Tiere) bestand die Tendenz zur Entwicklung von diabetogenen Stoffwechselstörungen im adulten Alter nur dann, wenn die SGA-Tiere einer frühpostnatalen Überernährung ausgesetzt waren und ein rasches Aufholwachstum zeigten. Die Stoffwechselstörungen lagen auch ohne Entwicklung eines erhöhten Körpergewichts im adulten Alter vor, wobei ein erhöhtes Leptin bei diesen Tieren auf eine gesteigerte Körperfettmasse hinwies.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der frühpostnatalen Körpergewichtszunahme eine besondere Bedeutung für das Risiko, Symptome des metabolischen Syndroms auszubilden, zukommt. Dieser sensible frühpostnatale Zeitraum ist vorrangig geprägt durch die Neugeborenen- und Säuglingsernährung. Weitere Untersuchungen zur Klärung der grundlegenden Pathomechanismen des 'small baby syndrome' sind dringend erforderlich, die z.B. durch neue wissenschaftlich basierte Erkenntnisse und Empfehlungen bezüglich der Säuglingsernährung die stetige Zunahme der Prävalenz von Adipositas, Bluthochdruck und Stoffwechselstörungen im Sinne des metabolischen Syndroms künftig mit dem Ziel der primären Prävention reduzieren könnten.

## VI. Literaturverzeichnis

- Aerts L, Van Assche FA. Rat foetal endocrine pancreas in experimental diabetes. *J Endocrinol* 1977;73:339-346.
- Aerts L, Van Assche FA. Is gestational diabetes an acquired condition? *J Dev Physiol* 1979;1:219-225.
- Aerts L, Van Assche FA. Endocrine pancreas in the offspring of rats with experimentally induced diabetes. *J Endocrinol* 1981;88:81-88.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-437.
- Albertsson-Wikland K, Karlberg J. Postnatal growth of children born small for gestational age. *Acta Paediatr Suppl* 1997;423:193-195.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes federation. *Diabet Med* 2006;23:469-480.
- Alexander CM, Landsman PB, Grundy SM. The influence of age and body mass index on the metabolic syndrome and its components. *Diabetes Obes Metab* 2008;10:246-250.
- American Academy of Pediatrics. Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2005;115:496-506.
- Arenz S, Ruckerl R, Koletzko B, von Kries R. Breast-feeding and childhood obesity – a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1247-1256.
- Arias E, MacDorman MF, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics - 2002. *Pediatrics* 2003;112:1215-1230.
- Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: How strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 2004;561:355-377.
- Babický A, Ostádalová I, Parížek J, Kolár J, Bíbr B. Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes. *Physiol bohemoslov* 1973;22:449-456.
- Baird J, Fisher D, Lucas P, Kleijnen J, Roberts H, Law C. Being big or growing fast: Systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ* 2005;331:929-931.
- Bakketeig LS. Current growth standards, definitions, diagnosis and classification of fetal growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:S1-S4.
- Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 1972;97:142-145.
- Barker DJP. The wellcome foundation lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc R Soc Lond B* 1995;262:37-43.
- Barker DJP, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990;301:259-262.

- Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PMS. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36:62-67.
- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-580.
- Barr M, Jensch RP, Brent RL. Prenatal growth in the albino rat: Effects of number, intrauterine position, and resorptions. *Am J Anat* 1970;128:413-428.
- Bassi JA, Rosso P, Moessinger AC, Blanc WA, James LS. Fetal growth retardation due to maternal tobacco smoke exposure in the rat. *Pediatr Res* 1984;18:127-130.
- Battaglia FC, Meschia G. Principal substrates of fetal metabolism. *Physiol Rev* 1978;58:499-527.
- Bavdekar A, Yajnik CS, Fall CHD, et al. Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children. *Diabetes* 1999;48:2422-2429.
- Begg CB, Berlin JA. Publication bias and dissemination of clinical research. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:107-115.
- Bergvall N, Iliadou A, Tuvemo T, Cnattingius S. Birth characteristics and risk of high systolic blood pressure in early adulthood. Socioeconomic factors and familial effects. *Epidemiology* 2005;16:635-640.
- Bernstein PS, Divon MY. Etiologies of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 1997;40:723-729.
- Bertram CE, Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull* 2001;60:103-121.
- Birch EE, Garfield S, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev Med Child Neurol* 2000;42:174-181.
- Birnbaum SC, Kien N, Martucci RW, et al. Nicotine- or epinephrine-induced uteroplacental vasoconstriction and fetal growth in the rat. *Toxicology* 1994;94:69-80.
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10.
- Boloker J, Gertz SJ, Simmons RA. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. *Diabetes* 2002;51:1499-1506.
- Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood. *Diabetes* 2005;54:197-203.
- Brandt I, Sticker EJ, Lentze MJ. Catch-up growth of head circumference of very low birth weight, small for gestational age preterm infants and mental development to adulthood. *J Pediatr* 2003;142:463-468.
- Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine* 2006;29:109-117.
- Bruce NW. The effect on fetal development and utero-placental blood flow of ligating a uterine artery in the rat near term. *Teratology* 1977;16:327-331.
- Bryan SM, Hindmarsh PC. Normal and abnormal fetal growth. *Horm Res* 2006;65:19-27.



- Buelke-Sam J, Holson JF, Nelson CJ. Blood flow during pregnancy in the rat: II. Dynamics of and litter variability in uterine flow. *Teratology* 1982;26:279-288.
- Bunag RD, Teräväinen TL. Tail-cuff detection of systolic hypertension in different strains of ageing rats. *Mech Ageing Dev* 1991;59:197-213.
- Cameron N, Pettifor J, de Wet T, Norris S. The relationship of rapid weight gain in infancy to obesity and skeletal maturity in childhood. *Obes Res* 2003;11:457-460.
- Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: Prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2004;33:351-375.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996a;348:159-161.
- Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996b;45:1455-1462.
- Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the national cholesterol education program adult treatment panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004;53:2087-2094.
- Cederholm J, Wibell L. Evaluation of insulin release and relative peripheral resistance with use of the oral glucose tolerance test: A study in subjects with normoglycaemia, glucose intolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:741-751.
- Cha C-JM, Oh W. Growth and fatty acid metabolism in experimental intrauterine growth retardation: Effect of postnatal nutrition in rat. *J Nutr* 1986;116:1080-1087.
- Cha C-JM, Gelardi NL, Oh W. Growth and cellular composition in rats with intrauterine growth retardation: Effects of postnatal nutrition. *J Nutr* 1987;117:1463-1468.
- Clayton PE, Cianfarani S, Czernichow P, Johannsson G, Rapaport R, Rogol A. Consensus statement: Management of the child born small for gestational age through to adulthood: A consensus statement of the international societies of pediatric endocrinology and the growth hormone research society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:804-810.
- Cleasby ME, Kelly PAT, Walker BR, Seckl JR. Programming of rat muscle and fat metabolism by in utero overexposure to glucocorticoids. *Endocrinology* 2003;144:999-1007.
- Crowther NJ, Cameron N, Trusler J, Gray IP. Association between poor glucose tolerance and rapid post natal weight gain in seven-year-old children. *Diabetologia* 1998;41:1163-1167.
- Crowther NJ, Trusler J, Cameron N, Toman M, Gray IP. Relation between weight gain and beta-cell secretory activity and non-esterified fatty acid production in 7-year-old African children: Results from the birth to ten study. *Diabetologia* 2000;43:978-985.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ. Prevention of cardiovascular disease: Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 1996;94:3246-3250.

- Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. Birth weight, type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes Care* 1999;22:944-950.
- 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;40:115-120.
- Danne T, Reincke M. Prävention und Therapie von Metabolischem Syndrom und Diabetes. *Dtsch Med Wochenschr* 2004;129:1119.
- De Bernabé JV, Soriano T, Albaladejo R, et al. Risk factors for low birth weight: A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;116:3-15.
- De Prins FA, Van Assche FA. Intrauterine growth retardation and development of endocrine pancreas in the experimental rat. *Biol Neonate* 1982;41:16-21.
- De Souza Caldeira Filho J, Moura AS. Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000;108:213-226.
- Després JP, Pascot A, Lemieux I. Risk factors associated with obesity: a metabolic perspective. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000;61:31-38.
- Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin. *Gesunde Ernährung für mein Baby*. Berlin, DGKJ 2006.
- De Zegher F, Ong K, Dunger D, Ibáñez L. Along the path from fetal growth restraint to later diabetes: Fat excess emerges by age 3 yr. *Horm Res* 2005;64:183.
- Dickersin K, Min YI, Meinert CL. Factors influencing publication of research results. Follow-up of applications submitted to two institutional review boards. *JAMA* 1992;267:374-378.
- Dörner G. Die mögliche Bedeutung der prä- und/oder perinatalen Ernährung für die Pathogenese der Obesitas. *Acta biol med germ* 1973;30:K19-K22.
- Dörner G. Environment-dependent brain differentiation and fundamental processes of life. *Acta biol med germ* 1974a;33:129-148.
- Dörner G. Environment dependent brain organization and neuroendocrine, neurovegetative and neuronal behavioral functions. *Prog Brain Res* 1974b;41:221-237.
- Dörner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta biol med germ* 1975a;34:1093-1095.
- Dörner G. Perinatal hormone levels and brain organization. In: Stumpf WE, Grant LD. *Anatomical neuroendocrinology*, Karger, Basel 1975b;1:245-252.
- Dörner G, Mohnike A. Zur Bedeutung der perinatalen Überernährung für die Pathogenese der Fettsucht und des Diabetes mellitus. *Dt Gesundh Wesen* 1977;32:2325-2328.
- Dörner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 1994;26:213-221.
- Dörner G, Mohnike A, Thielke H. Further evidence for the dependence of diabetes prevalence on nutrition in perinatal life. *Exp Clin Endocrinol* 1984;84:129-133.

- Dörner G, Thoelke H, Mohnike A, Schneider H. High food supply in perinatal life appears to favour the development of insulin-treated diabetes mellitus (ITDM) in later life. *Exp Clin Endocrinol* 1985;85:1-6.
- Dowell RT, Kauer CD. Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1997;19:613-625.
- Dubos R, Savage D, Schaedler R. Biological Freudianism. Lasting effects of early environmental influences. *Pediatrics* 1966;38:789-800.
- Dulloo AG. Regulation of fat storage via suppressed thermogenesis: A thrifty phenotype that predisposes individuals with catch-up growth to insulin resistance and obesity. *Horm Res* 2006;65:90-97.
- Dulloo AG, Jacquet J, Montani J-P. Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: Focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat. *Int J Obes* 2002;26:S46-S57.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-1428.
- Egger M, Smith GD. Meta-analysis bias in location and selection of studies. *BMJ* 1998;316:61-66.
- Ekelund U, Ong K, Linné Y, et al. Upward weight percentile crossing in infancy and early childhood independently predicts fat mass in young adults: The Stockholm weight development study (SWEDES). *Am J Clin Nutr* 2006;83:324-330.
- Ekelund U, Ong KK, Linné Y, et al. Association of weight gain in infancy and early childhood with metabolic risk in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:98-103.
- Enzi G, Zanardo V, Caretta F, Inelmen EM, Rubaltelli F. Intrauterine growth and adipose tissue development. *Am J Clin Nutr* 1981;34:1785-1790.
- Eriksson UJ. Lifelong consequences of metabolic adaptations in utero? *Diabetologia* 1996;39:1123-1125.
- Eriksson U, Swenne I. Diabetes in pregnancy: Growth of the fetal pancreatic B cells in the rat. *Biol Neonate* 1982;42:239-48.
- Eriksson JG, Forsén T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJP. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: Longitudinal study. *BMJ* 1999;318:427-431.
- Eriksson M, Wallander M-A, Krakau I, Wedel H, Svärdsudd K. Birth weight and cardiovascular risk factors in a cohort followed until 80 years of age: The study of men born in 1913. *J Intern Med* 2004;255:236-246.
- Evans MI, Mukherjee AB, Schulman JD. Animal models of intrauterine growth retardation. *Obstet Gynecol Surv* 1983;38:183-192.
- Even MD, Laughlin MH, Krause GF, vom Saal FS. Differences in blood flow to uterine segments and placentae in relation to sex, intrauterine location and side in pregnant rats. *J Reprod Fertil* 1994;102:245-252.
- Fagerberg B, Bondjers L, Nilsson P. Low birth weight in combination with catch-up growth predicts the occurrence of the metabolic syndrome in men at late middle age: The atherosclerosis and insulin resistance study. *J Int Med* 2004;256:254-259.
- Fewtrell MS, Doherty C, Cole TJ, Stafford M, Hales CN, Lucas A. Effects of size at birth, gestational age and early growth in preterm infants on glucose and insulin concentrations at 9-12 years. *Diabetologia* 2000;43:714-717.

- Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol* 1991;260:R1104-R1113.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. Findings from the third national health and nutrition examination survey. *JAMA* 2002;287:356-359.
- Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 2004;27:2444-2449.
- Forsén T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJP. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: Longitudinal study. *BMJ* 1999;319:1403-1407.
- Forsén T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2000;133:176-182.
- Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28:2077-2080.
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 2005;81:723-734.
- Franke K, Harder T, Aerts L, et al. 'Programming' of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. *Brain Res* 2005;1031:276-283.
- Freinkel N. Of pregnancy and progeny. Banting lecture 1980. *Diabetes* 1980;29:1023-1035.
- Freinkel N, Metzger BE. Pregnancy as a tissue culture experience: The critical implications of maternal metabolism for fetal development. In: *Pregnancy metabolism, diabetes, and the fetus*. Ciba Foundation Symposium 63. Amsterdam, Excerpta Medica 1979:3-23.
- Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:99-107.
- Gale CR, Ashurst HE, Hall NF, MacCallum PK, Martyn CN. Size at birth and carotid atherosclerosis in later life. *Atherosclerosis* 2002;163:141-147.
- Garofano A, Czernichow P, Bréant B. Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 1999;42:711-718.
- Ghidini A. Idiopathic fetal growth restriction: A pathophysiologic approach. *Obstet Gynecol Surv* 1996;51:376-382.
- Gillman MW, Rifas-Shiman SL, Camargo CA, et al. Risk of overweight among adolescents who were breastfed as infants. *JAMA* 2001;285:2461-2467.
- Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:183-187.
- Gluckman PD, Hanson MA. The consequences of being born small – an adaptive perspective. *Horm Res* 2006;65:5-14.
- Gluckman PD, Hanson MA, Morton SMB, Pinal CS. Life-long echoes – a critical analysis of the developmental origins of adult disease model. *Biol Neonate* 2005;87:127-139.
- Goodner CJ, Thompson DJ. Glucose metabolism in the fetus in utero: The effect of maternal fasting and glucose loading in the rat. *Pediatr Res* 1967;1:443-451.

- Gortner L. Intrauterine growth restriction and risk for arterial hypertension: a causal relationship? *J Perinat Med* 2007;35:361-365.
- Greiner W, Krummacker S, Graf von der Schulenburg JM, Bestehorn K. Krankheitskostenanalyse eines neu aufgetretenen Diabetes mellitus Typ 2. *Diabetologie* 2006;1:237-244.
- Grummer-Strawn LM, Mei Z. Does breastfeeding protect against pediatric overweight? Analysis of longitudinal data from the centers for disease control and prevention pediatric nutrition surveillance system. *Pediatrics* 2004;113:e81-e86.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. *Circulation* 2005;112:2735-2752.
- Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
- Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
- Hales CN, Barker DJP, Clark PMS, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-1022.
- Hanefeld M, Leonhardt W. Das metabolische Syndrom. *Dtsch Gesundheitsw* 1981;36:545-551.
- Harder T, Plagemann A. Infant weight gain and later blood pressure. *Circulation* 2002;106:e58.
- Harder T, Aerts L, Franke K, Van Bree R, Van Assche FA, Plagemann A. Pancreatic islet transplantation in diabetic pregnant rats prevents acquired malformation of the ventromedial hypothalamic nucleus in their offspring. *Neurosci Lett* 2001;299:85-88.
- Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G, Plagemann A. Duration of breast-feeding and risk of overweight: A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005;162:397-403.
- Harder T, Franke K, Fahrenkrog S, et al. Prevention by maternal pancreatic islet transplantation of hypothalamic malformation in offspring of diabetic mother rats is already detectable at weaning. *Neurosci Lett* 2003;352:163-166.
- Harder Th, Schellong K, Rodekamp E, Dudenhausen JW, Plagemann A. Perinatale Programmierung. *Adipositas* 2007a;1:5-11.
- Harder T, Schellong K, Stupin J, Dudenhausen JW, Plagemann A. Where is the evidence that low birth weight leads to obesity? *Lancet* 2007b;369:1859.
- Hediger ML, Overpeck MD, Maurer KR, Kuczumarski RJ, McGlynn A, Davis WW. Growth in infants and young children born small or large for gestational age. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998;152:1225-1231.
- Hediger ML, Overpeck MD, McGlynn A, Kuczumarski RJ, Maurer KR, Davis WW. Growth and fatness at three to six years of age of children born small- or large-for-gestational age. *Pediatrics* 1999;104:e33.
- Heinig MJ, Nommsen LA, Peerson JM, Lonnerdal B, Dewey KG. Energy and protein intakes of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life and their association with growth velocity: The DARLING Study. *Am J Clin Nutr* 1993;58:152-161.

- Hellerström C, Swenne I. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1991;40:89-93.
- Hensleigh PA, Johnson DC. Heat stress effects during pregnancy. I. Retardation of fetal rat growth. *Fertil Steril* 1971;22:522-527.
- Higgins JPT, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Statist Med* 2002;21:1539-1558.
- Hofman PL, Regan F, Jackson WE, Jefferies C, Knight DB, Robinson EM, Cutfield WS. Premature birth and later insulin resistance. *N Engl J Med* 2004;351:2179-2186.
- Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth and long-term consequences in animal models of growth retardation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;81:149-156.
- Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:392-399.
- Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De Clerck F, Poston L, Van Assche FA. Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr* 1999;81:73-79.
- Houdijk ECAM, Engelbregt MJT, Popp-Snijders C, Delemarre-vd Waal HA. Endocrine regulation and extended follow up of longitudinal growth in intrauterine growth-retarded rats. *J Endocrinol* 2000;166:599-608.
- Hoyert DL, Mathews TJ, Menacker F, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics: 2004. *Pediatrics* 2006;117:168-183.
- Huizinga CT, Engelbregt MJT, Rekers-Mombarg LTM, Vaessen SFC, Delemarre-van de Waal HA, Fodor M. Ligation of the uterine artery and early postnatal food restriction – animal models for growth retardation. *Horm Res* 2004;62:233-240.
- Huxley R, Neil A, Collins R. Unravelling the fetal origins hypothesis: Is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure. *Lancet* 2002;360:659-665.
- Huxley R, Owen CG, Whincup PH, Cook DG, Colman S, Collins R. Birth weight and subsequent cholesterol levels. Exploration of the “Fetal Origins” hypothesis. *JAMA* 2004;292:2755-2764.
- Hyppönen E, Power C, Smith GD. Prenatal growth, BMI, and risk of type 2 diabetes by early midlife. *Diabetes Care* 2003;26:2512-2517.
- Ibáñez L, Ong K, Dunger DB, De Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2153-2158.
- Ip S, Chung M, Raman G, et al. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess* 2007;153:1-186
- Jansson T, Lambert GW. 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.
- Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, Collin D, Czernichow P, Lévy-Marchal C. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia* 2005;48:849-855.

- Jarvis S, Glinianaia SV, Torrioli MG, et al. Cerebral palsy and intrauterine growth in single births: European collaborative study. *Lancet* 2003;362:1106-1111.
- Kajantie E, Osmond C, Barker DJP, Forsén T, Phillips DIW, Eriksson JG. Size at birth as a predictor of mortality in adulthood: A follow-up of 350 000 person-years. *Int J Epidemiol* 2005;34:655-663.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999;20:68-100.
- Karaolis-Danckert N, Buyken AE, Bolzenius K, Perim de Faria C, Lentze MJ, Kroke A. Rapid growth among term children whose birth weight was appropriate for gestational age has a longer lasting effect on body fat percentage than on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1449-1455.
- Karlberg J, Albertsson-Wikland K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: From birth to final height. *Pediatr Res* 1995;38:733-739.
- Khan IY, Dekou V, Douglas G, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R127-R133.
- King H, Roglic G. Diabetes and the “thrifty genotype”: Commentary. *Bull World Health Organ* 1999;77:692-693.
- King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care* 1998;21:1414-1431.
- Kollée LAA, Monnens LAH, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Janssen AJM. Experimental intrauterine growth retardation in the rat. Evaluation of the Wigglesworth model. *Early Hum Dev* 1979;3:295-300.
- Kramer MS. Do breast-feeding and delayed introduction of solid foods protect against subsequent obesity? *J Pediatr* 1981;98:883-887.
- Kramer MS, Guo T, Platt RW, et al. Feeding effects on growth during infancy. *J Pediatr* 2004;145:600-605.
- Kromeyer K. Growth in body height by children between 4 and 12 years of age – results of the Jena longitudinal study. *Anthropol Anz* 1994;52:327-340.
- Kurth B-M, Schaffrath R. Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Ergebnisse des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS). *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 2007;50:736-743.
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry* 2004;55:367-375.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288:2709-2716.
- Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci* 1994;86:217-222.
- Langley-Evans SC, Sculley DV. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. *FEBS Lett* 2006;580:4150-4153.
- Lapillonne A, Braillon P, Claris O, Chatelain PG, Delmas PD, Salle BL. Body composition in appropriate and in small for gestational age infants. *Acta Paediatr* 1997;86:196-200.

- Larsson H, Elmstahl S, Ahren B. Plasma leptin levels correlate to islet function independently of body fat in postmenopausal women. *Diabetes* 1996;45:1580-1584.
- Latal-Hajnal B, von Siebenthal K, Kovari H, Bucher HU, Largo RH. Postnatal growth in VLBW infants: Significant association with neurodevelopmental outcome. *J Pediatr* 2003;143:163-170.
- Lawlor DA, Riddoch CJ, Page AS, et al. Infant feeding and components of the metabolic syndrome: Findings from the European Youth Heart Study. *Arch Dis Child* 2005a;90:582-588.
- Lawlor DA, Ronalds G, Clark H, Smith GD, Leon DA. Birth weight is inversely associated with incident coronary heart disease and stroke among individuals born in the 1950s. Findings from the Aberdeen Children of the 1950s Prospective Cohort Study. *Circulation* 2005b;112:1414-1418.
- Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega ACS, Czernichow P. International small for gestational age advisory board consensus development conference statement: Management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 2003;111:1253-1261.
- Legido A, Sarria A, Bueno M, Garagorri J, Fleta J, Abos D, Gonzalez JP. Relationship of body fat distribution to metabolic complications in obese prepubertal girls. *Clin Pediatr* 1987;26:310-315.
- Leichter J. Decreased birth weight and attainment of postnatal catch-up growth in offspring of rats exposed to cigarette smoke during gestation. *Growth Dev Aging* 1995;59:63-66.
- Leon DA, Lithell HO, Vagerö D, et al. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: Cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ* 1998;317:241-245.
- Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol* 2004;181:291-296.
- Leyk D, Rütger T, Wunderlich M, et al. Sportaktivität, Übergewichtsprävalenz und Risikofaktoren. *Dtsch Arztebl* 2008;105:793-800.
- Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ* 1996;312:406-410.
- Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 2000;12:5-12.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: *The childhood environment and adult disease*. Ciba Foundation Symposium 156. Wiley, Chichester, 1991:38-55.
- Lucas A. Programming by early nutrition: An experimental approach. *J Nutr* 1998;128:401S-406S.
- Lucas A, Boyes S, Bloom SR, Aynsley-Green A. Metabolic and endocrine responses to a milk feed in six-day-old term infants: Differences between breast and cow's milk formula feeding. *Acta Paediatr Scand* 1981;70:195-200.
- Lundgren EM, Cnattingius S, Jonsson B., Tuvemo T. Intellectual and psychological performance in males born small for gestational age with and without catch-up growth. *Pediatr Res* 2001;50:91-96.
- Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005;97:S68-S77.



- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995;1:1155-1161.
- Malik S, Wong ND, Franklin SS, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004;110:1245-1250.
- Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney Int* 2000;58:770-773.
- Manniello RL, Adams AJ, Farrell PM. The influence of antenatal corticosteroids on hypoglycemia in newborn rats with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1977;11:840-844.
- Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Munson ML. Births: Final Data for 2002. *Natl Vital Stat Rep* 2003;52:1-113.
- Martin RM, Ness AR, Gunnell D, Emmett P, Smith GD. Does breast-feeding in infancy lower blood pressure in childhood? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Circulation* 2004;109:1259-1266.
- Martyn CN, Gale CR, Jespersen S, Sherriff SB. Impaired fetal growth and atherosclerosis of carotid and peripheral arteries. *Lancet* 1998;352:173-178.
- Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Häring H-U. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 2000;21:585-618.
- McCance DR, Pettitt DJ, Hanson RL, Jacobsson LTH, Knowler WC, Bennett PH. Birth weight and non-insulin dependent diabetes: Thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ* 1994;308:942-945.
- McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med* 1999;340:1234-1238.
- McLaren A, Michie D. Control of pre-natal growth in mammals. *Nature* 1960;187:363-365.
- McMillen C, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: Prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005;85:571-633.
- Meaney MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1161-1192.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implication for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 1996;18:49-72.
- Mensink GBM, Lampert T, Bergmann E. Übergewicht und Adipositas in Deutschland 1984-2003. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 2005;48:1348-1356.
- Moher D, Tsertsvadze A, Tricco AC, et al. A systematic review identified few methods and strategies describing when and how to update systematic reviews. *J Clin Epidemiol* 2007;60:1095-1104.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003;289:76-79.

- Morley R, Fewtrell MS, Abbott RA, Stephenson T, MacFadyen U, Lucas A. Neurodevelopment in children born small for gestational age: A randomized trial of nutrient-enriched versus standard formula and comparison with a reference breastfed group. *Pediatrics* 2004;113:515-521.
- Moura AS, De Souza Caldeira Filho J, De Freitas Mathias PC, De Sa CCMF. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Comm Mol Pathol Pharmacol* 1997;96:179-192.
- Muaku SM, Beauloye V, Thissen JP, et al. Long-term effects of gestational protein malnutrition on postnatal growth, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins in rat progeny. *Pediatr Res* 1996;39:649-655.
- Nationale Stillkommission. Empfehlungen zur Stilldauer. Nationale Stillkommission am BFR 2004, [www.bfr.bund.de/cm/207/empfehlungen\\_zur\\_stilldauer.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/207/empfehlungen_zur_stilldauer.pdf).
- Neel JV. Diabetes mellitus: A “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am J Hum Genet* 1962;14:353-362.
- Neel JV. The “Thrifty Genotype” in 1998. *Nutr Rev* 1999;57:S2-S9.
- Nilsson PM, Östergren P-O, Nyberg P, Söderström M, Allebeck P. Low birth weight is associated with elevated systolic blood pressure in adolescence: A prospective study of a birth cohort of 149 378 Swedish boys. *J Hypertens* 1997;15:1627-1631.
- Nüsken K-D, Dötsch J, Rauh M, Rascher W, Schneider H. Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: Impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology* 2008;149:1056-1063.
- Nüsken K-D, Warnecke C, Hilgers KF, Schneider H. Intrauterine growth after uterine artery ligation in rats: Dependence on the fetal position in the uterine horn and need for prenatal marking of the animals. *J Hypertens* 2007;25:247-248.
- Nurjhan N, Consoli A, Gerich J. Increased lipolysis and its consequences on gluconeogenesis in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;89:169-175.
- Ogata ES, Finley SL. Selective ligation of uterine artery branches accelerates fetal growth in the rat. *Pediatr Res* 1988;24:384-390.
- Ogata ES, Bussey ME, LaBarbera A, Finley S. Altered growth, hypoglycemia, hypoalaninemia, and ketonemia in the young rat: Postnatal consequences of intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1985;19:32-37.
- Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA* 2002;288:1728-1732.
- Ong KK. Size at birth, postnatal growth and risk of obesity. *Horm Res* 2006;65:65-69.
- Ong KK, Dunger DB. Birth weight, infant growth and insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 2004;151:U131-U139.
- Ong KK, Loos RJF. Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: Systematic reviews and hopeful suggestions. *Acta Paediatr* 2006;95:904-908.
- Ong KKL, Ahmed ML, Emmett PM, Preece MA, Dunger DB. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: Prospective cohort study. *BMJ* 2000;320:967-971.

- Ong KKL, Preece MA, Emmett PM, Ahmed ML, Dunger DB. Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: Longitudinal birth cohort study and analysis. *Pediatr Res* 2002;52:863-867.
- O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E863-E870.
- Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: A quantitative review of published evidence. *Pediatrics* 2005a;115:1367-1377.
- Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Gillman MW, Cook DG. The effect of breast-feeding on mean body mass index throughout life: A quantitative review of published and unpublished observational evidence. *Am J Clin Nutr* 2005b;82:1298-1307.
- Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: Catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004;427:411-412.
- Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA. Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* 2005;48:547-552.
- Ozanne SE, Wang CL, Dorling MW, Petry CJ. Dissection of the metabolic actions of insulin in adipocytes from early growth-retarded male rats. *J Endocrinol* 1999;162:313-319.
- Pallotto EK, Kilbride HW. Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49:257-269.
- Père MC. Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: Comparison between species. *Reprod Nutr Dev* 2003;43:1-15.
- Petersen S, Gotfredsen A, Knudsen FU. Lean body mass in small for gestational age and appropriate for gestational age infants. *J Pediatr* 1988;113:886-889.
- Peterside IE, Selak MA, Simmons RA. Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria in growth-retarded rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1258-E1266.
- Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN. Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clin Sci* 1997;93:147-152.
- Phillips DIW. Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. *Diabetologia* 1996;39:1119-1122.
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Develop Biol* 1972;29:436-467.
- Plagemann A. Fetale Programmierung und funktionelle Teratologie: Ausgewählte Mechanismen und Konsequenzen. In: Gortner L, Dudenhausen JW. Vorgeburtliches Wachstum und gesundheitliches Schicksal: Störungen – Risiken – Konsequenzen. Medizinische Verlagsgesellschaft Umwelt und Medizin Frankfurt/Main 2001:65-78.
- Plagemann A. 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': On epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *J Perinat Med* 2004;32:297-305.

- Plagemann A. Fetale Programmierung und Funktionelle Teratologie. In: Ganten D, Ruckpaul K, Wauer R. Molekulare Medizin Bd. 14: Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 2005a:325-344.
- Plagemann A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. *Physiol Behav* 2005b;86:661-668.
- Plagemann A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res* 2006;65:83-89.
- Plagemann A, Harder T. The changing face and implications of childhood obesity. *N Engl J Med* 2004;350:2414-2416.
- Plagemann A, Harder T. Breast feeding and the risk of obesity and related metabolic diseases in the child. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 2005a;3:222-232.
- Plagemann A, Harder T. Premature birth and insulin resistance. *N Engl J Med* 2005b;352:939-940.
- Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dörner G. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:451-456.
- Plagemann A, Harder T, Melchior K, Rake A, Rohde W, Dörner G. Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats. *Neuroreport* 1999a;10:3211-3216.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *Neuroreport* 1998;9:4069-4073.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain Res* 1999b;818:160-163.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res* 1999c;836:146-155.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol* 1999d;11:541-546.
- Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. Lifelong enhanced diabetes susceptibility and obesity after temporary intrahypothalamic hyperinsulinism during brain organization. *Exp Clin Endocrinol* 1992a;99:91-95.
- Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol* 1992b;99:154-158.
- Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18:195-200.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA. Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:968-976.
- Pollak A, Susa JB, Stonestreet BS, Schwartz R, Oh W. Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in experimental intrauterine growth retardation in rats. *Pediatr Res* 1979;13:175-177.

- Poore KR, Fowden AL. Insulin sensitivity in juvenile and adult large white pigs of low and high birthweight. *Diabetologia*. 2004;47:340-348.
- Porte D, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW. Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 1998;41:863-881.
- Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, Bracken MB, Roberts I. Where is the evidence that animal research benefits humans? *BMJ* 2004;328:514-517.
- Premji SS, Fenton TR, Sauve RS. Higher versus lower protein intake in formula-fed low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;1:CD003959.
- Ramadhani MK, Grobbee DE, Bots ML, et al. Lower birth weight predicts metabolic syndrome in young adults: The Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA)-study. *Atherosclerosis* 2006;184:21-27.
- Rao MR, Hediger ML, Levine RJ, Naficy AB, Vik T. Effect of breastfeeding on cognitive development of infants born small for gestational age. *Acta Paediatr* 2002;91:267-274.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 1976;295:349-353.
- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.
- Resnick HE, Jones K, Ruotolo G, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease in nondiabetic American Indians. *Diabetes Care* 2003;26:861-867.
- Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 2002;99:490-496.
- Rettwitz-Volk W. Indices of birthweight-specific perinatal mortality in Germany from 1985 to 1999. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002;16:383-385.
- Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann Intern Med* 1999;130:278-284.
- Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ* 1997;315:396-400.
- Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Breastfeeding during infancy and the risk of cardiovascular disease in adulthood. *Epidemiology* 2004;15:550-556.
- Riley V. Adaptation of orbital bleeding technic to rapid serial blood studies. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960;104:751-754.
- Robson JRK, Larkin FA, Bursick JH, Perri KP. Growth standards for infants and children: A cross-sectional study. *Pediatrics* 1975;56:1014-1020.
- Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 1998;47:699-713.
- Sadiq HF, DeMello DE, Devaskar SU. The effect of intrauterine growth restriction upon fetal and postnatal hepatic glucose transporter and glucokinase proteins. *Pediatr Res* 1998;43:91-100.
- Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: Short stature and beyond. *Endocr Rev* 2007;28:219-251.

- Sanders M, Fazzi G, Janssen G, Blanco C, De Mey J. Prenatal stress changes rat arterial adrenergic reactivity in a regionally selective manner. *Eur J Pharmacol* 2004;488:147-155.
- Scaglioni S, Agostoni C, Notaris RD, et al. Early macronutrient intake and overweight at five years of age. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:777-781.
- Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann NY Acad Sci* 2004;1032:63-84.
- Sharma AM. The thrifty-genotype hypothesis and its implications for the study of complex genetic disorders in man. *J Mol Med* 1998;76:568-571.
- Shaul PW, Cha CJM, Oh W. Neonatal sympathoadrenal response to acute hypoxia: Impairment after experimental intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1989;25:466-472.
- Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 2001;50:2279-2286.
- Singhal A. Early nutrition and long-term cardiovascular health. *Nutr Rev* 2006;64:S44-S49.
- Slykerman RF, Thompson JMD, Becroft DMO, et al. Breastfeeding and intelligence of preschool children. *Acta Paediatr* 2005;94:832-837.
- Soto N, Bazaes RA, Pena V, et al. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: Results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3645-3650.
- Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans. *JAMA* 1978;240:1607-1610.
- Stein CE, Fall CHD, Kumaran K, Osmond C, Cox V, Barker DJP. Fetal growth and coronary heart disease in South India. *Lancet* 1996;348:1269-1273.
- Sterne JAC, Egger M. Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: Guidelines on choice of axis. *J Clin Epidemiol* 2001;54:1046-1055.
- Sterne JAC, Egger M, Smith GD. Investigating and dealing with publication and other biases in meta-analysis. *BMJ* 2001;323:101-105.
- Stettler N, Kumanyika SK, Katz SH, Zemel BS, Stallings VA. Rapid weight gain during infancy and obesity in young adulthood in a cohort of African Americans. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1374-1378.
- Stettler N, Zemel BS, Kumanyika S, Stallings VA. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. *Pediatrics* 2002;109:194-199.
- Styrud J, Eriksson UJ, Grill V, Swenne I. Experimental intrauterine growth retardation in the rat causes a reduction of pancreatic B-cell mass, which persists into adulthood. *Biol Neonate* 2005;88:122-128.
- Swaab DF, Boer GJ, Feenstra MGP. Concept of functional neuroteratology and the importance of neurochemistry. *Prog Brain Res* 1988;73:3-13.
- Tanis BC, Kapiteijn K, Hage RM, Rosendaal FR, Helmerhorst FM. Dutch women with a low birth weight have an increased risk of myocardial infarction later in life: A case control study. *Reprod Health* 2005;2:1.

- Tapanainen PJ, Bang P, Wilson K, Unterman TG, Vreman HJ, Rosenfeld RG. Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: Effects on insulin-like growth factors and their binding proteins. *Pediatr Res* 1994;36:152-158.
- Tappy L. Adiposity in children born small for gestational age. *Int J Obes* 2006;30:S36-S40.
- Tian JY, Cheng Q, Song XM, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults. *Eur J Endocrinol* 2006;155:601-607.
- Tu YK, West R, Ellison GTH, Gilthorpe MS. Why evidence for the fetal origins of adult disease might be a statistical artefact: The “reversal paradox” for the relation between birth weight and blood pressure in later life. *Am J Epidemiol* 2005;161:27-32.
- Vaag A, Jensen CB, Poulsen P, et al. Metabolic aspects of insulin resistance in individuals born small for gestational age. *Horm Res* 2006;65:137-143.
- Van Assche FA, De Prins F, Aerts L, Verjans M. The endocrine pancreas in small-for-dates infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1977;84:751-753.
- Van Marthens E, Zamenhof S. Deoxyribonucleic acid of neonatal rat cerebrum increased by operative restriction of litter size. *Exp Neurol* 1969;23:214-219.
- Victora CG, Barros FC, Horta BL, Martorell R. Short-term benefits of catch-up growth for small-for-gestational-age infants. *Int J Epidemiol* 2001;30:1325-1330.
- Vos LE, Oren A, Bots ML, Gorissen WHM, Grobbee DE, Uiterwaal CSPM. Birth size and coronary heart disease risk score in young adulthood. The Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) study. *Eur J Epidemiol* 2006;21:33-38.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
- Ward WF, Karp CH, Aceto H. Developmental effects of the uterine environment: Dependence on fetal sex in rats. *J Reprod Fert* 1977;50:269-274.
- Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;69:179-197.
- Weaver LT. Rapid growth in infancy: Balancing the interests of the child. *JPGN* 2006;43:428-432.
- WHO multicentre growth reference study group. WHO child growth standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr* 2006;450:76-85.
- WHO, UNICEF. Global Strategy for infant and young child feeding. WHO, 2003, [www.who.int/nutrition/publications/growth\\_infant\\_feeding\\_text\\_eng.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/growth_infant_feeding_text_eng.pdf)
- Wigglesworth JS. Experimental growth retardation in the foetal rat. *J Pathol Bacteriol* 1964;88:1-13.
- Wilson MR, Hughes SJ. The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J Endocrinol* 1997;154:177-185.
- Wit J-M, Boersma B. Catch-up growth: Definition, mechanisms, and models. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15:1229-1241.

- Witschi H, Lundgaard SM, Rajini P, Hendrickx AG, Last JA. Effects of exposure to nicotine and to sidestream smoke on pregnancy outcome in rats. *Toxicol Lett* 1994;71:279-286.
- Woods LL, Weeks DA. Naturally occurring intrauterine growth retardation and adult blood pressure in rats. *Pediatr Res* 2004;56:763-767.
- Wrutniak C, Cabello G. Changes in the concentration of thyroxine in the plasma of rat fetuses during late gestation: Influence of ligation of the maternal uterine vein and artery. *J Endocrinol* 1983;99:233-238.
- Wyatt SG, Winters KP, Dubbert PM. Overweight and obesity: Prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am J Med Sci* 2006;331:166-174.
- Yeung MY. Postnatal growth, neurodevelopment and altered adiposity after preterm birth – from a clinical nutrition perspective. *Acta Paediatr* 2006;95:909-917.
- Zamenhof S, Van Marthens E. Litter size, maternal parameters, and brain and body parameters of neonatal rats. *Biol Neonate* 1984;45:296-298.



## **Lebenslauf**

**Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

Caputh, 22.06.2009

Uta Neitzke

## Publikationen, die Bestandteile der vorliegenden Dissertation enthalten

### Originalarbeiten

Neitzke U, Harder T, Schellong K, et al. Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: A critical appraisal of the experimental evidence. *Placenta* 2008;29:246-254.

### Zitierfähige Kongressbeiträge

Harder T, Neitzke U, Schellong K, et al. The small baby syndrome hypothesis revised: Animal studies and a meta-analysis. *Early Hum Dev* 2006;82:560.

Harder T, Neitzke U, Schellong K, et al. Development of adipogenic, diabetogenic, and cardiovascular alterations in a genuine animal model of the “small-baby-syndrome”. *Early Hum Dev* 2007;83:S136.

Neitzke U, Harder T, Melchior K, Ziska T, Dudenhausen JW, Plagemann A. Die Arteria uterina-Ligatur als Modell für pränatale Programmierung von Typ-2-Diabetes bei intrauterin wachstumsretardierten Ratten: Tierexperiment und Metaanalyse. *Z Geburtsh Neonatol* 2005;209:S84.

Neitzke U, Schellong K, Stupin J, et al. Entwicklung von adipogenen, diabetogenen und kardiovaskulären Alterationen in einem genuinen Tiermodell für das ‘small baby syndrome’. *Geburtsh Frauenheilk* 2006;67:S19.

Neitzke U, Schellong K, Stupin J, et al. Entwicklung von adipogenen, diabetogenen und kardiovaskulären Alterationen in einem genuinen Tiermodell für das ‘small baby syndrome’. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2007;2:S19-S20.

Neitzke U, Schellong K, Stupin J, et al. Entwicklung von adipogenen, diabetogenen und kardiovaskulären Alterationen in einem genuinen Tiermodell für das small baby syndrome. *Z Geburtsh Neonatol* 2007;211:S36-S37.

### Übersichtsarbeiten, Proceedings

Harder T, Neitzke U, Melchior K, et al. The fetal origins hypothesis revised: Animal studies and a meta-analysis. In: Zabransky S: SGA-Syndrom. Risiken für das cardio-pulmo-reno-vasculäre System. Conte Verlag, Saarbrücken 2006:26-32.

### Kritiken

Faculty of 1000 Biology: Evaluations for Neitzke U et al *Placenta* 2008 Jan 18: <http://www.f1000biology.com/article/id/1099200/evaluation>

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Experimentelle Untersuchungen zur Ätiopathogenese des 'small baby syndrome' an zwei Tiermodellen der Ratte“ von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde. Die Arbeit stellt keine Kopie, auch nicht in Teilen, anderer Arbeiten dar. Sämtliche benutzte Hilfsmittel und die Literatur sind vollständig angegeben.

Caputh, 22.06.2009

Uta Neitzke