

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. med. N. Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Fetale Cholesterolsynthesemetabolite bei der Intrauterinen Wachstumsrestriktion

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Verena Kopsicker

aus Haltern am See

Kiel 2022

1. Berichterstatter Prof. Dr. med. Ulrich Pecks, Klinik für Gynäkologie
und Geburtshilfe

2. Berichterstatter Prof. Dr. Edmund Maser, Institut für Toxikologie und
Pharmakologie für Naturwissenschaftler

Tag der mündlichen Prüfung 15.11.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.07.2023

gez.: Priv.-Doz. Dr. André Farrokh
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Intrauterine Wachstumsrestriktion.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Klassifikation.....	2
1.1.3 Ätiologie.....	3
1.1.4 Diagnostik.....	5
1.1.5 Management.....	8
1.1.6 Prophylaxe.....	11
1.1.7 Prognose.....	11
1.2 Cholesterol.....	12
1.2.1 Cholesterolsynthese.....	12
1.2.2 Bedeutung von Cholesterol in der Schwangerschaft.....	16
1.3 Fragestellung und Hypothese.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Probandenkollektiv.....	20
2.2 Probengewinnung.....	22
2.3 Probenaufbereitung.....	22
2.4 Probenanalyse.....	23
2.5 Statistik.....	24
3. Ergebnisse.....	26
4. Diskussion.....	41
4.1 Diskussion der Methodik.....	41
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	54
4.3 Einschränkungen der Studie.....	58
4.4 Ausblick.....	58
5. Zusammenfassung.....	60
6. Literaturverzeichnis.....	62
7. Anhang.....	71

7.1 Aufklärung der Probandinnen.....	71
7.2 Ethikvotum.....	77
7.3 Publikationen.....	83
7.4 Eigenständigkeits-Erklärung.....	93
7.5 Datenaufbewahrungs-Erklärung.....	93
7.4 Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

A./ Aa.	Arteria/Arteriae
AFI	Amniotic fluid index, Fruchtwasserindex
AU	Abdominalumfang
AEDF	Absent enddiastolic blood flow
ARED-flow	Absent or reversed enddiastolic blood flow
BPD	Biparietaler Diameter
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CI	Confidence interval, Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPR	Zerebroplazentare Ratio
CTG	Kardiotokographie
CTRL	Kontroll
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DM	Diabetes mellitus
eV	Elektronenvolt
FL	Femurlänge
g	Gramm
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HDL	High Density Lipoprotein
HPL	Humanes Plazentalaktogen
IUGR	Intrauterine growth restriction, Intrauterine Wachstumsrestriktion
kg	Kilogramm
kg/m ²	Kilogramm/Quadratmeter
KU	Kopfumfang

KU/AU	Kopf-zu-Bauchumfang-Ratio
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
M	männlich
m	Meter
mg	Milligramm
mg/dL	Milligramm/Deziliter
mL	Milliliter
mL/min	Milliliter/Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
n	Number, Anzahl
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NPC1	Niemann-Pick C1
P	Perzentile
p	Korrelationskoeffizient rho
PI	Pulsatilitätsindex
p.m.	post menstruationem
RDS	Respiratory distress syndrome, Atemnotsyndrom
REDF	Reversed enddiastolic blood flow
RI	Resistenzindex
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
SGA	Small for gestational age
SIM	Selektives Ionenmonitoring
SR-BI	Scavenger-receptor class I
SSW	Schwangerschaftswoche
TC	Total cholesterol, Gesamtcholesterol
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
V.	Vena
V.a.	Verdacht auf
vs.	versus
W	weiblich
Z.n.	Zustand nach

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Algorithmus zum pränatalen Management der Intrauterinen Wachstumsrestriktion	9
Abbildung 2: Strukturformel von Cholesterol	12
Abbildung 3: Cholesterolsynthese über den Mevalonsäure-, Bloch- und Kandutsch-Russell-Pathway.....	15
Abbildung 4: Extraktion von Cholesterol und Cholesterolsynthesemetaboliten aus den Serumaliquots.....	24
Abbildung 5: Konzentration der fetalen Sterole im Gruppenvergleich	29
Abbildung 6: Konzentration der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol im Gruppenvergleich	30
Abbildung 7: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole nach Geschlecht	32
Abbildung 8: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol nach Geschlecht	33
Abbildung 9: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole nach Schwangerschaftswoche bei Entbindung.....	35
Abbildung 10: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol nach Schwangerschaftswoche bei Entbindung.....	36
Abbildung 11: Residualanalyse für den maternalen Rauchstatus der fetalen Sterole im Gruppenvergleich	37
Abbildung 12: Residualanalyse für bekannte Konfounder der fetalen Sterole im Gruppenvergleich	38
Abbildung 13: Konzentration der fetalen Sterole im Schwangerschaftsverlauf im Gruppenvergleich	39
Abbildung 14: Konzentration der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol im Schwangerschaftsverlauf im Gruppenvergleich.....	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Maternale, plazentare und fetale Risikofaktoren für eine Intrauterine Wachstumsrestriktion	4
Tabelle 2: Beurteilbarkeit hämodynamischer Kompartimente mittels Dopplersonographie	7
Tabelle 3: Klinische und laborchemische Parameter der CTRL- und IUGR-Gruppe	27
Tabelle 4: Gegenüberstellung der Definitionskriterien für eine Intrauterine Wachstumsrestriktion in der vorliegenden Arbeit und in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe.....	50

1. Einleitung

1.1 Intrauterine Wachstumsrestriktion

Die Intrauterine Wachstumsrestriktion (Intrauterine growth restriction, IUGR) verkompliziert bis zu 8 % aller Schwangerschaften und stellt damit ein häufiges geburtshilfliches Krankheitsbild dar (Mandrizzato *et al.*, 2008), welches mit einer erhöhten perinatalen, fetalen und maternalen Morbidität und Mortalität einhergeht. So sind beispielsweise die Gefahren für fetale Azidose, Sepsis oder einen neonatalen Tod signifikant höher als in einer normalgewichtigen Kontrollgruppe (Donald *et al.*, 1999).

1.1.1 Definition

Wichtig bei der Definition von IUGR-Feten ist die Abgrenzung zu SGA-Feten (small for gestational age). In der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Pecks wurde mit einheitlichen Definitionen gearbeitet (Pecks, Rath, Maass, *et al.*, 2016): SGA-Feten kommen mit einem Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile (P) zur Welt, wobei das Wachstum während der Schwangerschaft durchgehend in etwa an dieser Perzentile entlang gemessen werden kann. Hiervon sind beispielsweise Feten von Eltern mit einer unterdurchschnittlichen Körpergröße betroffen, ohne dass dies einen Krankheitswert darstellt. Bei diesen konstitutionell kleinen Feten liegt das Wachstumspotenzial lediglich unter dem Durchschnitt der Normalbevölkerung.

Bei der IUGR handelt es sich um eine Pathologie, bei der das genetisch vorgegebene Wachstumspotenzial nicht erreicht wird. Zusätzlich zu einem Gewicht unter der 10. P, welches pränatal gemessen und postnatal bestätigt wird, muss mindestens eines der folgenden präpartalen Kriterien erfüllt sein:

- I. Wachstumsabfall/Perzentilenflucht um >40 P in den letzten 4 Wochen
- II. Nachweis eines Resistenzindex (RI) $>95.$ P oder ARED-flows (absent or reversed end-diastolic blood flow) in der Dopplersonographie der A. umbilicalis
- III. fetale Asymmetrie mit einem Kopf-zu-Bauchumfangs-Quotienten (KU/AU) $>95.$ P
- IV. Oligohydramnion mit einem Fruchtwasserindex (Amnion Fluid Index, AFI) <6 cm

(Pecks, Caspers, et al., 2012)

1.1.2 Klassifikation

Die IUGR kann zur weiteren Klassifikation in einen symmetrischen und einen asymmetrischen Typ unterteilt werden. Tritt bereits in der Frühschwangerschaft eine fetale Wachstumsrestriktion auf, kommt es typischerweise zur symmetrischen Form der IUGR (Typ I, 30 % der Fälle (Steiner and Schneider, 2008)). Der Kopfumfang ist im Vergleich zum Abdominalumfang proportional vermindert (Pollack and Divon, 1992). Bei dieser Form liegt die Ursache nach heutigem Verständnis in der Regel intrinsisch, also bei dem Fetus. Die Zellteilung und das Zellwachstum sind reduziert (Pollack and Divon, 1992). Es handelt sich demnach um eine hypoplastische Form, die unabhängig vom Nährstoffangebot verläuft (Wollmann, 1998). Eine perinatale Hypoxie ist bei der Typ I IUGR selten, jedoch ist aufgrund der verminderten Zellteilung und dem damit einhergehenden Defizit an Hirnzellen das Risiko für Langzeitschäden durch eine gestörte neurologische Entwicklung erhöht (Pollack and Divon, 1992). Zudem wird das Wachstumsdefizit postpartal selten wieder aufgeholt (Wollmann, 1998).

Bei der asymmetrischen Form (Typ II, 70 % der Fälle (Campbell, 1974)) kommt es zu einem Sauerstoff- bzw. Substratmangel im dritten Trimenon, wahrscheinlich aufgrund einer reduzierten funktionellen Kapazität der Plazenta (Wollmann, 1998). Die Ursache liegt meist extrinsisch, beispielsweise in einer progressiven uteroplazentaren Insuffizienz (Gruenwald, 1966). Durch den Effekt des „brain-sparings“ ist der Kopfumfang im Gegensatz zum Abdominalumfang regelhaft entwickelt (Pollack and Divon, 1992). Das Risiko für eine perinatale Hypoxie und Hypoglykämie ist bei dieser Form erhöht, die Langzeitprognose ist jedoch gut (Pollack and Divon, 1992). Auch kommt es postpartal meist zu einem Aufholwachstum (Wollmann, 1998).

Eine weitere Unterteilung erfolgt anhand der Schwangerschaftswoche (SSW) bei Auftreten der Wachstumsrestriktion. Tritt diese vor der 34. SSW (<34. SSW) auf, spricht man von einer early-onset-IUGR, tritt sie nach der 34. SSW (>34. SSW) auf, spricht man von einer late-onset-IUGR (Hodel, 2013). Diese Einteilung hat eine hohe klinische Relevanz, wenn beispielsweise über den optimalen Entbindungszeitpunkt entschieden wird. Zudem muss im Hinblick auf das präpartale und neonatale

Management bedacht werden, inwiefern die fetalen Organsysteme weitere Unterstützung benötigen (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016).

1.1.3 Ätiologie

Während der Schwangerschaft ist der Fetus verschiedenen Einflussfaktoren ausgesetzt. Die fetale Reaktion auf Stress ist eine reduzierte Wachstumsrate. Ursachen des Stresses können hierbei auf maternaler, plazentarer und fetaler Seite liegen (Pollack and Divon, 1992).

Auf mütterlicher Ebene nimmt der Ernährungsstatus Einfluss auf das fetale Wachstum, da über ihn die Nährstoffzufuhr zum Fetus bestimmt wird (Pollack and Divon, 1992). In diesem Zusammenhang lässt sich auch der sozioökonomische Status als Risikofaktor für eine Wachstumsrestriktion nennen (Wollmann, 1998). Zudem kann eine Hypoxie die Wachstumsrate vermindern, wie etwa bei einer bestehenden obstruktiven oder restriktiven Lungenerkrankung (beispielsweise Asthma bronchiale oder Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)), sowie bei zyanotischen Herzerkrankungen. Weitere maternale Erkrankungen, die zu einer IUGR führen können, sind Diabetes mellitus, Kollagenosen und Nierenerkrankungen, sowie hypertensive Erkrankungen, sowohl schwangerschaftsinduzierte als auch präexistente Hypertonien (Pollack and Divon, 1992). Auch der Verzehr von Koffein, Alkohol, Drogen und Medikamenten reduziert das fetale Wachstum, den größten Einfluss nimmt jedoch der Zigarettenkonsum während der Schwangerschaft (Wollmann, 1998).

Die Plazenta reagiert auf Umwelteinflüsse mit strukturellen und funktionellen Veränderungen. Durch Infarktareale, Plazentaablösungen oder eine pathologische Plazentation wird das Risiko für eine fetalen Wachstumsrestriktion erhöht (Wollmann, 1998). Zudem sind Mehrlingsschwangerschaften im Zuge der plazentaren Risikofaktoren einer IUGR zu nennen (Pollack and Divon, 1992).

Maternal	plazentar	fetal
<i>maternaler Ernährungsstatus</i> (Mangelernährung, Adipositas)	<i>gestörte Plazentation</i> (Placenta praevia)	<i>Infektionen</i> (Zytomegalie-Virus, Rubella, Toxoplasmose, Herpes)
<i>maternale Erkrankungen</i>	<i>Infarkte</i>	<i>kongenitale Malformationen</i>

<u>Hypoxämie</u> (Höhenaufenthalt, Asthma bronchiale, COPD, zyanotische Herzvitien, Anämie) <u>hypertensive Erkrankungen</u> (schwangerschaftsinduzierter Hypertonus, Präeklampsie, präexistenter Hypertonus) <u>Diabetes mellitus</u> <u>Autoimmunerkrankungen</u> <u>chronische Nierenleiden</u> <u>Antiphospholipidsyndrom</u>		zentralnervös, kardiovaskulär, gastrointestinal, muskuloskelettal
<i>Noxen:</i> Nikotin, Alkohol, Koffein, Drogen, Medikamente	<i>multiple Schwangerschaften</i>	<i>chromosomale Anomalien</i> autosomale Trisomien, Turner Syndrom
<i>sozioökonomischer Status</i> <i>Alter</i>	<i>Chromosomenanomalien</i>	<i>Stoffwechselerkrankungen</i>
<i>Sterilitätstherapie</i> (in-vitro Fertilisation)	<i>Uterusanomalien</i>	<i>Strahlenexposition</i>

Tabelle 1: Maternale, plazentare und fetale Risikofaktoren für eine Intrauterine Wachstumsrestriktion
 (Pollack and Divon, 1992; Wollmann, 1998; Schneider, Husslein and Schneider, 2006; Hodel, 2013)
 (COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung)

Fetale Ursachen für eine Wachstumsrestriktion können zum einen genetische Varianten wie chromosomale Anomalien sein. 38 % der Feten mit karyotypischen Auffälligkeiten sind unterdurchschnittlich groß. Zum anderen können fetale kongenitale Malformationen und intrauterine Infektionen ursächlich sein (Pollack and Divon, 1992). Als wichtige Vorsorgeuntersuchung im Hinblick auf virale Infektionen findet bei anders nicht erklärbarer IUGR das TORCH-Screening statt, welches folgende Infektionen abdeckt:

- **T:** Toxoplasmose
- **O:** others (z.B. Parvovirus B19, Varizella-Zoster-Virus)
- **R:** Rubellavirus (bei fehlender Dokumentation einer zweimaligen Impfung)
- **C:** Zytomegalievirus
- **H:** Herpes-simplex-Virus, Hepatitis B- & C-Virus, Humanes-

Immundefizienz-Virus (auf freiwilliger Basis)

Obwohl eine Vielzahl an Risikofaktoren bereits bekannt ist, bleibt die Ursache in bis zu 40 % der IUGR-Fälle ungeklärt (Wollmann, 1998).

Eine Übersicht der bekannten Ätiologien der IUGR findet sich in Tabelle 1.

1.1.4 Diagnostik

Die präpartale Diagnostik der IUGR ergibt sich aus den Definitionskriterien und setzt sich aus einer klinischen Untersuchung und einer apparativen Diagnostik zusammen. Die Mehrzahl der IUGR-Feten wird präpartal nicht entdeckt (Chauhan *et al.*, 2014), wobei eine nicht entdeckte IUGR mit einem 8-fach erhöhten Risiko für einen Intrauterinen Fruchttod einhergeht (Gardosi *et al.*, 2013). Ernst *et al.* ermittelten 2017 eine Detektionsrate der IUGR von 47,8 % (Ernst *et al.*, 2017). Mit Hilfe einer ausführlichen Anamneseerhebung, welche neben der Eigenanamnese auch eine Familien-, Schwangerschafts- sowie Arbeits- und Sozialanamnese umfassen sollte, lassen sich bereits zu Beginn der Schwangerschaft Risikofaktoren für eine IUGR benennen (Bundesausschuss, 2016). Durch die Ermittlung dieser Faktoren können die Schwangeren mit einem besonders hohen Risiko herausgefiltert werden. In einer Studie von Miranda *et al.* konnte gezeigt werden, dass allein durch die Anamnese 29 % der IUGR-Feten erkannt werden können. Arbeitet man zusätzlich mit angepassten Perzentilen, dopplersonographischen Untersuchungen, Plazentarem Wachstumsfaktor und Estriol, konnten bis zu 77 % detektiert werden (Miranda *et al.*, 2017).

Klinische Untersuchung

Für die klinische Untersuchung steht die Kontrolle des Fundusstandes sowie die Schätzung des fetalen Gewichts zur Verfügung. Aufgrund der niedrigen Sensitivität ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen jedoch eingeschränkt (Bais *et al.*, 2004).

Sonographie

Sonographisch kann in der Frühschwangerschaft mittels fetaler Scheitel-Steiß-Länge eine Korrektur des Gestationsalters erfolgen.

Durch die Fetometrie lässt sich das fetale Wachstum im Verlauf betrachten. Hierbei kann ein auftretender Wachstumsabfall anhand einer Perzentilenflucht dokumentiert werden. Die pränatale sonographische Vermessung erfolgt nach Hadlock et al. mittels Kopfumfang (KU), Bauchumfang (AU), Femurlänge (FL) und Biparietalen Diameter (BPD) (Hadlock *et al.*, 1984, 1990). Die Zuordnung des hieraus errechneten Schätzwichts innerhalb der Normalverteilung erfolgt über populationsbasierte Perzentile nach Voigt et al. (Voigt, Schneider and Jährig, 1996). Zusätzlich wird die Methode der angepassten Perzentilen nach Gardosi et al. angewandt. Durch computergenerierte Regressionsanalysen werden die Einflüsse von fetalem Geschlecht, maternalem Gewicht zu Beginn der Schwangerschaft, maternaler Größe, ethnischer Zugehörigkeit und Parität auf das fetale Schätzwicht heraus gerechnet (Gardosi, J.; Chang, A.; Kalyan, B.; Sahota, D.; Symonds, 1992).

Eine fetale Asymmetrie im Sinne einer Diskrepanz zwischen AU und KU oder das Vorliegen eines Oligohydramnion, welches sich durch einen reduzierten AFI zeigt, können ebenso auf eine IUGR hinweisen (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016).

Dopplersonographie

Liegt das fetale Schätzwicht in der Fetometrie unter der 10. P sollte eine weitere Abklärung mittels sonographischer Feindiagnostik und/oder Dopplersonographie erfolgen (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016).

Mithilfe der Dopplersonographie lassen sich wichtige Aussagen über den Versorgungsstatus des Fetus treffen. Der Resistance-Index (RI) beschreibt das Verhältnis von maximaler enddiastolischer und maximaler systolischer Blutflussgeschwindigkeit und dient als direktes Maß für den peripheren Gefäßwiderstand. Dabei führt ein hoher Gefäßwiderstand zu einem hohen RI. Der Pulsatilitätsindex (PI) beschreibt das Verhältnis von peripherem Widerstand zu Blutflussgeschwindigkeit. Dieser nimmt mit steigendem Gefäßwiderstand und sinkendem Blutfluss zu und umgekehrt mit sinkendem Gefäßwiderstand und steigendem Blutfluss ab. Der RI steigt bei zunehmendem Gefäßwiderstand anfangs linear an, wird jedoch bei hohen Widerständen nur noch minimal beeinflusst. Der PI hingegen steht durchgehend in einem linearen Zusammenhang mit dem Gefäßwiderstand und kann demnach auch bei hochpathologischen Werten angewandt werden (Steiner and Schneider, 2008).

Eine zunehmende periphere Widerstandserhöhung führt zu einem diastolischen Nullfluss. Steigt der Widerstand weiter an, kann es im Verlauf zu einem retrograden Blutfluss in der Diastole kommen. Diese Veränderung kann in der Dopplersonographie als ARED dargestellt werden (Strauss, 2017).

Es ist gezeigt worden, dass wachstumsretardierte Feten signifikant häufiger Gefäßpathologien aufweisen als Kontrollgruppen (Fok *et al.*, 1990). Zur Beurteilung der maternoplazentaren, fetoplazentaren und fetalen Hämodynamik können spezifische Gefäße untersucht werden. Tabelle 2 stellt dar, welcher Aspekt durch die untersuchten Gefäße beurteilt werden kann.

Beurteilung	Gefäß
maternoplazentare Hämodynamik	A. uterina
fetoplazentare Hämodynamik	A. umbilicalis fetale Aorta
fetale Hämodynamik	V. umbilicalis fetale A. cerebri media fetaler Ductus venosus fetale Aorta fetale V. cava inferior fetale V. hepatica

Tabelle 2: Beurteilbarkeit hämodynamischer Kompartimente mittels Dopplersonographie

(Steiner and Schneider, 2008) (A.: Arteria, V.: Vena)

Schädigende Einflüsse der Dopplersonographie sind nicht nachgewiesen, jedoch durch Wärmeinduktion im Gewebe denkbar. Im Sinne einer Kosten-Risiken-Nutzen-Abwägung wird eine Dopplersonographie laut der Mutterschaftsrichtlinien nur bei den folgenden Indikationen empfohlen:

- Verdacht auf (V.a.) Intrauterine Wachstumsrestriktion
- Hypertensive Schwangerschaftserkrankung
- Zustand nach (Z.n.) Mangelgeburt oder intrauterinem Fruchttod
- Z.n. Präeklampsie oder Eklampsie
- Auffälligkeiten der fetalen Herzfrequenzregistrierung
- begründeter V.a. Fehlbildungen oder fetale Erkrankung
- Mehrlingsschwangerschaft bei diskordantem Wachstum
- Abklärung bei V.a. Herzfehler oder Herzerkrankung

Abgesehen davon ist eine Untersuchung außerhalb der Fehlbildungsdiagnostik nur in der zweiten Schwangerschaftshälfte zugelassen, um die zerebralen Strukturen während der neurologischen Entwicklung zu schützen (Bundesausschuss, 2016).

Kardiotokographie (CTG)

Die Kardiotokographie (CTG) eignet sich zur Detektion akuter hypoxischer Zustände und ist bei v.a. Plazentainsuffizienz indiziert. Weniger Aussagekraft besitzt sie jedoch in Hinblick auf eine Verlaufsdarstellung, wie sie bei der Diagnostik der IUGR benötigt wird (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016).

1.1.5 Management

Eine Zusammenfassung der Empfehlungen der DGGG für das Management der IUGR findet sich in Abbildung 1.

Derzeit steht für die IUGR keine kausale Therapieoption zur Verfügung. Die Schwangeren werden engmaschig überwacht, um einen möglichst optimalen Zeitpunkt für die Entbindung zu finden. Es muss individuell abgewogen werden, ob der Fetus eher von einem Fortbestehen der Schwangerschaft mit dem Risiko für einen Intrauterinen Fruchttod oder von der Beendigung der Schwangerschaft mit den einhergehenden Risiken einer Frühgeburtlichkeit profitiert (Baschat, 2004).

Zum Monitoring dienen Dopplersonographie, CTG, regelmäßige Kontrollen des AFI, der fetalen Entwicklung und der Kindsbewegungen (Mandrizzato *et al.*, 2008).

Ein Nikotinverzicht ist, unabhängig vom Vorliegen einer IUGR, in jeder Schwangerschaft empfohlen, da Nikotinkonsum mit einem erhöhten Risiko für eine Wachstumsrestriktion einhergeht (Figueras *et al.*, 2008).

Diagnostische Verlaufskontrollen

Die klinische Verlaufskontrolle umfasst die regelmäßige Fetometrie inklusive AFI-Kontrollen sowie Dopplersonographien. Besonders das dopplersonographische Flussprofil der A. (Arteria) umbilicalis ist von klinischer Relevanz in Hinblick auf die Dokumentation der uteroplazentaren Dysfunktion. Sie steht stellvertretend für hämodynamische fetoplazentare Veränderungen. Bei Embolisationsversuchen an Lämmern zeigte sich ein erhöhter PI bei zunehmendem Verschluss der Zottenarterien.

Bei einem hochgradigen Verschluss konnte ein ARED gezeigt werden (Morrow et al., 1989).

Die A. cerebri media gibt Informationen über den hämodynamischen Status des Fetus. Bei einer Hypoxämie zeigt sich eine kompensatorische Gefäßdilataion, um die Sauerstoffversorgung des Gehirns im Sinne des „brain-sparing“-Effekts zu gewährleisten (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016). Die Vasodilatation führt zu einer Abnahme des PI der A. cerebri media (Hecher et al., 2001).

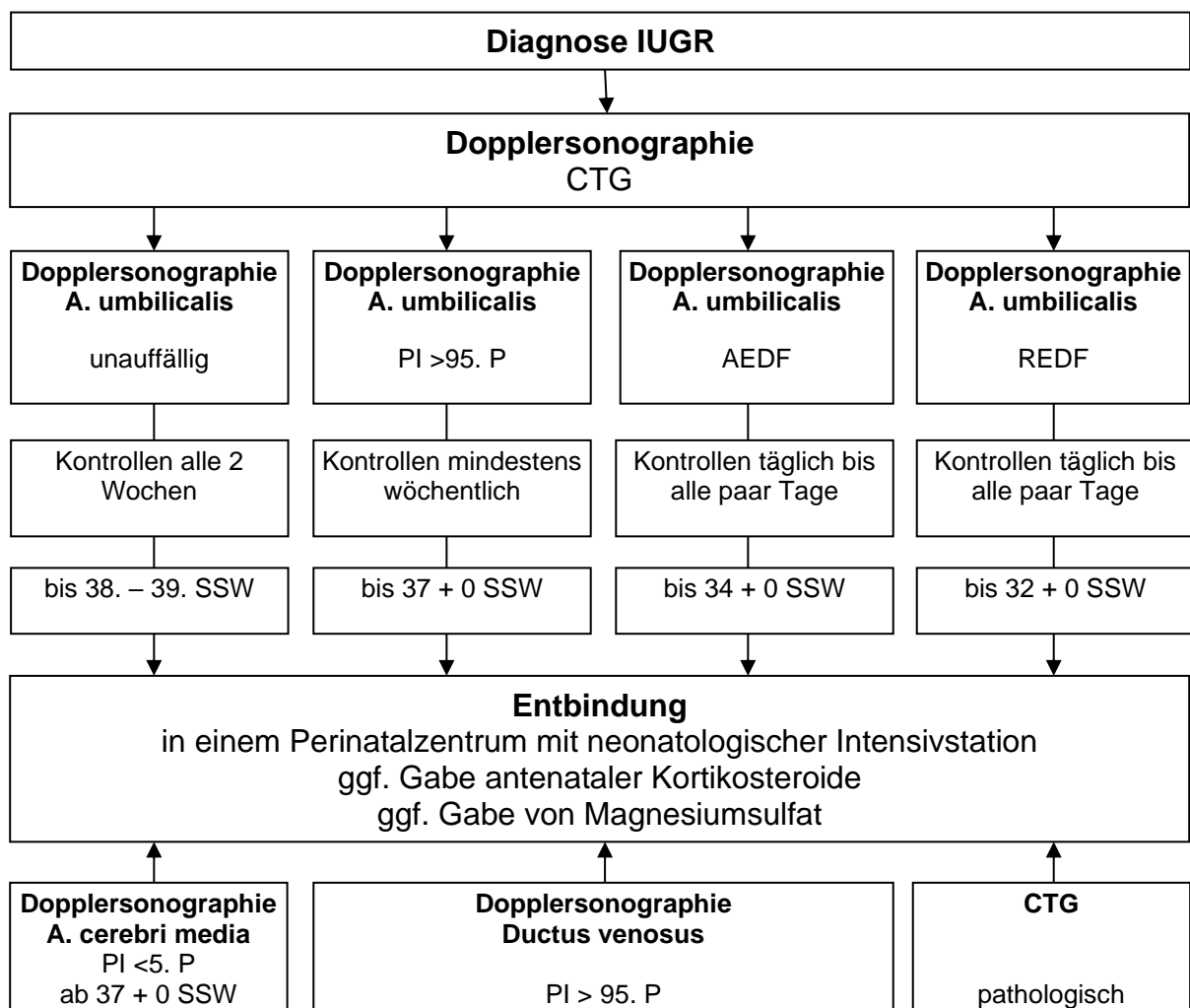


Abbildung 1: Algorithmus zum pränatalen Management der Intrauterinen Wachstumsrestriktion
 nach Intrauterine growth restriction. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics, 2016 (IUGR: Intrauterine Wachstumsrestriktion, CTG: Kardiotokographie, A.: Arteria, PI: Pulsatility Index, P: Perzentile, AEDF: absent enddiastolic blood flow, REDF: reversed enddiastolic blood flow, SSW: Schwangerschaftswoche, ggf.: gegebenenfalls)

Einen Hinweis auf das Vorliegen des „brain-sparings“ gibt die zerebroplazentare Ratio (CPR). Sie ist der Quotient aus PI bzw. RI der A. cerebri media und PI bzw. RI der A.

umbilicalis. Erniedrigte Werte zeigen eine vermehrte Umverteilung des Blutvolumens zugunsten des fetalen Gehirns auf (Boelen *et al.*, 2016) und sind mit einem schlechten perinatalen Outcome assoziiert (Morales-Roselló, J.; Khalil, 2015).

Ein erhöhter dopplersonographischer PI des fetalen Ductus venosus gibt Hinweise auf eine myokardiale Hypoxämie und dient als Prädiktor für eine fetale Azidämie (Kush *et al.*, 2004).

Atemnotsyndrom (Respiratory Distress Syndrome, RDS)-Prophylaxe

Je nach Zeitpunkt der Entwicklung und Ausprägung einer IUGR bedürfen fetale Organe eventuell einer Unterstützung im Reifungsprozess. So ist leitliniengerecht zwischen 24+0 SSW und 34+0 SSW eine intramuskuläre Lungenreifeinduktionstherapie mittels Kortikosteroiden indiziert, wenn eine Entbindung in den nächsten 7 Tagen zu erwarten ist (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016).

Neuroprotektion

Das Risiko für die Entwicklung neurologischer Schäden nimmt proportional zur Schwangerschaftswoche ab. IUGR-Feten, welche ein erhöhtes Risiko für Frühgeburtlichkeit haben, sind unter anderem gefährdet, eine Infantile Zerebralparese zu entwickeln (Platt *et al.*, 2007; Marret *et al.*, 2013). Es wird daher vor der 32+0 SSW die Gabe von Magnesiumsulfat zur Neuroprotektion empfohlen, wenn die Geburt in den folgenden Stunden erwartet wird (Peebles and Kenyon, 2011).

Entbindung

Besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer IUGR, ist die Entbindung in einem Perinatalzentrum mit neonatologischer Intensivstation empfohlen, um auf eventuelle Morbiditäten zeitnah reagieren zu können. Dabei ist das Gestationsalter ein signifikanter Faktor für ein morbiditätsfreies Überleben (Baschat *et al.*, 2007), sodass der Nutzen einer Entbindung im Vergleich zum Risiko einer Frühgeburtlichkeit abgeschätzt werden muss. Eine Entbindung wird im Leitlinienprogramm für IUGR der DGGG empfohlen, wenn mindestens eine der folgenden Auffälligkeiten beobachtet wird:

- auffällige Dopplersonographie des Ductus venosus bei einem Gestationsalter <32+0 SSW, zuvor RDS-Prophylaxe notwendig

- enddiastolischer retrograder Blutfluss (REDF) in der A. umbilicalis bei einem Gestationsalter ab 32+0 SSW
- enddiastolischer Nullfluss der A. umbilicalis (AEDF) bei einem Gestationsalter ab 34+0 SSW
- erhöhter PI der A. umbilicalis $>95. P$ bei einem Gestationsalter ab 37+0 SSW
- erhöhter PI der A. cerebri media $>95. P$ bei einem Gestationsalter ab 37+0 SSW
- auffälliger CPR <1 bzw. $<5. P$ bei einem Gestationsalter ab 37+0 SSW

1.1.6 Prophylaxe

Besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer IUGR, beispielsweise nach vorangegangener IUGR-Schwangerschaft, wird empfohlen, eine Therapie mit 100mg (Milligramm) Acetylsalicylsäure täglich möglichst vor der 16. SSW zu beginnen (Emmanuel Bujold, Stéphanie Roberge, Yves Lacasse, Marc Bureau and Audibert, Sylvie Marcoux, Jean-Claude Forest, 2010).

1.1.7 Prognose

Im Vergleich zu normalgewichtigen Neugeborenen ist die Rate der neonatalen Mortalität bei einem Geburtsgewicht $\leq 3. P$ um das 10-fache erhöht (Donald *et al.*, 1999). Zudem gehen 10 % der perinatalen Mortalität auf eine unentdeckte IUGR zurück (Richardus *et al.*, 2003). Neben dem erhöhten neonatalen Risikoprofil für wachstumsrestringierte Kinder geht die IUGR mit Langzeitfolgen einher. Bower *et al.* fanden heraus, dass IUGR-Feten mit einem abnormen Flussprofil in der Dopplersonographie signifikant häufiger eine klinische Behandlung benötigen. IUGR-Feten $>5. P$ mit einem abnormen dopplersonographischen Flussprofil werden signifikant häufiger früh geboren sowie per Kaiserschnitt entbunden, weisen neonatal niedrige APGAR-Scores auf und bedürfen der Behandlung auf einer spezialisierten Station (Bower, Schuchter and Campbell, 1993). Neugeborene mit einem Geburtsgewicht $\leq 3. P$ haben eine signifikant höhere Inzidenz für Intubationen nach der Geburt, Operationen am ersten Lebenstag und die Entwicklung einer Sepsis (Donald *et al.*, 1999). Veränderungen im Flussprofil der A. umbilicalis als Zeichen einer

plazentaren Insuffizienz gehen mit Veränderungen der Zahl von Erythrozyten, Leukozyten sowie Thrombozyten der Neugeborenen einher (Baschat, R and U, 1997; Gortner, Weiner and Harman, 2000; Baschat *et al.*, 2013). Pallotto et al. haben die Erkenntnisse zu Kurz- und Langzeitfolgen verschiedener Studien zusammengefasst: Perinatal kommt es vermehrt zu Hypoglykämie, Hyperthermie sowie Immundefizienz. In Verbindung mit der signifikant erhöhten Frühgeburtlichkeitsrate sind IUGR-Kinder stärker für chronische Lungenerkrankungen und Nekrotisierende Enterokolitis gefährdet. In der Kindheit zeigen die Betroffenen häufiger Wachstumsstörungen und kognitive Einschränkungen (Pallotto and Kilbride, 2006). Im Laufe des Lebens haben Menschen mit einem niedrigen Geburtsgewicht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Koronaren Herzkrankheit, eines Diabetes mellitus Typ 2 bzw. einer gestörten Glukosetoleranz, eines Bluthochdrucks sowie eines Schlaganfalls (Barker *et al.*, 2009). Dieser Effekt wird als fetale Programmierung bezeichnet.

1.2 Cholesterol

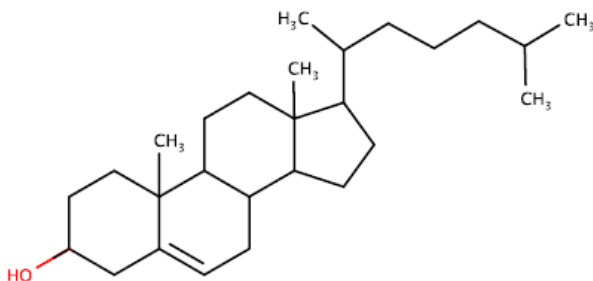


Abbildung 2: Strukturformel von Cholesterol
(H: Wasserstoff; C: Kohlenstoff; O: Sauerstoff)

Chemisch gesehen ist Cholesterol ein polycyclischer Alkohol aus der Gruppe der Sterole. Als elementarer Bestandteil von Membranen ist es für Menschen und Tiere lebensnotwendig.

1.2.1 Cholesterolsynthese

Die Cholesterolsynthese in Wirbeltieren lässt sich in vier Abschnitte unterteilen:

1. Kondensation von Acetat zu Isoprenoiden
2. Polymerisation von Isoprenoiden zu Squalen
3. Zyklisierung von Squalen zu Lanosterol
4. Konversion von Lanosterol zu Cholesterol

(Mitsche *et al.*, 2015)

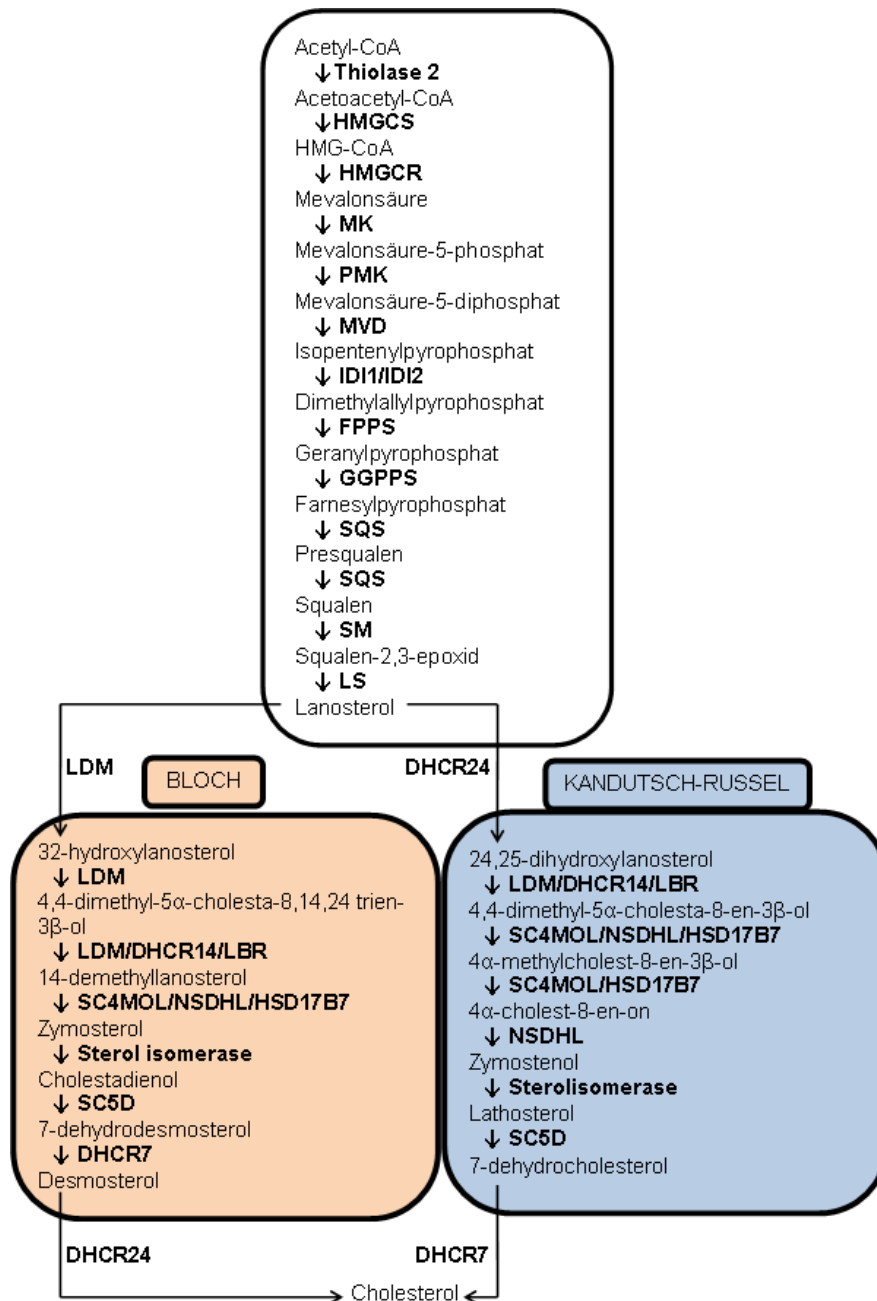
Lynen und Bloch arbeiteten parallel, jedoch unabhängig voneinander an der Entdeckung dieses Syntheseweges. Lynen beschrieb bevorzugt die Synthese von Acetyl-CoA zu Squalen (Lynen, 1964). Gleichzeitig widmete sich Bloch besonders dem Syntheseweg von Squalen über Lanosterol zu Cholesterol (Bloch, 1964). Kandutsch und Russell untersuchten einen Tumor der Präputialdrüse auf mögliche Cholesterolsynthesemetabolite. Im Zuge dieser Arbeit ergab sich ein metabolischer Pathway von Lanosterol zu Cholesterol, welcher sich von Blochs Erkenntnissen unterscheidet (Kandutsch and Russell, 1959, 1960a, 1960b).

Aus Acetyl-CoA wird in mehreren Schritten Lanosterol synthetisiert. Dabei ist die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase geschwindigkeitsbestimmend. Obwohl im Bloch-Pathway und Kandutsch-Russell-Pathway dieselben Enzyme aktiv sind, unterscheiden sich die Synthesewege in ihren Metaboliten. Über den Bloch-Pathway wird Lanosterol über Zymosterol zu Desmosterol, über den Kandutsch-Russell-Pathway wird Lanosterol über 24-, 25-dihydroxylanosterol (im weiteren Verlauf der Arbeit als Dihydrolanosterol bezeichnet) und Lathosterol zu 7-dehydrocholesterol. Aus den Endprodukten wird im letzten Schritt Cholesterol synthetisiert. In Abbildung 3 ist die Cholesterolsynthese über die beiden Synthese-Pathways nach Bloch und Kandutsch-Russell dargestellt.

Mitsche *et al.* untersuchten im Jahre 2015 verschiedene Gewebe von Mäusen auf die Gegenwart der beiden Pathways. Dabei zeigte sich in keinem der untersuchten Gewebe das Vorkommen des Kandutsch-Russell-Pathways. Stattdessen fand sich ein Hybrid-Pathway im Sinne eines Übergangs von Metaboliten des Bloch-Pathways in den Kandutsch-Russell-Pathway besonders auf Höhe von Zymosterol, welcher als modifizierter Kandutsch-Russell-Pathway bezeichnet wurde. Metabolite des Bloch-Pathways können besonders in den Hoden, der Milz, den Nebennieren, dem braunen und weißen Fettgewebe, den Nieren und der Leber nachgewiesen werden. Damit sind besonders die Steroidsynthese-aktiven Gewebe über den Bloch-Pathway mit Cholesterol versorgt. Im Gewebe vom Herzen, den Muskeln, dem Gehirn, der Haut

und der Präputialdrüse überwiegen die Metabolite des modifizierten Kandutsch-Russell-Pathways. Zudem wurden Veränderungen der Syntheseleistung über die beiden Pathways in einem Cholesterol-armen Serum untersucht: Während der Umsatz über den Bloch-Pathway stark zunimmt, verändert sich die Leistung des modifizierten Kandutsch-Russell-Pathways nicht. Eine Anpassung an den Cholesterolbedarf läuft hierbei demnach lediglich über eine vermehrte Aktivierung des Bloch-Pathways, während der modifizierte Kandutsch-Russell-Pathway eine konstante Cholesterolversorgung in den über ihn versorgten Geweben sichert (Mitsche *et al.*, 2015).

Der Fetus bezieht sein Cholesterol aus zwei Quellen: Aus dem maternalen Blut durch Transport über die Plazenta und aus eigener de-novo-Synthese. Die fetale Cholesterolsynthese erfolgt vor allem in den fetalen Nebennieren, der Leber und bei männlichen Feten zusätzlich in den Hoden (Carr and Simpson, 1982). Ab der 19. SSW nimmt der Anteil von Cholesterol aus der fetalen de-novo-Synthese einen zunehmenden Anteil des fetalen Cholesterolpools ein (Baardman *et al.*, 2012). Dabei lassen sich die Erkenntnisse von Mitsche *et al.* bezüglich der Verteilung von Bloch- und Kandutsch-Russell-Pathway nicht gänzlich auf die Situation während der fetalen Entwicklung übertragen. In Untersuchungen von Baardmann *et al.* zeigte sich eine positive Korrelation von Lanosterol als Ausdruck der oberen Hälfte des Cholesterolsyntheseweges mit der Schwangerschaftswoche. Während die Desmosterolkonzentration als Ausdruck des Bloch-Pathways im Verlauf der Schwangerschaft konstant bleibt, steigen die Konzentrationen der Metabolite des Kandutsch-Russell-Pathways, Dihydrolanosterol und Lathosterol, weiter an. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die fetale Cholesterolversorgung über den Kandutsch-Russell-Pathway ab der 19. SSW zunehmend wichtiger wird (Baardman *et al.*, 2012).



Legende:

CoA	Coenzym A	SQS	Squalen-Synthase
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl	SM	Squalen-Monooxygenase
HMGCS	HMG-CoA-Synthase	LS	Lanosterol-Synthase
HMGCR	HMG-CoA-Reduktase	LDM	Lanosterol-14 α -Demethylase
MK	Mevalonat-Kinase	DHCR24	24-Dehydrocholesterol-Reduktase
PMK	Phosphomevalonsäure- Kinase	DHCR7	7-Dehydrocholesterol-Reduktase
MVD	Diphosphomevalonsäure- Decarboxylase	LBR	Lamin B-Rezeptor
IDI1/2	Isopentenyl-diphosphat- Δ -Isomerase 1/2	SC4MOL	Methylsteroid-Monooxygenase 1
FPPS	Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase	NSDHL	NAD(P)-dependent steroid dehydrogenase-like
GGPPS	Geranylgeranyl-diphosphat-Synthase	HSD17B7	Hydroxysteroid-17-Dehydrogenase 7
		SC5D	Sterol-C5-Desaturase

Abbildung 3: Cholesterolsynthese über den Mevalonsäure-, Bloch- und Kandutsch-Russell-Pathway nach (Sharpe and Brown, 2013)

In einer physiologischen Schwangerschaft ist der Bloch-Pathway zwischen der 10. und 20. SSW im Hirn besonders aktiv (Fumagalli, 1963; Dennick RG, Dean PD, 1973). Fumagalli et al. haben herausgefunden, dass Desmosterol im fetalen Gehirn zum Ende der Schwangerschaft in großen Mengen vorkommt.

Zu diesem Zeitpunkt finden die Hirnreifung, Differenzierung und Myelinisierung des Zentralen Nervensystems statt (Fumagalli, 1963). In Astrozytenmembranen sind Cholesterol und Desmosterol die vorherrschenden Sterole (Mutka et al., 2004). Die fetale Leber synthetisiert als einziges Organ mehr Cholesterol, als sie für ihre Entwicklung benötigt (Jurevics, Kidwai and Morell, 1997; Haave and Innis, 2001). Neben der Deckung des Eigenbedarfs, versorgt sie zusätzlich alle anderen Organe, mit Ausnahme des Gehirns, mit Cholesterol und unterstützt somit deren Entwicklung und Wachstum. Haave et al. haben zudem herausgefunden, dass das fetale Gehirn und der Darm in der Lage sind, ihren Cholesterolbedarf gänzlich durch eigene Cholesterolsynthese zu decken (Haave and Innis, 2001).

1.2.2 Bedeutung von Cholesterol in der Schwangerschaft

Das fetale Wachstum ergibt sich aus dem genetischen Potenzial und dessen Modulierung durch Nährstoffangebot und Hormongegebenheiten (Cetin and Alvino, 2009). Cholesterol ist für das fetale Wachstum essentiell: Es ist Bestandteil von Zellmembranen und ein Grundbaustein für die Synthese von Steroidhormonen und Stoffwechselmediatoren (Woollett, 2005). Als Bestandteil in membranständigen Mikrodomänen ist es unerlässlich für den Ablauf membranassoziierter Signalkaskaden (Woollett, 2011). Über eine Regulation des Sonic Hedgehog-Pathways beeinflusst es beispielsweise die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (Woollett, 2005). Vianey-Saban et al. fassten die häufigsten postsqualenen Cholesterolsynthesestörungen zusammen: Die häufigste Störung ist das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, welches aufgrund eines 7-Dehydrocholesterol-Reduktase-Mangels besteht und mit einem reduzierten Übergang von 7-Dehydrocholesterol zu Cholesterol einher geht. Daraus ergibt sich eine erhöhte Blutkonzentration an 7-Dehydrocholesterol. Als seltene autosomal-rezessive Erkrankungen sind die Lathosterolose und Desmosterolose bekannt. Die Lathosterolose entsteht aufgrund eines Sterol- Δ 5-Desaturase-Mangels, wodurch Lathosterol nicht zu 7-

Dehydrocholesterol umgesetzt wird und im fetalen Blut vermehrt anfällt. Die Desmosterolose kommt aufgrund eines Sterol- $\Delta 24$ -Reduktase-Mangel zustande und geht mit einem verminderten Umbau von Desmosterol zu Cholesterol einher, sodass die Blutkonzentration von Desmosterol erhöht ist (Vianey-Saban *et al.*, 2016). Diese Enzymdefekte in der fetalen Cholesterolsynthese gehen mit Skelett- und Hirnfehlbildungen einher (Zolotushko *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2015).

Maternofetoplazentare Einheit

Die Blutgefäße der Plazenta werden von maternaler Seite aus von der A. uterina gespeist. Durch einen veränderten Gefäßaufbau entfallen vasoregulatorische Mechanismen und die Blutversorgung ist allein vom maternalen Blutdruck abhängig (Schünke *et al.*, 2011). Auf der fetalen Seite ist die Plazenta mit den Nabelschnurgefäßen, Arteriae (Aa.) und Vena (V.) umbilicales, verbunden. Die Nabelschnur führt das nährstoffreiche Blut über die V. umbilicalis zum Fetus und über die beiden Aa. umbilicales zurück zur Plazenta und von dort aus in den maternalen Kreislauf (Schünke *et al.*, 2011). Der Austausch von Nährstoffen erfolgt über die Plazentaschranke zwischen maternalem Blut im intervillösen Raum und den fetalen Gefäßen in den Zottenbäumen. Dabei gilt es besonders den Synzytiotrophoblast zu überwinden. Der Austausch im Blut gelöster Stoffe wird durch das Druckgefälle zwischen fetalem und maternalem Kreislauf ermöglicht (Diedrich *et al.*, 2007). Das maternale Cholesterolangebot bestimmt daher die transplazentare Cholesterolbereitstellung für den Feten (Burke *et al.*, 2009). Maternales Cholesterol wird gebunden in LDL und HDL (High Density Lipoproteinen) mithilfe der trophoblastenständigen LDLR (LDL-Rezeptoren), LRP (LDLR-related proteins), SR-A (scavenger receptor A) und SR-BI (scavenger receptor class B type I) sowie rezeptorunabhängig aus dem maternalen Blut vom Synzytiotrophoblast aufgenommen (Wyne and Woollett, 1998; Palinski, 2009). Nach einer Hydrolyse der Cholesterylester wird das freie Cholesterol mittels NPC1 (Niemann-Pick C1) oder Steroltransporterproteinen zur endothelialen Membran oder zu metabolisch aktiven Pools transportiert (Wyne and Woollett, 1998). Der Cholesterolefflux zum fetalen Blutkreislauf kann auf unterschiedlichen Wegen verlaufen: Die Plazenta sezerniert Apolipoprotein-B-haltige Lipoproteine (Madsen *et al.*, 2004). Zudem geben plazentare Zellen Cholesterol über ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) an

Apolipoprotein E und Apolipoprotein A-I (Rindler *et al.*, 1991; Richardson *et al.*, 1996; Palinski, 2009) sowie über ABCG1 an HDL-Partikeln ins fetale Blut ab (Palinski, 2009).

Ca. 20 % seines Cholesterols bezieht der Fetus von der Mutter (Burke *et al.*, 2009). Besonders in der Frühschwangerschaft ist der maternofetale Transport von Cholesterol über die Plazenta essentiell (Baardman *et al.*, 2012). Später erfolgt die Deckung des fetalen Cholesterolbedarfs durch die eigene de-novo-Synthese des Fetus. Lediglich das fetale Zentrale Nervensystem deckt seinen Cholesterolbedarf auch vor Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (Turley *et al.*, 1996) selbst. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Pitkin *et al.*, welche bei Experimenten an Rhesusaffen lediglich Spuren von Cholesterol maternalen Ursprungs im fetalen Hirn nachweisen konnten (Pitkin *et al.*, 1972).

Eine weitere Aufgabe der Plazenta in Zusammenarbeit mit dem fetalen und maternalen Kreislauf als maternofetoplazentare Einheit ist die Hormonproduktion. Im Gegensatz zu Hypophyse und Hypothalamus unterliegt die Plazenta dabei keiner negativen Rückkopplung durch eine erhöhte Hormonkonzentration. Neben der Produktion von Humanem Choriongonadotropin (HCG) und Humanem Plazentalaktogen (HPL) produziert die Plazenta während der Schwangerschaft Steroidhormone. Östrogene werden dabei aus Cholesterol als Ausgangssubstanz synthetisiert. Die Synthese beginnt in der fetalen Nebenniere und bezieht auch die fetale Leber mit ein. In der Plazenta werden Androgene zu Östrogenen aromatisiert (Diedrich *et al.*, 2007). Auch Progesteron wird in der Plazenta hauptsächlich aus Cholesterol gebildet: 80 % aus maternalem Cholesterol, 20 % aus fetalem Cholesterol und Azetat. Dieses Progesteron dient dem Fetus als Vorstufe für andere Steroidhormone (Chatuphonprasert, Jarukamjorn and Ellinger, 2018).

Cholesterolhaushalt bei der IUGR

Obwohl Cholesterol essenziell für das fetale Wachstum ist, gibt es bisher wenige Arbeiten, welche den Cholesterolhaushalt bei wachstumsretardierten Feten untersuchen.

Merzouk *et al.* konnten zeigen, dass die Konzentration von Gesamtcholesterol im venösen Nabelschnurblut bei SGA-Feten signifikant niedriger liegt als bei nicht-wachstumsretardierten Feten (Merzouk *et al.*, 1998). Auch in Untersuchungen von Nagano *et al.* lag die Konzentration von Gesamtcholesterol im venösen

Nabelschnurblut bei SGA-Feten signifikant niedriger als bei regulär gewachsenen Feten, während die Konzentration von Triglyceriden bei den SGA-Feten signifikant höher lag als bei den gesunden Feten (Nagano *et al.*, 2013). Spencer *et al.* zeigten signifikant niedrigere Konzentrationen von Gesamtcholesterol im venösen Nabelschnurblut von Feten mit einem Geburtsgewicht <10. P im Vergleich zu Feten mit einem Geburtsgewicht >10. P. Zwischen SGA-Feten und Feten mit einer Perzentilenflucht zeigten sich hierbei jedoch keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Cholesterol-Konzentration (Spencer *et al.*, 1997).

1.3 Fragestellung und Hypothese

Die fetalen Cholesterolspiegel sind bei der IUGR erniedrigt. Es stellt sich die Frage, ob dies aufgrund eines verminderten maternoplazentaren Cholesteroltransports oder einer herabgesetzten fetalen Syntheserate besteht. Ziel dieser Arbeit ist es, die fetale Cholesterol synthese anhand von Cholesterol synthese metaboliten genauer zu betrachten. Typischerweise werden zur Darstellung der Syntheseaktivität die Endprodukte eines Pathways verwendet. Daher dient Lanosterol als Marker des Mevalonsäure-Pathways, Desmosterol repräsentiert die Aktivität des Bloch-Pathways und Dihydrolanosterol und Lathosterol sind Repräsentanten des Kandutsch-Russell-Pathways.

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Hypothese, dass eine reduzierte fetale Cholesterol synthese rate ursächlich für die niedrigen Cholesterolspiegel bei IUGR-Feten ist. Durch Bestätigung dieser Hypothese können neue Ansätze in der Klärung der Pathogenese der IUGR entstehen. Zudem können sich Therapieoptionen ergeben, die regulierend in den Syntheseweg eingreifen.

2. Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv

Für die Durchführung der Studie erfolgte eine ethische Beratung bei den Ethikkommissionen des Universitätsklinikums der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen und des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel eingeholt. Ein positives Votum wurde unter den Nummern EK-154-11 und B 315/15 erteilt. Alle Probandinnen haben ein schriftliches Einverständnis für die Verwendung schwangerschaftsbezogener Daten und der Bioproben gegeben. Von 2006 bis 2018 wurden insgesamt 1200 schwangere Patientinnen ab 24+0 SSW an den Universitätskliniken der RWTH Aachen und Schleswig-Holstein, Campus Kiel, im Rahmen ihres geburtshilflichen Klinikaufenthalts in eine Biobank eingeschlossen. Es galten folgende Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie:

- Mehrlings-Schwangerschaft
- Fetale Anomalien, abnormer Karyotyp
- Klinische oder laborchemische Zeichen einer Infektion
- Positives TORCH-Screening
- Maternaler Diabetes mellitus/Gestationsdiabetes mellitus
- Schwere maternale Erkrankungen
- Lungenreifeinduktionstherapie vor ≤ 5 Tagen
- Fehlende Einwilligung

Die Informationen zum Schwangerschaftsverlauf wurden anhand des Mutterpasses erfasst. Das Schwangerschaftsalter wurde anhand des Beginns der letzten Menstruationsblutung (post menstruationem, p.m.) berechnet. Da die Berechnung hierbei von einem regelmäßigen Zyklus von 28 Tagen Länge ausgeht, kann es bei unregelmäßigem, verkürztem oder verlängertem Zyklus zu Abweichungen kommen. Das Schwangerschaftsalter wurde daher stets per Ersttrimester-Ultraschall-Befund überprüft und ggf. korrigiert. Dazu diente die Biometrie des Fetus mittels Messung der Scheitel-Steiß-Länge (Bundesausschuss, 2016). Die Berechnung des fetalen Schätzwichts erfolgte nach Hadlock et al. mittels Biparietalem Durchmesser (BPD), Kopfumfang (KU), Abdominalumfang (AU) und Femurlänge (FL) (Hadlock *et al.*, 1984).

Die eingeschlossenen Wöchnerinnen und ihre Feten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: CTRL- (Kontroll-) und IUGR-Gruppe. Die Einschlusskriterien für die IUGR-Gruppe ergaben sich aus den genannten Diagnosekriterien:

- Gewicht <10. P (postpartal bestätigt) und mindestens ein weiteres Kriterium
 - Wachstumsabfall in den letzten 4 Wochen um >40 P
 - RI der A. umbilicalis >95. P oder ARED in der Dopplersonographie
 - Fetale Asymmetrie: KU/AU >95. P
 - Oligohydramnion: AFI <6cm (Zentimeter)

Die Studienteilnehmer mit einem unauffälligem Schwangerschaftsverlauf und einem Geburtsgewicht zwischen der 10. und 90. Perzentile wurden der CTRL-Gruppe zugeteilt. Als zusätzliches Ausschlusskriterium galt für diese Studienkohorte ein maternaler Hypertonus.

Die Fallzahlplanung erfolgte anhand des maternalen LDL/HDL-Quotienten aus vorangegangenen Studien zum Thema (Pecks, Brieger, *et al.*, 2012). Dies begründet sich durch die bisherige Überzeugung einer Korrelation von maternalen Blutfettwerten mit der IUGR. Bei einer angestrebten Power von 80 % und einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ ergab sich eine notwendige Fallzahl von $n=26$ pro Studiengruppe.

Von 40 IUGR-Feten unterschiedlicher Schwangerschaftswochen bei Entbindung standen ausreichend Nabelschnurblut sowie vollständige klinische Datensätze zur Verfügung. 102 Neugeborene wurden als adäquat entwickelte Früh- oder Termingeborene gewertet. Entsprechend der Abwägung eines Kosten-Nutzen-Verhältnisses und um unabhängige Störfaktoren auszuschließen, wurden 40 IUGR-Probanden anhand von fetalem Geschlecht und Gestationsalter bei Geburt (± 7 Tage) mit 40 CTRL-Probanden gepaart. Zudem wurden für die Paare möglichst geringe Unterschiede in Bezug auf das maternale Alter, den maternalen Nikotinkonsum und BMI sowie eine stattgehabte Betamethasontherapie angestrebt.

Neben dem Vergleich von IUGR- und CTRL-Gruppe erfolgten Analysen unter Ausschluss unabhängiger Einflussfaktoren. So wurden Subgruppen in Bezug auf den Entbindungszeitpunkt und das fetale Geschlecht erstellt. Daraus ergaben sich zusätzlich folgende Konstellationen:

- IUGR ≤ 34 . SSW versus (vs.) CTRL ≤ 34 . SSW
- IUGR > 34 . SSW vs. CTRL < 34 . SSW
- IUGR ≤ 34 . SSW vs. IUGR > 34 . SSW

- CTRL \leq 34. SSW vs. CTRL $>$ 34. SSW
- IUGR männlich vs. CTRL männlich
- IUGR weiblich vs. CTRL weiblich
- IUGR männlich vs. IUGR weiblich
- CTRL männlich vs. CTRL weiblich

2.2 Probengewinnung

Die Entnahme des fetalen Nabelschnurblutes erfolgte postnatal innerhalb von 15 Minuten nach der Geburt an einer doppelt abgeklemmten Nabelschnur. Es wurde je eine 4,9ml Serum-Monovette der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) mit venösem Nabelschnurblut befüllt. Die Blutentnahmen erfolgten durch Mitarbeiter der geburtshilflichen Abteilungen der Universitätskliniken Aachen und Kiel. War keine direkte Aufarbeitung der Blutproben möglich, wurden die befüllten Serum-Monovetten in einer Kältemaschine der Firma Kirsch (Willstätt-Sand, Deutschland) bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Aufgrund der Ausschlusskriterien liegen dieser Studie die Blutproben für 40 der untersuchten Paare zugrunde.

2.3 Probenaufbereitung

Die Blutproben wurden nach einer Inkubationszeit von 15-30 Minuten bei Raumtemperatur in Serum und korpuskuläre Bestandteile getrennt. Hierfür wurden die Blutproben mit einer Waage der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland), abgewogen und ein gewichtsidentisches Oppositionsröhrchen angefertigt. Bei Raumtemperatur und einer Zentrifugalkraft von 2000 g erfolgte die Phasentrennung innerhalb von 15 Minuten in einer Zentrifuge der Firma Hettrich (Tuttlingen, Deutschland). Das Serum, welches als Überstand zurückblieb, wurde mittels einer Pipette der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland), in Kombination mit Pipettenspitzen der Firma Sarstedt (Nürnberg, Deutschland) abgenommen und in 4 Cryoröhrchen „Cryovials“ der Firma Simport (Québec, Canada), aliquotiert. Die Serumproben wurden bis zur Analyse in einem Gefrierschrank Ultraflow der Firma SANYO (Osaka, Japan), bei -80°C (Grad

Celsius) gelagert. Zwischen der Probengewinnung und der Serumlagerung vergingen maximal 24 Stunden.

2.4 Probenanalyse

Die Analyse der maternalen sowie fetalen Cholesterol-, Triglycerid-, HDL-Cholesterol- und LDL-Cholesterol-Konzentrationen erfolgte standardisiert nach der routinemäßigen Prozedur des Zentrallabors der jeweiligen Universitätsklinik. Hierzu wurden kolorimerische Enzymtests im Analyseautomaten Modular P800 der Firma Roche/Hitachi (Basel, Schweiz) durchgeführt wie bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Pecks, Brieger, *et al.*, 2012). Die Messbereiche lagen für Cholesterol bei 3-800mg/dl (Milligramm/Deziliter), für Triglyceride bei 4-1000mg/dl, für HDL-Cholesterol bei 3-120mg/dl und für LDL-Cholesterol bei 3-550mg/dl.

Die Analyse der Konzentrationen von fetalem Cholesterol und Cholesterolsynthesemetaboliten erfolgte in der Universitätsklinik Bonn unter der Aufsicht von Professor Lütjohann. Der Probenversandt erfolgte auf Trockeneis. Die kontinuierliche Kühlung der Proben wurde nicht unterbrochen. Die Proben wurden unmittelbar nach Ankunft im Labor überprüft und im gefrorenen Zustand auf -80°C bis zur endgültigen Verarbeitung gelagert. Die Analyse erfolgte nach festgelegten Standards, welche bereits in vorausgehenden Arbeiten veröffentlicht wurden (Lütjohann *et al.*, 2002, 2004; Mackay *et al.*, 2014). Für diese Arbeit erfolgten Extraktionen und Konzentrationsmessungen von fetalem Cholesterol, Lanosterol, Dihydrolanosterol, Lathosterol und Desmosterol. Abbildung 4 stellt das Extraktionsverfahren dar. Die abschließende Derivatisierung dient der Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften der Probe.

Unter standardisierten Bedingungen erfolgte im Anschluss die Bestimmung der fetalen TC- (Gesamtcholesterol-) Konzentrationen mittels GC-FID (Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor). Die Bestimmung von Lanosterol, Dihydrolanosterol, Lathosterol und Desmosterol erfolgte bei bekannten Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) der Sterole mittels GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) im SIM-Modus (Selektives Ionenmonitoring) wie von Prof. Lütjohann in einer vorangegangenen Studie beschrieben (Lütjohann *et al.*, 2002).

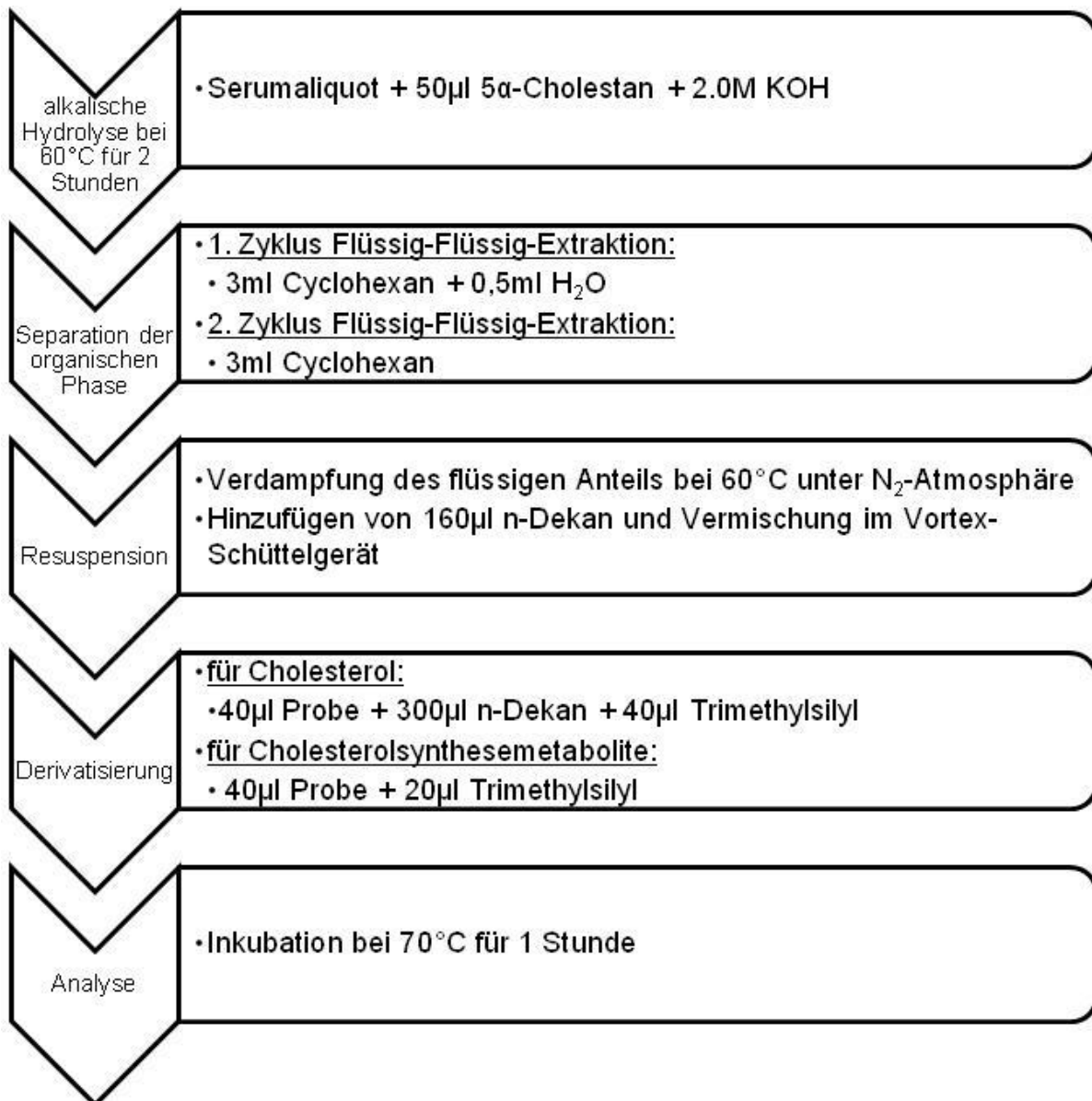


Abbildung 4: Extraktion von Cholesterol und Cholesterolsynthesemetaboliten aus den Serumaliquots
 (°C: Grad Celsius, µl: Mikroliter, KOH: Kaliumhydroxid, ml: Milliliter, H₂O: Wasser, N₂: Stickstoff)

2.5 Statistik

Die ermittelten Parameter und die klinischen Daten wurden mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism 7 der Firma GraphPad Software Inc. (San Diego, California, USA) ausgewertet.

Klinische Daten wurden präsentiert als Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts. Ein p-Wert durch den Student's t-Test mit $p < 0,05$ wurden als signifikant angenommen.

Laborchemische Daten wurden unter der Annahme einer nicht-parametrischen Verteilung mittels Mann-Whitney-U-Test, bei der Betrachtung von zwei unabhängigen Gruppen, sowie der Kruskal-Wallis-Test, bei der Betrachtung von mehr als zwei unabhängigen Gruppen, in Kombination mit dem Dunn's-Test analysiert. Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman's Rang-Summen Test. Die graphische Darstellung erfolgte ebenfalls mit Hilfe von GraphPad Prism 7 sowie GraphPad Prism 8.

3. Ergebnisse

Charakteristika der Studiengruppen

Ein klinischer Vergleich inklusive der Lipidprofile der beiden Studiengruppen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Im Hinblick auf das durchschnittliche maternale Alter, die maternale Größe und das maternale Gewicht zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der IUGR- und CTRL-Kohorte.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Parität. In der CTRL-Gruppe lagen diese 1,56-mal so hoch wie in der IUGR-Gruppe.

Der Anteil an Müttern, die angaben, während der Schwangerschaft geraucht zu haben, lag in der IUGR-Gruppe um 87,5% höher als in der CTRL-Gruppe. Vor der Schwangerschaft lag der Anteil der rauchenden Frauen um 12,5% höher als in der CTRL-Gruppe. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Da ein maternaler Hypertonus als Ausschlusskriterium für die CTRL-Kohorte galt und die IUGR in etwa 25% der Fälle mit einer arteriellen Hypertonie in der Schwangerschaft assoziiert ist, unterscheiden sich die maternalen Blutdruckwerte beider Gruppen signifikant. Während in der CTRL-Gruppe aufgrund der Ausschlusskriterien kein Bluthochdruck in der Schwangerschaft auftritt, haben in der IUGR-Gruppe 22,5 % der Frauen einen Schwangerschaftshypertonus entwickelt. Der systolische Blutdruck der IUGR-Gruppe lag im Durchschnitt 8,8%, der diastolische 10,8% über denen der CTRL-Gruppe.

Aufgrund der Paarung von IUGR-Feten und CTRL-Feten anhand der Schwangerschaftswoche bei Entbindung und Geschlecht, ergeben sich bei der Auswertung dieser Parameter keine signifikanten Unterschiede.

Dahingegen zeigen sich signifikante Unterschiede in Bezug auf das Gewicht der Neugeborenen. In der IUGR-Gruppe liegt dies durchschnittlich 66,45% unter dem der CTRL-Gruppe. Im Hinblick auf die Einordnung auf den populationsbasierten Perzentilenkurven nach Voigt lagen die Feten der IUGR-Gruppe 37,83, auf den angepassten Perzentilenkurven nach Gardosi 38,67 Perzentilenpunkte unterhalb der CTRL-Gruppe.

	CTRL			IUGR			p
	n	Mittelwert/ %	95% CI	n	Mittelwert/%	95% CI	
maternales Alter (a)	40	32,53	30,69- 34,73	40	29,95	27,82- 32,07	0,1247
maternale Größe (m)	40	1,66	1,64-1,68	40	1,65	1,64-1,67	0,7974
maternales Gewicht vor SS (kg)	40	63,13	59,74- 66,51	40	66,5	61,9-71,7	0,3610
maternaler BMI vor SS (kg/m ²)	40	22,85	21,69- 24,01	40	24,18	22,78- 25,57	0,1765
maternale Geburtzahl	40	1,25	0,84-1,66	40	0,8	0,37-1,23	0,0137
maternaler Rauchstatus (%)	40	20	7,04-32,96	40	37,5	21,82- 53,18	0,1374
maternaler Rauchstatus vor SS (%)	40	40	24,13- 55,87	40	45	28,89- 61,11	0,8213
maternaler systolischer Blutdruck (mmHg)	40	117,1	113,9- 120,3	40	127,4	121,1- 133,8	0,0009
maternaler diastolischer Blutdruck (mmHg)	40	67,35	64,62- 70,08	40	74,6	70,64- 78,56	0,0034
Hypertonie während SS (%)	40	0	0,0-0,0	40	22,5	8,98-36,03	0,0024
Gestationsalter bei Einschluss (SSW)	40	33,8	32,37- 35,23	40	32,95	31,6-34,33	0,3414
Gestationsalter bei Entbindung (SSW)	40	34,21	32,89- 35,52	40	33,96	32,68- 35,25	0,7832
neonatales Geschlecht (% weiblich)	40	52,5	36,33- 68,67	40	52,5	36,33- 68,67	>0,9999
neonatales Geburtsgewicht (g)	40	2304	2023-2585	40	1531	1326-1735	<0,0001
neonatale Gewichtsperzentile (populationsbasiert)	40	41,78	35,89- 47,66	40	3,95	3,05-4,85	<0,0001
neonatale Gewichtsperzentile (angepasst)	40	39,52	31,28- 47,77	40	0,85	0,11-1,60	<0,0001
maternales LDL-Cholesterol (mg/dL)	37	158,5	145,4- 171,5	40	134,2	118,7- 149,7	0,0096
maternales HDL-Cholesterol (mg/dL)	37	75,32	69,3-81,35	40	72,9	67,55- 78,25	0,5750
maternales Gesamtcholesterol (mg/dL)	37	274	256,8- 291,3	40	246	226,9-265	0,0232
maternale Triglyceride (mg/dL)	37	241,5	212,1- 270,9	40	225,2	188-262,4	0,3840
fetales LDL-Cholesterol (mg/dL)	40	29,13	23,87- 34,38	40	20,03	15,8-24,25	0,0032
fetales HDL-Cholesterol (mg/dL)	40	31,08	28,64- 33,51	40	15,7	13,34- 18,06	<0,0001
fetales Gesamtcholesterol (mg/dL)	40	70,48	63,88- 77,07	40	50,08	44,4-55,75	<0,0001
fetale Triglyceride (mg/dL)	40	20,75	16,92- 24,58	40	45,4	35,87- 54,93	<0,0001

Tabelle 3: Klinische und laborchemische Parameter der CTRL- und IUGR-Gruppe

(CTRL: Kontroll-Gruppe, IUGR: Intrauterine Wachstumsrestriktion-Gruppe, p: Korrelationskoeffizient rho, n: Anzahl, CI: Konfidenzintervall, a: Jahre, m: Meter, SS: Schwangerschaft, kg: Kilogramm, BMI: Body Mass Index, kg/m²: Kilogramm pro Quadratmeter, mmHg: Torr, SSW: Schwangerschaftswoche, g: Gramm, LDL: Low-Density-Lipoprotein, HDL: High-Density-Lipoprotein, mg/dL: Milligramm pro Deziliter)

Die maternalen Werte für TC liegen in der CTRL-Gruppe durchschnittlich 11,38%, die maternalen LDL-Werte 18,11% über denen der IUGR-Gruppe, woraus sich signifikante

Unterschiede ergeben. Die maternalen HDL-Werte liegen in der CTRL-Gruppe hingegen durchschnittlich 3,32% über denen der IUGR-Gruppe, woraus sich kein signifikanter Unterschied ergibt. Gleiches gilt für die durchschnittlichen Werte der maternalen Triglyceride. Diese lagen in der CTRL Gruppe 7,24% über denen der IUGR-Gruppe und unterscheiden sich somit nicht signifikant.

Betrachtet man die fetalen Blutfettwerte ergibt sich ein signifikanter Unterschied. Das fetale LDL-Cholesterol liegt in der CTRL-Gruppe um 45,43%, das fetale HDL-Cholesterol um 97,96% und das fetale TC um 40,73% über dem Wert der IUGR-Gruppe. Die fetalen Triglycerid-Werte hingegen liegen in der IUGR-Gruppe im Durchschnitt um 118,8% über denen der CTRL-Gruppe.

Fetale Sterole

Vergleicht man die Konzentrationen von Gesamtcholesterol, Lanosterol, Dihydrolanosterol, Lathosterol und Desmosterol im venösen Nabelschnurblut der CTRL- und IUGR-Gruppe miteinander, ergeben sich signifikante Unterschiede für Cholesterol, Lanosterol und Lathosterol (jeweils $p < 0,0001$), sowie für Dihydrolanosterol ($p = 0,0023$). Der Vergleich der Desmosterolkonzentrationen ergibt hingegen keinen signifikanten Unterschied.

Die Gesamtcholesterol-Konzentration liegt in der CTRL-Gruppe bei durchschnittlich 76,83 mg/dL und somit um 42,35 % höher als in der IUGR-Gruppe, wo diese im Durchschnitt 55,12 mg/dL beträgt. Die Konzentration von Lanosterol liegt mit durchschnittlich 10,9 µg/dL in der IUGR-Gruppe um 51,83 % niedriger als in der CTRL-Gruppe mit durchschnittlich 16,55 µg/dL. Für Dihydrolanosterol liegt die Konzentration in der CTRL-Gruppe bei gemittelt 0,63 µg/dL, in der IUGR-Gruppe bei durchschnittlich 0,47 µg/dL. Der Unterschied beträgt damit 34,04 %. Die Lathosterol-Konzentration liegt in der CTRL-Gruppe bei 0,18 mg/dL und somit um 50 % höher als in der IUGR-Gruppe, wo diese durchschnittlich 0,12 mg/dL beträgt. Für Desmosterol liegt die durchschnittliche Konzentration in der CTRL-Gruppe bei 0,088 mg/dL, in der IUGR-Gruppe bei 0,082 mg/dL. Der Unterschied beträgt damit bei 7,3 % und ist nicht signifikant.

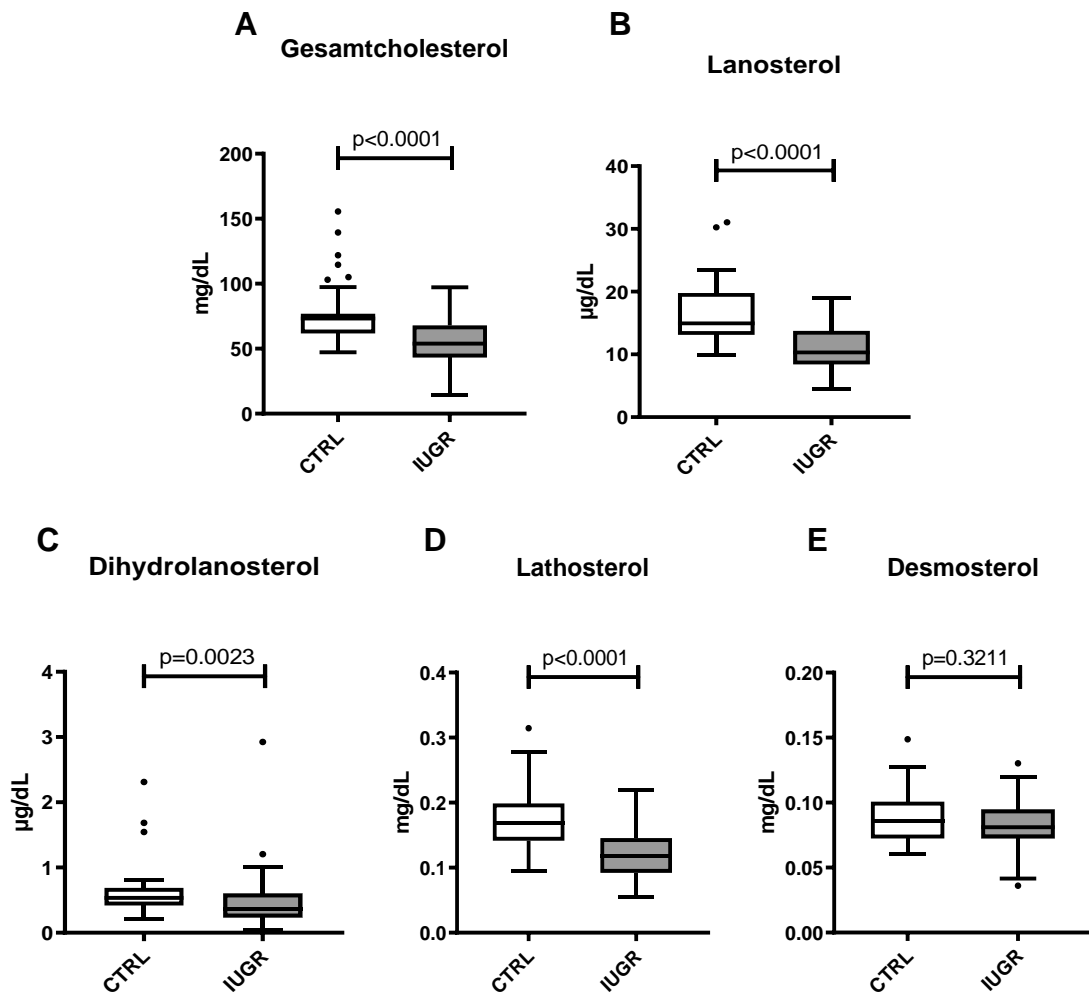


Abbildung 5: Konzentration der fetalen Sterole im Gruppenvergleich

Box-Whisker-Plot-Darstellung der Konzentrationen von A: Gesamtcholesterol, B: Lanosterol, C: Dihydrolanosterol, D: Lathosterol und E: Desmosterol der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mittels Mann-Whitney-U-Tests ermittelt mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient rho) (mg/dL: Milligramm pro Deziliter; µg/dL: Mikrogramm pro Deziliter)

Setzt man die Cholesterolsynthesemetabolite ins Verhältnis zu TC, ergibt sich ein signifikanter Unterschied für den Vergleich des Desmosterol/TC-Quotienten beider Gruppen ($p < 0,0001$).

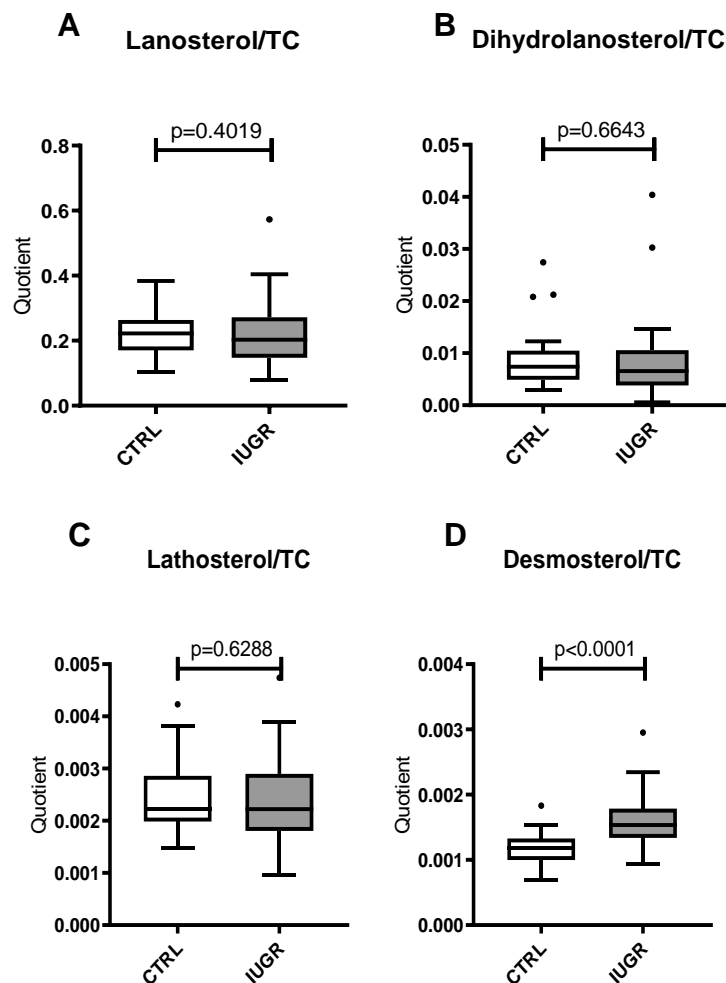
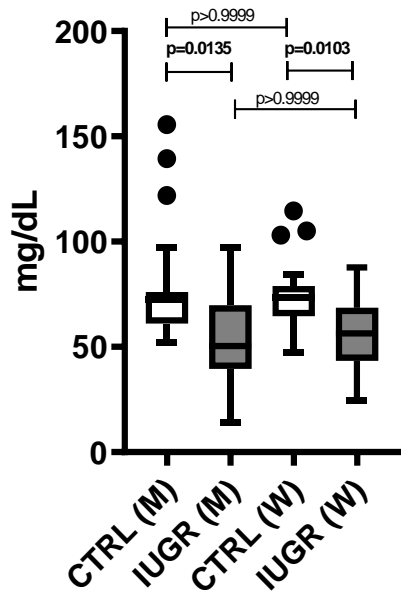


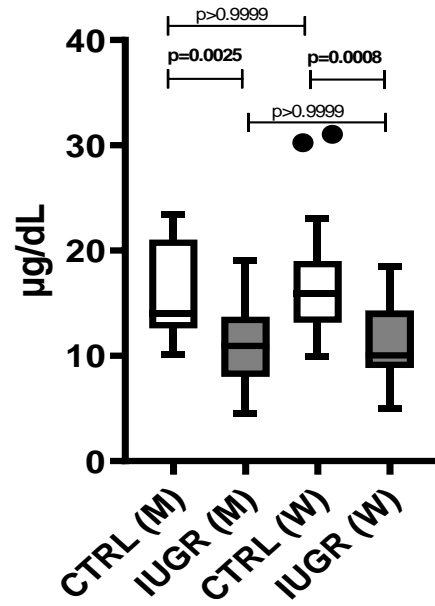
Abbildung 6: Konzentration der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol im Gruppenvergleich
 Box-Whisker-Plot-Darstellung der Quotienten aus A: Lanosterol/TC (Gesamtcholesterol), B: Dihydrolanosterol/TC, C: Lathosterol/TC und D: Desmosterol/TC der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mittels Mann-Whitney-U-Tests ermittelt mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient rho)

Um den Einfluss des Geschlechts zu beleuchten, werden die Sterole in jeweils zwei Subgruppen – männlich (M) und weiblich (W) – zwischen CTRL- und IUGR-Gruppe verglichen. Dabei besteht weiterhin ein signifikanter Unterschied in Bezug auf TC (M: $p=0,0135$, W: $p=0,0103$), Lanosterol (M: $p=0,0025$, W: $p=0,0008$) und Lathosterol (M: $p=0,0011$, W: $p=0,0010$). Ebenso können innerhalb der beiden Studiengruppen die beiden Geschlechter miteinander verglichen werden, wobei sich kein signifikanter Unterschied ergibt.

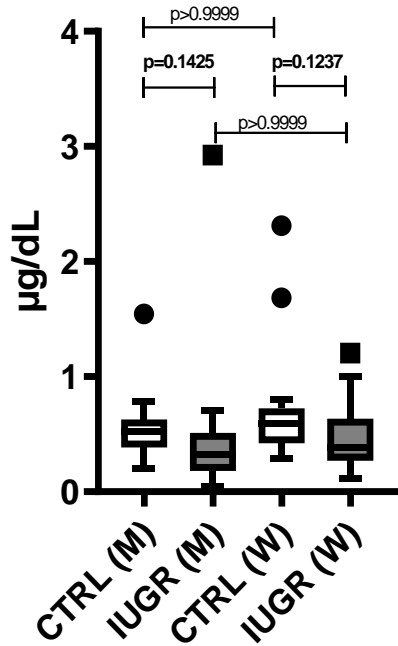
A Gesamtcholesterol



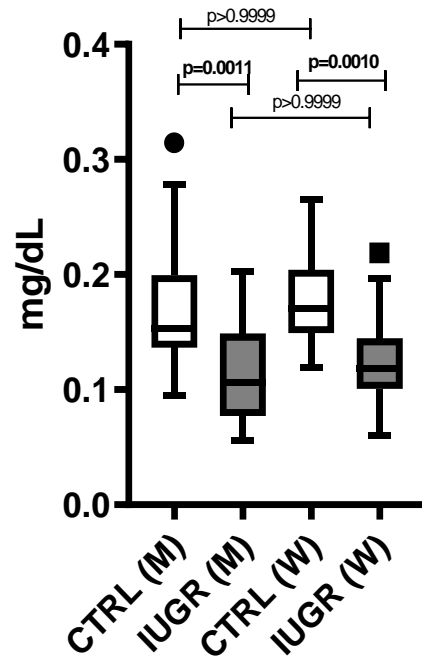
B Lanosterol



C Dihydrolanosterol



D Lathosterol



E Desmosterol

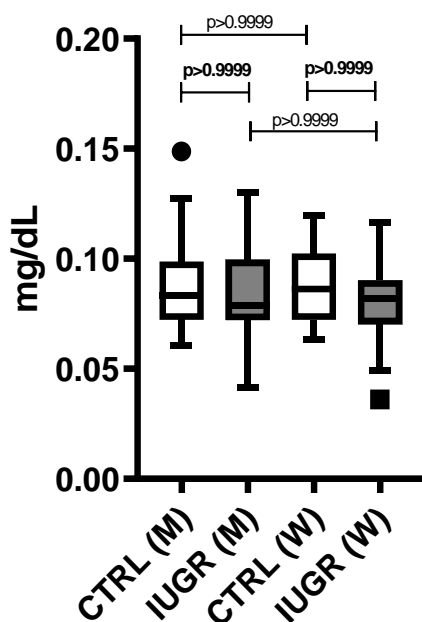


Abbildung 7: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole nach Geschlecht

Box-Whisker-Plot-Darstellung der Konzentrationen von A: Gesamtcholesterol, B: Lanosterol, C: Dihydrolanosterol, D: Lathosterol und E: Desmosterol innerhalb und unterhalb der Subgruppen nach Geschlecht der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient rho) (mg/dL: Milligramm pro Deziliter; µg/dL: Mikrogramm pro Deziliter, M: männlich, W: weiblich)

Bildet man auch hier ein Verhältnis zwischen Synthesemetaboliten und TC, ergeben sich signifikante Unterschiede für den Desmosterol/TC-Quotienten beim Vergleich von männlichen IUGR- mit männlichen CTRL-Feten ($p < 0,0001$) und weiblichen IUGR- mit weiblichen CTRL-Feten ($p = 0,0168$).

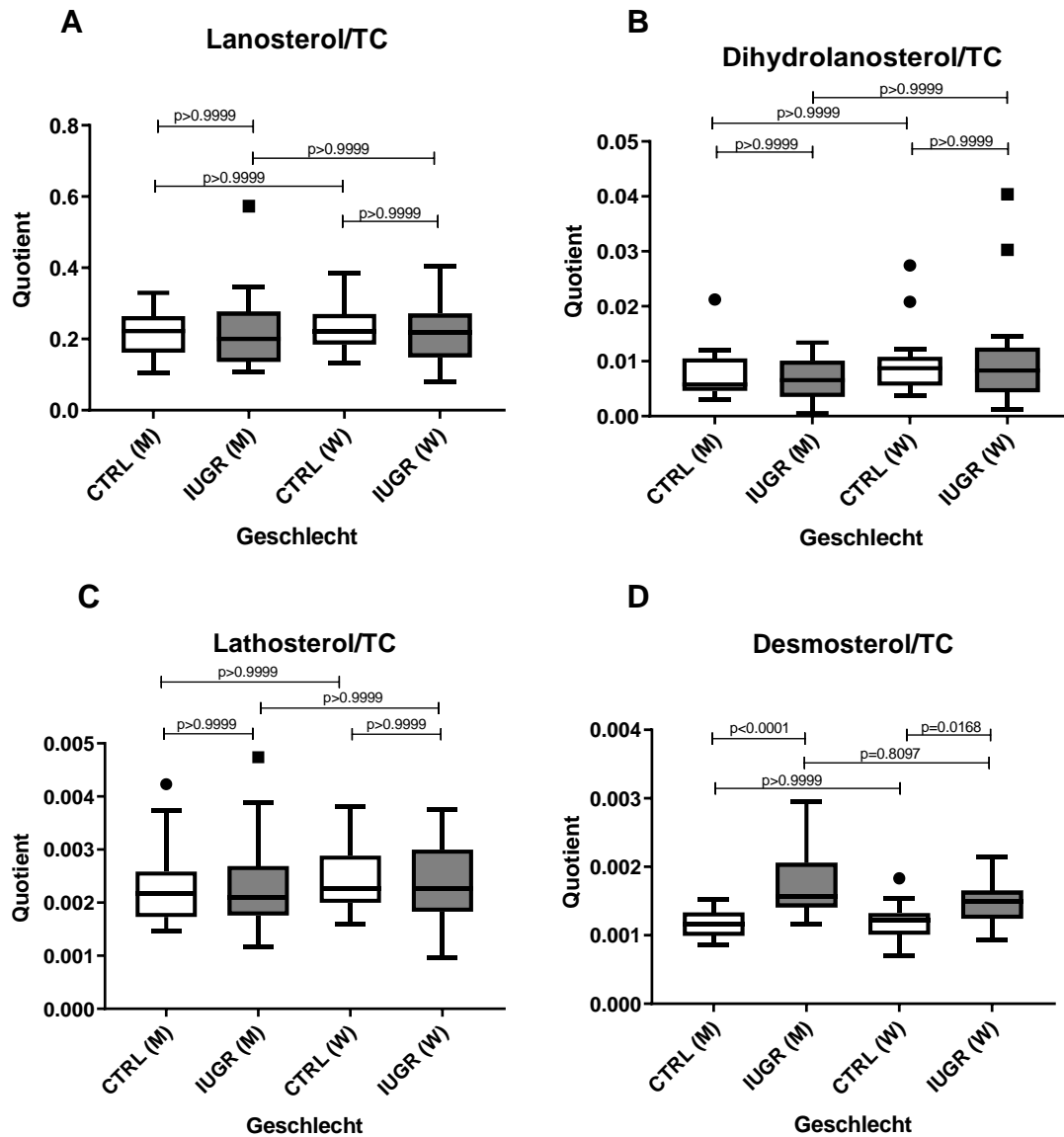
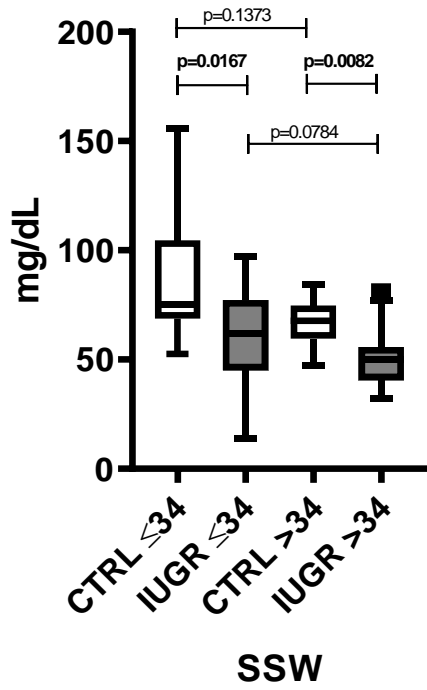


Abbildung 8: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol nach Geschlecht

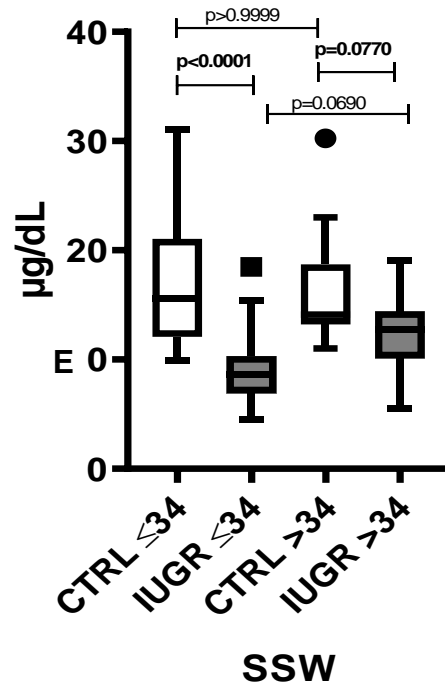
Box-Whisker-Plot-Darstellung der Quotienten aus A: Lanosterol/TC (Gesamtcholesterol), B: Dihydrolanosterol/TC, C: Lathosterol/TC und D: Desmosterol/TC innerhalb und unterhalb der Subgruppen nach Geschlecht der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient ρ) (M: männlich, W: weiblich)

Um die Schwangerschaftswoche bei der Geburt als Einflussfaktor zu untersuchen, werden die beiden Studiengruppen anhand des Geburtszeitpunktes weiter unterteilt: ≤ 34 . SSW und > 34 . SSW. Vergleicht man die Subgruppen zwischen den Studiengruppen, ergeben sich signifikante Unterschiede für TC in beiden Subgruppen hinsichtlich des Vergleichs zwischen den beiden Studiengruppen (≤ 34 . SSW: $p=0,0167$, > 34 . SSW: $p=0,0082$) sowie innerhalb der ≤ 34 . SSW-Subgruppe für Lanosterol ($p<0,0001$) und Lathosterol ($p<0,0001$).

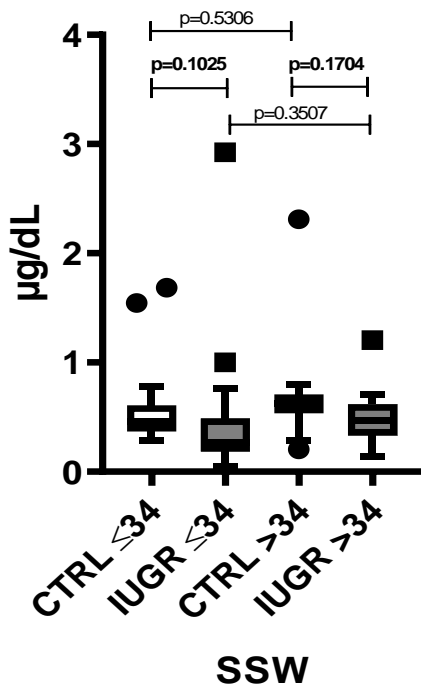
A Gesamtcholesterol



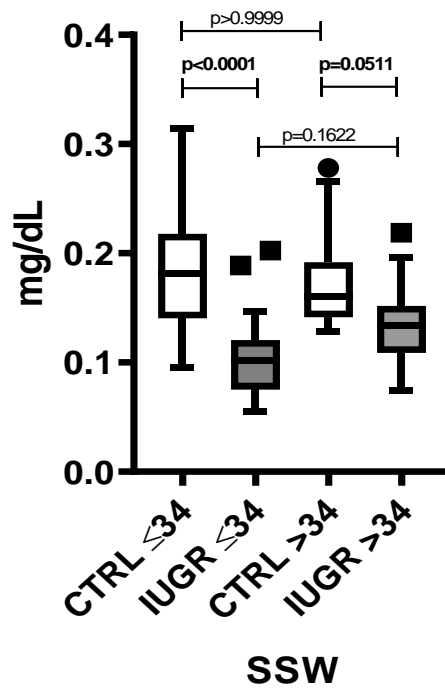
B Lanosterol



C Dihydrolanosterol



D Lathosterol



E Desmosterol

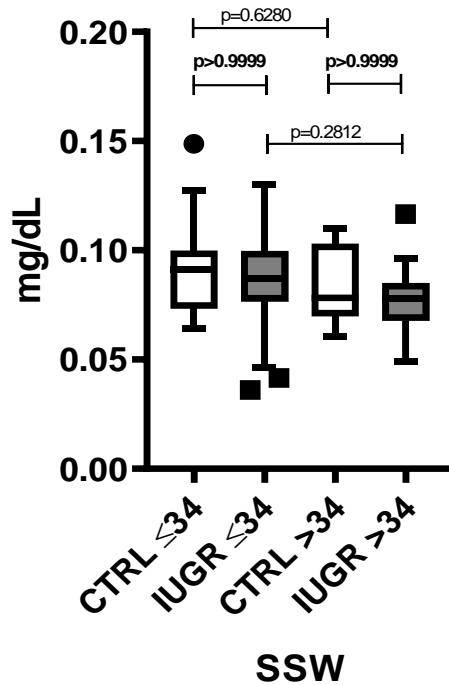


Abbildung 9: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole nach Schwangerschaftswoche bei Entbindung

Box-Whisker-Plot-Darstellung der Konzentrationen von A: Gesamtcholesterol, B: Lanosterol, C: Dihydrolanosterol, D: Lathosterol und E: Desmosterol innerhalb und unterhalb der Subgruppen nach Schwangerschaftswoche bei Entbindung der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion)-Kohorte mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient rho) (mg/dL: Milligramm pro Deziliter; µg/dL: Mikrogramm pro Deziliter, SSW: Schwangerschaftswoche)

Bildet man erneut einen Quotienten aus Synthesemetabolit und TC, ergibt sich ein signifikanter Unterschied für Desmosterol/TC hinsichtlich beider Subgruppen im Kohorten-Vergleich (≤ 34 . SSW: $p=0,0002$; >34 . SSW: $p=0,0105$). Ebenso besteht ein signifikanter Unterschied innerhalb der IUGR-Gruppe im Hinblick auf Lanosterol ($p=0,0005$), Dihydrolanosterol ($p=0,0413$) und Lathosterol ($p<0,0001$).

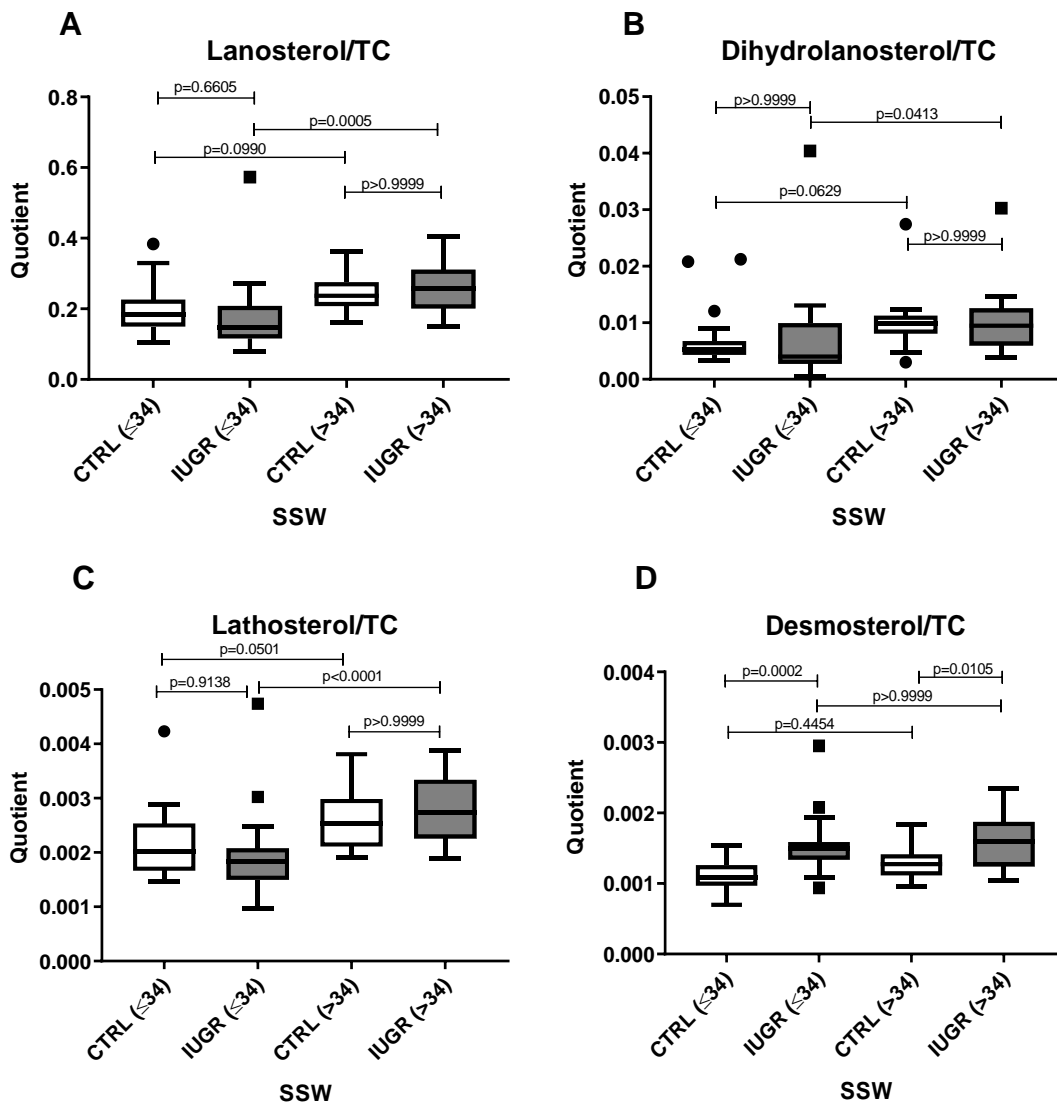


Abbildung 10: Subgruppenanalyse der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol nach Schwangerschaftswoche bei Entbindung

Box-Whisker-Plot-Darstellung der Quotienten aus A: Lanosterol/TC (Gesamtcholesterol), B: Dihydrolanosterol/TC, C: Lathosterol/TC und D: Desmosterol/TC innerhalb und unterhalb der Subgruppen nach Schwangerschaftswoche bei Entbindung der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient rho) (SSW: Schwangerschaftswoche)

Rechnet man den Einfluss von Rauchen als Störfaktor mittels Residualanalyse heraus, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen CTRL- und IUGR-Gruppe für TC ($p < 0,0001$), Lanosterol ($p < 0,0001$), Dihydrolanosterol ($p = 0,0498$) und Lathosterol ($p < 0,0001$).

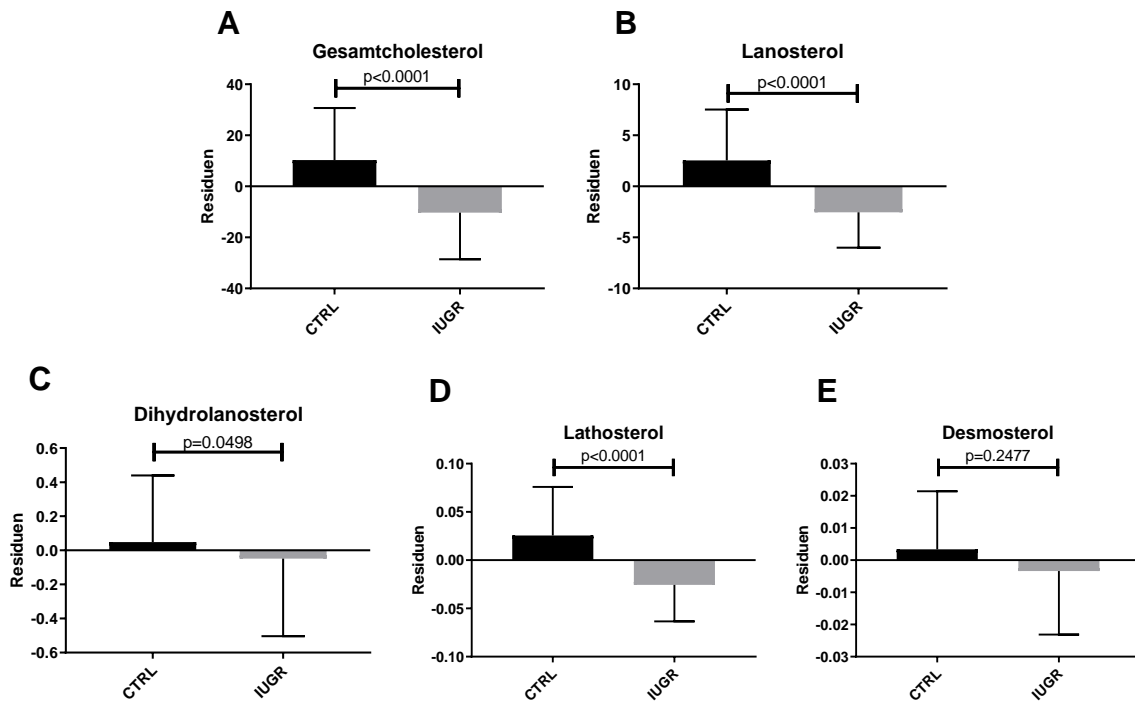


Abbildung 11: Residualanalyse für den maternalen Rauchstatus der fetalen Sterole im Gruppenvergleich

Box-Whisker-Plot-Darstellung der Residualanalyse für den maternalen Rauchstatus von A: Gesamtcholesterol, B: Lanosterol, C: Dihydrolanosterol, D: Lathosterol und E: Desmosterol der CTRL (Kontrolle)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient rho)

Rechnet man den Einfluss weiterer potenzieller Störfaktoren, zusätzlich zum maternalen Rauchstatus das Gestationsalter bei Geburt, das fetale Geschlecht, die Parität und den maternalen BMI, mittels Residualanalyse heraus, bleibt der signifikante Unterschied zwischen TC-, Lanosterol- und Lathosterolkonzentration der beiden Studiengruppen erhalten ($p < 0,0001$).

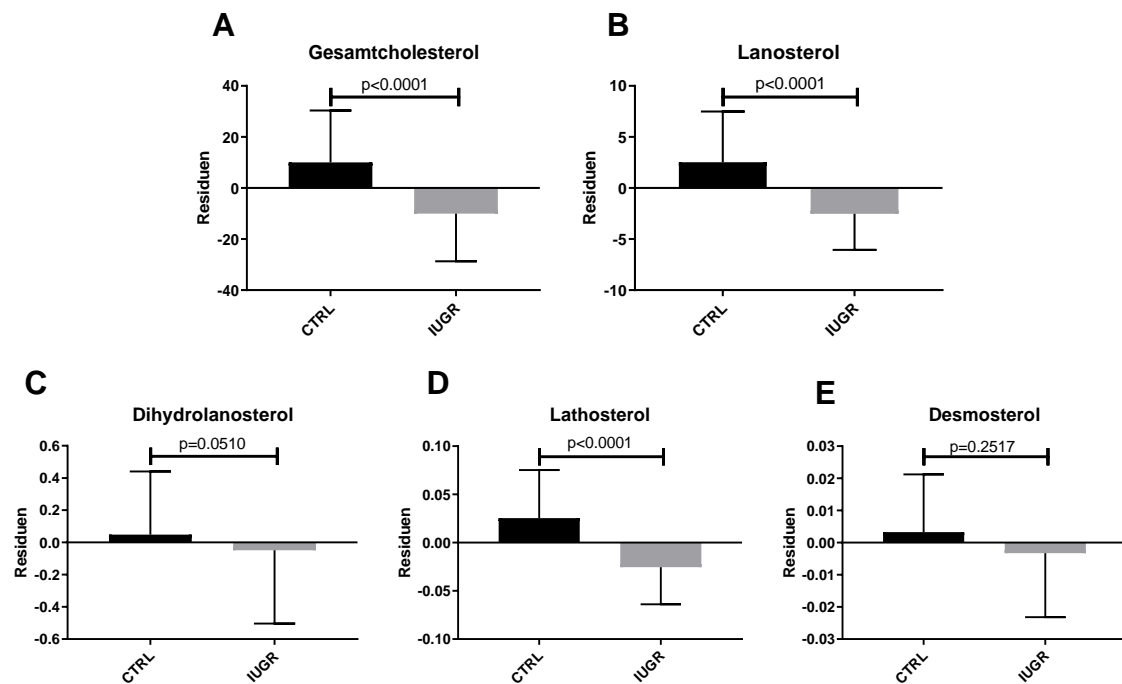


Abbildung 12: Residualanalyse für bekannte Konfunder der fetalen Sterole im Gruppenvergleich

Box-Whisker-Plot-Darstellung der Residualanalyse von A: Gesamtcholesterol, B: Lanosterol, C: Dihydrolanosterol, D: Lathosterol und E: Desmosterol CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient ρ); es erfolgten multiple Residualanalysen für Rauchen, Gestationsalter bei Geburt, fetales Geschlecht, Parität und maternalen BMI

Zur Darstellung der Sterolkonzentration in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Entbindung dient eine Regressionsanalyse. Dabei wird deutlich, dass in der IUGR-Kohorte alle Sterole im gesamten Schwangerschaftsverlauf in geringerer Konzentration vorliegen als in der Kontrollgruppe. Die TC-Konzentration nimmt im Verlauf der Schwangerschaft von gemittelt 102,48 mg/dL in der 25. SSW auf 59,26 mg/dL in der 41. SSW ab. In der IUGR-Kohorte bleibt sie weitestgehend konstant bei im Mittel 60,25 mg/dL in der 26. SSW und 51,35 mg/dL in der 41. SSW, sodass sich die mittleren TC-Konzentrationen von CTRL- und IUGR-Gruppe in der 41. SSW nur noch geringfügig unterscheiden. Die Lanosterol-Konzentration bleibt in der CTRL-Gruppe nahezu konstant bei 17,23 $\mu\text{g/dL}$ in der 25. SSW und 16,1 $\mu\text{g/dL}$ in der 41. SSW. In der IUGR-Gruppe nimmt diese im Schwangerschaftsverlauf von 7,14 $\mu\text{g/dL}$ in der 26. SSW auf 13,68 $\mu\text{g/dL}$ in der 41. SSW zu und nähert sich dem Level der CTRL-Kohorte immer weiter an. Die Konzentration von Dihydrolanosterol steigt im Schwangerschaftsverlauf der CTRL-Gruppe von 0,46 $\mu\text{g/dL}$ in der 25. SSW auf 0,74 $\mu\text{g/dL}$ in der 41. SSW an und sinkt im Gegensatz dazu in der IUGR-Schwangerschaft geringfügig von 0,53 $\mu\text{g/dL}$ in der 26. SSW auf 0,44 $\mu\text{g/dL}$ ab. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist, im Vergleich zu den anderen aufgezeigten Sterolen,

geringer. Die Lathosterol-Konzentration zeigt sich in der CTRL-Kohorte im Schwangerschaftsverlauf abnehmend von 0,20 mg/dL in der 25. SSW auf 0,16 mg/dL in der 41. SSW, während es in der IUGR-Kohorte deutlich von 0,08 mg/dL in der 26. SSW auf 0,15 mg/dL in der 41. SSW ansteigt. Die Desmosterol-Konzentration sinkt in beiden Gruppen mit steigendem Schwangerschaftsalter ab, in der CTRL-Gruppe von 0,1 mg/dL in der 25. SSW auf 0,08 mg/dL in der 41. SSW, in der IUGR-Gruppe von 0,09 mg/dL in der 26. SSW auf 0,08 mg/dL in der 41. SSW.

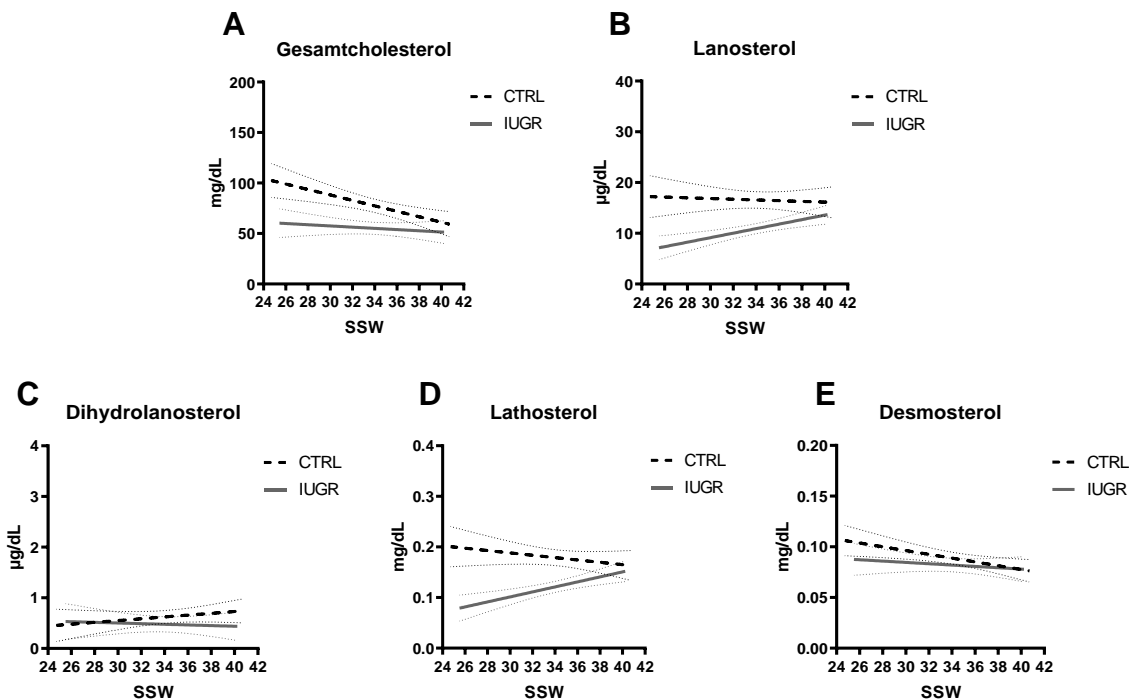


Abbildung 13: Konzentration der fetalen Sterole im Schwangerschaftsverlauf im Gruppenvergleich

Darstellung der Regressionsanalyse von A: Gesamtcholesterol, B: Lanosterol, C: Dihydrolanosterol, D: Lathosterol und E: Desmosterol im Schwangerschaftsverlauf der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient ρ) (mg/dL: Milligramm pro Deziliter; $\mu\text{g/dL}$: Mikrogramm pro Deziliter, SSW: Schwangerschaftswoche)

Im Verhältnis zum TC stellen sich die Verlaufskurven von Lanosterol und Dihydrolanosterol in beiden Studiengruppen nahezu deckungsgleich dar. Der Lathosterol/TC-Quotient steigt in beiden Studiengruppen an, wobei der Verlauf in der IUGR-Gruppe steiler ist, sodass dieser etwa ab der 36. SSW den Quotienten der CTRL-Gruppe übersteigt. Der Graph des Desmosterol/TC-Quotienten der IUGR-Feten verläuft etwa parallel und unterhalb zu dem der CTRL-Feten.

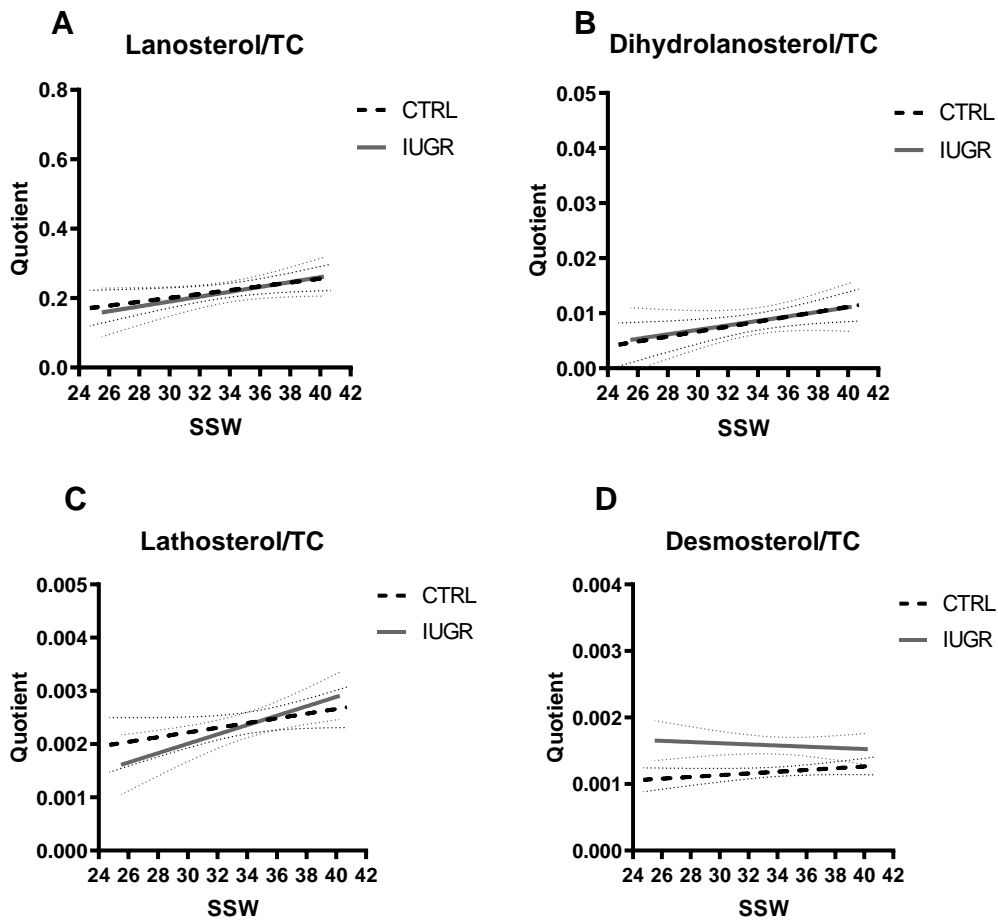


Abbildung 14: Konzentration der fetalen Sterole im Verhältnis zu Gesamtcholesterol im Schwangerschaftsverlauf im Gruppenvergleich

Darstellung der Regressionsanalyse von A: Lanosterol/TC (Gesamtcholesterol), B: Dihydrolanosterol/TC, C: Lathosterol/TC und D: Desmosterol/TC im Schwangerschaftsverlauf der CTRL (Kontroll)-Kohorte verglichen mit der IUGR (Intrauterine Wachstumsrestriktion) -Kohorte mit Angabe des Signifikanzniveaus p (Korrelationskoeffizient ρ) (SSW: Schwangerschaftswoche)

4. Diskussion

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass eine herabgesetzte Cholesterolsyntheserate des Fetus ursächlich für die erniedrigten Cholesterolspiegel bei einer IUGR ist. Um die fetale Cholesterolsynthese zu untersuchen, wurden die Konzentrationen der Cholesterolsynthesemetabolite Lanosterol, Desmosterol, Dihydrolanosterol und Lathosterol im venösen Nabelschnurblut von normotrophen Feten und IUGR-Feten mittel GC-MS im SIM-Modus bestimmt. Hierbei kann die aufgestellte Hypothese dahingehend bestätigt werden, dass die Konzentrationen der Cholesterol-Vorstufen Lanosterol, Dihydrolanosterol und Lathosterol bei der IUGR signifikant niedriger sind. Die Desmosterolkonzentration unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

4.1 Diskussion der Methodik

Ein- und Ausschlusskriterien

Der Einschluss der Probanden in die Studie erfolgte prospektiv, ohne dass das fetale Outcome bekannt war. Die Rekrutierung wurde durch Doktoranden der Kliniken vorgenommen. Bei einer Anzahl von jährlich 1200 Geburten in Aachen und 1500 Geburten in Kiel, wurden nach Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien insgesamt 1200 Probanden aufgenommen. Aus logistischen Gründen war es nicht gewährleistet, mit allen zur Entbindung aufgenommenen Frauen in Kontakt zu treten. Dies war beispielsweise durch den Wunsch nach einer ambulanten Entbindung, kurze Klinikaufenthalte oder die Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung bedingt. In der Frauenklinik der Universitätsklinik Kiel kamen im untersuchten Zeitraum von 12 Monaten 1126 Geburten für den Einschluss in die Studie in Frage. Davon konnte bei 879 Müttern eine Einwilligung eingeholt werden, sodass insgesamt etwa 22 % der Mütter nicht erreicht wurden oder keine Einwilligung gaben. Durch engmaschigere Anwesenheit der Doktoranden hätte diese Quote geringer gehalten werden können. Im Probandenkollektiv der vorliegenden Studie liegt die Inzidenz für eine IUGR schätzungsweise bei 20 %, in der Allgemeinbevölkerung bei bis zu 8 %. Diese Abweichung erklärt sich durch die Empfehlung zu einer Entbindung in einer Klinik mit perinatalem Schwerpunkt, welches sich üblicherweise bevorzugt in Kliniken

der Maximalversorgung findet. Die Universitätskliniken Aachen und Kiel stellen Perinatalzentren ersten Levels dar. Aufgrund der abweichenden Inzidenz zur Normalbevölkerung kann die Übertragbarkeit dieser Studie eingeschränkt sein. Da das Ziel jedoch in der Untersuchung pathophysiologischer Zusammenhänge und nicht in der Entwicklung klinischer Tests z. B. zum Screening lag, ist die Prävalenz in der vorliegenden Untersuchung von geringer Bedeutung. Im Gegenteil erhöht die höhere Prävalenz die Rekrutierungsrate.

Um mögliche Störfaktoren auszuschließen, gab es neben der fehlenden Einwilligung verschiedene Ausschlusskriterien für die Aufnahme in die Studie: Mehrlingsschwangerschaften sind mit einer Wachstumsretardierung assoziiert und es ist noch nicht abschließend geklärt, ob sich hieraus gleiche pathophysiologische Konsequenzen ergeben (Pollack and Divon, 1992; Johnson *et al.*, 2011). Die Abgrenzung zur IUGR kann hierbei durch mehrlingsspezifische ähnliche Krankheitsbilder erschwert werden. Ein feto-fetales Transfusionsyndrom beispielsweise geht häufig mit einem vermindertem fetalen Schätzwert bei gleichzeitigem Oligohydramnion einher (Society for Maternal-Fetal Medicine and Simpson, 2013) und könnte somit als IUGR gewertet werden, obwohl der pathophysiologische Mechanismus nicht dem Formenkreis der Plazentainsuffizienz zugerechnet wird. Das Geburtsgewicht von Mehrlingen ist zudem vom maternalen Ernährungszustand, dem uterinen Blutfluss, der Transportkapazität der Plazenta sowie den jeweiligen Anteilen der Feten an der Plazentamasse abhängig (Dudenhausen and Maier, 2010). Um eine daraus resultierende Fehlerquelle zu vermeiden, galten Mehrlingsschwangerschaften als Ausschlusskriterium. Fetale kongenitale Malformationen sind in 22,3 % der Fälle mit einem geringen Geburtsgewicht vergesellschaftet (David and Mccarthy, 1988). Da hieraus eine Anfälligkeit für fälschliche Diagnosestellungen einer IUGR entsteht, beispielsweise bei gleichzeitigem Vorliegen eines Oligohydramnions durch fehlende Nierenanlage und daraus resultierender reduzierter fetaler Urinmenge, wurden Feten mit Anomalien und abnormem Karyotyp aus der Studie ausgeschlossen. Infektionen der Mutter können über die Plazenta auf das Ungeborene übergehen und die Entwicklung beeinflussen. Mit einem TORCH-Screening können folgende Infektionen, die mit einer nachgewiesenen hohen Rate für Totgeburten einhergehen, detektiert werden (Neu, Duchon and Zachariah, 2016): Während das Zytomegalievirus zu einer Zytolyse und

durch den anschließenden Heilungsprozess zu Entzündungsreaktionen, Fibrosierungen und Kalzifizierungen führt, sind Infektionen mit dem Rubellavirus mit einer vaskulären Insuffizienz und verzögerter Zellteilung assoziiert, wodurch die Organentwicklung beeinflusst wird (Pollack and Divon, 1992). Eine Vielzahl viraler Infektionen in der Schwangerschaft gehen mit einer verminderten Wachstumsrate einher (Waldorf and Mcadams, 2013), sodass ein positives TORCH-Screening zum Ausschluss aus der Studie führte. Auch bakterielle Infektionen, beispielsweise mit Syphilis oder Listerien sowie Protozoeninfektionen wie Malaria oder die Chagas-Krankheit können von einer Wachstumsreduktion begleitet sein (Pollack and Divon, 1992). NETs („Neutrophil Extracellular Traps“) sind Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie werden bei Infektionen aus der DNA von Neutrophilen Granulozyten gebildet und bekämpfen pathogene Mikroorganismen. NETs fördern über eine Thrombozytenaggregation die Blutgerinnung (Fuchs *et al.*, 2010). Eine entsprechende Reaktion während der Schwangerschaft kann zu thrombotischen Veränderungen führen, wie sie auch bei der Präeklampsie beschrieben werden, wodurch der Austausch von Nährstoffen von der Mutter zum Fetus behindern und somit das Wachstum beeinflussen. Bakterielle Infekte gehen typischerweise mit einer Erhöhung der Entzündungsparameter im Blut einher. Klinische oder laborchemische Zeichen einer Infektion führten aufgrund der nicht ausreichend bekannten, jedoch möglichen Einflüsse durch die Erreger und das Immunsystem zum Ausschluss aus der Studie.

Bezüglich des Einflusses eines maternalen Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (T1DM bzw. T2DM) oder Gestationsdiabetes mellitus (GDM) auf die fetale Wachstumsdynamik gibt es in der Literatur viele Ansätze. Die meisten basieren auf einer Veränderung des Nährstoffangebots dem Fetus gegenüber. Einerseits besteht eine Assoziation von maternalem Diabetes mellitus (DM) mit einer fetalen Makrosomie. Durch die hohen Blutglukosekonzentrationen bei Diabetikerinnen steigt das Glukoseangebot dem Fetus gegenüber, woraus eine Hyperinsulinämie mit exzessiver Zunahme an Fettgewebe sowie Muskelwachstum und Organomegalie beim Fetus resultiert (Mayer and Joseph, 2013; Herrera and Desoye, 2016). Andererseits sind auch Assoziationen zu einem verminderten fetalen Wachstum bei maternalem DM beschrieben worden: Beispielsweise ist die Thrombozytenmasse bei Patienten mit T2DM erhöht, wodurch ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose besteht (Coban, Bostan and Ozdogan, 2006). Daraus können sich Veränderungen im Blutgefäßsystem der Mutter und der uterinen

Strombahn ergeben, die zu einer Minderversorgung der Plazenta und des Fetus mit einhergehender Wachstumseinschränkung führen. Aufgrund der uneinheitlichen Datenlage sind die Einflüsse eines maternalen DM auf das fetale Wachstum schwer zu berechnen, weshalb Diabetikerinnen aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Ebenso führten andere schwere maternale Erkrankungen zum Ausschluss. Pollack et al. fassen die Einflüsse der Erkrankungen an sich sowie der medikamentösen Therapie zusammen: Chronisch-entzündliche Darmerkrankung gehen mit einer verminderten Resorption von Nährstoffen einher und führen damit zu einem nutritiven Problem. Erkrankungen der Atemwege, wie Asthma bronchiale, Zystische Fibrose sowie zyanotische Herzfehler führen zu einer Hypoxie, die sich auf den Fetus übertragen kann. Ein maternaler Hypertonus kann über Schäden und Infarkte im Gefäßsystem der Plazenta die Blutzufuhr verringern, aber auch eine antihypertensive Therapie ist mit einer Wachstumsrestriktion assoziiert. Auch Methotrexat und Cyclophosphamid sowie Antikoagulantien haben einen schädlichen Effekt auf das fetale Wachstum (Pollack and Divon, 1992). In den meisten Fällen erfolgte die Erkrankungs- und Medikamentenanamnese anhand des Mutterpasses und war damit abhängig von der Gewissenhaftigkeit Dritter. Dadurch kann es zu einer Verfälschung der Daten aufgrund eines fehlerhaften Einschlusses von Probandinnen mit Vorerkrankungen in die Studie gekommen sein, wobei dieser Einfluss als gering eingeschätzt wird.

Bei drohender Frühgeburtlichkeit ist zwischen 24+0 und 34+0 SSW eine Lungenreifeinduktion mittels Betamethason indiziert. Diese Behandlung kann zu Veränderungen der Blutfettwerte führen (Parker *et al.*, 1995), weshalb eine RDS-Prophylaxe vor ≤ 5 Tagen zum Studienausschluss führte. In der Arbeit von Parker et al. wird beschrieben, dass die fetale Cholesterolkonzentration bis zum 3. und 4. Tag nach der Behandlung signifikant erhöht ist, am 5. Tag mit der der Kontrollgruppe übereinstimmt und daraufhin am 6. und 7. Tag erneut ansteigt. Die Cholesterolkonzentrationen können auch nach mehr als 5 Tagen noch verändert sein und die Studienergebnisse verfälschen. Daher wurde die Paarung zwischen IUGR- und CTRL-Feten zusätzlich möglichst deckend in Bezug auf eine Betamethasontherapie vorgenommen, sodass der Effekt weitestgehend vernachlässigt werden kann.

Ähnlich wie Medikamente, kann auch der Konsum von Drogen und Alkohol das fetale Wachstum beeinflussen (Pollack and Divon, 1992).

Reproduktionsmedizinische Eingriffe wurden im Zuge der Anamnese erfasst, führten aber nicht zum Ausschluss aus der Studie und wurden bei der Gruppenzuordnung nicht berücksichtigt. Nach Wang et al. gehen Schwangerschaften, die auf der Grundlage einer in-vitro-Fertilisation oder eines Gametentransfers bestehen, signifikant häufiger mit einer Wachstumsrestriktion einher (Wang et al., 1994). Daraus kann eine Verfälschung der vorliegenden Studiendaten resultieren. Es wird vermutet, dass der Pathomechanismus bei reproduktiven Maßnahmen in einer idiopathischen, plazentaren Funktionseinschränkung in Folge immunologischer Komponenten und daraus resultierender verminderter Trophoblastinvasion zu suchen ist (Pecks, Maass and Neulen, 2011). Somit liegt der Pathomechanismus bei der IUGR nach reproduktionsmedizinischen Maßnahmen auch innerhalb des gesetzten Fokus der Arbeit.

Studiengruppen

Die Zuordnung zu den Studiengruppen, IUGR vs. CTRL, erfolgte nach der Auswertung der schwangerschaftsbezogenen Daten, die von den Probanden in Form des Mutterpasses offengelegt wurden. Im Verlauf der Schwangerschaft steigen die Blutfettwerte stetig an (Jin et al., 2016). Um Einflüsse des Gestationsalters bei Geburt auf die ermittelten Parameter zu vermeiden, wurde jeweils ein IUGR-Proband mit einem CTRL-Probanden gepaart, sodass sich das Gestationsalter bei Geburt um maximal sieben Tage unterscheidet. Ebenso hat das fetale Geschlecht Einfluss auf das Gewicht, weshalb gleichzeitig der Anspruch auf eine gleichgeschlechtliche Paarung bestand. Zudem wurde Wert auf ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis gelegt: Die 80 Proben venösen Nabelschnurblutes stammen von je 21 weiblichen und 19 männlichen Feten pro Studienkohorte. Um eine hohe Aussagekraft zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit 49 Probanden pro Studienkohorte eingeschlossen, wobei nur von 40 Feten pro Studiengruppe venöses Nabelschnurblut vorhanden war. In vielen vorangegangenen Studien wurde nicht konsequent zwischen IUGR und SGA unterschieden. Diese Unterscheidung ist jedoch wichtig, da ca. 70% der Feten mit Gewicht unter der 10. P. konstitutionell mindergewichtig sind. Nur ca. 30% unterliegt eine Pathologie. Diese Gruppe ist von besonderer klinischer Relevanz aufgrund des erhöhten Risikos eines ungünstigen Ausgangs der Schwangerschaft und Neonatalzeit (Mandrizzato et al., 2008). Um eine möglichst homogene und definitionsgerechte Studiengruppe zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit

die Definition der IUGR als Geburtsgewicht unterhalb der 10. P in Kombination mit einem weiteren IUGR-typischen Kriterium, welches den Entwicklungsverlauf oder den Zustand des Fetus erfasst, verwendet (Mandrizzato *et al.*, 2008). Die hierzu gewählten sonographischen Zusatzkriterien basierten auf vorangegangene Studien anderer, die zu einer verbesserten Diskriminierung zwischen pathologischer IUGR und konstitutioneller SGA durchgeführt wurden: Eine Perzentilenflucht ist ein wichtiges Merkmal, um zwischen konstitutionell kleinen und wachstumsrestringierten Feten zu unterscheiden. Eine einheitliche Definition eines relevanten Wachstumsabfalls gibt es dabei nicht. In der vorliegenden Studie wird eine Perzentilenflucht um >40 P als Zusatzkriterium gewählt, um zu vermeiden, dass fehlerhafte Messungen und Untersucherabhängigkeit fälschlicherweise zu einer Diagnosestellung führen. Es wird davon ausgegangen, dass im Sinne einer Normalverteilung der Hauptanteil der Feten ein Gewicht auf der 50. P aufweist. Da eine Wachstumsrestriktion als Geburtsgewicht <10 . P definiert wird, müssen die Feten einen Perzentilenabfall um >40 P aufweisen, um diese Definition zu erfüllen. Als Zeitintervall zwischen den Untersuchungen wurden 4 Wochen gewählt. Nach Mongelli *et al.* ist die Rate an falsch-positiven Ergebnissen bei diesem Zeitintervall signifikant niedriger ist als bei einer zweiwöchigen oder sogar einwöchigen Kontrolle. Zudem beschreiben sie, dass die Rate an falsch-positiven Diagnosestellungen für eine IUGR mit steigendem Gestationsalter zum Zeitpunkt der initialen Messung zunimmt (Mongelli, Ek and Tambyrajia, 1998). Daraus ergibt sich eine Einschränkung der vorliegenden Studie: Da das Studiendesign prospektiv gewählt wurde, gab es keinen einheitlich definierten Gestationszeitpunkt, zu dem die initiale Ultraschalluntersuchung mit Bestimmung der fetalen Größe bei allen Probandinnen stattfand. Für die ermittelten Daten aus dem Mutterpass wurde keine Interpolierung in Bezug auf diese Fehleranfälligkeit vorgenommen. Im klinischen Alltag ist eine vierwöchige Verlaufsbeobachtung zudem oftmals nicht möglich, da eine Entbindung aufgrund anderer Faktoren bereits vor einer Wachstumskontrolle indiziert ist. Daher fließen auch andere Kriterien, die nicht zwingend einer Verlaufsbeobachtung bedürfen, in die Diagnose der IUGR ein.

Trudinger *et al.* zeigen, dass die IUGR mit einem erhöhten plazentaren Gefäßwiderstand assoziiert ist. Dieser kann dopplersonographisch anhand des Flussprofils der A. umbilicales dargestellt werden (Trudinger *et al.*, 1985), weshalb ein RI oberhalb der 95. P oder ein fehlender enddiastolischer Blutfluss als Zusatzkriterium gilt. Da der RI im Gegensatz zum PI bei hohen Gefäßwiderständen nur noch wenig

beeinflusst wird und damit an Aussagekraft verliert (Steiner and Schneider, 2008), muss jedoch diskutiert werden, ob in zukünftigen Studien bevorzugt eine dopplersonographische Beurteilung des PI herangezogen werden sollte.

Ein fetaler KU/AU-Quotient oberhalb der 95. P weist in Verbindung mit einem Schätzwert <10 . P auf eine plazentare Insuffizienz hin (Campbell and Thoms, 1977). Besonders eine asymmetrische IUGR zeichnet sich durch einen im Vergleich zum Bauchumfang erhöhten Kopfumfang aus und wird mit diesem Diagnosekriterium erfasst. Dabei geht das „brain-sparing“ besonders mit einem erhöhten PI oder einem ARED-Flussmuster der A. umbilicalis einher (Kiserud *et al.*, 2006), sodass diese beiden Zusatzkriterien gehäuft zusammen erwartet werden können. Eine Asymmetrie kann daher als ein valides Zeichen einer IUGR angesehen werden.

Bezüglich des Vorliegens eines Oligohydramnions in Verbindung mit einer IUGR gibt es zahlreiche Ansätze. Lin *et al.* kommen zu dem Ergebnis, dass die IUGR signifikant häufiger mit einem Oligohydramnion einhergeht, wobei das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Detektion keinen Einfluss auf die Signifikanz hat. Eine Kombination aus geringem fetalen Schätzwert und Oligohydramnion verdoppelt den positiv-prädiktiven Wert für eine IUGR (Lin, Sheikh and Lopata, 1990). Das Vorliegen eines Oligohydramnions korreliert unter anderem mit einer Minderperfusion der Plazenta sowie Schäden im fetalen Gefäßsystem (Spinillo *et al.*, 2015). Hierbei sind die Unterschiede zwischen der Studiengruppe mit schwerem Oligohydramnion, definiert durch einen AFI ≤ 4 cm, und der Kontrollgruppe signifikant. In der vorliegenden Arbeit wird das Oligohydramnion durch einen AFI <6 cm definiert, wodurch die Spezifität eingeschränkt sein kann. Zusätzlich ist die Messung der Fruchtwassermenge mittels Berechnung des AFI der Messung mittels SDP (single deepest vertical pocket) dahingehend unterlegen, dass sie eine höhere falsch-positive Rate für die Diagnose eines Oligohydramnions aufweist (Nabhan and Abdelmoula, 2009; Kehl *et al.*, 2016). Die Definition über den AFI <6 cm ist jedoch in vielen Studien gebräuchlich, was für ein hohes Maß an Übertragbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spricht (Mongelli, Ek and Tambyrajia, 1998; Hecher *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2007; Spinillo *et al.*, 2015). Der Fetus bezieht seine Nährstoffe nicht nur über das Blut. Auch das Fruchtwasser beinhaltet wichtige Stoffe wie Kohlenhydrate, Proteine, Lipide, Elektrolyte, Enzyme und Hormone, die vom Fetus aufgenommen werden (Burjonrappa, Crete and Bouchard, 2009). Ein verminderter AFI als Ausdruck einer geringeren Fruchtwassermenge geht demnach mit einem verminderten

Nährstoffangebot dem Fetus gegenüber einher. Burjonrappa et al. gehen davon aus, dass die mit dem Fruchtwasser aufgenommene Glucose über die Regulation der fetalen Insulinspiegel einen wichtigen Faktor für das fetale Wachstum darstellt. Gleichzeitig kann die Ernährung der Mutter die Zusammensetzung des Fruchtwassers beeinflussen (Friesen and Innis, 2019). Durch den AFI kann demnach die Quantität des zur Verfügung stehenden Fruchtwassers dargestellt werden, nicht jedoch die Qualität. Eine Analyse der Fruchtwasserzusammensetzung bei IUGR-Feten im Vergleich zu CTRL-Feten wäre in Betracht zu ziehen, jedoch logistisch nur schwer mit einem prospektiven Studiendesign bei gleichzeitig großer Fallzahl zu vereinbaren. Auf die einheitliche Definition der IUGR-Gruppe wurde im Rahmen der Studie großer Wert gelegt. Von 160 Kieler Schwangeren, bei denen das fetale Geburtsgewicht unterhalb der 10. P lag, wurden 18 aufgrund einer pathologischen Dopplersonographie der A. umbilicalis als IUGR definiert. Bei unauffälligem dopplersonographischen Flussprofil der A. umbilicalis wies ein Fetus eine pathologische CPR auf, neun Frauen zeigten ein pathologisches Flussprofil der A. uterina, bei zwei Feten wurde ein Wachstumsarrest festgestellt, bei 23 Schwangeren ein Oligohydramnion und bei neun Feten eine KU/AU-Diskrepanz. Dennoch gibt es Einschränkungen der vorliegenden Definitionskriterien: Das Nichterreichen des genetisch vorgegebenen Wachstumspotenzials kennzeichnet die IUGR. Liegt das genetisch determinierte Geburtsgewicht auf der 90. P, das tatsächliche Geburtsgewicht jedoch auf der 30. P, ist das Wachstumspotenzial nicht erreicht, ohne dass der Fetus über die vorliegende Definition als wachstumsretardiert eingestuft wird. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Feten fälschlicherweise als gesund eingestuft und trotz bestehender IUGR in die CTRL-Gruppe eingeschlossen wurden.

Die in dieser Arbeit verwendete Definition der IUGR erhebt nicht den Anspruch auf Allgemeingültigkeit. Sie unterscheidet sich geringfügig von der Definition der 2017 erstmals veröffentlichten Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Die DGGG definiert zwei Hauptkriterien: ein fetales Schätzwert unterhalb der 10. P und/oder ein im Verlauf nicht perzentilengerechtes Wachstum. Für die Diagnosestellung einer IUGR muss lediglich eines der beiden Hauptkriterien zwingend bestätigt sein und mit mindestens einem der Zusatzkriterien kombiniert auftreten. So können auch wachstumsretardierte Feten oberhalb der 10. P erfasst werden. Da nach Einschätzung der eigenen Arbeitsgruppe hierin aber eine zu große Unsicherheit zu sehen ist, die zwar klinisch sinnvoll, aber für eine

wissenschaftliche Studie zur Pathophysiologie unzureichend ist, wurden Neugeborene mit einem Gewicht >10 P aus der IUGR-Gruppe ausgeschlossen.

Ein pathologisches Wachstum wird in der vorliegenden Arbeit durch einen Wachstumsabfall bzw. eine Perzentilenflucht um >40 P innerhalb von 4 Wochen definiert. Solch eine klare Definition gibt es bei den DGGG-Kriterien nicht, wodurch die Einschätzung einer Wachstumsverlangsamung einen Interpretationsspielraum zulässt und an Objektivität verliert – eine Stärke der Definition dieser Arbeit.

Eine fetale Asymmetrie als Ausdruck einer fetalen Minderversorgung mit „brain-sparing“ wird in den Leitlinien der DGGG nicht einbezogen. Ein erhöhter PI oder ein ARED der A. umbilicalis gehen signifikant häufiger mit einem Shunt über den fetalen Ductus venosus einher, wodurch der Blutfluss zum Gehirn der Blutversorgung des Abdomens vorgezogen wird (Kiserud *et al.*, 2006). Auch wenn daraus häufig eine fetale Asymmetrie mit erhöhtem KU/AU-Verhältnis resultiert, sollte diese unabhängig von dem dopplersonographischen Flussprofil betrachtet werden.

Beide Definitionen beziehen eine pathologische Dopplersonographie als Zusatzkriterium ein. Die vorliegende Arbeit arbeitet mit einem erhöhten RI oberhalb der 95. P oder einem ARED in der A. umbilicalis als Zusatzkriterium. Die Dopplersonographie der Aa. uterinae wird in der vorliegenden Arbeit nicht gewichtet. Für die DGGG sind die Aa. uterinae von Bedeutung. Welche Pathologie jedoch nachgewiesen sein muss, ist nicht klar definiert. Ebenso fehlt in den DGGG-Kriterien eine einheitliche Definition des Oligohydramnions, welches als Zusatzkriterium gilt. Es wird die Bestimmung mittels SDP empfohlen (Leitlinienprogramm der DGGG, 2016). Die Arbeitsgruppe um PD Dr. Pecks arbeitet mit einem AFI <6cm als Ausdruck eines Oligohydramnions. Ein großer Vorteil der DGGG-Kriterien ist die Berücksichtigung der IUGR-Feten oberhalb der 10. P, wohingegen die Zusatzkriterien der vorliegenden Arbeit weniger Interpretationsspielraum zulassen. Dennoch ist im Hinblick auf die Übertragbarkeit eine Anpassung der IUGR-Definition der Arbeitsgruppe an die gültigen Leitlinien der DGGG sinnvoll. Um innerhalb des Gesamtprojektes einheitlich zu arbeiten und die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten in Beziehung setzen zu können, wurde hierauf jedoch zunächst bewusst verzichtet.

	vorliegende Arbeit	DGGG 2017
fetales Gewicht <10. P	<u>Hauptkriterium</u>	<u>Hauptkriterium</u> fetales Schätzwert

	pränatal gemessen, postnatal bestätigt	
Wachstum	<u>Zusatzkriterium</u> Wachstumsabfall/ Perzentilenflucht von >40 P innerhalb 4 Wochen	<u>Hauptkriterium</u> im Verlauf nicht perzentilengerecht
fetale Asymmetrie	<u>Zusatzkriterium</u> KU/AU-Ratio >95. P	-
Dopplersonographie	<u>Zusatzkriterium</u> A. umbilicalis: RI >95. P oder ARED	<u>Zusatzkriterium</u> A. umbilicalis ODER Aa. uterinae pathologische Dopplersonographie
Oligohydramnion	<u>Zusatzkriterium</u> AFI <6cm	<u>Zusatzkriterium</u> nicht näher definiert

Tabelle 4: Gegenüberstellung der Definitionskriterien für eine Intrauterine Wachstumsrestriktion in der vorliegenden Arbeit und in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG: Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, P: Perzentile, KU/AU: Kopf-zu-Abdominalumfang-Verhältnis, A.: Arteria, RI: Resistance Index, ARED: absent or reversed enddiastolic blood flow, Aa.: Arteriae, AFI: Amnion Fluid Index)

Probengewinnung

Um die Konzentration fetaler Cholesterolsynthesemetabolite zu bestimmen, wurde postpartal innerhalb von 15 Minuten venöses Nabelschnurblut abgenommen. Die Entnahme erfolgte im Zuge der Routineentnahme zur Bestimmung von pH-Wert, Sauerstoff- sowie Kohlenstoffdioxid-Partialdruck und Sauerstoffkonzentration. Nach Perkins et al. unterscheiden sich die Konzentrationen der Blutfettwerte Cholesterol, Triglyceride, LDL- und HDL-Cholesterol im venösen Nabelschnurblut nicht signifikant von denen im arteriellen Nabelschnurblut (Perkins, Livesey and Belcher, 1993). Lütjohann et al. zeigen, dass ebenfalls die Sterole 24S-Hydroxycholesterol und 27-Hydroxycholesterol ohne signifikanten Unterschied im venösen und arteriellen Nabelschnurblut vorliegen. 24S-Hydroxycholesterol kommt, ähnlich wie Desmosterol, bevorzugt im fetalen Gehirn vor, während 27-Hydroxycholesterol, ähnlich wie Lanosterol, Dihydrolanosterol und Lathosterol, im gesamten fetalen Körper vertreten ist (Lütjohann *et al.*, 2010). Da die Nabelschnurarterie ein geringes Blutvolumen aufweist, welches im geburtshilflichen Management bereits zur Bestimmung des Säure-Basen-Status genutzt wird ('Betreuung von gesunden reifen Neugeborenen in der Geburtsklinik. Leitlinie der DGGG, DGKJ, DGPM, dem Deutschen Hebammenverband und der GNPI', 2012), entschieden wir uns für die Verwendung von venösem Nabelschnurblut, das zudem ein deutlich höheres Volumen aufweist.

Probenaufbereitung und -analyse

Um ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen zu vermeiden, wurden die Blutproben innerhalb von 24 Stunden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Diese Arbeit wurde von mehreren Laboranten und Doktoranden nach einem klar definierten Arbeitsprotokoll ausgeführt, sodass die Probenaufbereitung eine hohe Qualität aufweist.

Um metabolische Synthesewege zu untersuchen, wird typischerweise die Konzentration des Endprodukts des Pathways bestimmt. Lanosterol dient als Marker für den Mevalonsäure-Weg und Desmosterol repräsentiert den Fluss über den Bloch-Pathway. Zur Analyse des Kandutsch-Russell-Pathways wurde Dihydrolanosterol als Repräsentant des ersten Syntheseschrittes und Lathosterol als vorletztes Synthesemetabolit bestimmt. Durch die getrennte Bestimmung von Ein- und Ausfluss des Kandutsch-Russell-Pathways konnte auch untersucht werden, ob ein Übertritt von Metaboliten vom Bloch- zum Kandutsch-Russell-Pathway im Sinne eines modifizierten Kandutsch-Russell-Pathways Einfluss auf die Ergebnisse nimmt.

Im maternalen und fetalen Blut wurden die Konzentrationen von Cholesterol, Triglyceriden, HDL- und LDL-Cholesterol mittels enzymatisch kolorimetrischem Testverfahren bestimmt. Die Analyse erfolgte standardisiert im Zuge der Routine-Untersuchung bei geburtshilflicher Aufnahme in der jeweiligen Klinik und ist hoch valide. Somit kann ein relevanter Unterschied der Messgenauigkeit aufgrund verschiedener Testverfahren weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Analyse fetaler Sterole erfolgte ausschließlich in der Universitätsklinik Bonn unter Aufsicht von Professor Lütjohann. Die adäquate Kühlung der Kieler Aliquots während des Transportes wurde mit Hilfe von Trockeneis sichergestellt. Die fetalen Konzentrationen von TC wurden mittels GC-FID bestimmt, um die Konzentrationen der Cholesterolsynthesemetabolite in ein Verhältnis setzen zu können. Diese wurden mit einer GC-MS im SIM-Modus bestimmt. Ein selektives Ionenmonitoring ist möglich, da das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis der zu detektierenden Stoffe bekannt ist. Im Hinblick auf die Selektivität ist dieses Analyseverfahren den Alternativverfahren überlegen, da Signale durch irrelevante Inhaltsstoffe der Probe unterdrückt werden (Jenden and Cho, 1979). Ein alternatives Analyseverfahren stellt die GC-MS im Full-Scan-Modus dar. Hierbei werden alle Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Probe angegeben und somit nicht nur die zu analysierenden Sterole erfasst. Daraus ergibt sich eine geringere Selektivität im Vergleich zur MS-SIM (Harris and Werner, 2014).

Die GC-MS ist ein spezifisches Verfahren, welches auch bei strukturell ähnlichen Stoffen eine eindeutige Detektion ermöglicht. Jedoch ist es über die Zeit wenig stabil, sodass die Standardkurven regelmäßig angepasst werden müssen, wodurch die Validität sinken kann (Mackay *et al.*, 2014). Zudem ist eine Analyse mittels GC-FID möglich, sodass sich die Analyseverfahren von TC und Synthesemetaboliten gedeckt hätten. Diese ist jedoch weniger spezifisch und besonders im Hinblick auf Lanosterol fehleranfällig. Die Stabilität der Untersuchung ist der der GC-MS hingegen überlegen (Mackay *et al.*, 2014). Ein optimales Analyseverfahren würde der parallele Ablauf von GC-MS und GC-FID darstellen, da hierbei die Spezifität der GC-MS mit der Stabilität der GC-FID kombiniert wird (Mackay *et al.*, 2014).

Charakteristika der Studienkohorten

Ein Qualitätsmerkmal der vorliegenden Studie ist die klare Abgrenzung von IUGR- zu SGA-Feten. Diese zeigt sich auch darin, dass sich die Mittelwerte für maternale Größe und Gewicht zwischen IUGR und CTRL nicht signifikant unterscheiden. Da die maternale Größe einer der wichtigsten Determinanten des kindlichen Geburtsgewichts ist (Gardosi, J.; Chang, A.; Kalyan, B.; Sahota, D.; Symonds, 1992), kann dies als ein indirekter Hinweis dafür gewertet werden, dass ein pathologisches Ereignis dem niedrigen Geburtsgewicht zugrunde liegt und somit konstitutionell kleine Feten weitestgehend ausgeschlossen sind. Andere Parameter, die das fetale Gewicht maßgeblich beeinflussen, sind durch Gardosi eingehend beschrieben und werden in den durch ihn entwickelten angepassten Perzentilen berücksichtigt (Gardosi, J.; Chang, A.; Kalyan, B.; Sahota, D.; Symonds, 1992). Dies sind insbesondere der Einfluss von fetalem Geschlecht, maternaler Größe und Gewicht, ethnischer Zugehörigkeit und Parität. Auch nach Anwendung der individualisierten Perzentile nach Gardosi liegt das Geburtsgewicht weit unter der 10. Perzentile, was unterstreicht, dass es sich bei der Fallgruppe in dieser Studie um „echte“ IUGR-Feten handelt.

In einer 1987 von Kramer veröffentlichten Zusammenfassung von 30 Studien über den Zusammenhang von Rauchen während der Schwangerschaft und fetalem Untergewicht zeigt sich, dass ein maternaler Nikotinkonsum signifikant mit einer Wachstumsrestriktion assoziiert ist (Kramer, 1987). Aus diesem Grund erfolgte die Paarung der CTRL- und IUGR-Feten mit dem Ziel, möglichst geringe Unterschiede im maternalen Rauchstatus zu verzeichnen. In der vorliegenden Studie besteht daher kein signifikanter Unterschied zwischen CTRL- und IUGR-Gruppe in Bezug auf den

maternalen Rauchstatus während der Schwangerschaft. Innerhalb des Probandenkollektivs konnten demnach normotrophe Feten rauchender Mütter gefunden werden, die nicht nur im Hinblick auf das fetale Geschlecht, sondern auch auf die Schwangerschaftswoche bei Geburt mit IUGR-Feten übereinstimmen. Dies erklärt sich unter anderem über die erhöhte Frühgeburtsrate durch Nikotinabusus (Ion, 2015). Leider wurde nicht konsequent erfragt, in welcher Phase der Schwangerschaft Nikotin konsumiert wurde. Es gibt jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter bei Nikotingebrauch und dem fetalen Geburtsgewicht: Ein Rauchstopp zum Ende des 4. Schwangerschaftsmonats geht mit einem annähernd normalen Geburtsgewicht einher (Butler, Goldstein and Ross, 1972). Eine Reduktion des Nikotinkonsums während der Schwangerschaft führt zu einer Zunahme des Geburtsgewichtes (Sexton and Hebel, 1984). Die Anzahl der konsumierten Zigaretten wurde jedoch nicht erfasst. Es besteht die Möglichkeit, dass die Probandinnen der CTRL-Gruppe häufiger den Zigarettenkonsum im Schwangerschaftsverlauf reduziert oder innerhalb der ersten vier Schwangerschaftsmonate mit dem Rauchen aufgehört und somit ein normalgewichtiges Kind zur Welt gebracht haben. Auch ein arterieller Hypertonus geht vermehrt mit einer Wachstumsrestriktion einher (Ankumah and Sibai, 2017; Panaitescu *et al.*, 2017). In der vorliegenden Studie galt ein Hypertonus als Ausschlusskriterium für die CTRL-Kohorte, sodass sich die Prävalenz zwischen den Studienkohorten definitionsgeschuldet signifikant unterscheidet. Die Rate an wachstumsrestringierten Feten ist in der ersten Schwangerschaft erhöht (Kramer, 1987). Auch in der vorliegenden Studie hatten Frauen in der ersten Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für IUGR-Feten.

Die maternalen Cholesterol- und HDL- und LDL-Cholesterolkonzentrationen, welche mittels kolorimetrischen Enzymtests gemessen wurden, liegen in der CTRL-Gruppe signifikant höher. Daraus ergibt sich ein Zusammenhang aus maternalem Cholesterolangebot und fetalem Wachstum, wie er auch in vorangegangenen Studien beschrieben wird (Pecks, Brieger, *et al.*, 2012; Pecks, Rath, Kleine-Eggebrecht, *et al.*, 2016). Dieser Zusammenhang wird in der vorliegenden Studie bewusst nicht berücksichtigt, da lediglich die Rolle der fetalen Cholesterolsynthese beleuchtet werden soll. Die fetalen Blutkonzentrationen der abgebildeten IUGR-Feten liegen für Cholesterol um 28,9 %, für HDL-Cholesterol um 49,5 % und für LDL-Cholesterol um 31,2 % niedriger als in der CTRL-Gruppe, woraus sich signifikante Unterschiede ergeben.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war ein Vergleich fetaler Cholesterolsynthese-Interbolite von IUGR-Feten mit nicht-wachstumsretardierten Feten. Um die verschiedenen Synthesepathways getrennt voneinander begutachten zu können, wurden Cholesterolsynthesemetabolite im venösen Nabelschnurblut bestimmt. Hierbei dient Lanosterol, welches als Endprodukt des Mevalonsäure-Pathways entsteht, zur Beurteilung des ersten, gemeinsamen Abschnitts der Cholesterolsynthese. Aus Lanosterol entsteht über den Bloch-Pathway Desmosterol, sodass dies als Zeichen der Syntheseproduktivität des Bloch-Pathways dient. Außerdem entsteht aus Lanosterol über den Kandutsch-Russell-Pathway zunächst Dihydrolanosterol und im Verlauf Lathosterol, sodass mittels dieser beiden Metabolite der Ein- und Ausfluss des Kandutsch-Russell-Pathways beurteilt werden kann.

Mevalonsäure-Pathway

Bereits die Konzentration von Lanosterol als Ausdruck des Mevalonsäure-Pathways liegt bei IUGR-Feten um durchschnittlich 31 % niedriger als in der CTRL-Gruppe, womit auf eine Störung bereits zu Beginn der Cholesterolsynthese geschlossen werden kann. Zu diskutieren ist eine reduzierte Leberfunktion als auslösender Mechanismus. IUGR-Feten mit einem erhöhten PI der A. umbilicalis weisen signifikant häufiger einen Shunt über den Ductus venosus auf, sodass nährstoffreiches Blut an der Leber vorbei zum Hirn transportiert wird (Kiserud *et al.*, 2006). Die Leber als Hauptsyntheseort für fetales Cholesterol bleibt daraus resultierend minderentwickelt, wodurch die Syntheserate sinkt. Dieser Regulationsmechanismus führt zu einer regelrechten Hirnentwicklung, erkennbar an einem regulären KU, im Vergleich zu einer reduzierten Entwicklung des Körpers, erkennbar an einem reduzierten AU. Jones *et al* haben zudem festgestellt, dass in der Leber von IUGR-Feten die Gene für die HMG-CoA-Reduktase und HMG-CoA-Synthetase-1, welche im Mevalonsäure-Pathway geschwindigkeitsbestimmend sind, herunterreguliert sind (Jones *et al.*, 2019). Auch dies ist ein Hinweis auf eine Leberfunktionsstörung bei IUGR-Feten, welche zu einer erniedrigten Cholesterolsyntheserate führt.

Bloch-Pathway

Obwohl die Cholesterolkonzentration bei IUGR-Feten signifikant erniedrigt ist, unterscheidet sich die Desmosterolkonzentration zwischen den beiden Studiengruppen nicht. Das Verhältnis von Cholesterolmetabolit zu TC zeigt die Aktivität eines Pathways auf (Olkkonen, Gylling and Ikonen, 2017). Das Verhältnis von Desmosterol zu TC ist in der IUGR-Gruppe mit 25 % signifikant höher als in der CTRL-Gruppe, woraus auf eine höhere Aktivität des Bloch-Pathways oder einen verminderten Umsatz von Desmosterol zu Cholesterol bei IUGR-Feten geschlossen werden kann. Im Hinblick auf die reduzierte Aktivität der Mevalonsäure- und Kandutsch-Russell-Pathways, wird in der vorliegenden Arbeit am ehesten von einer kompensatorisch erhöhten Aktivität des Bloch-Pathways ausgegangen. Der Bloch-Pathway ist während der fetalen Entwicklung besonders im Hirn aktiv (Fumagalli, 1963). Eine erhöhte Aktivität kann ein Hinweis sein, dass hierüber die Versorgung des fetalen Gehirns mit Cholesterol sichergestellt wird. Die Effektivität der kompensatorischen Erhöhung spiegelt sich in der ausgeglichenen Desmosterolkonzentration zwischen den Studiengruppen wider. Dem IUGR-Fetus gelingt es folglich, trotz der verringerten Zufuhr von Lanosterol die ausreichende Desmosterolzufuhr zu sichern, um die Hirnentwicklung nicht zu gefährden. Es zeigt sich ein „brain-sparing“, welches in erster Linie mit einer asymmetrischen IUGR einhergeht (Campbell and Thoms, 1977). Eine symmetrische IUGR lässt sich durch diesen Mechanismus nicht erklären. Wie eingangs erwähnt, fanden Mitsche et al zudem heraus, dass der Bloch-Pathway besonders in Zeiten eines Cholesterol-Mangels aktiviert wird, welcher bei der IUGR vorliegt (Mitsche *et al.*, 2015). Unsere Erkenntnisse unterstützen diese Hypothese.

Kandutsch-Russell-Pathway

Die fetalen Cholesterolsynthesemetabolite Lathosterol und Dihydrolanosterol sind in der IUGR-Kohorte in um 30,3 % und 32,1 % erniedrigten Konzentrationen nachweisbar als in der CTRL-Kohorte. Daraus ergibt sich, dass der Fluss über den Kandutsch-Russell-Pathway bei IUGR-Feten reduziert ist. Die Aktivität des Pathways, gemessen an dem Quotienten von Dihydrolanosterol bzw. Lathosterol zu TC, unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Studiengruppen. Dies lässt auf eine unbeeinträchtigte Enzymaktivität schließen, sodass ein anderer Mechanismus für die verminderte Sterolkonzentration verantwortlich sein muss. Denkbar wäre, dass die reduzierten

Lanosterolkörper am ehesten dem Bloch-Pathway zugeführt werden, um die Hirnentwicklung zu sichern, wodurch der Zufluss des Kandutsch-Russell-Pathways verringert ist. Interessant wären weiterführende Untersuchungen, welche die Aktivität der 24-Dehydrocholesterol-Reduktase, welche Lanosterol zu Dihydrolanosterol umwandelt, bei IUGR-Feten im Vergleich zu CTRL-Feten untersucht.

Mittels Regressionsanalyse lässt sich der Einfluss der Gestationswoche auf die Sterolkonzentration berechnen. Laut Baardman et al. nimmt der Kandutsch-Russell-Pathway im Verlauf einer physiologischen Schwangerschaft an Bedeutung zu (Baardman *et al.*, 2012). In der vorliegenden Studie zeigt sich eine steigende Dihydrolanosterolkonzentration in der CTRL- und eine weitestgehend konstante Konzentration in der IUGR-Kohorte. Die Lathosterolkonzentration hingegen zeigt sich in der CTRL-Gruppe im Verlauf abnehmend, bei IUGR-Feten zunehmend. Es kann darauf geschlossen werden, dass eine alternative Quelle für die Lathosterolsynthese bestehen muss. Dies kann für das Vorliegen eines modifizierten Kandutsch-Russell-Pathways im Fetus sprechen (Mitsche *et al.*, 2015). Mitsche et al. vermuten hierbei, dass bei einer Überexpression der 24-Dehydrocholesterol-Reduktase Sterole des Bloch-Pathways durch diese zu Sterolen des Kandutsch-Russell-Pathways umgewandelt werden, sodass der Fluss über den Kandutsch-Russell-Pathway zunimmt. Eine andere Erklärung wäre eine Akkumulation von Lathosterol aufgrund eines reduzierten Umsatzes zu Cholesterin durch die 7-Dehydrocholesterol-Reduktase, welche auch für die Umsetzung von 7-dehydrodesmosterol zu Desmosterol verantwortlich ist. Aufgrund einer erhöhten Aktivität des Bloch-Pathways bei der IUGR wäre eine Ausschöpfung des Enzyms denkbar, weshalb vermehrt Lathosterol im Blut anfällt, welches nicht zu Cholesterin umgesetzt wird.

Konfounder/Residuen

Innerhalb der Studiengruppen wurden anhand bekannter Konfounder (Kramer, 1987) Untergruppen gebildet und verglichen. Dies geschah mit dem Ziel, im Anschluss mittels Residualanalysen die Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Sterole, unabhängig von einer Beeinflussung durch Störfaktoren, darstellen zu können. Für das fetale Geschlecht ergab sich kein signifikanter Unterschied der Metabolitkonzentrationen innerhalb der Studiengruppen. Die Aktivität des Bloch-Pathways liegt sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen IUGR-Feten höher als in der entsprechenden CTRL-Subgruppe. Die vorliegenden Ergebnisse lassen keinen

geschlechtsspezifischen Unterschied der Sterolkonzentration vermuten. Aufgrund der Erkenntnisse vorangegangener Studien wurde dennoch eine Residualanalyse für das fetale Geschlecht durchgeführt (Lawlor *et al.*, 2005; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2015; Fornes *et al.*, 2017).

Hingegen ergibt sich auch in dieser Arbeit ein zu berücksichtigender Unterschied in Bezug auf das Gestationsalter bei Entbindung. Die Konzentrationen von Lanosterol und Lathosterol bei Geburt bis zur 34. SSW liegen bei CTRL-Feten um 65,6 % und 64,2 % höher als in der IUGR-Kohorte. Die Aktivität des Mevalonsäure- sowie des Kandutsch-Russell-Pathways liegen bei IUGR-Feten, die nach der 34. SSW geboren werden, höher als bei jenen, die vor der 34. SSW geboren werden. Zwischen den beiden Studienkohorten zeigt sich kein Unterschied. Die Aktivität des Bloch-Pathways liegt in der IUGR-Kohorte sowohl bei Geburt bis zur 34. SSW als auch danach höher als in der CTRL-Gruppe.

Rauchen gilt als einer der wichtigsten Einflussfaktoren auf das fetale Wachstum (Figueras *et al.*, 2008), sodass mittels Residualanalyse zunächst ausschließlich der Einfluss von Nikotinkonsum auf die Sterolkonzentrationen herausgerechnet wird. Dabei zeigt sich, dass die Blutspiegel von TC, Lanosterol, Dihydrolanosterol und Lathosterol in der CTRL-Kohorte signifikant höher liegen als bei IUGR-Feten. Auch nach der Residualanalyse bestehen weiterhin signifikant höhere TC-, Lanosterol und Lathosterolkonzentrationen in der CTRL-Gruppe. Der Unterschied in Bezug auf Dihydrolanosterol liegt mit $p=0,051$ minimal über dem gesetzten Signifikanzniveau von $p=0,05$. Daraus lässt sich schließen, dass Residuen besonders den Kandutsch-Russell-Pathway beeinflussen, während der Fluss über den Bloch-Pathway bei der IUGR konstant gehalten werden kann. Abraham *et al.* fassten multiple Arbeiten zur fetalen Wachstumsrestriktion bei rauchenden Müttern von 1987 bis 2013 zusammen. Hier zeigte sich, dass im zweiten Trimester der fetale Kopfumfang sowie die fetale Femurlänge und im dritten Trimester die fetale Femurlänge und das fetale Gewicht bei Feten rauchender Mutter signifikant reduziert sind (Abraham *et al.*, 2017).

Besonders die beeinflussbaren Faktoren, maternaler BMI und maternaler Rauchstatus, sollten bei Risiko-Schwangerschaften optimiert werden. So zeigt sich beispielsweise in der Review von Abraham *et al.*, dass die Feten von Müttern, welche vor oder zu Beginn der Schwangerschaft das Rauchen aufgaben im Vergleich zu Feten von Nichtraucher-Müttern, kein signifikant erniedrigtes Wachstum aufweisen. Insgesamt gibt es bisher leider wenige Arbeiten, welche den Einfluss der wichtigsten

Konfounder auf die Cholesterolsynthese des Fetus untersuchen. Hier besteht ein dringender Bedarf an weiterführenden Arbeiten.

4.3 Einschränkungen der Studie

Die vorliegende Studie beleuchtet die fetale Rolle in der Entstehung einer IUGR. Da eine multifaktorielle Genese anzunehmen ist, können maternale und plazentare Parameter betrachtet werden. Im Zuge der Probengewinnung wurden sowohl maternale Blutproben als auch plazentare Gewebeproben gesammelt, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren und in anschließenden Studien ausgewertet werden können.

Mittels Paarung der IUGR-Feten mit CTRL-Feten anhand des fetalen Geschlechts und des Gestationsalters bei Entbindung werden unabhängige Einflussfaktoren ausgeschlossen. Optimalerweise sollten die Kohorten-Paare einzeln verglichen werden, anstatt Mittelwerte zu bilden. Auch wenn Residual- und Regressionsanalysen zur Verfügung stehen, sind diese theoretischen Berechnungen anfällig für Fehler. Es sollten innerhalb der Paare individuelle Ergebnisse erzielt und auf Übertragbarkeit geprüft werden.

Da sich die Definition der IUGR in der vorliegenden Studie von der Definition der aktuellen DGGG-Leitlinien unterscheidet, kann die Übertragbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt sein. Dies gilt besonders für IUGR-Feten mit einem Geburtsgewicht oberhalb der 10. P, die in der vorliegenden Arbeit nicht in der IUGR-Kohorte abgebildet werden. Eine Anpassung der Definitionskriterien ist für folgende Studien sinnvoll.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet eine Grundlage für Folgestudien, welche die fetale Rolle in der Pathogenese der IUGR noch näher betrachten sollten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die erniedrigten Cholesterolspiegel bei IUGR-Feten aufgrund einer reduzierten fetalen Cholesterolsyntheserate bestehen. Es muss weiterführende Untersuchungen geben, welche die Unterschiede der Aktivität von Mevalonsäure-, Bloch- und Kandutsch-Russell-Pathways zwischen Feten mit asymmetrischer und symmetrischer IUGR untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass eine asymmetrische Form der IUGR, welche den Hauptanteil der Erkrankung

ausmacht, aufgrund einer bevorzugten Zufuhr des reduzierten Lanosterols zugunsten des Bloch-Pathways entsteht. Die Genese der reduzierten Cholesterolvere bei der symmetrischen Form der IUGR bleibt jedoch nicht endgültig geklärt.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich neue Erkenntnisse in Bezug auf die Pathogenese der IUGR. Eine asymmetrische IUGR entsteht am ehesten auf dem Boden einer plazentaren Insuffizienz (Gruenwald, 1966). Diese kann sich beispielsweise bei einer Präeklampsie entwickeln, bei der es zu Atherosklerose-ähnlichen Veränderungen der Plazentagefäßen kommt. Neue Therapiekonzepte der Präeklampsie bringen daher Statine als Cholesterolsenker zum Einsatz (Staff *et al.*, 2014). Im Hinblick auf die bestehenden Zusammenhänge von Präeklampsie und Plazentainsuffizienz sowie Plazentainsuffizienz und reduzierter fetaler Cholesterolsyntheserate, ist dieser Therapieansatz kritisch zu hinterfragen. Eine Präeklampsie definiert sich durch einen arteriellen Hypertonus in Verbindung mit einem Endorganschaden, wobei auch eine Plazentainsuffizienz und IUGR als solch einer gelten. Bei den 22,5 % der IUGR-Mütter in der vorliegenden Studie, die während der Schwangerschaft einen Hypertonus aufwiesen, kann demnach eine Präeklampsie diagnostiziert werden. Daraus ergibt sich die hohe Relevanz dieser kritischen Hinterfragung. Eine zusätzliche Senkung des maternalen Cholesterolangebots reduziert das Angebot dem Fetus gegenüber und könnte auf diesem Wege eine Wachstumsrestriktion verstärken.

Zudem zeigt sich, dass der Kandutsch-Russell-Pathway durch maternales Rauchverhalten und durch den BMI beeinflusst wird. Es muss geprüft werden, ob durch eine Optimierung der Einflussfaktoren das fetale Wachstum optimiert werden kann. Der Bloch-Pathway hingegen wird autonom durch den Fetus reguliert und entgeht daher dem Einfluss von außen. Ein regulierendes Eingreifen in den fetalen Cholesterolsyntheseweg kann einen Therapieansatz für die IUGR darstellen.

5. Zusammenfassung

Bei der Intrauterinen Wachstumsrestriktion erreicht der Fetus sein genetisch vorgegebenes Wachstumspotenzial nicht. Obwohl diese Erkrankung bis zu 8 % der Schwangerschaften verkompliziert, konnte die Pathogenese bisher nicht endgültig geklärt werden. In vorangegangenen Arbeiten wurden erniedrigte Cholesterolspiegel im Blut wachstumsrestringierter im Vergleich zu normotrophen Feten festgestellt. Mit dem Ziel die fetale Rolle in der Entstehung der Intrauterinen Wachstumsrestriktion zu beleuchten, entstand die vorliegende Arbeit auf dem Boden der Hypothese, dass eine reduzierte fetale Cholesterolsyntheserate ursächlich für die niedrige Cholesterolkonzentration ist.

Zur Prüfung der aufgestellten Vermutung wurden die Konzentrationen von Cholesterolsynthesemetaboliten im venösen Nabelschnurblut von 40 Kontroll-Feten mit denen von 40 wachstumsverzögerten Feten verglichen. Dabei dienten Lanosterol als Repräsentant des Mevalonsäure-Pathways, Dihydrolanosterol und Lathosterol zur Beurteilung des Kandutsch-Russell-Pathways und Desmosterol als Vertreter des Bloch-Pathways. Um die Aktivität der Synthesewege zu beurteilen, wurden die Sterole in Verhältnis zu der Gesamtcholesterolkonzentration gesetzt. Zum Ausschluss von Störfaktoren erfolgten zudem Residualanalysen im Hinblick auf das fetale Geschlecht, die Schwangerschaftswoche bei Entbindung, den maternalen Body-Mass-Index, die Parität und dem maternalen Rauchstatus.

Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die reduzierten Cholesterolkonzentrationen bei der Intrauterinen Wachstumsrestriktion aufgrund einer reduzierten fetalen Cholesterolsyntheserate bestehen. Hierbei sind besonders der Mevalonsäure- sowie der Kandutsch-Russell-Pathway, welche im größten Ausmaß in der fetalen Leber vertreten sind, in ihrer Aktivität herabgesetzt. Der Bloch-Pathway hingegen, welcher während der fetalen Entwicklung besonders im Hirn aktiv ist, ist in seiner Aktivität im Vergleich zu normotrophen Feten erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass der Fetus bei einem geringen Angebot von Lanosterol, welches aufgrund einer reduzierten fetalen Leberfunktion bei plazentarer Insuffizienz bestehen kann, die Zufuhr zugunsten des Bloch-Pathways reguliert. Folglich kann eine ausreichende Versorgung des Gehirns mit Cholesterol erreicht und die Entstehung neurologischer Entwicklungsstörungen verringert werden. Im Hinblick auf

Therapieverfahren, die einen regulierenden Einfluss auf die fetale Cholesterolsynthese nehmen, sollte es weiterführende Studien geben.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham, M. *et al.* (2017) "A systematic review of maternal smoking during pregnancy and fetal measurements with meta-analysis," *PLoS ONE*, 12(2), pp. 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0170946.
- Ankumah, N.E. and Sibai, B.M. (2017) "Chronic Hypertension in Pregnancy : Diagnosis , Management , and Outcomes," 60(1), pp. 206–214.
- Baardman, M.E. *et al.* (2012) "The origin of fetal sterols in second-trimester amniotic fluid: Endogenous synthesis or maternal-fetal transport?," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 207(3), pp. 202.e19-202.e25. doi:10.1016/j.ajog.2012.06.003.
- Bais, J.M.J. *et al.* (2004) "Effectiveness of detection of intrauterine growth retardation by abdominal palpation as screening test in a low risk population : an observational study," 116, pp. 164–169. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.01.037.
- Barker, D.J.P. *et al.* (2009) "Growth and chronic disease : findings in the Helsinki Birth Cohort," 4460. doi:10.1080/03014460902980295.
- Baschat, A.A. (2004) "Doppler application in the delivery timing of the preterm growth-restricted fetus: another step in the right direction.," *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 23, pp. 111–118.
- Baschat, A.A. *et al.* (2007) "Predictors of Neonatal Outcome in Early-," 109(2), pp. 253–261.
- Baschat, A.A. *et al.* (2013) "Hematologic profile of neonates with growth restriction is associated with rate and degree of prenatal Doppler deterioration," (December 2012), pp. 66–72. doi:10.1002/uog.12322.
- Baschat, A.A., R, H.C. and U, G. (1997) "Haematological consequences of placental insufficiency," p. 1989.
- "Betreuung von gesunden reifen Neugeborenen in der Geburtsklinik. Leitlinie der DGGG, DGKJ, DGPM, dem Deutschen Hebammenverband und der GNPI" (2012), pp. 1–14.
- Bloch, K. (1964) "The biological synthesis of cholesterol," *Nobel Lecture* [Preprint].
- Boelen, M.R. *et al.* (2016) "Correlation between Doppler flow patterns in growth-restricted fetuses and neonatal circulation," (September 2015), pp. 210–216. doi:10.1002/uog.15744.
- Bower, S., Schuchter, K. and Campbell, S. (1993) "Doppler ultrasound screening as part of routine antenatal scanning: prediction of pre-eclampsia and intrauterine growth retardation," *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 100(11), pp. 989–994. doi:10.1111/j.1471-0528.1993.tb15139.x.
- Bundesausschuss, G. (2016) "Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien")."
- Burjonrappa, S.C., Crete, E. and Bouchard, S. (2009) "The role of amniotic fluid in influencing neonatal birth weight," *Journal of Perinatology*, 30(1), pp. 27–29. doi:10.1038/jp.2009.102.

- Burke, K.T. *et al.* (2009) "Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster.," *Journal of lipid research*, 50(6), pp. 1146–55. doi:10.1194/jlr.M800538-JLR200.
- Butler, N.R., Goldstein, H. and Ross, E.M. (1972) "Cigarette Smoking in Pregnancy : Its Influence on Birth Weight and Perinatal Mortality," *British Medical Journal*, 2, pp. 127–130.
- Campbell, S. (1974) "Fetal Growth.," *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 1(1), pp. 41–65.
- Campbell, S. and Thoms, A. (1977) "Ultrasound Measurement of the Fetal Head to Abdomen Circumference Ratio in the Assessment of Growth Retardation," *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 84(March).
- Carr, B.R. and Simpson, E.R. (1982) "Cholesterol synthesis in human fetal tissues," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55(5), pp. 447–452.
- Cetin, I. and Alvino, G. (2009) "Intrauterine Growth Restriction: Implications for Placental Metabolism and Transport. A Review," *Placenta*, 30(SUPPL.), pp. 77–82. doi:10.1016/j.placenta.2008.12.006.
- Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K. and Ellinger, I. (2018) "Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis , Transport and Metabolism in the Human Placenta," *frontiers in Pharmacology*, 9, pp. 1–29. doi:10.3389/fphar.2018.01027.
- Chauhan, S.P. *et al.* (2007) "Intrauterine Growth Restriction and Oligohydramnios among High-Risk Patients," *American Journal of Perinatology*, 24, pp. 215–221. doi:10.1055/s-2007-972926.
- Chauhan, S.P. *et al.* (2014) "Prenatal Detection of Fetal Growth Restriction in Newborns Classified as Small for Gestational Age : Correlates and Risk of Neonatal Morbidity," *American Journal of Perinatology*, 31, pp. 187–194.
- Coban, E., Bostan, F. and Ozdogan, M. (2006) "The mean platelet volume in subjects with impaired fasting glucose," *Platelets*, 17(1), pp. 67–69. doi:10.1080/09537100500220729.
- David, J. and McCarthy, J. (1988) "Congenital Malformations and Intrauterine Growth Retardation : A Population Study Mum," *Pediatrics*, 82(1), pp. 83–90.
- Dennick RG, Dean PD, A. DA (1973) "Desmosterol levels in human foetal brain--a reassessment.," 20(November 1972), pp. 1293–1294.
- Diedrich, K. *et al.* (2007) *Gynäkologie und Geburtshilfe, Journal of Chemical Information and Modeling*. Springer Medizin Verlag Heidelberg. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Donald, D. *et al.* (1999) "BIRTH WEIGHT IN RELATION TO MORBIDITY AND MORTALITY AMONG NEWBORN INFANTS," *The New England Journal of Medicine* [Preprint].
- Dudenhausen, J.W. and Maier, R.F. (2010) "Perinatale Probleme von Mehrlingen," *Deutsches Ärzteblatt*, 107(38), pp. 663–669. doi:10.3238/arztebl.2010.0663.
- Emmanuel Bujold, Stéphanie Roberge, Yves Lacasse, Marc Bureau, F. and Audibert, Sylvie Marcoux, Jean-Claude Forest, Y.G. (2010) "Prevention of Preeclampsia and Intrauterine," 116(2), pp. 402–414.

- Ernst, S.A. *et al.* (2017) "Care-Related and Maternal Risk Factors Associated with the Antenatal Nondetection of Intrauterine Growth Restriction : A Case-Control Study from Bremen , Germany," *BioMed Research International* [Preprint].
- Figueras, F. *et al.* (2008) "Association of smoking during pregnancy and fetal growth restriction : Subgroups of higher susceptibility," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 138, pp. 171–175. doi:10.1016/j.ejogrb.2007.09.005.
- Fok, R. *et al.* (1990) "The Correlation of Arterial Lesions With Umbilical Artery Doppler Velocimetry in the Placentas of Small-for-Dates Pregnancies," *Obstetrics & Gynecology*, 75(4), pp. 578–583.
- Fornes, D. *et al.* (2017) "Sex-dependent changes in lipid metabolism, PPAR pathways and microRNAs that target PPARs in the fetal liver of rats with gestational diabetes," *Molecular and Cellular Endocrinology* [Preprint]. doi:10.1016/j.mce.2017.08.004.
- Friesen, R. and Innis, S.M. (2019) "Maternal dietary fat alters amniotic fluid and fetal intestinal membrane essential n-6 and n-3 fatty acids in the rat." doi:10.1152/ajpgi.00257.2005.
- Fuchs, T.A. *et al.* (2010) "Extracellular DNA traps promote thrombosis," *PNAS*, 107(36), pp. 15880–15885. doi:10.1073/pnas.1005743107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005743107.
- Fumagalli, R. and P.R. (1963) "THE IDENTIFICATION AND SIGNIFICANCE OF DESMOSTEROL," pp. 291–295.
- Gardosi, J. *et al.* (2013) "Maternal and fetal risk factors for stillbirth : population," 108(January), pp. 1–14. doi:10.1136/bmj.f108.
- Gardosi, J.; Chang, A.; Kalyan, B.; Sahota, D.; Symonds, E.M. (1992) "Customised antenatal growth charts," *The Lancet*, pp. 283–287.
- Gonzalez-Bulnes, A. *et al.* (2015) "Fetal Sex Modulates Developmental Response to Maternal Malnutrition," *PLoS ONE*, 10, pp. 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0142158.
- Gortner, L., Weiner, C.P. and Harman, C.R. (2000) "Absent Umbilical Artery End-Diastolic Velocity in Growth-Restricted Fetuses : A Risk Factor for Neonatal Thrombocytopenia," 96(2), pp. 162–166.
- Gruenwald, P. (1966) "Growth of the human fetus: I. Normal growth and its variation," *The American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 94(8), pp. 1112–1119. doi:10.1016/0002-9378(66)90774-5.
- Haave, N.C. and Innis, S.M. (2001) "Cholesterol Synthesis and Accretion Within Various Tissues of the Fetal and Neonatal Rat," 50(1), pp. 12–18. doi:10.1053/meta.2001.19498.
- Hadlock, F.P. *et al.* (1984) "Estimating Fetal Age: Computer- Assisted Analysis of Multiple Fetal Growth Parameters," *Radiology*, 152, pp. 497–501. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hadlock, F.P. *et al.* (1990) "Sonographic fetal growth standards. Are current data applicable to a racially mixed population?," *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 9(3), pp. 157–160.

- Harris, D.C. and Werner, T. (2014) *Lehrbuch der Quantitativen Analyse, Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. doi:10.1007/978-3-642-37788-4_24.
- Hecher, K. *et al.* (2001) "Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: a longitudinal study," pp. 564–570.
- Herrera, E. and Desoye, G. (2016) "Maternal and fetal lipid metabolism under normal and gestational diabetic conditions," *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 26(2), pp. 109–127. doi:10.1515/hmbci-2015-0025.
- Hodel, M.B.T. (2013) "Die intrauterine Wachstumsrestriktion," *Thema Frauenklinik Luzern* [Preprint], (11).
- Ion, R. (2015) "Smoking and Preterm Birth," 22(8), pp. 918–926. doi:10.1177/1933719114556486.
- Jenden, D.J. and Cho, A.K. (1979) "Selected ion monitoring in pharmacology.," *Biochemical Pharmacology*, 28, pp. 705–713.
- Jin, W.-Y. *et al.* (2016) "Associations between maternal lipid profile and pregnancy complications and perinatal outcomes: a population-based study from China," *BMC Pregnancy and Childbirth*, 16(1), p. 60. doi:10.1186/s12884-016-0852-9.
- Johnson, L. *et al.* (2011) "Genetic and Environmental Influences on Infant Growth : Prospective Analysis of the Gemini Twin Birth Cohort," *PLoS ONE*, 6(5), pp. 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0019918.
- Jones, A.K. *et al.* (2019) "Differential effects of intrauterine growth restriction and a hypersulinemic-isoglycemic clamp on metabolic pathways and insulin action in the fetal liver," *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 316(5), pp. R427–R440. doi:10.1152/ajpregu.00359.2018.
- Jurevics, H.A., Kidwai, F.Z. and Morell, P. (1997) "Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs," *Journal of Lipid Research*, 38, pp. 723–733.
- Kandutsch, A.A. and Russell, A.E. (1959) "Preputial Gland Tumor Sterols: I. The occurrence of 24, 25-Dihydrolanosterol and a comparison with liver and the normal gland," *The Journal of Biological Chemistry*, 234(8).
- Kandutsch, A.A. and Russell, A.E. (1960a) "Preputial Gland Tumor Sterols: II. The identification of 4a-Methyl-d8-Cholesten-3b-ol," *The Journal of Biological Chemistry*, 235(8).
- Kandutsch, A.A. and Russell, A.E. (1960b) "Preputial Gland Tumor Sterols: III. A Metabolic Pathway from Lanosterol to Cholesterol," *The Journal of Biological Chemistry*, 235(8).
- Kehl, S. *et al.* (2016) "Single deepest vertical pocket or amniotic fluid index as evaluation test for predicting adverse pregnancy outcome (SAFE trial): a multicenter , open-label , randomized controlled trial," *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47, pp. 674–679. doi:10.1002/uog.14924.

- Kiserud, T. *et al.* (2006) "Ductus venosus shunting in growth-restricted fetuses and the effect of umbilical circulatory compromise," *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 28(2), pp. 143–149. doi:10.1002/uog.2784.
- Kramer, M.S. (1987) "Determinants of low birth weight : methodological assessment and meta-analysis," *Bulletin of the World Health Organization*, 65(5), pp. 663–737.
- Kush, M.L. *et al.* (2004) "Venous Doppler in the prediction of acid-base status of growth-restricted fetuses with elevated placental blood flow resistance." doi:10.1016/j.ajog.2003.11.028.
- Lawlor, D.A. *et al.* (2005) "Sex Differences in the Association Between Birth Weight and Total Cholesterol . A Meta-Analysis," *Annals of Epidemiology*, 16(1), pp. 19–25. doi:10.1016/j.annepidem.2005.04.006.
- Leitlinienprogramm der DGGG, O. und S. (2016) "Leitlinien zur Intrauterinen Wachstumsrestriktion."
- Lin, C., Sheikh, Z. and Lopata, R. (1990) "The association between oligohydramnion and IUGR.pdf," *The American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 76, pp. 1100–1104.
- Lütjohann, D. *et al.* (2002) "Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain," 43. doi:10.1194/jlr.M200071-JLR200.
- Lütjohann, D. *et al.* (2004) "High doses of simvastatin , pravastatin , and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs," 69, pp. 431–438. doi:10.1016/j.steroids.2004.03.012.
- Lütjohann, D. *et al.* (2010) "Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24S-hydroxycholesterol," *Acta Paediatrica*, 90(6), pp. 652–657. doi:10.1111/j.1651-2227.2001.tb02429.x.
- Lynen, F. (1964) "The pathway from 'activated acetic acid' to the terpenes and fatty acids," *Nobel Lecture* [Preprint].
- Mackay, D.S. *et al.* (2014) "Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis," *Journal of Chromatography B*, 957, pp. 116–122. doi:10.1016/j.jchromb.2014.02.052.
- Madsen, E.M. *et al.* (2004) "Human Placenta Secretes Apolipoprotein B-100-containing Lipoproteins," 279(53), pp. 55271–55276. doi:10.1074/jbc.M411404200.
- Mandrizzato, G. *et al.* (2008) "Intrauterine restriction (IUGR)," *Journal of Perinatal Medicine*, 36(4), pp. 277–281. doi:10.1515/JPM.2008.050.
- Marret, S. *et al.* (2013) "Brain Injury in Very Preterm Children and Neurosensory and Cognitive Disabilities during Childhood : The EPIPAGE Cohort Study," *PLoS ONE*, 8(5), pp. 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0062683.
- Mayer, C. and Joseph, K.S. (2013) "Fetal growth : a review of terms , concepts and issues relevant to obstetrics," 1(May 2012), pp. 136–145. doi:10.1002/uog.11204.

- Merzouk, H. *et al.* (1998) "Low birth weight at term impairs cord serum lipoprotein compositions and concentrations," *European Journal of Pediatrics*, 157(4), pp. 321–326. doi:10.1007/s004310050820.
- Miranda, J. *et al.* (2017) "Prediction of fetal growth restriction using estimated fetal weight vs a combined screening model in the third trimester," (December 2016), pp. 603–611. doi:10.1002/uog.17393.
- Mitsche, M.A. *et al.* (2015) "Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways," pp. 1–21. doi:10.7554/eLife.07999.
- Mongelli, M., Ek, S. and Tambyrajia, R. (1998) "Screening for Fetal Growth Restriction : A Mathematical Model of the Effect of Time Interval and Ultrasound Error," *American College of Obstetrics & Gynecologists*, 7844(98), pp. 908–912.
- Morales-Roselló, J.; Khalil, A. (2015) "Fetal cerebral redistribution: a marker of compromise regardless of fetal size," pp. 385–388. doi:10.1002/uog.15664.
- Morrow, R.J. *et al.* (1989) "Effect of placental embolization on the umbilical arterial velocity waveform in fetal sheep," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(4), pp. 1055–1060. doi:10.1016/0002-9378(89)90783-7.
- Mutka, A. *et al.* (2004) "Secretion of Sterols and the NPC2 Protein from Primary Astrocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47), pp. 48654–48662. doi:10.1074/jbc.M405345200.
- Nabhan, A.F. and Abdelmoula, Y.A. (2009) "Amniotic fluid index versus single deepest vertical pocket : A meta-analysis of randomized controlled trials," *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 104, pp. 184–188. doi:10.1016/j.ijgo.2008.10.018.
- Nagano, N. *et al.* (2013) "Insulin-like growth factor-1 and lipoprotein profile in cord blood of preterm small for gestational age infants," *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(6), pp. 507–512. doi:10.1017/S2040174413000408.
- Neu, N., Duchon, J. and Zachariah, P. (2016) "TORCH Infections," *Clinics in Perinatology*, 42(1), pp. 77–103. doi:10.1016/j.clp.2014.11.001.
- Olkkonen, V.M., Gylling, H. and Ikonen, E. (2017) "Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: Minute concentrations—Major physiological effects," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 169, pp. 4–9. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.026.
- Palinski, W. (2009) "Maternal – Fetal Cholesterol Transport in the Placenta: Good, Bad, and Target for Modulation," *Circulation Research*, pp. 569–571. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.194191.
- Pallotto, E.K. and Kilbride, H.W. (2006) "Perinatal Outcome and Later Implications of Intrauterine Growth Restriction," *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 49(2), pp. 257–269.
- Panaïtescu, A.M. *et al.* (2017) "Chronic hypertension and adverse pregnancy outcome : a cohort study," (April), pp. 228–235. doi:10.1002/uog.17493.

Parker, C.R. *et al.* (1995) "Dynamics of the fetal adrenal , cholesterol , and apolipoprotein B responses to antenatal betamethasone therapy," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(2), pp. 562–565.

Pecks, U., Brieger, M., *et al.* (2012) "Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction," *Journal of Perinatal Medicine*, 40(3), pp. 287–296. doi:10.1515/jpm.2011.135.

Pecks, U., Caspers, R., *et al.* (2012) "The Evaluation of the Oxidative State of Low-Density Lipoproteins in Intrauterine Growth Restriction and Preeclampsia," (2), pp. 156–165. doi:10.3109/10641955.2010.544805.

Pecks, U., Rath, W., Maass, N., *et al.* (2016) "Fetal gender and gestational age differentially affect PCSK9 levels in intrauterine growth restriction," *Lipids in Health and Disease*, 15(1), p. 193. doi:10.1186/s12944-016-0365-6.

Pecks, U., Rath, W., Kleine-Eggebrecht, N., *et al.* (2016) "Maternal Serum Lipid, Estradiol, and Progesterone Levels in Pregnancy, and the Impact of Placental and Hepatic Pathologies Mütterlicher Lipid-, Estradiol-und Progesteronspiegel in der Schwangerschaft in Abhängigkeit von Plazenta-und Leberpathologien," *Maternal Serum Lipid, ... Geburtsh Frauenheilk*, 76, pp. 799–808. doi:10.1055/s-0042-107078.

Pecks, U., Maass, N. and Neulen, J. (2011) "Eizellspende - Ein Risikofaktor für Schwangerschaftshochdruck - eine Metaanalyse und Fallserie," *Deutsches Arzteblatt*, 108(3), pp. 23–31. doi:10.3238/arztebl.2011.0023.

Peebles, D. and Kenyon, A. (2011) "Magnesium Sulphate to Prevent Cerebral Palsy following Preterm Birth," *Scientific Impact Paper* [Preprint], (29).

Perkins, S.L., Livesey, J.F. and Belcher, J. (1993) "Reference intervals for 21 clinical chemistry analytes in arterial and venous umbilical cord blood," *Clinical Chemistry*, 39(6), pp. 1041–1044.

Pitkin, R.M. *et al.* (1972) "Cholesterol Metabolism and Placental Transfer in the Pregnant Rhesus Monkey Find the latest version : Cholesterol Metabolism and Placental Transfer in the Pregnant Rhesus Monkey," *The Journal of Clinical Investigation*, 51(10), pp. 2584–2592.

Platt, M.J. *et al.* (2007) "Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (< 1500 g) or born prematurely (< 32 weeks) in 16 European centres : a database study," *The Lancet*, 369, pp. 43–50.

Pollack, R.N. and Divon, M.Y. (1992) "Intrauterine growth restriction: definition, classification and etiology," pp. 99–107.

Richardson, B. *et al.* (1996) "Human Placental Tissue Expresses a Novel 22 . 7 kDa Apolipoprotein A-I-like," 2960(95), pp. 7580–7585. doi:10.1021/bi9526950.

Richardus, J.H. *et al.* (2003) "Differences in perinatal mortality and suboptimal care between 10 European regions : results of an international audit B," *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 110, pp. 97–105.

- Rindler, M.J. *et al.* (1991) "Synthesis and Secretion of Apolipoprotein E by Human Placenta and Choriocarcinoma Cell Lines," pp. 615–624.
- Rossi, M. *et al.* (2015) "Radiographic features of the skeleton in disorders of post-squalene cholesterol biosynthesis," *Pediatric Radiology*, 45(7), pp. 965–976. doi:10.1007/s00247-014-3257-9.
- Schneider, H.Dr. med., Husslein, P.Prof.Dr. med. and Schneider, K.-T.M.Dr. med. (2006) *Die Geburtshilfe*. 3rd edn. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Schünke, M. *et al.* (2011) *Prometheus LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Georg Thieme Verlag.
- Sexton, M. and Hebel, J.R. (1984) "A Clinical Trial of Change on in Maternal Smoking and Its Effect Birth Weight," *JAMA*, 251(7), pp. 911–915.
- Sharpe, L.J. and Brown, A.J. (2013) "Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)," *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), pp. 18707–18715. doi:10.1074/jbc.R113.479808.
- Society for Maternal-Fetal Medicine and Simpson, L.L. (2013) "Twin-twin transfusion syndrome," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 208(1), pp. 3–18. doi:10.1016/j.ajog.2012.10.880.
- Spencer, J.A.D. *et al.* (1997) "Third trimester fetal growth and measures of carbohydrate and lipid metabolism in umbilical venous blood at term," *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, 76(1). doi:10.1136/fn.76.1.F21.
- Spinillo, A. *et al.* (2015) "Placental lesions associated with oligohydramnios in fetal growth restricted (FGR) pregnancies," *Placenta*, 36(5), pp. 538–544. doi:10.1016/j.placenta.2015.02.007.
- Staff, A.C. *et al.* (2014) "Preeclampsia and uteroplacental acute atherosclerosis: Immune and inflammatory factors," *Journal of Reproductive Immunology*, 101–102(1), pp. 120–126. doi:10.1016/j.jri.2013.09.001.
- Steiner, H.Dr. med. and Schneider, K.-T.M.Dr. med. (2008) *Dopplersonographie in Geburtshilfe und Gynäkologie*. 2nd edn. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Strauss, A. (2017) *Ultraschallpraxis in Geburtshilfe und Gynäkologie*.
- Trudinger, B.J. *et al.* (1985) "Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance : clinical significance," *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 92(January), pp. 23–30.
- Turley, S.D. *et al.* (1996) "Brain does not utilize low density lipoprotein-cholesterol during fetal and neonatal development in the sheep," *Journal of Lipid Research*, 37, pp. 1953–1961.
- Vianey-Saban, C. *et al.* (2016) "Antenatal manifestations of inborn errors of metabolism: biological diagnosis," *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 39(5), pp. 611–624. doi:10.1007/s10545-016-9947-8.
- Voigt, M., Schneider, K. and Jährig, K. (1996) "Analyse des Geburtsgutes des Jahrgangs 1992 der Bundesrepublik Deutschland," *Geburtshilfe und ...*, pp. 550–558. doi:10.1055/s-2007-1023283.

- Waldorf, K.M.A. and Mcadams, R.M. (2013) "Influence of infection during pregnancy on fetal development," *Reproduction*, 146, pp. 151–162. doi:10.1530/REP-13-0232.
- Wang, J.X. *et al.* (1994) "The obstetric outcome of singleton pregnancies following in-vitro fertilization / gamete intra-Fallopian transfer," *Human Reproduction*, 9(1), pp. 141–146.
- Wollmann, H.A. (1998) "Intrauterine growth restriction: definition and etiology," *Hormone Research*, 49(2), pp. 1–6.
- Woollett, L.A. (2005) "Maternal cholesterol in fetal development: Transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation," *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(6), pp. 1155–1161. doi:10.1016/j.placenta.2011.01.011.
- Woollett, L.A. (2011) "Review : Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation," *Placenta*, 32, pp. S218–S221. doi:10.1016/j.placenta.2011.01.011.
- Wyne, K.L. and Woollett, L.A. (1998) "Transport of maternal LDL and HDL to the fetal membranes and placenta of the Golden Syrian hamster is mediated by receptor-dependent and receptor-independent processes," 39, pp. 518–530.
- Zolotushko, J. *et al.* (2011) "The desmosterolosis phenotype : spasticity , microcephaly and micrognathia with agenesis of corpus callosum and loss of white matter Clinical evaluation," *European Journal of Human Genetics*, 19, pp. 942–946. doi:10.1038/ejhg.2011.74.

7. Anhang

7.1 Aufklärung der Probandinnen

Version 1.1



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

Klinik Für Gynäkologie und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Studienprojektleiter: PD Dr. med. Ulrich Pecks
Arnold-Heller-Straße 3 (Haus 24), 24105 Kiel
Tel.: 0431 597-2041, Fax 0431 597-2146

Informationsblatt und Einverständniserklärung **für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material**

Titel der Studie:

**Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion,
Präeklampsie und Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus**

Sehr geehrte Patientin, Liebe werdende Eltern,

Ein wissenschaftlicher Schwerpunkt unserer Klinik ist die Erforschung der FETALEN WACHSTUMSRESTRIKTION. Dabei handelt es sich um eine Unterversorgung des ungeborenen Kindes deren Ursache weitgehend unbekannt ist. In vielen Fällen muss die Schwangerschaft durch eine vorzeitige Entbindung beendet werden, um schwerwiegende Schäden bis zum Tod des Kindes abzuwenden. Wachstumsverzögerungen können eigenständig auftreten oder sich im Rahmen einer GESTOSE (volkstümlich „Schwangerschaftsvergiftung“) oder DIABETES (Zuckerkrankheit) bemerkbar machen.

Um die Ursache der Erkrankung und die Bedeutung für das Neugeborene besser zu verstehen, untersuchen wir das Blut aus der Nabelschnur, die Nabelschnur selbst und den Mutterkuchen von betroffenen und nicht betroffenen Frauen nach der Entbindung. Im Einzelnen sollen Substanzen (Eiweiße, Fette, Kohlehydrate, Stoffwechselprodukte, Wachstumsfaktoren) in den Proben untersucht werden, an denen man diese Krankheit besonders gut erkennen kann, so genannte Krankheitsmarker. Weiter lassen sich Zellen oder auch ganze Gewebestücke in einer Kultur anlegen, um Einflüsse auf die lebende Zelle ermitteln zu können. Normalerweise wird der Mutterkuchen mit der Nabelschnur nach der Geburt vernichtet. Wir bitten Sie aber nun um die Erlaubnis, dieses Material in einer Gewebebank tiefgefroren sammeln und aufbewahren zu dürfen, bis es in den verschiedenen Forschungslaboratorien unserer Universität wissenschaftlich untersucht wird. Um auch die Entwicklung nach der Entbindung des Kindes abschätzen zu können, sind ein bis zwei Blutproben (jeweils bis zu zehn Tropfen) des Neugeborenen innerhalb von vier Wochen nach der Geburt vorgesehen, die jedoch ausschließlich im Rahmen von ohnehin medizinisch notwendigen Blutabnahmen gewonnen würden (zum Beispiel der Stoffwechselltest am dritten Tag). Von der werdenden Mutter benötigen wir ebenfalls ein bis zwei Blutproben (1 Röhrchen

Version 1.1



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

**Klinik Für Gynäkologie und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein**
Studienprojektleiter: PD Dr. med. Ulrich Pecks
Arnold-Heller-Straße 3 (Haus 24), 24105 Kiel
Tel.: 0431 597-2041, Fax 0431 597-2146

à 10 ml und ggf. ein weiteres im Schwangerschaftsverlauf, falls es nicht zu einer baldigen Entbindung kommt), um auch hier Einflüsse feststellen zu können.

Ferner möchten wir gerne erfahren, wie es ihrem Nachwuchs im weiteren Verlauf seines Lebens geht. Hierzu möchten wir Sie gerne um Erlaubnis bitten, Sie erneut kontaktieren zu dürfen.

In der geplanten Gewebebank werden die gesammelten Gewebeteile und das Blut für alle wissenschaftlichen Untersuchungen mit einer Codenummer verschlüsselt (pseudonymisiert), so dass Ihre persönlichen Daten wie Name, Geburtsdatum, Adresse usw. bei den wissenschaftlichen Untersuchungen nicht mehr erkennbar sind. Das gesammelte Material geht in den Besitz des UKSH über und bleibt unbefristet verwahrt, um es im Rahmen und zum Zweck der oben genannten Studie gegebenenfalls für weitere Folgeuntersuchungen nutzen zu können. Dazu zählen auch Untersuchungen, die nicht am UKSH durchgeführt werden können. Hierzu ist es notwendig, die Proben pseudonymisiert (also ohne die Weitergabe persönlicher Daten) wissenschaftlichen Kooperationspartnern zur Verfügung zu stellen.

Für diese Studie benötigen wir außerdem einige Informationen über das Neugeborene, wie z. B. das Gewicht und den allgemeinen Zustand.

Wir möchten Sie darauf aufmerksam machen, dass sie einen persönlichen Nutzen aus der Teilnahme an der Studie nicht ziehen, Sie aber vielleicht anderen Patienten auf diesem Weg in Zukunft helfen können. Die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben beziehungsweise der Studie ist ganz und gar freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen ihr Einverständnis zur Teilnahme zurücknehmen ohne dass Ihnen hieraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Das Team der Universitätsfrauenklinik dankt für Ihre Mithilfe!

Kiel, im Juni 2016 *Ihr Priv.-Doc. Dr. med. Ulrich Pecks*

Ort, Datum, Unterschrift der verantwortlichen Ärzte

Einwilligungserklärung zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben

Titel der Studie: Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus

Ich bestätige hiermit, dass ich durch den behandelnden Arzt, Herrn/Frau Dr.
mündlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der beabsichtigten Studie aufgeklärt wurde
und für meine Entscheidung genügend Bedenkzeit hatte.

Ich habe die Patienteninformation gelesen, ich fühle mich ausreichend informiert und habe verstanden,
worum es geht. Mein Arzt hat mir ausreichend Gelegenheit gegeben, Fragen zu stellen, die alle für mich
ausreichend beantwortet wurden. Ich hatte genügend Zeit mich zu entscheiden

Meine Einwilligung, an diesem Forschungsvorhaben als Patient bzw. Proband teilzunehmen, erfolgt ganz
und gar freiwillig. Ich wurde darauf hingewiesen, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von
Gründen widerrufen kann, ohne dass mir dadurch irgendwelche Nachteile für meine weitere ärztliche
Behandlung und medizinische Versorgung entstehen.

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und dieser unterschriebenen Einwilligungserklärung erhalten.

Datenschutzerklärung:

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe wie in der
Information beschrieben

- personenbezogene Daten von mir erhebt und speichert,
- weitere Angaben über meine Gesundheit aus meinen Krankenunterlagen entnimmt,
- und die Daten gemeinsam mit meinen Biomaterialien pseudonymisiert (das heißt verschlüsselt) für
das genannte medizinische Forschungsvorhaben nutzt.

Die Biomaterialien (Gewebe der Nabelschnur und des Mutterkuchens sowie Blutproben) und Daten
dürfen unbefristet für medizinische Forschungsvorhaben verwendet werden. Sie dürfen
pseudonymisiert (also ohne die Nennung persönlicher Daten, wie der Name) an Universitäten,
Forschungsinstitute und forschende Unternehmen, ggf. auch im Ausland, zu Zwecken medizinischer
Forschung weitergegeben werden.

Ich habe weiter verstanden, dass in begrenztem Umfang Daten zu meinem Kind nach der Geburt
erhoben werden (Gewicht, Größe, Geschlecht, allgemeiner Zustand des Kindes). Ich bin damit
einverstanden, dass im Rahmen der Studie die personenbezogenen Daten meines Kindes (Name,
Geburtsdatum, Anschrift etc.) und die medizinischen Daten aufgezeichnet und pseudonymisiert (d.h.
ohne Namensnennung verschlüsselt) zur Auswertung der Ergebnisse verwendet werden.

Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden strikt vertraulich gemäß dem Datenschutz
behandelt. Einer wissenschaftlichen Auswertung der Daten und einer möglichen Veröffentlichung
der vollständig anonymisierten Ergebnisse stimme ich zu.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber der Klinik für Gynäkologie
und Geburtshilfe ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden auf
mein Verlangen die verbliebenen Biomaterialien und die erhobenen Daten vernichtet bzw. gelöscht
oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeführten Analysen können nicht mehr entfernt werden.

- Fortsetzung nächste Seite -

- Fortsetzung Einwilligungserklärung -

Ich willige hiermit ein, als Patient an dem Forschungsvorhaben **„Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus“** teilzunehmen.

Ich bin damit einverstanden, dass mein Blut/Mutterkuchen/Nabelschnur für die Erforschung der oben genannten Krankheit untersucht wird und persönliche und klinische Daten dazu erhoben werden.	Ja	Nein
Zur Geburt darf im Rahmen der Studie Blut aus der Nabelschnur entnommen werden.	Ja	Nein
Meinem Kind dürfen im Rahmen der Routineblutentnahme (z.B. Stoffwechselltest) bis zu zwei weiteren Blutproben (je 10 Tropfen) für die Studie entnommen werden.	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass die Proben in den Besitz des UKSH übergehen und für zukünftige Untersuchungen zu oben genannten Schwangerschaftserkrankungen aufbewahrt werden.	Ja	Nein
Falls ich meine Teilnahme widerrufe, dürfen die bis dahin einverständlich gesammelten Proben für die vorgesehenen Untersuchungen genutzt werden.	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass die Proben pseudonymisiert (also verschlüsselt und ohne Namensnennung) auch von anderen Forschern für Untersuchungen, die mit der Erforschung der oben genannten Krankheit zu tun haben, verwendet werden können.	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass Daten zu meinem Kind nach der Geburt erhoben werden (z. B. Geburtsgewicht und allgemeiner Zustand).	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der Studie für Nachfragen und Informationen zur weiteren Entwicklung meines Kindes Kontakt zu mir aufgenommen werden darf.	Ja	Nein

Telefonisch bin ich zu erreichen unter der Nummer: _____
 (nur wenn sie die letzte Frage mit „Ja“ beantwortet haben)

 Ort – Datum - Uhrzeit - Name der Patientin/Eltern in Druckschrift - Unterschrift

Grundsätzlich sind die Unterschriften **beider** Sorgeberechtigter notwendig. Liegt nur die Unterschrift eines Sorgerechthinhabers vor, versichert dieser gleichzeitig, dass dieser im Einverständnis des anderen handelt oder das alleinige Sorgerecht besitzt.

Ich habe den Patienten/ die werdenden Eltern mündlich über Wesen, Bedeutung, Reichweite und Risiken des Forschungsvorhabens (der Studie) aufgeklärt.

 Ort/Datum/Uhrzeit/Name des Arztes in Druckschrift/Unterschrift Arzt

- Fortsetzung Einwilligungserklärung -

Ich willige hiermit ein, als Patient an dem Forschungsvorhaben **„Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus“** teilzunehmen.

Ich bin damit einverstanden, dass mein Blut/Mutterkuchen/Nabelschnur für die Erforschung der oben genannten Krankheit untersucht wird und persönliche und klinische Daten dazu erhoben werden.	Ja	Nein
Zur Geburt darf im Rahmen der Studie Blut aus der Nabelschnur entnommen werden.	Ja	Nein
Meinem Kind dürfen im Rahmen der Routineblutentnahme (z.B. Stoffwechselltest) bis zu zwei weiteren Blutproben (je 10 Tropfen) für die Studie entnommen werden.	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass die Proben in den Besitz des UKSH übergehen und für zukünftige Untersuchungen zu oben genannten Schwangerschaftserkrankungen aufbewahrt werden	Ja	Nein
Falls ich meine Teilnahme widerrufe, dürfen die bis dahin einverständlich gesammelten Proben für die vorgesehenen Untersuchungen genutzt werden.	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass die Proben pseudonymisiert (also verschlüsselt und ohne Namensnennung) auch von anderen Forschern für Untersuchungen, die mit der Erforschung der oben genannten Krankheit zu tun haben, verwendet werden können.	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass Daten zu meinem Kind nach der Geburt erhoben werden (z. B. Geburtsgewicht und allgemeiner Zustand).	Ja	Nein
Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der Studie für Nachfragen und Informationen zur weiteren Entwicklung meines Kindes Kontakt zu mir aufgenommen werden darf.	Ja	Nein

Telefonisch bin ich zu erreichen unter der Nummer: _____
 (nur wenn sie die letzte Frage mit „Ja“ beantwortet haben)

 Ort – Datum - Uhrzeit - Name der Patientin/Eltern in Druckschrift - Unterschrift

Grundsätzlich sind die Unterschriften **beider** Sorgeberechtigter notwendig. Liegt nur die Unterschrift eines Sorgerechthinhabers vor, versichert dieser gleichzeitig, dass dieser im Einverständnis des anderen handelt oder das alleinige Sorgerecht besitzt.

Ich habe den Patienten/ die werdenden Eltern mündlich über Wesen, Bedeutung, Reichweite und Risiken des Forschungsvorhabens (der Studie) aufgeklärt.

 Ort/Datum/Uhrzeit/Name des Arztes in Druckschrift/Unterschrift Arzt

Name: _____ Datum: _____
 Geb-Datum: _____ Patientenkennnummer: _____
 Kennnummer Klinikum: _____ Diagnose(n): _____
 (Etikette) _____
 Gruppenzuordnung: _____

Anamnese:

FA: _____; ET: _____; FrühUS am: _____ mit SSL: _____ mm
 Z.n. HELLP _____ Z.n. Präeklampsie _____ Z.n. IUGR _____
 (bitte Jahreszahl mit angeben)

_____gravida _____para; Ethnische Gruppe: _____ Größe: _____ cm, Gewicht: _____ kg/vor SS: _____ kg

Nikotin: Zig/d _____ bis zur SSW: _____ **aktuelle Medikation:** _____

Nikotin vor SS: _____ Zig/d über _____ Jahre = _____ py _____

präexistente Hypertonie nein ja RDS-Prophylaxe: nein ja, am _____

präexistenter Diabetes melitus nein ja Diabetes Typ 1? ja Diabetes Typ 2? ja

andere (z.B. Stoffwechsel, Herz, Niere, Leber?) _____

Familienanamn. positiv für Herzerkr. nein ja Wer? Was? (RR, MI, Stroke) mit wie viel Jahren? _____

Familienanamn. positiv für Diabetes. nein ja Wer? Was? (Typ 1, Typ 2) mit wie viel Jahren? _____

RR: RR _____ / _____ bei zweimaliger Messung im Abstand von 4 Stunden (höchster Wert)

24-h-RR mittel _____ / _____ mmHg Tagesmittel RR _____ / _____ mmHg

24-h-RR max _____ / _____ mmHg Nachtmittel RR _____ / _____ mmHg

Z.Ztp. der Messung behandelt mit: _____

Urin: Dip-Stick Protein: 0 + ++ +++; 24-h-SU Protein: _____ mg/d, _____ mg/l, Vol: _____ ml

OGTT: _____ nüchtern: _____ mg% / 1h _____ mg% / 2h _____ mg%

Fetometrie: Datum: _____, Symmetrie: AU: _____ mm, KU: _____, FL: _____; AFI: _____ cm
 geschätztes Gewicht: _____ g Bemerkungen: _____

Aa. uterina -Doppler: Datum: _____ RI li: _____ Notch nein ja; RI re: _____ Notch nein ja

Fetale Zirkulation: Datum: _____ RI A. umbilicalis: _____ ARED nein ja; brain sparing: nein ja

Bemerkungen: _____

postpartal

Entbindung: in der _____ SSW, am _____, **Geburtsmodus:** spontan Sectio Eilige-/Notsectio

fetales Outcome: Gewicht _____ g, Lebendgeburt Todgeburt postpartal verstorben

Fehlbildung: _____ männlich weiblich

APGAR: ___/___/___, pH: _____; Bemerkungen: _____

Wochenbettverlauf: _____ RR: _____ / _____ mmHg

Material:

Datum/Zeit:	Mutter			Nabelschnurblut				Nabelschnur			Plazenta					
	Serum	Plasma	Urin	Serum	Plasma	Kryo	Paraffin	Kultur	Kryo	Paraffin	Kultur					
Standard:	Ja	nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein

Bemerkung: wenn Standard nicht erfüllt -> Abweichungen vom Standard hier notieren:

7.2 Ethikvotum

7.2.1 Ethikvotum Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanebergweg 20 · 24105 Kiel

PD Dr. med. Ulrich Pecks
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
UKSH Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 24
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 21. Dezember 2015

AZ.: B 315/15 (bitte stets angeben)

**Studienplan
Gesamtprojekt:** **Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus**
Anschreiben vom 15. Oktober 2015; Basisformular für einen Ethikantrag vom 15. Oktober 2015; Checkliste; Prüfplan des Gesamtprojekts vom 01. Juni 2011 mit Datenerhebungsbogen; Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material für Patienten/ Eltern (Gesamtprojekt); Einwilligungserklärung zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben Patient/ Eltern/ Sorgeberechtigter); Prüfplan des Teilprojektes;
Voten der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen vom 19.07.2011 und 04.12.2014

**Studienplan
Teilprojekt:** **Cholesterin-Efflux-Mechanismen und ihre Auswirkung auf angiogenetische Signalwege bei der fetalen Wachstumsrestriktion**

**Studienleiter und
Antragsteller:** **PD Dr. Ulrich Pecks, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH Campus Kiel**

In Kooperation mit: **Dr. Meike Bendiks, Neonatologische Abteilung Kinderklinik, UKSH Campus Kiel**

Antrag vom: **15. Oktober 2015**

Überarbeitung vom: **17. Dezember 2015**
Stellungnahme vom 17.12.2015 mit geändertem Informationsblatt und Einwilligungserklärung Version 1.1

Sehr geehrter Herr Kollege Pecks,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen nunmehr gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.

3. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass für eventuell in Zukunft weitere teilnehmende Zentren eine berufsrechtliche Beratung bei der jeweils für sie zuständigen Ethik-Kommission erforderlich ist.

4. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** die Studie vor Beginn der Rekrutierung in einer öffentlich zugänglichen Datenbank registriert werden. Wir empfehlen die Registrierung im Deutschen Register für Klinische Studien (www.drks.de).

5. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mendorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.2.2 Ethikvotum Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

**ETHIK-KOMMISSION AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER RHEINISCH-WESTFÄLISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN**
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen - Tel. 0241-80 89 963 – FAX 0241-80 82 012
E-Mail: ekaachen@ukaachen.de

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät
der RWTH Aachen – Pauwelsstr. 30 – D - 52074 Aachen

Herrn
Dr. med. Ulrich Pecks
Frauenklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
im Hause

Aachen, den 19.07.2011

nachrichtlich an:

Herrn Prof. Dr. med. N. Maass, Direktor der Frauenklinik für Gynäkologie und
Geburtshilfe, im Hause

Schmal/nl

Betreff:

EudraCT-Nr.: -
Protokoll-Nr.: -
Titel: „Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner
Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und
Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus.“
Sponsor: -
Antragsteller: Dr. med. Ulrich Pecks, Frauenklinik für Gynäkologie und
Geburtshilfe, Universitätsklinikum der RWTH Aachen,
Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen
LKP: -
Lokaler Hauptprüfer: Dr. med. Ulrich Pecks, s.o.
Internes Aktenzeichen: EK 154/11

Hier: Anschreiben zum Votum


Sehr geehrter Herr Dr. Pecks,

Sie haben bezüglich der o. g. Studie um eine Beratung durch die Ethik-Kommission an
der hiesigen Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen gebeten.

Als Anlage übersende ich Ihnen das Votum mit der Bitte um Kenntnisnahme.

Für das Forschungsvorhaben wünschen wir Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. G. Schmalzing
Vorsitzender

Anlage

**ETHIK-KOMMISSION AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER RHEINISCH-WESTFÄLISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE AACHEN**
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen - Tel. 0241-80 89 963 – FAX 0241-80 82 012
E-Mail: ekaachen@ukaachen.de

VOTUM

zu dem Forschungsantrag

EudraCT-Nr.: -
Protokoll-Nr: -
Titel: „Das atherogene Potential bei Feten nach Intrauteriner Wachstumsrestriktion, Präeklampsie und Gestationsdiabetes/ Diabetes mellitus.“
Sponsor: -
Antragsteller: Dr. med. Ulrich Pecks, Frauenklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen
LKP: -
Lokaler Hauptprüfer: Dr. med. Ulrich Pecks, s.o.
Internes Aktenzeichen: **EK 154/11**

vom 01.06.11 und vom 19.07.2011, eingegangen bei der Ethik-Kommission am 21.06.11 und am 19.07.2011 mit folgenden Unterlagen:

- Anschreiben vom 01.06.2011
- Checkliste
- Antragsformular
- Prüfplan vom 01.06.2011
- Datenerhebungsbogen
- Patienteninformation
- Einwilligungserklärung
- Lebenslauf von Dr. med Ulrich Pecks
- Zertifikat Prüfarzt Dr. med Ulrich Pecks
- Lebenslauf von Dr. med Nele Freerksen

Der Antrag wurde unter Beteiligung von Herrn Professor Dr. med. G. Schmalzing als Vorsitzenden und den Mitgliedern Proffs. Dr. U. Büll, Dr. G. Jakse, Dr. R. Osieka sowie Kanzler a.D. Keßler, Dr. G. Souvignier beraten und wie folgt bewertet:

Gegen das Forschungsvorhaben sind aus ethischer und berufsrechtlicher Sicht keine Bedenken zu erheben.

Die Bewertung ist für folgende Prüferin/Prüfer und Prüfstelle gültig:

Prüfstelle:

- Frauenklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum der RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen

Prüfer:

- Dr. med. Ulrich Pecks
- Dr. med. Nele Freerksen

Für dieses Votum gelten die nachfolgenden Auflagen und Empfehlungen (von deren Erfüllung die Wirksamkeit der positiven Bewertung abhängt):

1. Auflagen:

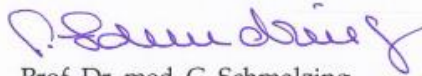
- a. Die Ethik-Kommission bittet darum, Mitteilungen über schwerwiegende und unerwartete unerwünschte Ereignisse, die während der Studie auftreten und welche die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten, zu übersenden, mit einer Stellungnahme, ob sich damit die Nutzen/Risiko-Relation des Forschungsvorhabens verändert hat.
- b. Ethisch relevante Änderungen im Prüfplan und in der Phase der Umsetzung sind der Kommission mitzuteilen; geänderte Passagen sollten deutlich kenntlich gemacht werden.
- c. Der Antragsteller hat sicherzustellen, dass die Akten und Unterlagen nach dem Abschluss des Vorhabens in seinem derzeitigen Arbeitsbereich verwahrt und ordnungsgemäß verwaltet werden.
- d. Die Ethik-Kommission empfiehlt den Abschluss einer Probandenversicherung/Wegeunfallversicherung, der Versicherungsschein sollte vor Studienbeginn eingereicht werden.

2. Hinweise:

- a. Es wird darauf hingewiesen, dass unabhängig vom Beratungsergebnis der Ethik-Kommission die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt.
- b. Die Ethik-Kommission sollte vom Ergebnis der Studie unterrichtet werden.

Im Falle einer Publikation der Ergebnisse könnte auch ein Sonderdruck eingereicht werden.

Aachen, den 19.07.2011



Prof. Dr. med. G. Schmalzing
Vorsitzender

Die Ethik-Kommission ist nach Landesrecht konstituiert und bei den zuständigen Landesbehörden, beim Bundesamt für Arzneimittel (BfArM) sowie beim Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) registriert. Sie berät unabhängig nach den Regeln des Weltärztebundes in der Deklaration von Helsinki über Forschung am Menschen in der Fassung von 1996 in Somerset West, nach nationalen Gesetzen, Vorschriften und der ICH-GCP-Leitlinie in der jeweils gültigen Fassung (siehe Homepage der Ethik-Kommission unter www.ethikkommission.ukaachen.de).

7.3 Publikationen

Pecks et al. *Lipids in Health and Disease* (2019) 18:185
<https://doi.org/10.1186/s12944-019-1117-1>

Lipids in Health and Disease

RESEARCH

Open Access

Estimating fetal cholesterol synthesis rates by cord blood analysis in intrauterine growth restriction and normally grown fetuses



Ulrich Pecks^{1*}, Verena Bornemann¹, Anika Klein¹, Laura Segger¹, Nicolai Maass¹, Ibrahim Alkatout¹, Christel Eckmann-Scholz¹, Mohamed Elessawy¹ and Dieter Lütjohann²

Abstract

Background: Cholesterol is an essential component in human development. In fetuses affected by intrauterine growth restriction (IUGR), fetal blood cholesterol levels are low. Whether this is the result of a reduced materno-fetal cholesterol transport, or due to low fetal de novo synthesis rates, remains a matter of debate. By analyzing cholesterol interbolites and plant sterols we aimed at deeper insights into transplacental cholesterol transport and fetal cholesterol handling in IUGR with potential targets for future therapy. We hypothesized that placental insufficiency results in a diminished cholesterol supply to the fetus.

Methods: Venous umbilical cord sera were sampled post-partum from fetuses delivered between 24 weeks of gestation and at full term. IUGR fetuses were matched to 49 adequate-for-age delivered preterm and term neonates (CTRL) according to gestational age at delivery. Cholesterol was measured by gas chromatography-flame ionization detection using 5 α -cholestane as internal standard. Cholesterol precursors and synthesis markers, such as lanosterol, lathosterol, and desmosterol, the absorption markers, 5 α -cholestanol and plant sterols, such as campesterol and sitosterol, as well as enzymatically oxidized cholesterol metabolites (oxysterols), such as 24S- or 27-hydroxycholesterol, were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry, using epicoprostanol as internal standard for the non-cholesterol sterols and deuterium labeled oxysterols for 24S- and 27-hydroxycholesterol.

Results: Mean cholesterol levels were 25% lower in IUGR compared with CTRL ($p < 0.0001$). Lanosterol and lathosterol to cholesterol ratios were similar in IUGR and CTRL. In relation to cholesterol mean, desmosterol, 24S-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol levels were higher by 30.0, 39.1 and 60.7%, respectively, in IUGR compared to CTRL ($p < 0.0001$). Equally, 5 α -cholestanol, campesterol, and β -sitosterol to cholesterol ratios were higher in IUGR than in CTRL (17.2%, $p < 0.004$; 33.5%, $p < 0.002$; 29.3%, $p < 0.021$).

Conclusions: Cholesterol deficiency in IUGR is the result of diminished fetal de novo synthesis rates rather than diminished maternal supply. However, increased oxysterol- and phytosterol to cholesterol ratios suggest a lower sterol elimination rate. This is likely caused by a restricted hepatobiliary function. Understanding the fetal cholesterol metabolism is important, not only for neonatal nutrition, but also for the development of strategies to reduce the known risk of future cardiovascular diseases in the IUGR fetus.

Keywords: IUGR, FGR, Fetal growth rates, Fetal nutrition, Placental sterol transfer rates

* Correspondence: Ulrich.Pecks@uksh.de

¹Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Schleswig-Holstein Campus Kiel, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Intrauterine growth restriction (IUGR) is a condition where the fetus does not reach its genetically determined growth potential [1, 2]. Affecting approximately 3–8% of all pregnancies it is a major cause of fetal mortality and morbidity; it is also generally considered an independent risk factor for the development of cardiovascular diseases (CVD) later in life [3–6]. Although its pathogenesis remains enigmatic, factors, such as disturbed blood perfusion of the placenta with events of hypoxia-reperfusion injury, increased oxidative stress, accumulation of oxidized LDL, atherogenic changes, and placental damage, have been suggested to play key roles in its etiology [7–9]. Consequently, the resulting “placental insufficiency” leads to fetal malnutrition. One component that is believed to play a decisive role in cellular growth and functionality - and in fetal development - is cholesterol. Cholesterol is the most important sterol in humans and, besides its function in membrane fluidity, it is also a precursor of bile acids and steroid hormones [10–14].

Various enzymatic defects at different stages of cholesterol biosynthesis have been reported and are linked to abnormal fetal development. The most common inborn error of cholesterol synthesis is the Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS), a 7-dehydrocholesterol- Δ^7 -reductase deficiency. Clinically, patients frequently present with structural abnormalities of the brain, the skeleton and the skin, underlining the important role of cholesterol in fetal development [15, 16].

In IUGR, cholesterol concentration in fetal blood is low [17–23]. In particular, the high-density lipoprotein (HDL) fraction, which is the main cholesterol acceptor and dominant lipoprotein in the fetus, is diminished by about 50% when compared to appropriately grown fetuses [17]. The cause (maternal, fetal, or placental origin) of the low fetal cholesterol concentration in IUGR is still a matter of debate. In general, the fetus synthesizes most of its cholesterol *de novo*, although it has been estimated that 20–50% of the fetal cholesterol originates from the mother and is transferred through the placenta by distinctive transport pathways [11, 16, 24, 25]. At the fetal side, cholesterol is released from the placenta to circulating acceptors, such as apolipoproteins, and native HDL particles [26]. The hypothesis of a relevant transplacental transport of cholesterol from the mother to the fetus is supported by the analysis of plant sterols. As plant sterols cannot be synthesized in humans, their blood concentration is dependent on ingestion or, in case of the fetus, solely on the amount transported from the mother through the placenta. Plant sterols use the same transport mechanisms as cholesterol and can be detected in relevant concentrations in amniotic fluid and umbilical cord blood [11, 27].

In this study, we measured biochemical markers of cholesterol biosynthesis, lanosterol, lathosterol, and

desmosterol, in venous umbilical cord sera of IUGR and normally grown fetuses. We also determined 5 α -cholestanol and the most prominent plant sterols, campesterol and β -sitosterol levels, assuming these to be valid markers to estimate materno-fetal cholesterol transport. Finally, we estimated oxysterol concentrations as a means of cholesterol catabolism.

We hypothesized that a diminished fetal cholesterol concentration is caused by a reduced maternal cholesterol supply as a consequence of placental insufficiency and disturbed transport pathways through the placenta.

Methods

Biomaterial for this case control study was sampled prospectively at the University Hospital of the RWTH Aachen, Germany. Patients were included between March 2008 and March 2012. Prior to the study, a power analysis was performed. Calculating the minimum required sample size on the basis of the fetal HDL cholesterol concentration, choosing a power (1– β -error) of 80% and a level of significance (α -error) below 0.05 for each group, IUGR and control group (CTRL), at least five patients had to be included in each group.

Clinical data were recorded at inclusion and following delivery. Gestational age was calculated by the last menstrual period and verified by first trimester scan documentation. Fetal cord blood was sampled immediately after birth and processed as described [17].

IUGR was diagnosed antenatally, as recently described, and defined in accordance with the guidelines of the American College of Obstetricians and Gynecologists and the German guidelines on IUGR [1, 2, 17] as an estimated fetal weight < 10th percentile, in addition to at least one of the following criteria: (1) deceleration of fetal growth rate > 40th percentile, (2) elevated resistance index in umbilical artery Doppler sonography above the 95th percentile, (3) head-to-abdominal circumference ratio > 95th percentile or (4) amniotic fluid index < 6 cm. Of the IUGR cases, 13 were additionally complicated by preeclampsia as defined by the ISSHP criteria [28]. IUGR was subgrouped into early-onset IUGR (detection and delivery before 34 weeks of gestation) and late-onset IUGR (detection and delivery at 34 weeks of gestation or later). Fetal and neonatal birth weight centiles were determined according to the population-based newborn weight charts [29]. Additionally, customized centiles were calculated by use of the online platform www.gestation.net (Gardosi J, Francis A. Customised weight centile calculator. GROWTH V6.7.6.11 (DE)).

A total of 299 patients giving birth at our University Hospital were enrolled during the study period. Of those, we identified 49 IUGR cases with sufficient serum volume to be used further for the scheduled investigation. Thirty-six of the IUGR fetuses needed mandatory

preterm delivery before 37 weeks of gestation (WOG). The IUGR cases were matched with CTRL as closely as possible for maternal age, gestational age, fetal gender, betamethasone administration, maternal smoking habits, and maternal body mass index (BMI). Neonatal weight in the CTRL group was within the 10th and 90th percentiles. Thirty-two of the 49 CTRL fetuses were born preterm before 37 WOG for various reasons (including premature rupture of the membrane, spontaneous onset of labor, and vaginal bleeding). None of the CTRL mothers suffered from hypertension or preeclampsia.

Exclusion criteria were defined as multiple gestation, fetal anomalies, abnormal fetal karyotype, patients with clinical or biochemical signs of infection, positive toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, herpes simplex, and HIV (TORCH) screening results, maternal diabetes mellitus/gestational diabetes or other severe maternal metabolic disorders, and the patient's withdrawal from the study. Sample storage times and conditions were equal for all groups.

Blood sampling, serum generation, and storage of aliquots

Blood samples (up to 4.9 mL each) were taken postnatally from a double-clamped umbilical cord vein using Monovette syringes (Serum 4.9 mL Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Germany). After incubation at room temperature for 15–30 min, samples were centrifuged at 2000 g for 15 min. Serum was aliquoted and stored at -80°C .

Basic serum lipid profiling

Analysis of serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), LDL- and HDL cholesterol was performed by colorimetric enzymatic methods using an automated photometric measuring unit (Roche/Hitachi Modular P800; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) as described [17].

Cholesterol, non-cholesterol sterols and oxysterols measurements

After thawing, butylated hydroxytoluene as radical scavenger (antioxidant) and 5α -cholestane, epicoprostanol, and deuterium labelled oxysterols were added as internal standards for the quantification of targets, respectively, to 100 μL of plasma. After alkaline hydrolysis, the free sterols and oxysterols were extracted using cyclohexane and silylated to their corresponding (di) trimethylsilyl ethers prior to gas chromatographic (GC) separation. Cholesterol was determined by flame-ionization detection (FID), the non-cholesterol sterols and oxysterols by selected-ion monitoring mass spectrometry (MS-SIM) as previously described in detail [30–32].

Statistics

nQuery Advisor 7.0 (Janet D. Elashoff (2007), CA, USA) was used for sample size calculation. Data analysis was

conducted using the Prism Version 6.0e Software (GraphPad Software Inc., CA, USA). Clinical data are presented as means \pm 95% CI or percentages. Analytical variables are expressed as median \pm 95% CI. A two-tailed Mann-Whitney test was conducted to compare the metric variables of the two groups. Values were adjusted for potential confounders (maternal age, BMI, parity, smoking status, weeks of gestation at delivery, and fetal stress response (umbilical artery pH)) by residual calculation. Subgroup analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's comparison for multiple testing. Fisher's exact test was used for categorical data. Correlations were analyzed by Spearman's correlation coefficient. Values of $p < 0.05$ were regarded as significant.

Results

Study population and basic lipid profile

Maternal and neonatal characteristics are summarized in Table 1. Gestational age at inclusion into the study, gestational age at delivery, mode of delivery, and neonatal gender were kept similar. Maternal age, pre-pregnancy BMI, and smoking status during pregnancy differed slightly, but were not significant between the study groups, while we found a significant proportion of patients in the CTRL group to be multiparous compared to the IUGR group. None of the CTRL group and 27% in the IUGR group were hypertensive during pregnancy. Neonatal birth weight, birth weight centiles, and umbilical artery pH were lower in the IUGR group than in the CTRL group. In the IUGR group, mean fetal TC and HDL cholesterol concentrations were 28 and 48% lower than in the CTRL group (Table 1).

Cholesterol

Cholesterol concentrations measured by GC-FID were virtually identical to those measured with the automated photometric measuring unit Modular P800 ($\rho = 0.9371$, $p < 0.0001$). Cholesterol concentration in the CTRL group decreases with ongoing gestational age at birth ($\rho = -0.451$; $p = 0.001$). This was not observed in the IUGR group ($\rho = -0.149$; $p = 0.306$) (Fig. 1a). When cholesterol concentrations were related to birth weights ((cholesterol (mmol/L)) / (birth weight (g))), no significant difference was detected between IUGR and CTRL fetuses in all gestational weeks at birth (Fig. 1b). Assuming that the fetal serum cholesterol concentration (mmol/L) mirrors fetal tissue cholesterol content (mmol/kg), the fetal body accumulates twice as much cholesterol during intrauterine development (calculated as cholesterol (mmol/L) * birth weight (kg)) in CTRL as in IUGR (Fig. 1c).

Table 1 Maternal and neonatal clinical characteristics and lipid concentrations

		CTRL (n = 49)		IUGR (n = 49)		p-value
		Mean or %	95% CI	Mean or %	95% CI	
Maternal age	(y)	32.0	(30.4–33.6)	29.6	(27.7–31.6)	0.065
Maternal height	(m)	1.66	(1.64–1.68)	1.65	(1.64–1.67)	0.654
Maternal weight b. p.	(kg)	63.7	(60.7–66.8)	68.8	(63.8–73.8)	0.085
Maternal BMI b. p.	(kg/m ²)	23.2	(22.1–24.3)	25.0	(23.4–26.6)	0.063
Maternal smoking status	(%)	24.5		36.7		0.192
Maternal primiparity	(%)	32.7		67.4		0.000
Maternal systolic BP	(mmHg)	117	(114–120)	129	(123–135)	0.000
Maternal diastolic BP	(mmHg)	67	(64–69)	76	(72–79)	0.000
Maternal hypertension	(%)	0.0		26.6		0.278
Maternal WOG at inclusion	(w)	33.4	(32.1–34.7)	32.6	(31.4–33.8)	0.360
Delivery WOG	(w)	33.9	(32.7–35.1)	33.6	(32.4–34.7)	0.705
Delivery mode: cesarean	(%)	81.6		83.7		0.792
Neonatal gender	(% female)	59.2		57.1		0.861
Neonatal birth weight	(g)	2246	(2000–2492)	1478	(1295–1661)	0.000
Neonatal birth weight centile		43.3	(37.9–48.7)	4.2	(3.4–5.0)	0.000
Neonatal customized weight centile		41.7	(34.2–49.2)	0.8	(0.2–1.4)	0.000
Neonatal umbilical artery pH		7.33	(7.32–7.35)	7.27	(7.23–7.30)	0.000
Neonatal 5 min APGAR value		9.2	(8.9–9.5)	8.9	(8.5–9.3)	0.186
Storage time at –80 °C	(y)	5.32	(5.08–5.56)	4.98	(4.68–5.27)	0.076
Neonatal LDL cholesterol	(mg/dL)	30	(25–34)	20	(16–24)	0.002
Neonatal HDL cholesterol	(mg/dL)	31	(29–33)	16	(14–18)	0.000
Neonatal total cholesterol	(mg/dL)	71	(66–77)	52	(47–57)	0.000
Neonatal triglycerides	(mg/dL)	21	(18–25)	46	(37–54)	0.000

Significant p-values are in bold

Cholesterol synthesis

In IUGR, absolute lanosterol and lathosterol concentrations were 35 and 33% lower than in CTRL (Table 2). Adjustment for potential confounders had no major influence on the significance. The lanosterol/TC and lathosterol/TC ratios did not differ significantly (Table 3). We found no significant difference in mean desmosterol concentrations between both study groups (Table 2), although in the IUGR group, the desmosterol/TC ratio was 30% higher than in the CTRL group (Table 3). Findings were similar for the two subgroups, early onset and late onset IUGR (Fig. 2), but we failed to provide significance for desmosterol/TC ratio in the late onset IUGR group compared to their gestational age matched CTRL group (data not shown).

Oxysterols

No significant differences were found in absolute 24S-OH-cholesterol (24S-OHC) and 27-OHC levels in IUGR compared to CTRL (Table 2). Adjustment for potential confounders had no major influence on significance. Hence, 24S-OHC/TC ratio and 27-OHC/TC ratio were increased

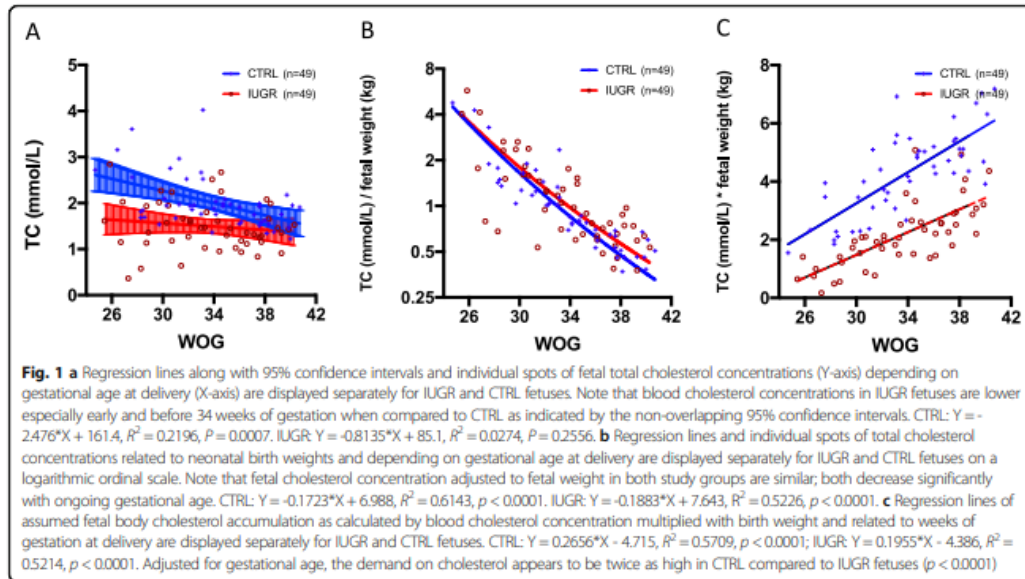
by 39 and 61%, respectively, indicating an increased cholesterol turnover (Table 3). Findings were similar in the early and the late onset subgroups of IUGR (Fig. 3).

Plant sterols

No significant differences were found in absolute campesterol and β -sitosterol levels, while in the IUGR group, 5 α -cholestanol levels were in the mean 13% lower than in the CTRL group (Table 2). Adjustment for potential confounders had no major influence on significance. Ratios of campesterol, β -sitosterol, and 5 α -cholestanol to TC were increased by 34, 39, and 17%, respectively (Table 3). However, this could not be confirmed when separately analyzing data in the late onset subgroup of IUGR (Fig. 4).

Discussion

Several studies, including our own, have reported diminished fetal cholesterol concentrations in IUGR [17–23]. Characterizing umbilical cord blood sterol profiles in IUGR and normally grown fetuses we aimed at a deeper understanding of cholesterol metabolism during fetal development and impaired fetal growth. To estimate the



contribution of maternal cholesterol to the fetal cholesterol pool, we measured plant sterol concentrations such as β -sitosterol. Plant sterols cannot be synthesized de novo in humans. Their concentration levels in the circulation are dependent on nutritional intake, and, in the case of the fetus, maternal provision. At term, concentration levels of plant sterols in umbilical cord blood are 40–50% of the maternal levels [27]. Consequently, placental insufficiency and disturbed placental transport processes should result in lower fetal plant sterol concentrations. By contrast to this assumption, plant sterol to cholesterol ratios were indeed

higher in IUGR than in CTRL fetuses, especially in those born preterm, suggesting an unrestricted transplacental sterol transport and a general substantial maternal contribution to the fetal cholesterol pool independent of placental insufficiency. High plant sterol to cholesterol ratios can, however, also be explained by lower hepato-biliary elimination rates of the phytosterols. The liver is the main organ regulating body cholesterol homeostasis. The synthesis of cholesterol starts with the mevalonate pathway by the formation of acetyl CoA, which is then converted to 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) and further to

Table 2 Total sterol concentrations in umbilical cord vein of IUGR and CTRL neonates

Total concentration		CTRL (n = 49)		IUGR (n = 49)		p-value	adj. p-value
		Median	95% CI	Median	95% CI		
Cholesterol (GCMS)	mmol/L	1.90800	(1.75800–1.96900)	1.44600	(1.28500–1.61000)	< 0.0001	< 0.0001
Lathosterol	μ mol/L	4.34600	(3.87600–4.69100)	2.97500	(2.67200–3.24700)	< 0.0001	0.0009
Dihydro-lanosterol	μ mol/L	0.01248	(0.01009–0.01462)	0.00806	(0.00652–0.01101)	0.0019	0.0040
Desmosterol	μ mol/L	2.20600	(1.98800–2.50300)	2.13100	(2.01400–2.25800)	0.3145	0.8708
Lanosterol	μ mol/L	0.34760	(0.31850–0.41090)	0.23700	(0.21380–0.27620)	< 0.0001	0.0001
24OH cholesterol	μ mol/L	0.14230	(0.12250–0.15840)	0.14870	(0.13130–0.16870)	0.6355	0.8430
27OH cholesterol	μ mol/L	0.06026	(0.05529–0.06517)	0.06440	(0.05743–0.07782)	0.2345	0.3010
β -sitosterol	μ mol/L	0.78970	(0.61960–0.94940)	0.66460	(0.56740–0.82710)	0.2451	0.3916
Campesterol	μ mol/L	0.73540	(0.63070–0.82030)	0.62460	(0.56650–0.76840)	0.5196	0.3462
Sa-cholestanol	μ mol/L	10.66000	(10.15000–11.75000)	9.72100	(9.13700–10.47000)	0.0061	0.0159
Stigmaterol	μ mol/L	0.13850	(0.13220–0.16650)	0.11290	(0.10060–0.14100)	0.0011	0.0060
Brassicasterol	μ mol/L	0.08838	(0.07519–0.10950)	0.08332	(0.07112–0.10850)	0.9605	0.3390

Significant p-values are in bold

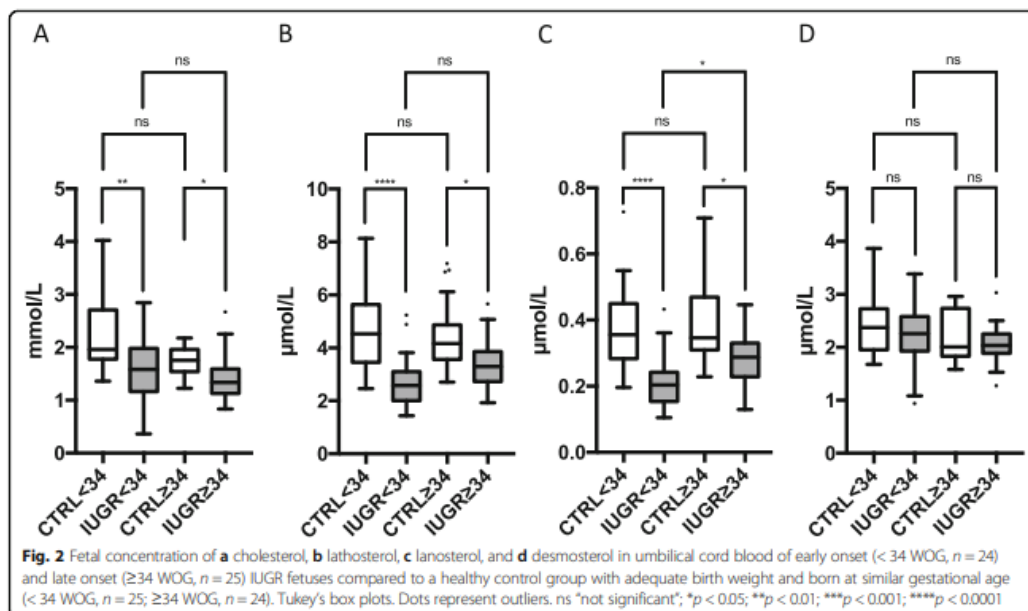
Table 3 Ratios of specific sterol to cholesterol concentrations in umbilical cord vein of IUGR and CTRL neonates

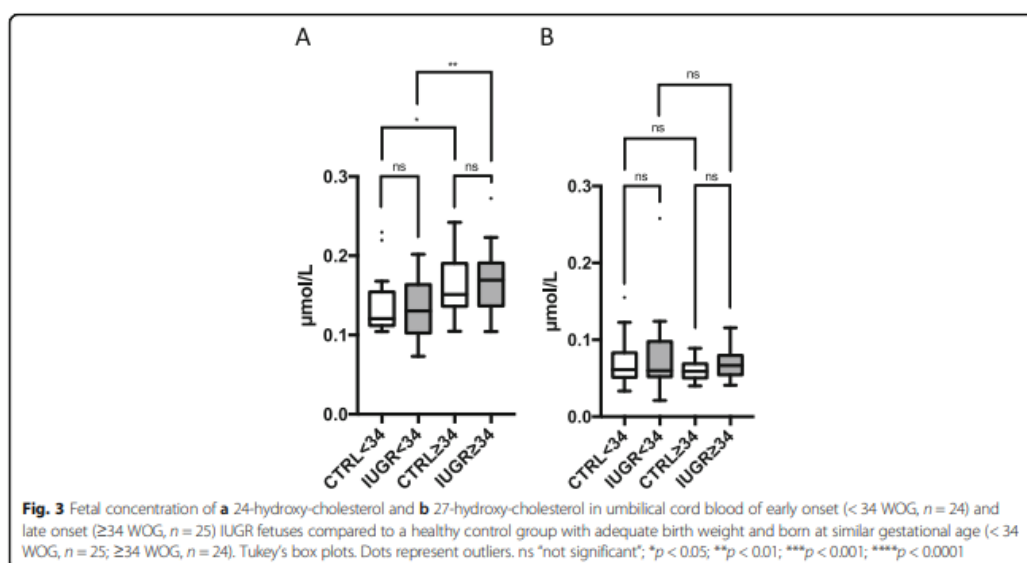
Sterol to TC ratio	μmol/mmol *10exp3	CTRL (n = 49)		IUGR (n = 49)		p-value
		Median	95% CI	Median	95% CI	
Lathosterol/TC	Ratio	2.183	(2.049–2.523)	2.081	(1.894–2.276)	0.2952
Dihydro-lanosterol/TC	Ratio	0.006	(0.005–0.008)	0.006	(0.005–0.008)	0.6267
Desmosterol/TC	Ratio	1.156	(1.080–1.259)	1.522	(1.399–1.586)	< 0.0001
Lanosterol/TC	Ratio	0.187	(0.167–0.206)	0.175	(0.145–0.206)	0.1795
24OH cholesterol/TC	Ratio	0.075	(0.065–0.084)	0.108	(0.091–0.123)	< 0.0001
27OH cholesterol/TC	Ratio	0.033	(0.030–0.035)	0.047	(0.043–0.050)	< 0.0001
β-sitosterol/TC	Ratio	0.420	(0.354–0.481)	0.478	(0.418–0.558)	0.0210
Campesterol/TC	Ratio	0.387	(0.360–0.429)	0.469	(0.437–0.569)	0.0002
5α-cholestanol/TC	Ratio	5.990	(5.426–6.489)	6.924	(6.515–7.175)	0.0004
Stigmasterol/TC	Ratio	0.075	(0.069–0.085)	0.082	(0.070–0.094)	0.1585
Brassicasterol/TC	Ratio	0.045	(0.040–0.053)	0.059	(0.055–0.066)	0.0001

Significant p-values are in bold

mevalonate, squalene and finally, lanosterol. Lanosterol can be processed to cholesterol through an enzyme-mediated 19-step process following the Kandutsch-Russell pathway through lathosterol and 7-dehydrocholesterol. In the present study, low circulating lanosterol and lathosterol concentrations together with balanced cholesterol ratios suggest an unaffected enzymatic capacity of the Kandutsch-Russell pathway in IUGR. Hence, reduced lanosterol concentration in IUGR is most probably caused by lower enzymatic activity prior to the mevalonate pathway, or by a decrease in nutritional supply or energy

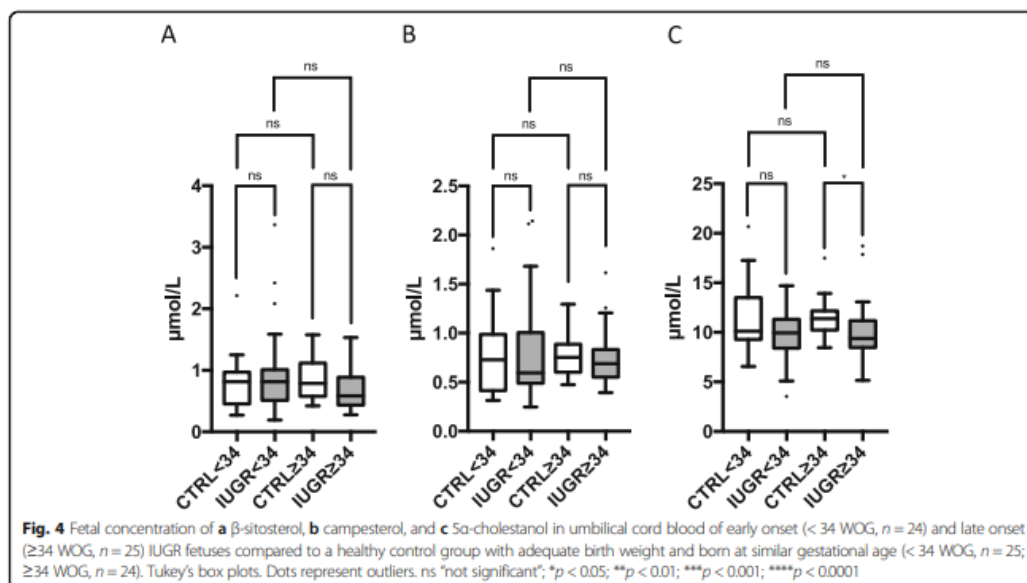
provision to the fetal liver. Indeed, in IUGR, a reduced placental oxygen uptake and glucose transfer forces the fetus to increase shunting through the ductus venosus bypassing the liver to maintain nutritional supply to the heart and the brain [33, 34]. This so-called “brain-sparing-effect” results in a reduced hepatic volume [35–37], declining hepatic glycogen stores, and fetal hypoglycemia, and affects maintenance of fetal oxidative metabolism [20, 34, 38]. As a result, diminished synthesis of acetyl-CoA in the fetal liver and, subsequently, reduced mevalonate and lanosterol production can be expected.





Interestingly, and in contrast to lathosterol, the desmosterol to cholesterol ratios in our study were higher in the IUGR than in the CTRL group. Desmosterol is synthesized from lanosterol via zymosterol. A high ratio suggests either increased synthesis rates or reduced conversion to cholesterol via the 3β-hydroxysterol-Δ24-reductase (DHCR24), the final enzymatic step of the Bloch

pathway, an alternative pathway of cholesterol synthesis [30]. The Bloch pathway is particularly activated in the fetal brain and desmosterol transiently represents up to 30% of total brain sterols during intrauterine development [24, 39]. Desmosterol might cross from fetal brain into the body circulation either via an incomplete blood-brain barrier (BBB), or via to date unknown pathways,



e.g. potential re-conversion of brain-driven 24S-OHC to desmosterol. While the latter enzymatic step is theoretically possible, a specific enzyme has yet to be described. However, the presence of cholesterol transport molecules in the BBB suggests a potential flux of sterols from the brain into the body circulation [40, 41]. This is particularly important since fetal brain cholesterol homeostasis must be tightly regulated, separately from the body cholesterol homeostasis for beneficial neurodevelopment. Almost all inborn errors of cholesterol synthesis are associated with central neural system malformations or neuro-developmental disorders [15, 42]. In line with desmosterol, 24S-OHC to cholesterol ratios were evenly high in the IUGR fetuses in our study. 24S-OHC is a cholesterol metabolite almost exclusively produced in the brain that crosses the BBB to protect from cholesterol overload [43, 44]. In light of the “brain-sparing-effect”, this finding of desmosterol and 24S-OHC suggests conserved brain cholesterol turnover rates in IUGR fetuses independent of body cholesterol synthesis to guarantee uneventful neurodevelopment.

Since cholesterol and its metabolites are catabolized in the fetal liver by bile acid formation higher 24S-OHC/TC ratios (and also 27-OHC/TC ratios) in IUGR fetuses may also be explained by reduced elimination rates. Indeed, studies on liver function of IUGR fetuses suggest a reduced hepatic activity with lower alanine aminotransferase synthesis rates [45], and higher bile acids concentrations in cord blood of the IUGR fetuses as compared to controls [46] that persists in childhood [47].

These persisting metabolic alterations in IUGR neonates as well as increased plant sterol concentrations are in concert with the known observation that being small for gestational age is a risk factor for CVD later in life. High plasma plant sterol levels have been frequently associated with CVD [48]. Campesterol/cholesterol and sitosterol/cholesterol ratios, e.g., have been demonstrated to be independent predictors of CVD [49]. Mechanistically, plant sterols promote production of proinflammatory cytokines, influence ABC transporter expression, and inhibit cholesterol efflux from macrophages [50]. Indeed, we recently demonstrated a lower cholesterol efflux from [³H]-cholesterol-loaded macrophages when treated with serum from IUGR compared to CTRL fetuses [51] possibly contributing to early atherosclerotic changes of the fetal vascular walls.

The present study has certain limitations. IUGR fetuses often have to be delivered preterm, and gestational age is one of the main factors affecting cord blood composition [17]. Hence, the study groups need to be controlled for this issue. However, preterm birth per se is a pathological condition and we cannot exclude that cord blood parameters within the CTRL group are biased by factors that may lead to spontaneous onset of preterm

labor. Moreover, differences in the treatment regimens between the IUGR and the CTRL mothers may have an influence on maternal and/or fetal metabolism. For example, mothers with spontaneous onset of preterm labor or preterm premature rupture of membranes receive antibiotics and tocolytic agents, while IUGR mothers do not. Stress also influences lipid parameters, and fetal distress is a common medical indication for delivery in patients with IUGR. We also do not have data on nutritional intake of patients, which may influence plant sterol concentrations.

Strength of this study is its well characterized patient cohort and antenatal diagnosis and clear definition of “IUGR”. The use of GC methods resulted in a highly specific assessment of the sterols of interest, avoiding the frequently observed cross-reactivity that occurs with conventional antibody-based measurement techniques.

Conclusion

We here provide evidence that in IUGR fetuses, the fetal de novo cholesterol synthesis rate rather than the materno-fetal cholesterol transfer is low. Our data suggest that reduced energy provision forces the IUGR fetus to downregulate hepatic de novo cholesterol synthesis, yet this seems to be rather adaptive and well balanced to meet fetal growth rates. Additionally, reduced hepatic function causes lower elimination rates of sterols and cholesterol end-products. This observation is particularly important, since cholestasis is a well-described complication in extremely low birth weight neonates [52] that could progress to liver failure [53] and may affect hepatic drug metabolism [54]. Our study supports the idea that specific therapeutic regimes need to be considered in neonates born IUGR, especially in the setting of neonatal intensive care management. This applies to drug administration, but also to parenteral nutrition of the neonate with plant sterol containing soybean oil-based lipid emulsions.

Abbreviations

24S-OHC: 24S-OH-cholesterol; 27-OHC: 27-OH-cholesterol; BBB: Blood-brain barrier; BMI: Body mass index; CTRL: Controls; CVD: Cardiovascular diseases; DHCR24: 3 β -hydroxysterol- Δ 24-reductase; FID: Flame-ionization detection; GC: Gas chromatographic; HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA; IUGR: Intrauterine growth restriction; MS-SIM: Selected-ion monitoring mass spectrometry; SLOS: Smith-Lemli-Opitz syndrome; TC: Total cholesterol; TG: Triglycerides; WOG: Week of gestation

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our editorial policies. UP supervised data and blood collection, statistical analysis, and was a major contributor in writing the manuscript. LS, VB, and AK were involved in sampling and biobanking, data recording, statistical analyses, discussion of the results, NM, IA, CES, ME discussed the results and contributed to writing the manuscript. DL analyzed sterol concentrations,

discussed data and contributed to writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The study was funded by the Medical Faculty of the Christian-Albrechts University Kiel, Germany, F356910, and the Institute for Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Clinics of Bonn, Bonn, Germany.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Institutional Ethics Committee (EK 119/08 and 154/11). The authors complied with the World Medical Association Declaration of Helsinki regarding ethical conduct of research involving human subjects. Written informed consent was obtained from all participating parents.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Schleswig-Holstein Campus Kiel, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Germany.

²Institute for Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Clinics of Bonn, Bonn, Germany.

Received: 22 June 2019 Accepted: 12 September 2019

Published online: 25 October 2019

References

- ACOG. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2013;121:1122–33.
- Kehl S, Dötsch J, Hecher K, Schlembach D, Schmitz D, Stepan H, et al. Intrauterine growth restriction. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-level, AWMF registry no. 015/080, October 2016). *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2017;77:1157–73.
- Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995;311:171–4.
- Forsen T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ.* 1999;319:1403–7.
- Kajiser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, et al. Perinatal risk factors for ischemic heart disease: disentangling the roles of birth weight and preterm birth. *Circulation.* 2008;117:405–10.
- Rich-Edwards JW, Kleinman K, Michels KB, Stampfer MJ, Manson JE, Rexrode KM, et al. Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ.* 2005;330:1115.
- Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obs Invest.* 2007;64:187–92.
- Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta.* 2009;30:473–82.
- Pecks U, Rath W, Caspers R, Sosnowsky K, Ziems B, H-JH J T, et al. Oxidatively modified LDL particles in the human placenta in early and late onset intrauterine growth restriction. *Placenta.* 2013;34:1142–9.
- Pecks U, Rath W, Kleine-Eggebrecht N, Maass N, Voigt F, Goecke TW, et al. Maternal serum lipid, estradiol, and progesterone levels in pregnancy, and the impact of placental and hepatic pathologies. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2016;76:799–808.
- Baardman ME, Enwich JJ, Berger RM, Hofstra RM, Kerstjens-Frederikse WS, Lütjohann D, et al. The origin of fetal sterols in second-trimester amniotic fluid: endogenous synthesis or maternal-fetal transport? *Am J Obs Gynecol.* 2012;207:202 e19–25.
- Björkhem I, Diczfalussy U, Lütjohann D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:161–5.
- Björkhem I, Eggertsen G. Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:97–103.
- Shackleton CHL. Role of a disordered steroid metabolome in the elucidation of sterol and steroid biosynthesis. *Lipids.* 2012;47:1–12.
- Kanungo S, Soares N, He M, Steiner RD. Sterol metabolism disorders and neurodevelopment—an update. *Dev Disabil Res Rev.* 2013;17:197–210.
- Jenkins KT, Merkens LS, Tubb MR, Myatt L, Davidson WS, Steiner RD, et al. Enhanced placental cholesterol efflux by fetal HDL in smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab.* 2008;94:240–7.
- Pecks U, Brieger M, Schiessl B, Bauerschlag DOO, Piroth D, Bruno B, et al. Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction. *J Perinat Med.* 2012;40:287–96.
- Merzouk H, Meghelli-Bouchenak M, El-Korso N, Belleville J, Prost J. Low birth weight at term impairs cord serum lipoprotein compositions and concentrations. *Eur J Pediatr.* 1998;157:321–6.
- Spencer JA, Chang TC, Crook D, Proudler A, Felton CV, Robson SC, et al. Third trimester fetal growth and measures of carbohydrate and lipid metabolism in umbilical venous blood at term. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997;76:F21–5.
- Bon C, Raudrant D, Poloce F, Champion F, Golfier F, Pichot J, et al. Biochemical profile of fetal blood sampled by cordocentesis in 35 pregnancies complicated by growth retardation. *Pathol Biol.* 2007;55:111–20.
- Roberts A, Nava S, Bocconi L, Salmons S, Nicolini U. Liver function tests and glucose and lipid metabolism in growth-restricted fetuses. *Obstet Gynecol.* 1999;94:290–4.
- Nagano N, Okada T, Fukamachi R, Yoshikawa K, Munakata S, Usukura Y, et al. Insulin-like growth factor-1 and lipoprotein profile in cord blood of preterm small for gestational age infants. *J Dev Orig Health Dis.* 2013;4:507–12.
- Pecks U, Rath W, Maass N, Berger B, Lueg I, Farrokh A, et al. Fetal gender and gestational age differentially affect PCSK9 levels in intrauterine growth restriction. *Lipids Health Dis.* 2016;15:193.
- Lin DS, Pitkin RM, Connor WE. Placental transfer of cholesterol into the human fetus. *Am J Obs Gynecol.* 1977;128:735–9.
- Burke KT, Colvin PL, Myatt L, Graf GA, Schroeder F, Woollett LA. Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster. *J Lipid Res.* 2009;50:1146–55.
- Pecks U, Mohaupt MG, Hütten MC, Maass N, Rath W, Escher G. Cholesterol acceptor capacity is preserved by different mechanisms in preterm and term fetuses. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841:251–8.
- Vuorio AF, Miettinen TA, Turtola H, Oksanen H, Gylling H. Cholesterol metabolism in normal and heterozygous familial hypercholesterolemic newborns. *J Lab Clin Med.* 2002;140:35–42.
- Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014;4:97–104.
- Voigt M, Rochow N, Schneider KTM, Hagenah H-P, Scholz R, Hesse V, et al. New percentile values for the anthropometric dimensions of singleton neonates: analysis of perinatal survey data of 2007–2011 from all 16 states of Germany. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2014;218:210–7.
- Lütjohann D, Brzezinka A, Barth E, Abramowski D, Staufenbiel M, von Bergmann K, et al. Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. *J Lipid Res.* 2002;43:1078–85.
- Taubert A, Silva LMR, Velásquez ZD, Larrazabal C, Lütjohann D, Hermosilla C. Modulation of cholesterol-related sterols during *Eimeria bovis* macromeront formation and impact of selected oxysterols on parasite development. *Mol Biochem Parasitol.* 2018;223:1–12.
- Mackay DS, Jones PJH, Myrie SB, Plat J, Lütjohann D. Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;957:116–22.
- Kiserud T, Kessler J, Ebbing C, Rasmussen S. Ductus venosus shunting in growth-restricted fetuses and the effect of umbilical circulatory compromise. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2006;28:143–9.
- Baschat AA. Fetal responses to placental insufficiency: an update. *BJOG.* 2004;111:1031–41.
- Flood K, Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, et al. The role of brain sparing in the prediction of adverse outcomes in intrauterine growth restriction: results of the multicenter PORTO study. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211:288.e1–5.
- Campbell S, Thoms A. Ultrasound measurement of the fetal head to abdomen circumference ratio in the assessment of growth retardation. *Br J Obs Gynaecol.* 1977;84:165–74.

37. Molina Graldo S, Alfonso Ayala DA, Amaza Graterol M, Perez Olivo JL, Solano Montero AF. Three-dimensional Doppler ultrasonography for the assessment of fetal liver vascularization in fetuses with intrauterine growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet*. 2019;144:260–4.
38. Lane RH, Kelley DE, Gruentzmacher EM, Devaskal SJ. Uteroplacental insufficiency alters hepatic fatty acid-metabolizing enzymes in juvenile and adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280:R183–90.
39. Jensen M, Wang M, Greco D, Belenchi GC, di Porzio U, Brown AJ, et al. What dictates the accumulation of desmosterol in the developing brain? *FASEB J*. 2013;27:665–70.
40. Goszalat F, Candola P, Sevin E, Berezowski V, Cocchi R, Fenart L. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an *in vitro* model. *Brain Res*. 2000;249:34–42.
41. Kober AC, Manavalan APC, Tam-Amersdorfer C, Holmér A, Saeed A, Fanaee-Darwish E, et al. Implications of cardiovascular ATP-binding cassette transporter G1 (ABC G1) and apolipoprotein M in cholesterol transport at the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1903:573–88.
42. Viragano D, Esteve M, Cardano F, Capobianco C, Robertson D, Vimerizzi A, et al. Fetal blood-brain barrier P-glycoprotein contributes to brain protection during human development. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67:50–61.
43. Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Sidle L, Ahlborg G, Walgren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res*. 1998;39:1594–600.
44. Lütjohann D, Breuer G, Ahlborg G, Nannema J, Sidle A, Diczfalusy U, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:8799–804.
45. Kocylowski R, Dubiel M, Gudmundsson S, Fittler E, Kiserud T, von Katsenberg C. Hepatic aminotransferases of normal and IUGR fetuses in cord blood at birth. *Early Hum Dev*. 2012;88:961–5.
46. Boehm G, Müller DM, Teichmann B, Krumholz P. Influence of intrauterine growth retardation on parameters of liver function in low birth weight infants. *Eur J Pediatr*. 1990;149:356–8.
47. Sidiropoulou EI, Pihrogkou G, Vlahamakis G, Mergeli A, Mentzou A, Papassitirou V, et al. Biochemistry, hormones and adipocytokines in prepubertal children born with IUGR evoke metabolic, hepatic and renal clearances. *Sci Rep*. 2018;8:15693.
48. Vergès B, Fumeron F. Potential risks associated with increased plasma plant sterol levels. *Diabetes Metab*. 2015;41:76–81.
49. Rajaratnam RA, Gylling H, Miettinen TA. Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1185–91.
50. Sabeva NS, McPhaul OM, Li X, Coyle TJ, Feola DJ, Graf GA. Phytosterols differentially influence ABC transporter expression, cholesterol efflux and inflammatory cytokine secretion in macrophage foam cells. *J Nutr Biochem*. 2012;23:777–82.
51. Pecks U, Rath W, Bauerschlag DO, Maas N, Orlowski T, Mohaupt MG, et al. Serum Cholesterol Acceptor Capacity in Intrauterine Growth Restricted Fetuses. *J Pennat Med*. 2017; accepted. DOI: <https://doi.org/10.1515/jpm-2016-0270>.
52. Kelly DA. Liver complications of perinatal perinatal nutrition—epidemiology. *Nutrition*. 1998;14:153–7.
53. Zambrano E, El-Hennawy M, Ehrenkranz RA, Zetterman D, Reyes-Mugica M. Total parenteral nutrition induced liver pathology: an autopsy series of 24 newborn cases. *Pediatr Dev Pathol*. 2004;7:125–32.
54. Soo JF, Wine JD, Berry M, McMullen IC, Morrison JL. Intrauterine growth restriction may reduce hepatic drug metabolism in the early neonatal period. *Pharmacol Res*. 2018;134:68–78.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



7.4 Eigenständigkeits-Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit bei keinem anderen Prüfungsverfahren angemeldet habe.

7.5 Datenaufbewahrungs-Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Arbeit zugrundeliegenden Originaldaten bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. Pecks, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel hinterlegt sind.

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Pecks, für die Betreuung dieser Arbeit sowie die freundliche Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche waren eine große Hilfe für mich und haben mich stets angespornt.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Maass für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zu verfassen und die Räumlichkeiten zu nutzen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Laura Segger, Frau Anika Klein und Frau Claudia Baum für die reibungslose Zusammenarbeit im Rahmen der Datenerhebung. Die gegenseitige Unterstützung und wertvollen Diskussionen haben mich stets motiviert. Frau Catharina Verkooyen und Frau Dr. Sabrina Farrokh danke ich für die Aufbereitung der Blutproben sowie die Zusammenarbeit im Labor. Ein weiterer Dank gilt den Teams der Frauenkliniken des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel sowie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen für die Betreuung der Probandinnen während des Klinikaufenthalts.

Allen Probandinnen der Studie danke ich für die Teilnahme und die Bereitstellung aller notwendigen Informationen.

Meinen Eltern und meinen Schwestern möchte ich ganz besonders herzlich danken für die stetige Unterstützung auf allen Ebenen, nicht nur während des Verfassens dieser Arbeit, sondern während meines gesamten Studiums. Meinem Ehemann Herrn Tobias Kopsicker und seiner Familie danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung und Motivation.

Für die freundliche Korrektur und konstruktiven Anregungen danke ich allen Personen, die diese Dissertation gegengelesen haben. Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die mir in allen Lebenslagen Rückhalt geboten haben und meine Studienzeit erleichtert haben.