

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: apl. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander W. Eckert)

**Medikamentöse Beeinflussung der Entwicklung des sekundären Gaumens der
A/WySn-Maus in der Gewebekultur**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Julia Orce y Tigges
geboren am 25.11.1974 in Wuppertal

Betreuerin: Fr. Dr. med. Dr. med. dent. K. Scheller

Gutachter:

apl. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander W. Eckert

apl. Prof. Dr. med. habil. Sylva Bartel-Friedrich

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Hemprich

Datum der Eröffnung: 27.05.2014

Datum der Verteidigung: 11.02.2015

Referat

Zielsetzung:

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) gehören weltweit zu den häufigsten Fehlbildungen, die in Europa mit einer Häufigkeit von ca. 1:500 Geburten angegeben werden (Dixon et al., 2011). Viele klinische Studien beschäftigten sich seit mehr als 70 Jahren mit der Prävention der orofazialen Spaltbildung und konnten belegen, dass eine hoch dosierte Gabe von Polyvitamin B-Präparaten in der Frühschwangerschaft die Spaltbildungsrate in spaltbelasteten Familien erheblich reduzieren kann (Schubert und Krost, 2006). Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung des Polyvitamin-B Präparates Polybion N® (Merck, Deutschland) auf die Entwicklung des sekundären Gaumens bei einem hereditär spaltbelasteten Mäusestamm (A/WySn) zu untersuchen.

Methoden:

Der A/WySn-Mäusestamm weist eine hohe hereditäre Spaltbildungsrate von 20-44% auf und ist gegenüber teratogenen Einflüssen relativ resistent (Juriloff et al., 1982, Schubert et al., 2002). Die Präparation der Organkulturen erfolgte vor der physiologischen Entwicklung des sekundären Gaumens am 14.8 Tag p.c. und der Entwicklungsstand wurde vor und nach der Inkubation (72 h) bestimmt (Al Obaidi et al., 1995) und statistisch ausgewertet.

Ergebnisse:

89% der Gaumenplattenpaare der A/WySn-Maus wiesen unter Standardbedingungen in der Organkultur nach 72 Stunden kein Wachstum auf. Bei Substitution des Kulturmediums mit Polybion N® konnte jedoch ab einer Medienkonzentration von 0,1% ein signifikantes Wachstum der Gaumenplatten ($p_{0,1\%}=0,000$; $p_{1,0\%}=0,000$) beobachtet werden.

Folgerungen:

Die positive Wirkung der klinischen Prophylaxe mit Poly B-Vitaminen konnte in der Organkultur des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus bestätigt werden. Durch die direkte Beeinflussung der Strukturen des sekundären Gaumens kam es zu einer signifikanten Entwicklung dieser Strukturen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Zielstellung	3
3	Literaturüberblick	4
3.1	Normogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenregion	4
3.1.1	Entwicklung des sekundären Gaumens	4
3.2	Pathogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten	5
3.2.1	Formale Genese	5
3.2.2	Ätiologie	5
3.2.3	Ernährungsfaktoren	8
3.2.4	Medikamente und Chemikalien	8
3.2.5	Stress und starke psychische Belastung	9
3.2.6	Alkohol- und Nikotinabusus	9
3.2.7	Ionisierende Strahlung	9
3.2.8	Dysplastische Faktoren	10
3.2.9	Erkrankungen der Mutter während der Schwangerschaft	10
3.3	Epidemiologie	10
3.3.1	Häufigkeit	10
3.3.2	Ethnische Unterschiede	12
3.3.3	Geschlechterverteilung	12
3.3.4	Assoziierte Anomalien	12
3.3.5	Saisonale Verteilung	13
3.4	Interdisziplinäre Therapie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten	13
3.5	Prävention mit Schutzstoffen	15
3.5.1	Folsäure (Vitamin B9)	15
3.5.2	Thiamin (Vitamin B1)	17
3.5.3	Multivitamine	18
3.5.4	Vitamin B6	20
3.5.5	Vitamin B12 - Cobalamin	21
4	Material und Methoden	23
4.1	Versuchstiere	23
4.1.1	A/WySn-Maus	23
4.1.2	Tierhaltung	23
4.2	Verpaarung	24
4.3	Probeentnahme	24
4.4	Organkulturverfahren	27
4.5	Auswertung der Proben	29
4.5	Statistische Auswertung	30
5	Ergebnisse	31
6	Diskussion	36
7	Zusammenfassung	42
8	Literaturverzeichnis	44
9	Thesen	52

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A/WySn	Mausstamm mit genetischer Prädisposition für LKGS
A/WySnBk	spezieller Mausstamm
A/Jax	spezieller Mausstamm
BMI	Body Mass Index
BrdU	Bromodesoxyuridin
C57B1	spezieller Mausstamm
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetales bovines Serum
FGF	fibroblast growth factor
FUDR	Fluordesoxyuridin
GS	isolierte Gaumenspalte(n)
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
KFO	Kieferorthopädie
KG	Körpergewicht
LKS	Lippen-(Kiefer-)Spalte(n)
LKGS	Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalte(n)
LK(G)S	Lippen-Kieferspalte(n) mit oder ohne Gaumenspalte(n)
MEZ	Mitteuropäische Zeit
MfS	multifaktorielles Schwellenwertmodell
MLU	Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
NAT1	N-Acetyl-Transferase 1
p.c.	post conceptionem
PLP	Pyridoxalphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
SPSS	Statistik-und Analyse-Software

1 Einleitung

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) werden den kraniofazialen Dysplasien zugeordnet. Man unterscheidet hierbei Spalten des primären und des sekundären Gaumens. Erstere manifestieren sich klinisch als Lippen- und Lippen-Kieferspalten, die ein- oder doppelseitig auftreten können. Spalten des sekundären Gaumens treten als ein- oder doppelseitige Hart- und/oder Weichgaumenspalten auf (Bethmann und Koch, 1967). Diese angeborenen Fehlbildungen gehören hierzulande mit etwa 4%, neben dem Klumpfuß, zu den häufigsten Fehlbildungen. Während um 1930 noch eine Frequenz von 1:1000 angegeben wurde, ist heute unter etwa 700 Kindern mit einer Spaltgeburt zu rechnen (Dolk et al., 2010). In Deutschland leiden somit bei einer jährlichen Rate von etwa 678.000 Neugeborenen (Pötzsch, 2012) ca. 970 Kinder an einer orofazialen Spaltbildung unterschiedlicher Ausprägung. Global unterliegt die Prävalenz jedoch beträchtlichen Schwankungen, deren Ursache nicht bekannt ist. Trotz eingehender epidemiologischer Untersuchungen konnte die Ätiologie der LKGS bis heute nicht vollständig erklärt werden (Mossey et al., 2009).

Verschiedenste Entstehungsmodelle wurden bisher diskutiert. Ein ätiologisches Modell, das nach dem heutigen Wissen für das Auftreten der meisten Spaltbildungen zutreffend ist, ist das sogenannte multifaktorielle Schwellenwertsystem (mfS) nach Carter (1976). Es erklärt die Variationsbreite der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, das unterschiedliche Wiederholungsrisiko und andere Faktoren der Heterogenie durch die additive Polygenie und modulierenden Einfluss exogener Faktoren (Carter, 1976).

Die Geburt eines Kindes mit Spaltbildung stellt in vielerlei Hinsicht Ansprüche an die soziale Umgebung. Durch die pränatale Diagnostik, welche um die 11.-12. SSW mittels Feinsonographie die Spaltbildung im Gesichtsbereich diagnostizieren kann (Sepulveda et al., 2010), werden die Eltern oftmals vor eine psychisch belastende Entscheidung gestellt. Nach Paragraph 218a des Strafgesetzbuches ist ein Schwangerschaftsabbruch aus eugenischer Indikation aufgrund der Spaltbildung auch nach dem dritten Schwangerschaftsmonat noch möglich (§ 218 a Abs. 2 StGB).

Für das Kind stellt diese Art der Fehlbildung ebenfalls eine körperliche und später eventuell auch psychische Belastung dar. Schon im Alter von 5-6 Monaten werden angeborene Spaltbildungen im Bereich der Lippen verschlossen. Zahlreiche weitere Operationen folgen im Intervall und die chirurgische Rehabilitation umfasst den Zeitraum vom Säuglingsalter bis zur Adoleszenz.

Hinzu kommt die psychosoziale Beeinträchtigung durch vorübergehende, oder bleibende, ästhetische und phonetische Einschränkungen.

Nicht zuletzt ist die Rehabilitation von Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mit einem erheblichen finanziellen Aufwand verbunden. So wurden im Jahr 1992 die ungefähren Kosten für die komplette Behandlung eines LKG-Patienten mit ca. 100.000\$ in Kalifornien angegeben (Waitzman et al., 1995).

All diese angeführten Fakten zeigen deutlich, wie wichtig es ist das Augenmerk auf die Prävention dieser Fehlbildung zu richten. Durch die Prävention soll den werdenden Eltern, auch bei genetischer Prädisposition, die Geburt eines klinisch gesunden Kindes ermöglicht werden. Die Prävention beginnt im Sinne der medizinisch-genetischen Dispensaire-Betreuung mit einer humangenetischen Beratung von Risikogruppen und erstreckt sich über vorbereitende Verhaltensmassregeln bis zur Verordnung von Medikamenten in der Schwangerschaft (Schubert, 1991). Verschiedene empirische Untersuchungen zur erfolgreichen medikamentösen Prophylaxe von LKGS-Spalten durch Polyvitamin B-Präparate gibt es bereits seit Ende der fünfziger Jahre (Schubert, 1980).

2 Zielstellung

Ziel unserer Untersuchungen war es, die in der Klinik mit Erfolg angewandte Fehlbildungsprävention durch Polyvitamin B-Präparate anhand eines Organkulturmodells zu untersuchen. Dieses Organkulturmodell wurde an der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: apl. Prof. Dr. Dr. Alexander Eckert) unter Verwendung verschiedener Mäusestämme entwickelt. Diese *in vitro*-Modell ermöglicht die Mechanismen der normalen physiologischen Palatogenese sowie die der Spaltbildung des sekundären Gaumens unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen.

So wurde in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der Wachstumsentwicklung des sekundären Gaumens am Organkulturmodell der A/WySn-Maus durch Zugabe von Vitamin B-Komplexpräparaten zum Kulturmedium untersucht. Die Nachkommen dieser Mäuse weisen eine konstante hereditäre Spaltbildungsrate von etwa 24-40% auf deren Auftreten relativ unabhängig von exogenen Einflüssen ist (Juriloff et al., 2001; Hallgrimsson et al., 2004).

Für den allgemeinen Entstehungsmechanismus der genetisch determinierten Spaltbildung bei der A/WySn-Maus (www.jax.org) wird ein ähnlicher Mechanismus wie der, der bei der teratogen induzierten Spaltbildung beschrieben wurde, diskutiert (Shimizu et al., 2001; Juriloff und Harris, 2008). Die verlangsamte embryonale Entwicklung der A/WySn-Maus (Syska et al., 2004) führt neben einer Reduktion von Geburtsgewicht und -größe der Mäusenachkommen zu einem vermehrten Auftreten von Spaltbildungen korrelierend mit der Wachstumsverzögerung. Die verlangsamten Wachstumsvorgänge in utero medikamentös zu beschleunigen, um die kritische Phase der embryonalen Gesichtsentwicklung zu kürzen, wäre somit eine mögliche „therapeutische“ Option für die Klinik.

Die direkte Wirkung der in klinischen Studien angewendeten Vitamine, einschließlich Folsäure- (Vitamin B9) und β -Carotin-Derivate, zeigte in einem Organmodell des embryonalen Gaumens des A/J-Mäusestamms einen eindeutig positiven Effekt auf die Fusionstendenz des embryonalen Gaumens (Natsume et al., 1998). Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass durch den direkten Kontakt mit den Polyvitamin B-Präparaten eine direkte Beeinflussung der Organstrukturen und der Zellen des embryonalen Gaumens in der Gewebekultur möglich sei.

Die durchgeführten Versuche sollen einen Beitrag zu der Frage liefern, ob es möglich ist, auch eine genetisch determinierte Spaltbildung exogen zu beeinflussen.

3 Literaturüberblick

3.1 Normogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenregion

3.1.1 Entwicklung des sekundären Gaumens

Der primäre Gaumen bildet bei Säugetieren Oberlippe und Zwischenkiefer. Der sekundäre Gaumen schließt sich hinter dem Foramen incisivum an als Grundlage für den harten und weichen Gaumen. Für die aktuelle Arbeit ist die Entwicklung des embryonalen Gaumens wichtiger und wird daher näher beschrieben. Der embryonale Gaumen entwickelt sich aus den paarig angelegten Fortsätzen des Oberkiefers, den Processus palatini laterales, die sich zunächst nach kaudal entwickeln. Die Aufrichtung der Gaumenfortsätze in die Horizontale ist ein wichtiger Vorgang der sekundären Palatogenese, die durch zahlreiche morphogenetische und molekulare Mechanismen gesteuert werden (Bush und Jiang, 2012). Der Fusionsprozess der Fortsätze des sekundären Gaumens erfolgt beim Menschen zwischen der 9. und 12. Embryonalwoche von ventral (harter Gaumen hinter dem Foramen incisivum) nach dorsal. Die hinteren Abschnitte des Gaumens bilden den weichen Gaumen und die Uvula.

Tab. 1: Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Palatogenese bei A/WSn-Maus und Mensch in Tagen der Gravidität (modifiziert nach Raupach, 1987)

Spezies	Embryonalperiode	frühe / Fetalperiode	späte	Fusion der Gaumenplatten
Maus	10.-12. Tag	12.-14. Tag	15. Tag- Geburt	15. Tag ⁽¹⁾
Mensch	26.-42. Tag	42.-90. Tag	90. Tag- Geburt	57.-84. Tag ⁽²⁾

⁽¹⁾ A/ WySn-Mausstamm, Syska, 2000.

⁽²⁾ Moore, 1990

Vor der Fusion der Gaumenplatten besteht das mediale Kantenepithel im Bereich der Fusionszone aus zwei Epithelschichten, dem Periderm außen und einer zweiten Zellschicht über der Basalmembran. Vor der Adhäsion des Epithels geht das Periderm verloren (Ferguson, 1988), während die basale Zellschicht in einzelne von Basalmembran umgebene Inseln aufgelöst wird. In den Zwischenräumen ersetzen mesenchymale Zellen nach und nach die Epithelinseln. Holtgrave und Stoltenburg-Didinger (2002) konnten im Bereich des Epithels ausgeprägte Apoptosevorgänge nachweisen und beschrieben diese als eine wesentliche Voraussetzung einer

möglichen Fusion. Untersuchungen von Bittencourt und Bolognese (2002) konnten keine Apoptosevorgänge beobachten. Letztendlich werden für das Schicksal der Epithelzellen verschiedenste Vorgänge diskutiert.

Fitchett und Hay (1989) stellten die Theorie der epithelial-mesenchymalen Transformation auf, nach der die epithelialen Zellen sich unter Ausbildung von Pseudopodien in Mesenchym umwandeln können. Diesen Ansatz wiesen Holtgrave und Stoltenburg-Didinger allerdings entschieden zurück, da eine Transformation von epithelialen Zellen in mesenchymale Zellen bei sistierender Zellteilung, wie es in der basalen Epithelschicht zum Zeitpunkt der Fusion der Fall ist, unwahrscheinlich erscheint (Holtgrave und Stoltenburg-Didinger, 2002).

3.2 Pathogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

3.2.1 Formale Genese

Nach formalgenetischen Gesichtspunkten sind *Primärspalten*, bei denen zu keinem Zeitpunkt eine Vereinigung der Gewebe stattgefunden hat, von den *Sekundärspalten* als Folge des Einreißens nach Vereinigung der Gewebe zu unterscheiden.

Beide Formen, die primäre und sekundäre Spaltbildung, können am selben Individuum auftreten. So kann nach der Verschmelzung der Fortsätze im Lippen-Kiefer-Bereich durch Einreißen der Epithelmauer eine sekundäre Spalte entstehen, die hierauf dann im Sinne der Hemmungsfehlbildung die Fusion der Gaumenplatten verhindert (primäre Spaltbildung).

3.2.2 Ätiologie

Die kausale Genese der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ist bis heute nicht eindeutig geklärt (Dixon et al., 2011).

Studien belegen eine familiäre Häufung der LKG-Spalten und deren Mikroformen in betroffenen Familien (Hintz und Lindner, 1987). Weitere Hinweise auf eine Vererbung zeigen sich in Differenzen der Inzidenz zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und vor allem in der Konkordanz zwischen eineiigen Zwillingen, die in etwa 40% der Fälle zu beobachten ist (Wyszynski et al., 1996c).

Der Einfluss genetischer Faktoren auf die Ätiologie von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten wird von Schulze (1981, 1986) ausführlich diskutiert und eine polygene Vererbung propagiert. Für die polygene Vererbung spricht bei genauer Betrachtung der Vererbung

der auffällige Unterschied in der Konkordanzrate bei mono- (65,2%) und dizygoten Zwillingspaaren (7,3%), der sich um den Faktor 8,9 unterscheidet (Markowic und Ceran, 1989). Im Allgemeinen liegt nach Penrose (1953) das Konkordanz-Diskordanz-Verhältnis bei dominant vererbten Merkmalen bei 2:1 und bei rezessiven bei 4:1. Der beim Auftreten von LKG-Spalten beobachtete Konkordanz-Unterschied, der die beschriebenen Verhältnisse mit 8,9:1 deutlich überschreitet, spricht somit nach Penrose am ehesten für eine *additive* Polygenie. Hierbei handelt es sich um einen genetischen Summationseffekt, bei dem es erst durch Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts zur Ausbildung eines pathologischen Effekts kommt.

Die kontinuierliche Variabilität der meisten Merkmale (*multifaktorielle Merkmale*) und deren Phänotyp hängt somit nicht allein vom genetischen Hintergrund ab, sondern von einer Gen-Umwelt-Interaktion. Zur Beschreibung einer solchen Ätiologie entwickelte Carter (1969) das multifaktorielle Schwellenwertmodell (mfS, Abb. 1), das zu den anerkanntesten ätiologischen Modellen für die Entstehung von LKGS und anderen Fehlbildungen zählt.

Die in Abb. 1 dargestellte Kurve entspricht der Normalverteilung eines bestimmten Merkmals in der Bevölkerung. Die Neigung (*liability*) zur Ausbildung einer LKG-Spalte zu Beispiel beruht somit auf genetischen und exogenen Einflüssen und ist in der Bevölkerung kontinuierlich (*normal*) verteilt. Die Senkrechten am linken Ende der Kurven markieren die Schwelle, nach deren Überschreitung es durch die Summation schädigender (*teratogener*) Einflüsse zu einer unterschiedlichen Manifestation einer bestimmten Fehlbildung kommt. Die Fläche unter der Kurve, die rechts von der Schwelle liegt, entspricht der Inzidenz des untersuchten Merkmals. Dabei liegt die Position der Schwelle, je nach Spalttyp, Geschlecht, Ethnie und weiteren Faktoren in einem individuellen Wertebereich und kann durch protektive oder schädigende Einflüsse verschoben werden.

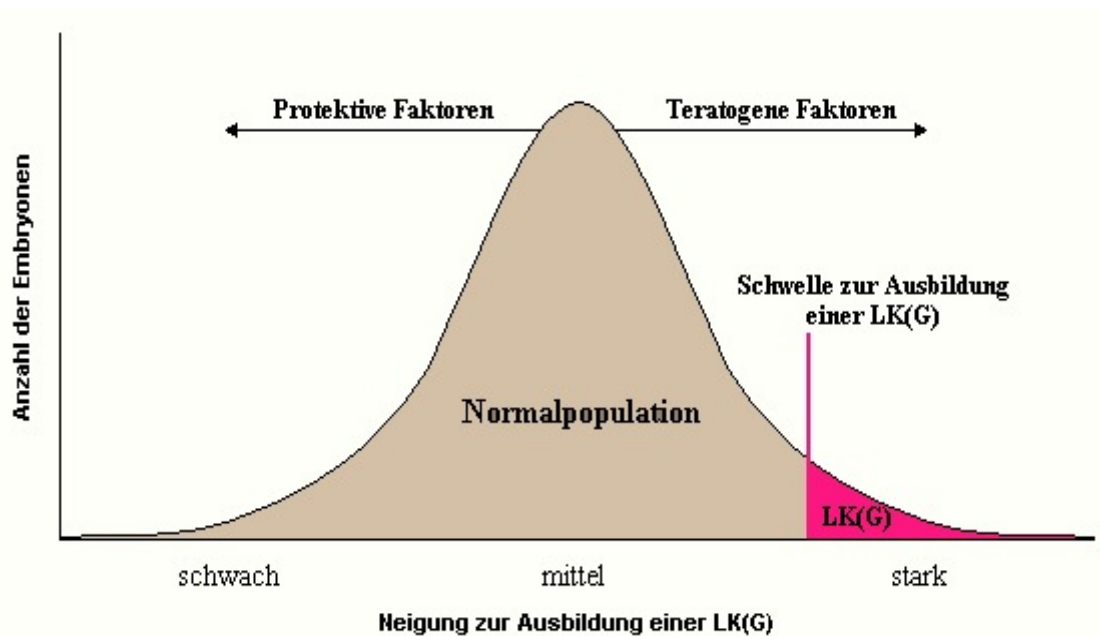


Abb.1: Das multifaktorielle Schwellenmodell mit dem Einfluss protektiver und teratogener Faktoren nach Krost und Schubert (2006).

Somit kann jedes Gen im Fall der multifaktoriellen Ätiologie und je nach Umwelteinfluss mit einem kleinen additiven Anteil an der Gesamtexpression eines Merkmals partizipieren. Dabei ist ein Hauptgeneffekt nicht ausgeschlossen, konnte aber bisher nicht eindeutig bewiesen werden. So wurden bis heute unterschiedlichste Gene mit der Genese der LKG-Spalten assoziiert.

- MSX1 auf Chromosom 4 mit der Lokalisation 4p13 (Lidral et al., 1997, 1998; Romitti et al., 1999; Beaty et al., 2002; Jugessur et al., 2003)
- JAG2 auf Chromosom 14 mit der Lokalisation 14q32 (Neiswanger et al., 2006)
- MTR_3g098210 auf Chromosom 3 (Mostowska et al., 2006)
- PVRL1 auf Chromosom 11 mit der Lokalisation 11q23.3 (Neiswanger et al., 2006; Scapoli et al., 2006)
- TGFB3 auf Chromosom 14 mit der Lokalisation 14q24 (Maestri et al., 1997; Lidral et al., 1998; Romitti et al., 1999; Beaty et al., 2002; Jugessur et al., 2003; Iwata et al., 2014)
- TGFA auf Chromosom 2 mit Lokalisation 2p13 (Beaty et al., 1997; Maestri et al., 1997; Carinci et al., 2000; Jugessur et al., 2003), der als erster Genlocus

mit der Entstehung nichtsyndromaler LKG-Spalten in Verbindung gebracht wurde (Ardinger et al., 1989).

- OFC1, OFC2, OFC3 (Carinci et al., 2000)
- BCL3 auf Chromosom 19 mit Lokalisation 19q13 (Maestri et al., 1997; Gaspar et al., 2002; Blanco et al., 2004)
- RARA auf Chromosom 17 mit Lokalisation 17q21 (Wyszynski et al., 1996b ; Peanchitlertkajorn et al., 2003)
- F13a auf Chromosom 6 (Eiberg et al., 1987)

Aufgrund der komplexen Ätiologie, der Heterogenität der LKG-Spalten und der meist geringen Zahl an Probanden blieb die Bestätigung eines Kandidatengens, ähnlich dem Renin-Gen bei arterieller Hypertonie, für die Spaltbildungen bisher erfolglos (Buselmaier und Tariverdian, 2004; Ludwig et al., 2012).

3.2.3 Ernährungsfaktoren

Vitaminmangel wird in verschiedenen Studien als ein entscheidender Risikofaktor für LKG-Spalten beschrieben (Pickerill, 1914; Strauss, 1914; Tolarová and Harris, 1995). Block et al. (2013) fanden einen deutlichen proportionalen Zusammenhang zwischen erhöhtem mütterlichen BMI >30 (Body Mass Index, kg/m²) und isolierten Gaumenspalten. In der Studie wurden an Diabetes mellitus leidende Mütter ausgeschlossen.

3.2.4 Medikamente und Chemikalien

Die unkontrollierte Einnahme von Medikamenten und der ungeschützte Umgang mit Chemikalien sollten in der Schwangerschaft möglichst vermieden werden. Die Behandlung mit speziellen Medikamenten sollte somit stets hinsichtlich des Nutzen-Risiko-Effekts abgewogen werden, da eine Vielzahl von Medikamenten teratogen wirken.

Fluordesoxyuridin (FUDR), ein Zytostatikum das im Rahmen der Chemotherapie von neoplastischen Erkrankungen eingesetzt wird, führte im Tierversuch in allen Fällen zu Gaumenspalten (Ferguson, 1978b).

Bromodesoxyuridin (BrdU), welches zur labordiagnostischen Markierung proliferierender Zellen in vitalen Geweben verwendet wird, wird im Tierversuch eingesetzt, um das Fehlbildungsmuster der Robin- Sequenz zu imitieren (Antoniades et al., 1993).

Phenytol, organischen Lösemitteln, Insektiziden, Herbiziden und Desinfektionsmitteln etc. wird ebenfalls eine teratogene Wirkung zugeschrieben (Longo, 1982; Wyszynski und Beaty, 1996a).

3.2.5 Stress und starke psychische Belastung

Im Tierversuch konnten isolierte Spaltbildungen des Gaumens durch Stress (Nahrungsentzug und unangemessene Lärmexposition) bei den Muttertieren erzeugt werden (Peters und Straßburg, 1968). Einen ähnlichen Zusammenhang vermuten Goenjian et al. (2011) bezüglich eines beobachteten Anstiegs craniofazialer Fehlbildungen nach dem Wirbelsturm Katrina 2005. Der Grund für die durch Stress bzw. psychische Traumata während der Schwangerschaft verursachten Fehlbildungen ist nach Selye (1953) eine vermehrte Sekretion von Nebennierenrindenhormonen (Adrenalin, Cortisol), die einen teratogenen Effekt auf die Frucht ausüben.

3.2.6 Alkohol- und Nikotinabusus

Mütterlicher Nikotinabusus und Alkoholkonsum während der Schwangerschaft werden ebenfalls mit der Entstehung von LKG-Spalten in Verbindung gebracht (Khoury et al., 1989; Munger et al., 1996; Romitti et al., 1999). Dabei kann der zugrunde liegende Mechanismus auf dem bei Rauchern häufig festgestellten Folatmangel und einer schlechteren Oxygenierung des Gewebes basieren. Der mütterliche Nikotinkonsum soll somit durch vermehrte Hypoxie in den Geweben das Zellwachstum speziell während der Gaumenentwicklung negativ beeinflussen (Millicovsky und Johnston 1981; Longo, 1982).

Eine schottische Studie beschreibt eine hochgradige Assoziation von LK(G)-Spalten mit dem sozioökonomischen Status der Eltern, der sich proportional zum Nikotinabusus verhalte (Clark et al. 2003).

3.2.7 Ionisierende Strahlung

Im Zusammenhang mit dem Reaktorunfall am 25.4.1986 im russischen Tschernobyl konnte in Studien der ehemaligen DDR während der Jahre 1980-1986 eine auf 9,4% erhöhte Spaltrate festgestellt werden. Eine besonders deutliche Steigerung der Prävalenz wurde in Gebieten mit erhöhter Strahlenbelastung gefunden (Ziegłowski und Hemprich, 1999).

3.2.8 Dysplastische Faktoren

Ein signifikanter Einfluss eines höheren mütterlichen Alters auf die Genese der LKG-Spalten und die Steigerung des Fehlbildungsrisikos mit der Geburtenziffer wurden vorab beschrieben (Fogh-Andersen, 1961; Woolf et al., 1963; Hanhart und Kälin, 1972). Bille et al. (2005a,b) stellten eine Assoziation zwischen einem erhöhten Alter der Eltern und dem Auftreten von nicht-syndromalen LK(G)-Spalten sowie zwischen hohem väterlichen Alter und dem Auftreten von nicht-syndromalen Gaumenspalten fest.

3.2.9 Erkrankungen der Mutter während der Schwangerschaft

Ács et al. (2006) fanden eine Häufung von unspezifischen Infekten der oberen Atemwege in den ersten drei Monaten der Gravidität bei Müttern von Spaltkindern und Kindern mit anderen Fehlbildungen. Die Einnahme von fiebersenkenden Medikamenten (z.B. Acetylsalicylsäure und Metamizol) zeigte allerdings einen vermutlich anti-teratogenen Effekt und konnte nicht mit der Entstehung von orofazialen Spaltbildungen in Zusammenhang gebracht werden.

3.3 Epidemiologie

Bei der Betrachtung epidemiologischer Daten kongenitaler Fehlbildungen ist es wichtig, die Begriffe Inzidenz und Prävalenz genau zu verwenden.

Unter Inzidenz versteht man das Neuauftreten von Spaltfällen in einer bestimmten Population über einen definierten Zeitraum, während die Prävalenz die absolute Anzahl von Spaltfällen in einer Population zu einem bestimmten Zeitpunkt (Punktprävalenz) oder in einem Zeitraum (Periodenprävalenz) angibt.

Dronamraju et al. (1982) machen diesbezüglich auf folgenden Zusammenhang aufmerksam: steigert ein Risikofaktor bei geringer Exposition das Fehlbildungsrisiko und führt gleichzeitig bei hoher Exposition zum Abort, so kommt es bei nachlassender Einwirkung durch die Noxe zu einer Steigerung der Inzidenz der Fehlbildung.

3.3.1 Häufigkeit

Die Häufigkeit für die verschiedenen Spalttypen vergleichen verschiedene internationale epidemiologische Studien der letzten Jahre (Tab. 2). Im Mittel lag die Inzidenz für alle Spalttypen bei 1,5 (Abb. 2).

Tab. 2: Internationale Untersuchungen zur Häufigkeit der Spaltbildungen

Region	Autor	Zeitraum	n	LK(G)S	GS	Gesamt
Victoria,						
Australien	Vallino-Napoli et al. (2004) ¹⁾	1983 - 2000	1129402	0,77	0,43	1,2
Sucré, Bolivien	Mcleod et al. (2004) ²⁾	1995 - 2001	22746	1,19	0,04	1,23
Dänemark	Bille et al. (2005a) ²⁾	1988 - 2001	992727	0,54	0,80	1,44
Jordanien	Al Omari et al. (2004) ²⁾	1991 - 2001	1548106	1,08	0,31	1,39
Hawaii	Forrester, Merz (2004) ²⁾	1986 - 2000	281866	1,25	0,68	1,93
Europa	Calzolari et al. (2004) ³⁾	1980 - 1996	6181499		0,62	
Dänemark	Jakobsen et al. (2003) ²⁾	1962 - 1987	2707972	1,4	0,5	1,9
Faröer Inseln	Jakobsen et al. (2003) ²⁾	1950 - 1999	39364	1	1,5	2,5
Grönland	Jakobsen et al. (2003) ²⁾	1950 - 1999	59037	0,6	1,1	1,7
Iran	Rajabian, Sherkat (2000) ²⁾	1976 - 1991	19369	0,62	0,41	1,03
Kalifornien, USA	Tolarová, Cervenka (1998) ⁴⁾	1983 - 1993	2493331	0,77	0,31	1,08
Kalifornien, USA	Croen et al. (1998) ⁴⁾	1983 - 1992	2221755	1,05	0,66	1,71
Philippinen	Murray et al. (1997) ²⁾	1989 - 1996	47969			1,94
Santiago, Chile	Palomino et al. (1997) ²⁾	1969 - 1988	200919	1,27	0,26	1,53
Schottland	Bellis, Wohlgemuth (1999) ²⁾	1971 - 1990	356922	0,77	0,63	1,4

¹⁾ Lebendgeburten/neonatale Todesfälle >20. Woche

²⁾ Lebendgeburten

³⁾ Lebendgeburten/Totgeburten/Schwangerschaftsabbrüche

⁴⁾ Lebendgeburten/Aborte >20. Schwangerschaftswoche

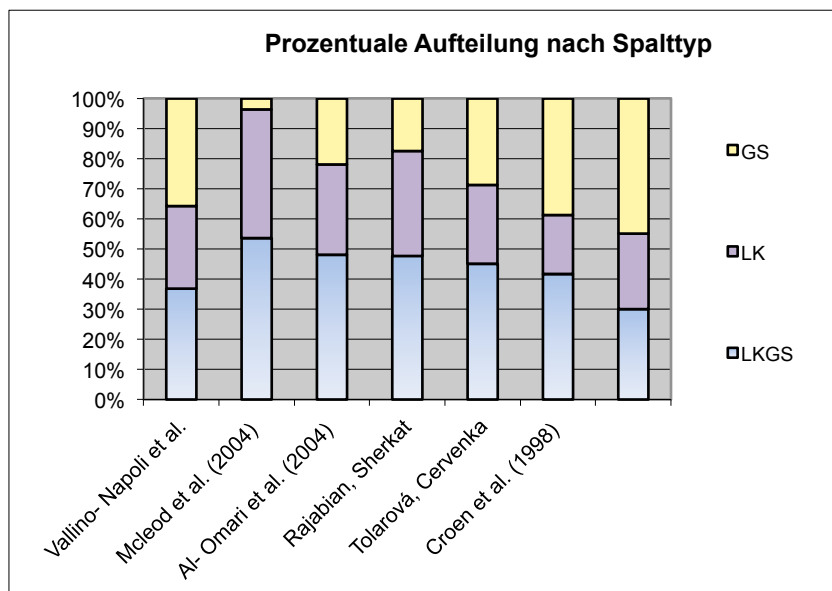


Abb. 2: prozentuale Verteilung der Spalttypen in der konsultierten Literatur.

3.3.2 Ethnische Unterschiede

Vanderas (1987) wertete hinsichtlich der ethnischen Verteilung 48 verschiedene epidemiologische Studien retrospektiv aus und bestätigte so die Existenz von Schwankungen der Inzidenz zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen.

Tab. 3: Inzidenz innerhalb verschiedener Ethnien nach Vanderas (1987)

Ethnie	Inzidenz			
	LK(G)S	LKS	LKGS	GS
Mongolide	0,85- 4,04			
Europide	0,80- 2,69	0,29- 0,45	0,36- 0,83	0,19- 0,83
Negrade	0,18- 1,67	0,04- 0,20	0,08- 0,26	0,05- 0,96

LK(G)S = Lippen- Kieferspalten mit oder ohne Gaumenspalten, LK = Lippen- Kieferspalten, LKGS = Lippen- Kiefer- Gaumen- Segelspalten, GS = isolierte Gaumenspalte

3.3.3 Geschlechterverteilung

Die Spaltbildungen des primären und sekundären Gaumens zeigen eindeutig eine Geschlechtsgebundenheit mit einer signifikanten Mehrheit von männlichen Individuen, die Lippen-, Lippen-Kiefer- und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und weiblichen Individuen, die vermehrt Gaumenspalten aufweisen.

Diese ungleiche geschlechtsspezifische Verteilung war für Fogh-Andersen (1961) einer der Hauptgründe für die These, dass es sich bei LKGS und GS um genetisch verschiedene Anomalien handeln könnte.

3.3.4 Assoziierte Anomalien

Nach Ingalls et al. (1964) zeigen fast die Hälfte aller Kinder mit isolierter Gaumenspalte weitere Fehlbildungen, während weniger als ein Fünftel der Kinder mit isolierter Lippenspalte oder LKGS weitere Anomalien aufweisen.

3.3.5 Saisonale Verteilung

Die Annahme einer saisonalen Abhängigkeit der Spaltbildungen ergibt sich aus dem multifaktoriellen Schwellenwertmodell. Im Jahreszyklus variieren exogene Faktoren wie beispielsweise die Intensität des ultravioletten Lichts, Ernährung, Infektionskrankheiten und teratogene Einflüsse durch z.B. Pestizide (Krost, 2001). Dem gegenüber stehen zahlreiche Studien, die keine saisonalen Einflüsse auf die Spaltrate sehen (Woolf et al., 1963; Ingalls et al., 1964).

3.4 Interdisziplinäre Therapie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Bei einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte handelt es sich um ein komplexes Krankheitsbild, bei dem sowohl ästhetische und funktionelle als auch psychologische Faktoren eine Rolle spielen. Die Behandlung erfordert somit eine enge Zusammenarbeit zwischen verschiedenen Fachdisziplinen. Unter Federführung des MKG-Chirurgen sind Fachärzte der HNO-Heilkunde, der Kieferorthopädie und der Kinderzahnheilkunde maßgeblich an der interdisziplinären Behandlung der Patienten beteiligt. Logopädische Therapie über einen langen Zeitraum und die Organisation in verschiedenen Selbsthilfegruppen sind anzuraten, um ein optimales Ergebnis für das Kind zu erzielen.

Vom chirurgischen Aspekt sollten eine symmetrische und gut bewegliche Oberlippe mit weitgehend unauffälliger Narbe, ein ausreichend tiefes Vestibulum im Oberkiefer, ein halb- und gewölbter harter Gaumen ohne Restperforationen (Krüger, 1993) symmetrische Naseneingänge, ein mittig stehendes Septum und ein gut bewegliches und ausreichend langes Gaumensegel, das eine normal klingende Sprache ermöglicht erzielt werden.

Die Kieferspalte sollte bei mangelndem Knochenangebot um das 8.-10. Lebensjahr mittels Osteoplastik versorgt werden, um den Durchbruch der spaltnahen Zähne zu ermöglichen. Fehlende Zähne sollten durch eine implantatgetragene Einzelkronenversorgung ersetzt sein.

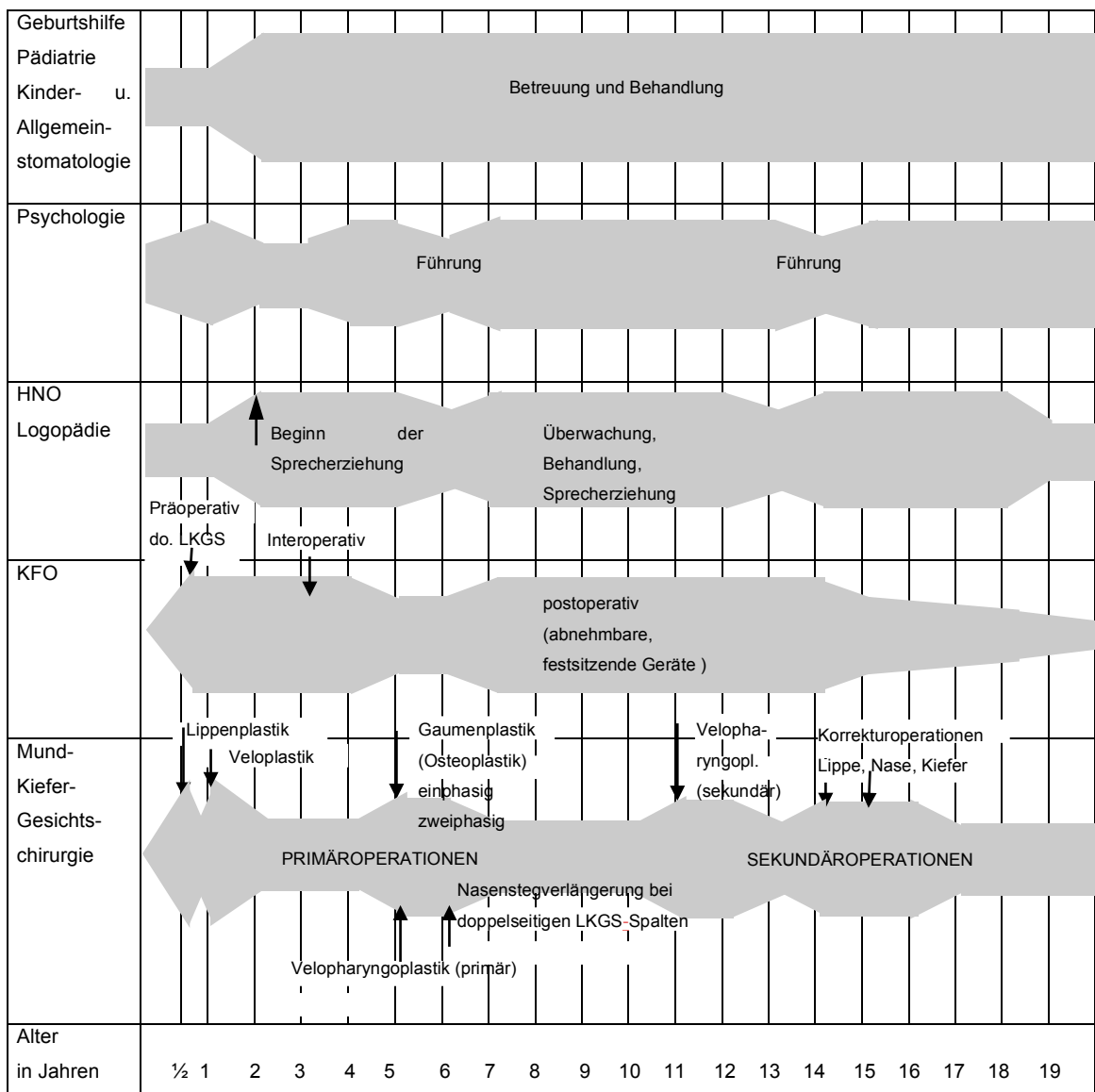


Abb. 3: Ablauf der komplexen Spaltträgerrehabilitation nach Andrä (Hintz und Lindner, 1987).

3.5 Prävention mit Schutzstoffen

Bei der Entwicklung eines Präventionsmechanismus muss man zwischen spezifischer und unspezifischer Prävention unterscheiden. Unter spezifischer Prävention versteht man die Vermeidung bzw. Elimination einer definierten Noxe. Die unspezifische Prävention richtet sich gegen mehrere unbekannte bzw. unspezifische Störfaktoren und hat in sich eine größere Breitenwirkung.

Im Hinblick auf die Prävention der LKGS stellt sich das Problem der Vielfalt möglicher Noxen, wie bereits im Rahmen der kausalen Genese beschrieben.

Seit Ende der fünfziger Jahre gibt es Ansätze, der Entwicklung der LKG-Spalten durch „Schutzstoffe“ als Präventiva vorzubeugen.

3.5.1 Folsäure (Vitamin B9)

Folsäure (Vitamin B9) ist ein essentielles Vitamin und muss im Verdauungstrakt aus der Nahrung resorbiert werden. Tetrahydrofolsäure ist als Coenzym für den Transfer von C1-Fragmenten nötig, wie er z.B. im Aminosäurenstoffwechsel und bei der Synthese von DNA benötigt wird (Voet und Voet, 1992). Der Bedarf an Folsäure ist während des Wachstums und der Schwangerschaft erhöht (Tolarová und Harris, 1995). Eine zu geringe Folsäureaufnahme durch die Nahrung, eine Störung der Synthese durch die intestinalen Mikroorganismen oder die mangelnde Utilisation im Organismus führt zu Folsäuremangel, unter dem bis zu 56% aller Schwangeren leiden (Czeizel et al., 1996).

Im Fall von Neuralrohrdefekten (neural tube defects = NTD) gilt als gesichert, dass eine Substitution mit 4 mg Folsäure/Tag eine Senkung der Fehlbildungsrate um 72 % zur Folge hat. So wurde zur Prävention von kongenitalen Fehlbildungen der Neuralleiste folgende Empfehlung gegeben: Frauen, die bereits ein Kind mit einer Fehlbildung zur Welt gebracht haben, sollten bei erneutem Kinderwunsch täglich 4 mg Folsäure einnehmen, während generell bei einer geplanten Schwangerschaft die tägliche Zufuhr von 0,4 mg Folsäure bis zur zwölften Woche der Schwangerschaft empfohlen wird.

Einer der gängigsten Marker für den Folsäuremangel im Organismus ist die Hyperhomozysteinämie, welche als Risikofaktor für LKGS erkannt wurde (Wong et al., 1999). Medikamente die in den Folsäurestoffwechsel eingreifen, wie z.B. Phenytoin, lösen LKGS sowie andere kraniofaziale Fehlbildungen bei den Nachkommen aus. Khoury et al. (1989) entdeckten, dass eine rauchende Mutter ein 1,6-2 mal höheres Risiko für eine Spaltbildung des Nachwuchses hat, als Mütter ohne Nikotinabusus in

der Anamnese. Dabei ist bekannt, dass Raucher einen wesentlich niedrigeren Folatspiegel aufweisen als Nichtraucher (McNulty, 1995).

Prescott und Malcolm (2002) suchten nach einer möglichen genetischen Basis einer Suszeptibilität für einen niedrigen Folatspiegel. Dabei konnten sie eine Assoziation mit dem MTHFR-Genotyp beobachten.

Itikala et al. (2001) untersuchten retrospektiv den Zusammenhang zwischen mütterlicher Einnahme von Multivitaminen bzw. Folsäure und dem Auftreten nicht-syndromaler LKGS und GS in der Gesamtbevölkerung. In ihrer Studie wird eine Reduktion des Risikos für LKGS um 48 % für Mütter beschrieben, die in den ersten drei Schwangerschaftsmonaten Dosen von 0,4-1 mg an Folsäure täglich einnahmen. Somit zeigte in diesen Studien nur eine hohe Dosis einen präventiven Effekt. Für GS konnte in dieser Studie keine signifikante Risikoreduktion festgestellt werden.

Auch in Tierversuchen ist ein protektiver Effekt von Folsäure hinsichtlich der Vermeidung einer teratogen bedingten Spaltbildung beschrieben worden. Bienengraber et al. (2001) verabreichten 11 Mutterratten (75 Rattenfeten) das Zytostatikum Prokarbazin (Hydrazin-Derivat) am 14. Tag p.c. um eine Gaumenspalte zu induzieren. Sieben der schwangeren Ratten (45 Rattenfeten) erhielten vom 14.-17. Tag Folsäure subkutan (4 mg/kg KG). Unter den mit Folsäure behandelten Feten lag der Prozentsatz an GS nicht signifikant niedriger als bei der unbehandelten Gruppe, aber es traten *weniger schwere* Formen der Gaumenspalte auf.

Paros und Beck (1999) führten eine *in vivo* Studie mit A/WySnBk-Mäusen durch, welche zu 25-45% Spalten entwickeln. Die trächtigen Weibchen wurden von Tag 8,5-9,5 p.c. durch subkutane Minipumpen ca. 7,6 µl/h Folsäure (Gesamtdosis von 12 mg/d) verabreicht. Nach Sectio wurden die Feten am 18. Tag p.c. auf LK(G)-Spalten und andere Fehlbildungen untersucht. Die Spaltrate der A/WySnBk-Mäuse sank hierbei unter Vitamingabe von ca. 40% in der Kontrollgruppe auf ca. 10% in der mit Folsäure behandelten Gruppe.

In einer prospektiven Patientenstudie konnte allerdings der protektive Effekt durch physiologische Dosen von Folsäure (<1 mg/d) hinsichtlich der Prävention von LKGS nicht nachgewiesen werden (Czeizel et al., 1996). Tolarová und Harris (1995) berichteten allerdings, dass hohe Dosen von 6 mg Folsäure/d die Inzidenz der LK(G)S und GS signifikant senken konnten, wenn sie in der kritischen Entwicklungsperiode verabreicht wurden (1. Trimenon). Aufgrund der unerwünschten Nebenwirkung dieser hohen Dosen, z.B. bei Patientinnen mit perniziöser Anämie, konnte allerdings keine generelle Empfehlung zur symptomatischen Prophylaxe geben. Hierauf empfahlen auch Czeizel et al. (1999) eine Hochdosis-Medikation nach Identifikation eines hohen

genetisch bedingten Risikos für LKGS, basierend auf der Identifikation der verantwortlichen Gene.

Im Rahmen einer aktuellen Untersuchung von Rozendaal et al. (2013) in der Nordholländischen Bevölkerung wurde hingegen eine Steigerung der Rate an Neugeborenen mit Lippen-Kiefer-Spalten unter perikonzeptioneller Folsäuremedikation beobachtet.

3.5.2 Thiamin (Vitamin B1)

Thiamin, auch Aneurin oder Vitamin B₁ genannt, ist wahrscheinlich das am längsten bekannte B-Vitamin. Thiamin besteht aus einem Pyrimidin- und Thiazol-Anteil, der durch eine Methylenbrücke verbunden ist. Die heute therapeutisch verwendeten Formen des Thiamins sind das Chlorid, das Hydrochlorid und das Mononitrat. Thiamin bildet als Hydrochlorid geruchslose, farblose Nadeln, die in Wasser leicht löslich sind. Die Substanz ist in neutraler und alkalischer Lösung thermolabil, gegen Luftsauerstoff beständig, aber empfindlich gegen Oxydationsmittel und ultraviolettes Licht. Im Dünndarm wird Thiamin leicht resorbiert und enzymatisch in der Darmmukosa in Thiamindiphosphat übergeführt. Der normale Thiamingehalt im Vollblut beträgt zwischen 20-25 µg/l, im Serum 18-62 µg/l, wobei der Thiamingehalt des Serums bei Neugeborenen stark erhöht ist. Während Schwangerschaft, Stillzeit und gewissen chronischen Erkrankungen ist der Thiaminbedarf erhöht (Woelk 1989).

Im Serum trächtiger Ratten konnte ein Thiamin bindendes Protein nachgewiesen werden, welches jedoch nicht im Serum jugendlicher Ratten nachweisbar ist. So schwankt der Thiaminspiegel trächtiger Ratten im Gleichklang mit dem Östrogenspiegel.

Bereits 1980 führte Schubert Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung experimentell erzeugter Gaumenspalten an der Hausmaus durch. Er stellte fest, dass Vitamin B1 bei alleiniger Applikation geeignet ist, die Rate teratogen erzeugter Gaumenspalten um etwa ein Drittel zu senken.

1997 behandelten Bienengräber et al. 14 gravide Wistar-Ratten am 14. Tag p.c. mit dem Prokarbazin (200 mg/kg KG) zur Induktion von teratogen induzierten Gaumenspalten. Sieben der so behandelten Rattenmütter erhielten zusätzlich eine tägliche Dosis von 200 mg/kg KG Thiamin (Vitamin B1) vom 14. bis zum 19. Tag p.c. Hier betrug der Anteil an LKGS in der Thiamin-Gruppe 100%, entgegen 88% bei alleiniger Injektion von Prokarbazin. Die Autoren vermuteten in diesen Fällen keine Protektion, sondern eine Amplifikation des teratogenen Effekts, begründet durch die These von Kreybig's (1981), der feststellte, dass Thiamingabe vor Applikation des

Teratogens einen Anstieg der Fehlbildungen bewirkt, während die Gabe *nach* Teratogeninjektion zu einem protektiven Effekt führt. Bienengrüber et al. diskutierten ihre Ergebnisse im Zusammenhang mit von Kreybig und Gabka (1981) und sah deren Erfolg eher als das Ergebnis der Optimierung von Begleitumständen der Schwangerschaft.

Zenk et al. (1987) beobachteten eine signifikante Reduktion der durch Hadacidin hervorgerufenen Gaumenspaltfrequenz um ca. 50% durch Thiaminhydrochlorid. Hadacidin beeinträchtigt die Glykosaminoglykansynthese, die nach Ansicht vieler Autoren die Grundlage der Horizontalisierung der Gaumenplatten darstellt (Ferguson, 1978a). Nach Zenk et al. (1987) ist durch die so verzögerte Horizontalisierung das Kantenepithel der aufeinandertreffenden Platten nicht mehr fusionsbereit. Thiamin begünstigt die Synthese von Proteoglykanen und verlegt so die Horizontalisierung der Platten wieder auf einen Zeitraum, in dem die Fusion noch möglich ist.

Gundlach et al. (1986) injizierten graviden Mäuseweibchen Formhydroxamsäure, der eine Organotropie im Kauschädelbereich zugeschrieben wurde. So entfaltete sich die teratogene Wirkung der Formhydroxamsäure speziell im Kauschädel. Ein Teil der Tiere wurde vom 9.-11. p.c.-Tag mit Thiamin behandelt (3 x täglich 25mg/kg). Gundlach et al. beobachteten sowohl eine Senkung der Fehlbildungsrate um 21%, als auch einen Rückgang der fetalen Aborte um 6%.

3.5.3 Multivitamine

1995 veröffentlichten Tolarová und Harris eine klinische Studie mit 2.122 Paaren, bei denen einer der Partner mit nicht-syndromaler LK(G)-Spalte geboren wurde. Um eine möglichst große ätiologische Homogenität der Stichproben zu erreichen, wurden ausschließlich sporadische Fälle ausgewählt. Die Supplementation bestand in einem Multivitaminpräparat (Vitamine A, B1, B2, B6, C, D3, E, Nicotinamid, Calcium pantothenicum) kombiniert mit Folsäure (10 mg/d) und umfasste einen Zeitraum von 2 Monaten vor geplanter Konzeption bis zum 3. Monat der Schwangerschaft. Die Spaltrate betrug in der Kontrollgruppe 4,05% und in der behandelten Gruppe 1,4%.

Wie bereits Gundlach et al. zuvor erzielten auch Tolarová und Harris den größten Erfolg bei männlichen Individuen mit einseitigen Spalten und keinen Effekt bei weiblichen Nachkommen mit beidseitiger Manifestation der Spaltbildung. Sie entwickelten daraus folgende These: *„Die Effektivität der Prävention steigt mit der steigenden Inzidenz des Spalttyps in der Bevölkerung und mit sinkenden Werten der Erblichkeit und des Wiederholungsrisikos“* (Tolarová und Harris, 1995).

Gabka (1981) behandelte 131 werdende Mütter, in deren Familienanamnese LKGS aufgetreten waren, während der Schwangerschaft mit einer Kombination von Actihaemyl® (entspricht Solcoseryl®: eiweißfreies Extrakt aus fetalem Kälberblut mit sauerstoffaktivierender Wirkung) und Multivitaminen. Im Behandlungskollektiv traten zu 1,75% spaltpositive Nachkommen auf, im Gegensatz zu 4,6% in der Kontrollgruppe. Gabka erkannte bereits, dass ein rechtzeitiges Einsetzen der symptomatischen Prophylaxe spätestens am 30.Tag post conceptionem zu erfolgen hat.

Von Kreybig (1981) weitete die aus Gabka's Studie erhaltenen Informationen aus, um die prophylaktischen Maßnahmen auf weitere Fehlbildungen zu erweitern. Er empfahl während der Vorbereitungszeit zur Schwangerschaft Screening-Untersuchungen zum Ausschluss von Röteln, Toxoplasmose, Listeriose und Zytomegalie (CMV). Ebenfalls empfahl er die Behandlung von Anämien, den Abschluss ärztlicher und zahnärztlicher Behandlungen sowie einen sechsmonatigen Abstand zum Absetzen hormoneller Kontrazeptiva. Nikotinkarenz, gesunde Ernährung, Stabilisierung des seelischen Gleichgewichts und Medikamenten-Abstinenz bei nicht vitaler Indikation wurden ebenfalls empfohlen .

Gundlach et al. (1986) erhoben eine prospektive klinische Studie, an der 358 Patientinnen teilnahmen, die bereits ein Kind mit LKGS zur Welt gebracht hatten. Die Patientinnen erhielten ein Vitamin B-Komplexpräparat, welches ab dem 5. Tag nach Ausbleiben der Menstruation dreimal täglich eingenommen werden sollte (300 mg B1, 300 mg B6, 0,75 mg B12) Die Schwangerschaften der so behandelten Mütter endeten mit 4 Spaltgeburten (1,1%), während in der Kontrollgruppe von 164 Müttern 35 Schwangerschaften Spaltbildungen, andere Fehlbildungen oder einen Abort erbrachten (21%).

Schubert (1980) testete unter anderem die Wirkung der Vitamine des B-Komplexes, wobei er eine sehr günstige Beeinflussung der Spaltrate bei weniger auffälliger Reduktion der allgemeinen Fehlbildungshäufigkeit fest stellen konnte. Dabei stieß er auf die prophylaktische Wirkung bei der Anwendung des Vitaminpräparates vor der Applikation von Teratogenen.

Eine aktuelle Studie von McKinney et al. (2013) empfehlen gerade in ärmeren Regionen den Konsum von Leber alternativ zur medikamentösen Vitaminsubstitution in der Schwangerschaft, da beides reproduzierbar die Rate von Nachkommen mit Lippenpalten erniedrigt. Leber ist reich an fettlöslichen und B-Vitaminen und außerdem das Lebensmittel mit dem höchsten Vitamin A-Gehalt.

3.5.4 Vitamin B₆

In der Natur kommen sechs biologisch aktive Vitamin B₆-Formen vor. Dazu gehören Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxol. Diese drei Substanzen sind als Phosphat bei Mensch und Tier als Coenzym zahlreicher Enzyme etwa gleich wirksam. Säuger sind nicht in der Lage Vitamin B₆ zu synthetisieren, können jedoch alle sechs Vitamin B₆-Formen ineinander überführen. So kann der allgemeine Vitamin B₆-Bedarf durch Pyridoxinhydrochlorid gedeckt werden. In wässrigen sauren Lösungen ist Vitamin B₆ stabil, in neutralen und alkalischen Lösungen und durch Lichteinwirkung wird es zerstört. Pyridoxalphosphat und Pyridoxal sind im Blutplasma an Albumin gebunden und werden beide rasch durch Transfer in die Organe und Gewebe aus dem Plasma entfernt. Der Pyridoxalphosphat Spiegel in Blut und Harn erreicht beim Menschen den höchsten Wert im Säuglingsalter bis zum 50. Lebensjahr und nimmt anschließend laufend ab. Als Coenzym ist Vitamin B₆ an mehr als vierzig enzymatischen Reaktionen beteiligt. Pyridoxamin- und Pyridoxalphosphat wirken als Coenzyme bei Transaminierungsreaktionen, die für den Abbau von Gamma-Aminobuttersäure im Gehirn und für den Oxalsäurestoffwechsel von Bedeutung sind. Pyridoxalphosphat ist u.a. das Coenzym für die Decarboxylierung von Aminosäuren. Vom Ende des ersten Trimenons an entwickelt sich bei Schwangeren fast immer ein Defizit an Pyridoxin, da der fetale Organismus, der einen bedeutenden Eiweißaufbau zu leisten hat, seinen Bedarf an Pyridoxin aus dem mütterlichen Organismus deckt (Rehner und Daniel, 2010).

Über die Wirkung der alleinigen Gabe von Vitamin B₆ zur Prävention angeborener Fehlbildungen ist wenig dokumentiert. Als Bestandteil von Multivitamin-Präparaten wird Pyridoxin jedoch häufig eingesetzt (Gundlach et al., 1986; Tolarová und Harris, 1995; Schubert, 2002). Es existieren Hinweise auf neurologische Erkrankungen durch mütterlichen Mangel an Vitamin B₆, da der Pyridoxalphosphat-Spiegel (PLP-Spiegel) des Fötus direkt abhängig von der Zufuhr durch die Mutter ist. Um den PLP-Spiegel des Fötus während der Schwangerschaft im geforderten Bereich zu halten, sollte eine tägliche Zufuhr von mindestens 4 mg B₆ erfolgen (Cleary et al., 1975; Lumeng et al., 1976).

3.5.5 Vitamin B₁₂ - Cobalamin

Vitamin B₁₂ nimmt beim Menschen als Coenzym an nur zwei enzymatischen Reaktionen teil, bei der Methionin-Synthetase und der Methylmalonyl-CoA-Mutase.

Bei der Bildung von Methionin wird Homocystein zu Methionin remethyliert. Gelingt dies nicht, bildet sich vermehrt Homocystein, ein Zwischenprodukt beim Abbau der Aminosäure Methionin.

Fehlt das Coenzym B₁₂, kommt es zu einem sekundären Mangel an THF (Tetrahydrofolsäure), welches für die Synthese der Purinbasen Adenin und Guanin und der Pyrimidinbase Thymidin essentiell erforderlich ist. Durch einen Mangel an diesen Nucleobasen ist die Synthese von DNA aber auch von RNA gestört. Dies äußert sich vorrangig in Organen mit hoher Zellteilungsaktivität wie dem Knochenmark oder einem wachsenden Organismus. Durch die Störung im Knochenmark kommt es zu einer mehr oder minder ausgeprägten Panzytopenie im Blut, wobei der Mangel an Erythrozyten am offensichtlichsten ist. Die Gabe von Folsäure kann diesen Block umgehen und so einen Mangel an Cobalamin maskieren.

Die Methylmalonyl-CoA-Mutase dient der Einschleusung der Abbauprodukte ungeradzahlicher Fettsäuren sowie der Aminosäuren Valin, Isoleucin, Threonin und Methionin in den mitochondrialen Citratzyklus. Ist dieser Schritt gehemmt, kommt es zu einem Anstieg von Methylmalonsäure im Plasma und vor allem im Urin. Dieser Stoffwechselweg spielt offenbar eine besondere Rolle im ZNS, da sich ein Vitamin B₁₂-Mangel bisweilen sogar vor der typischen Anämie mit Symptomen wie einer Störung der Pyramidenbahn und der Hinterstränge, aber auch scheinbaren Altersdemenzen bemerkbar macht.

Die Absorption von Vitamin B₁₂ aus dem Gastrointestinaltrakt verläuft über zwei Mechanismen, die Bindung an den intrinsic-factor, der in der Lage ist 1,5-3 µg Cobalamin anzulagern und intrinsic-factor unabhängig via Diffusion bei großen Mengen oral applizierten Cobalamin.

In Tierversuchen an der Ratte konnten Kasirsky et al. (1967) durch die post-teratogene Gabe von Cobalamin die Rate der durch Kortison induzierten Gaumenspalten um 63% senken. Eine alleinige Gabe von Cobalamin führte in ihrem Versuch allerdings zur Erhöhung der Spaltrate gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe um 12,9%. Zhang et al. untersuchten 2011 ebenfalls den Effekt von Vitamin B12 auf durch Vitamin-A-Säure-induzierte craniofaziale Fehlbildungen und verwendeten dabei ebenfalls Mäuse in einer Organkultur. Sie setzten den gesamten Embryo in der kritischen Phase der Organogenese 0,4µM Vitamin-A-Säure und verschiedenen Konzentrationen Cobalamin aus. Dabei stellten sie eine konzentrationsabhängige

Senkung der Kiemenbogenfehlbildungen um bis zu 90,5% fest. Zur Evaluation der biochemischen Grundlage wurde die Expression der Proteine ET-1 und dHAND in der Kiemenbogenregion bestimmt. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg dieser Proteine im untersuchten Gewebe festgestellt werden. Die Autoren gehen davon aus, dass die Substitution mit Vitamin B12 während der craniofazialen Organogenese der Vitamin-A-Säure induzierten Mindereexpression von Proteinen entgegenwirkt und so einen deutlichen präventiven Effekt auf craniofaziale Fehlbildungen bewirkt.

Zusammenfassend fordert die WHO im Zeichen der Prävention die Rolle spezieller mütterlicher Ernährungsfaktoren in der Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und anderer kraniofazialer Anomalien systematisch zu untersuchen. Dabei sind laut WHO die vielversprechendsten Kandidaten zur Risikoreduktion der Entstehung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten Folsäure und Pyridoxin (Vitamin B6) sowie möglicherweise Riboflavin (Vitamin B2) und Vitamin A (Shaw, 2004). Die von der Arbeitsgruppe "Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr"/Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), 2001 empfohlene tägliche Zufuhr dieser Ernährungsfaktoren bei Schwangeren ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Empfohlene tägliche Zufuhr von B-Vitaminen in der Schwangerschaft (Arbeitsgruppe "Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr"/ Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), 2001)

Vitamin	empfohlene tägliche Dosis	Versuchspräparat
Thiamin (Vitamin B1)	1,2 mg	5 mg/ml (Hydrochlorid)
Riboflavin (Vitamin B2)	1,5 mg	2 mg/ml (R-5-Phosphat)
Nicotinamid (Niacin)	15 mg	20 mg/ml
Pyridoxin (Vitamin B6)	1,9 mg	2 mg/ml.(Hydrochlorid)
Folsäure	400 µg (zusätzlich zur Nahrung als Supplement)	Nicht enthalten
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	3,5 µg	Nicht enthalten
Biotin	30- 60µg	0,25 mg/ml
Pantothensäure	6mg	3 mg/ml (Dexpanthenol)

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

4.1.1 A/WySn-Maus

Der A/WySn-Mäusestamm wurde 1921 von L. C. Strong durch die Kreuzung der Cold Spring Harbor Albino- und der Bagg Albino-Maus entwickelt und anschließend durch konsequente Inzuchtpaarung über mehr als 249 Generationen verpaart (<http://jaxmice.jax.org>). Dieser Mäuse-Stamm weist mit einer konstanten Frequenz von 25-30% Lippenspalten, mit oder ohne Gaumenspalten auf, die bei der Maus eine unvollständige Penetranz, eine variable Expressivität und überwiegend beidseitige Manifestation zeigen (Juriloff et al., 2001).

Die genetische Variation dieser Mäuse ist minimal (Hallgrimsson et al., 2004). Bei diesen Mäusen wird eine multifaktorielle Genese, analog dem Menschen, angenommen (Kalter, 1979).

4.1.2 Tierhaltung

Die standardisierte Koloniezucht der Versuchstiere erfolgte im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der MLU (ZAMED - Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung, Heinrich-Damerow-Str. 1, 06120 Halle (Saale), Leitung: Dr. Ilona Wolff). Die Tiere wurden hier entsprechend der EG-Richtlinie (Richtlinie des Rates vom 24. November 1986) in Fünfer-Gruppen in Standard-Käfigen aus Makrolon gehalten, mit einer Grundfläche von 400 cm² und einer Höhe von 14 cm. Die Lufttemperatur wurde bei einer konstanten Luftfeuchtigkeit von 65% auf 22°C gehalten. Das Beleuchtungsregime war auf einen 12 Stunden Rhythmus durch 250 Watt Leuchtstoffröhren (70 Lux) eingestellt. Die Tiere erhielten Futter, in Form von Altromin Standarddiät 1314 TPF (total Pathogen frei) und Frischwasser ad libitum.

Im Alter von 4 Wochen wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt.

4.2 Verpaarung

Die Verpaarung der Tiere fand konsequent zwischen 8:00 und 9:30 Uhr MEZ statt. Dazu wurden 2 bis 3, mindestens 14 Wochen alte, virginelle, weibliche Tiere (Nullipara) für 90 min mit einem männlichen Tier in eine separate Box gesetzt. Als Zeitpunkt 0 des laufenden Versuches wurde der Zeitpunkt des Zusammentreffens der Tiere (8:00 Uhr MEZ) definiert.

Nach der Verpaarung waren die Weibchen zu viert in Standard-Käfigen untergebracht. Das Vorhandensein eines Vaginalpropfes bei der morgendlichen Kontrolle wurde als Nachweis der Trächtigkeit gewertet.

4.3 Probenentnahme

Die Entnahme der Feten erfolgte 14 Tage und 8 Stunden nach der Verpaarung (Abb.4). Die trächtigen Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Bauchhaut mit 97%-igem Ethylalkohol desinfiziert. Durch eine mediane Unterbauchinzision wurde der Uterusschlauch freigelegt und entnommen. Die Uteri wurden sofort in eisgekühlte, physiologische NaCl-Lösung gegeben. Die Feten blieben während der Zwischenlagerung in der Kochsalzlösung in ihren Amnionhöhlen und somit in ihrer physiologischen Umgebung. Dann wurden die Feten einzeln aus ihren Eihüllen befreit und auf einer Glasplatte unter dem Stereomikroskop (Leica MZ6 Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle und Ringlicht #7191) präpariert.



Abb. 4: A/WySn-Fetus im Alter von 14 Tagen und 8 Stunden

Durch Einführen eines Heidemannspatels in die Mundhöhle wurde die gewünschte Schnittebene markiert, wobei die Zunge nach kaudal verdrängt wurde.

Der Kopf wurde parallel zu den Gaumenplatten mit dem Skalpell durchtrennt (Abb.5) und dann auf der Kalotte gelagert, so dass eine Aufsicht auf die Gaumenplatten möglich war. Mit der aufgesetzten Digitalkamera (Nikon Coolpix E4500) wurden die Präparate fotografiert, schriftlich nach einem Schema von Al Obaidi et al. (1995) klassifiziert (Tab. 3) und unverzüglich inkubiert. Das Auswertungsverfahren beruht auf der Bewertung von Stellung, Größe und Kontaktzone der Gaumenplatten.

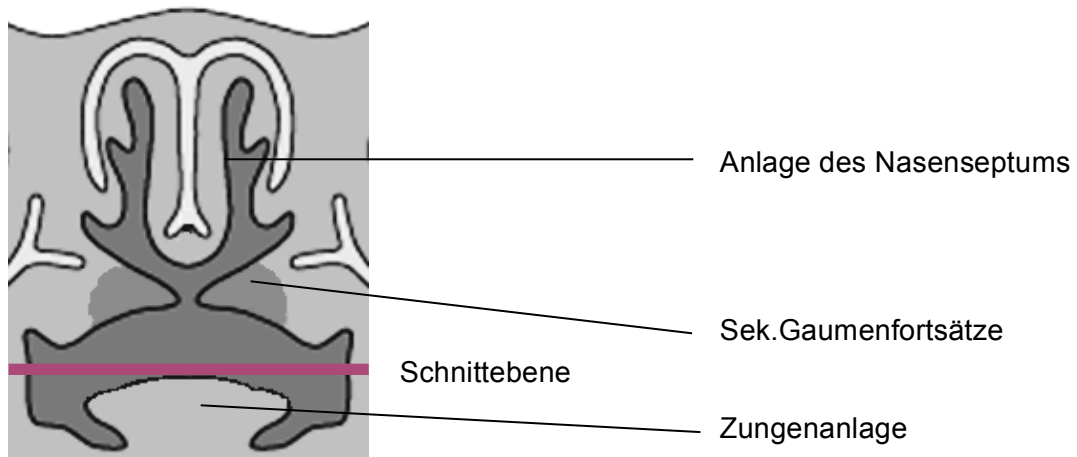


Abb. 5: schematischer Sagittalschnitt des präparierten Bereiches (Schnittebene rot eingezeichnet)

Tab. 5: Schematische (a) und fotografische (b) Klassifikation nach Al Obaidi et al. (1995).

Piktogramm (a)	Beispiel (b)	Beschreibung des Scores
		<p>Score 1 Gaumenplatten kaum erkennbar</p>
		<p>Score 2 Geringe Annäherung der Gaumenplatten</p>
		<p>Score 3 Starke Annäherung, aber kein Kontakt der Gaumenplatten</p>
		<p>Score 4 Erster Kontakt der Gaumenplatten</p>
		<p>Score 5 Fusion der Gaumenplatten zu 2/3 der Fläche</p>
		<p>Score 6 Vollständige Fusion der Gaumenplatten</p>

4.4 Organkulturverfahren

Alle Arbeitsschritte erfolgten in einer Reinraumwerkbank mit laminarem Luftstrom.

Dem Medium DMEM/HAM'S F-12 (1:1, Biochrom AG, Berlin) wurde 10% fetales Kälberserum (FBS, Biochrom AG, Berlin) sowie 2% Antibiotikum (Penicillin 10.000 E/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml, Seromed Biochrom, Berlin) zugegeben.

Das Vitamin B-Komplexpräparat Polybion N® (Merck KgaA, Darmstadt) wurde aus einer sterilen Ampulle in Konzentrationen von 0,1% und 1,0% dem Medium zugesetzt (Tab. 4). Die Vitaminkonzentration im Medium wurde für die einzelnen Vitamine in Tabelle 5 angeführt.

Tab.6: Zusammensetzung Polybion N® (Merck KgaA, Darmstadt)

Substanz	Konzentration (mg/ml)
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B1)	5
Riboflavin-5-Phosphat (Vitamin B2)	2
Nicotinamid	20
Dexpanthenol	3
Biotin	0,25
Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B6)	2

Tab. 7: Vitaminkonzentrationen in den verwendeten Kulturmedien

	Konzentration (mg/ml)		
	ohne	0,1% PolybionN	1,0% PolybionN
Thiamin (B1)	0,002	0,007	0,052
Riboflavin (B2)	0,0002	0,002	0,02
Nikotinamid (B3)	0,002	0,02	0,2
Pantothensäure (B5)	0,002	0,005	0,03
Pyridoxin (B6)	0,033	0,035	0,053
Biotin (B7)	0,00004	0,0003	0,0025
Folsäure (B9)	0,003	0,003	0,003
Cobalamin (B12)	0,0007	0,0007	0,0007

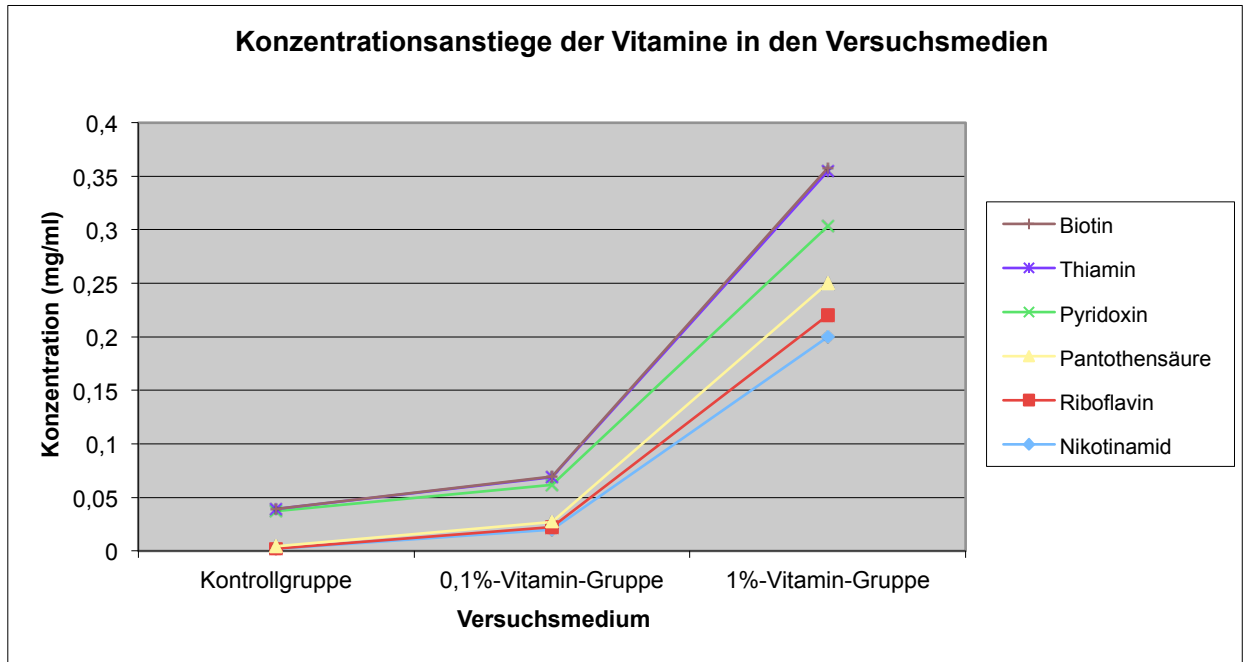


Abb.6: Graphische Darstellung des Anstiegs der Vitaminkonzentration in den zubereiteten Versuchsmedien

Das Medium wurde im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt und zu jeweils 1,5 ml in 6-er Schalen (Fa. Nunc, Dänemark) gegeben. In jede Vertiefung der Schalen wurde ein steriler Einsatz mit einer 0,4 µm Polycarbonat-Membran (Nunc 25 mm Organkultur-Einsätze, Fa. Nunc, Dänemark) eingelegt (Abb.10).

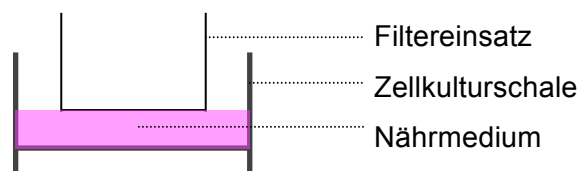


Abb.7: Skizze des vorbereiteten Kulturbedältnisses (Seitenansicht) für die Organkultur.

Zur eindeutigen Identifizierung der Proben wurde jeder Einsatz in seiner Position markiert, die präparierten Proben mit den Gaumenfortsätzen auf die Membran gelegt und die Organkulturen unverzüglich inkubiert.

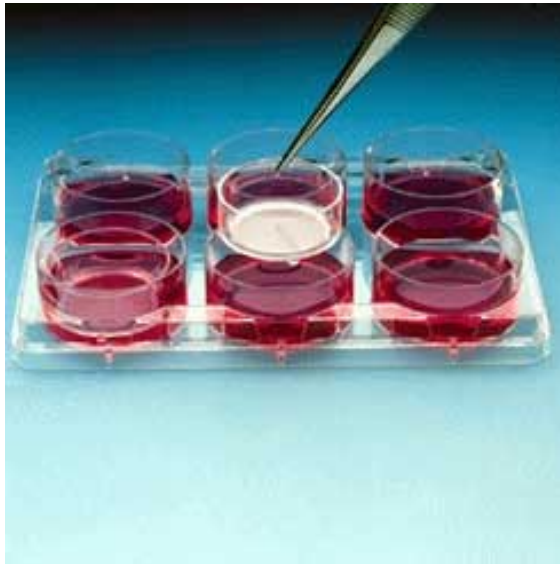


Abb. 8: Einsetzen eines sterilen Filter-inserts mit Polycarbonatmembran in die 6well-Schalen.

Die Kultivierung der Proben erfolgte bei 37°C, 95% O₂ und 5% CO₂ für 72 Stunden. Das Kulturmedium wurde nach 24 und 48 Stunden durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt, um die nötigen Nährstoffe in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen und einen Abfall des pH- Wertes zu vermeiden.

4.5 Auswertung der Proben

Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte die Auswertung des Wachstumsverhaltens der Organkulturen unter dem Stereomikroskop (Leica MZ6 Stereomikroskop mit Kaltlichtquelle und Ringlicht #7191). Zur Verstärkung des Kontrastes wurden die Organkulturen mit Phenolrot angefärbt, die Entwicklungsstufen der Gaumenplatten wurden klassifiziert und fotografiert.

4.4.1

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm SPSS Statistics, Version 12 (IBM Deutschland GmbH, 71137 Ehningen) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Frau Haufe im Universitäts-Rechenzentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Die Variablen „Kategorie vorher“ und „Kategorie nachher“ wurden als rangskalierte Daten mit nicht-parametrischen Standardtests ausgewertet. Zunächst wurde für jede der Versuchsgruppen ein nicht-parametrischer Vergleich der Variablen „Kategorie vorher“ und „Kategorie nachher“ als abhängige Stichproben durchgeführt. Dies erfolgte durch den Wilcoxon-Test, der auf einer Rangreihe der absoluten Wertepaardifferenzen beruht. Eine weitere Berechnung erfolgte durch den Vergleich der Variablen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen „vorher-nachher“ mittels des Kruskal-Wallis-Test. Dieser Test ist der Standardtest zum Vergleich von mehr als 2 unabhängigen Stichproben und beruht auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte aller Stichproben.

Zuletzt erfolgte ein Vergleich der Variablen „vorher-nachher“ in der Kontrollgruppe mit jeweils einer Vitamingruppe durch den Mann-Whitney-Test, der ebenfalls auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte aller Stichproben basiert.

Die Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn sich bei der statistischen Analyse eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) ergab.

5 Ergebnisse

Die Untersuchung stützt sich auf die Organkultur von 186 Feten von 37 Müttern. 163 Feten (87,6%) flossen in die Auswertung ein. 23 Feten konnten nach Präparation keinem Score zugeordnet werden und wurden deshalb in den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Zum Zeitpunkt der Präparation (14.8 Tag p.c.) lag der mittlere Entwicklungsscore über alle Versuchsgruppen bei 2 (n=163, 100%). Keines der Präparate zeigte eine vollständige Fusion der Gaumenplatten (0/163).

In der Kontrollgruppe (ohne Substitution mit Vitamin B, n= 54) war eine gruppenspezifische Regression der Palatogenese zu beobachten (Abb. 9). Der mittlere Score fiel von 2,35 ($\pm 0,85$) auf 2,25 ($\pm 0,89$) ab, es fand also kein signifikantes Wachstum statt ($p=0,32$). 70,4% (38/54) der Organkulturen zeigten kein erkennbares Gaumenwachstum, 14,3% (8/54) fielen um einen Score-Grad und 3,7% (2/54) um zwei zurück. Nur 6 von 54 Präparaten (11,1%) zeigten überhaupt eine registrierbare Weiterentwicklung: 5 Exemplaren um einen Score-Punkt und bei einem um zwei Punkte (1,9%).

Gaumenwachstum ohne Poly-Vitamin-Substitution

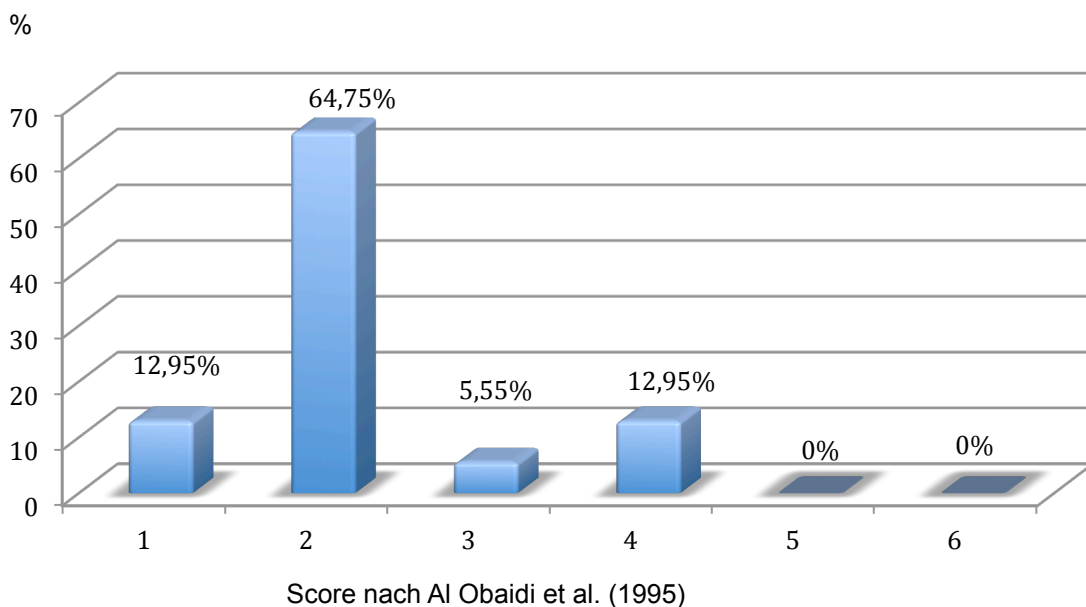


Abb. 9: Darstellung des erreichten Endscores in der nicht substituierten Organkultur nach 72h Inkubation (Kontrolle).

In jeder der beiden mit Vitamin B-substituierten Gruppen ($n_{0,1\%}=62$, $n_{1,0\%}=61$), zeigte sich makroskopisch je einmal eine vollständige Fusion der Gaumenplatten (Score 6) am Ende der 72-stündigen Inkubation (1,6%), die sich in den koronaren Schnitten dieser Proben histologisch als partielle Fusion mit einem epithelialen Saum in der Verschmelzungszone darstellte (Abb.10).

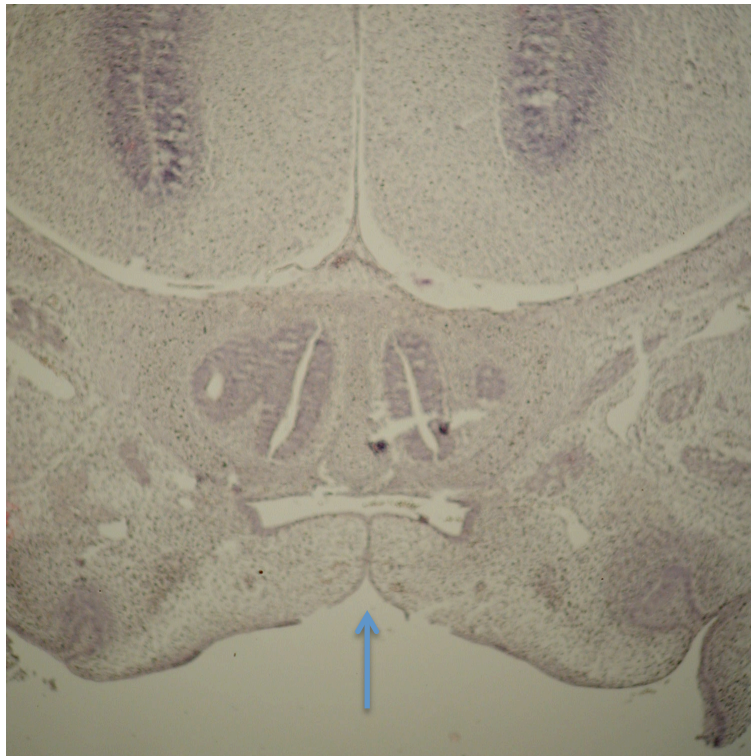


Abb. 10: Histologisches Präparat (H.E.-Färbung, 5-fache Vergrößerung) einer Organkultur des sekundären Gaumens in koronarer Schnittrichtung nach 72-stündiger Inkubation mit 0,1% Polyvitaminzusatz im Medium. Der Pfeil markiert den epithelialen Saum an der Verschmelzungszone der beiden Gaumenplattenpaare in der Mitte (Stadium VI, partiell).

In der 0,1% Vitamin-B Gruppe entwickelten sich insgesamt 51,5% der Organkulturen weiter (32/62). 35,5% (22/62) stiegen um einen Score an, 16,1% (10/62) um 2 Score-Grade. Drei Exemplare (3/62) zeigten nach der Inkubationsperiode einen um einen Grad geringeren Score (4,8%) und ein Exemplar um zwei Score-Stufen (1,6%). 24

Organkulturen (24/62, 38,7%) zeigten keinerlei Entwicklung während der Inkubation und stagnierten (Abb. 11).

Insgesamt war die Entwicklung durch den Zusatz des Polyvitamin B-Präparates PolybionN® in einer Medienkonzentration von 0,1% signifikant fortgeschritten ($p_{0,1\%} \leq 0,000$).

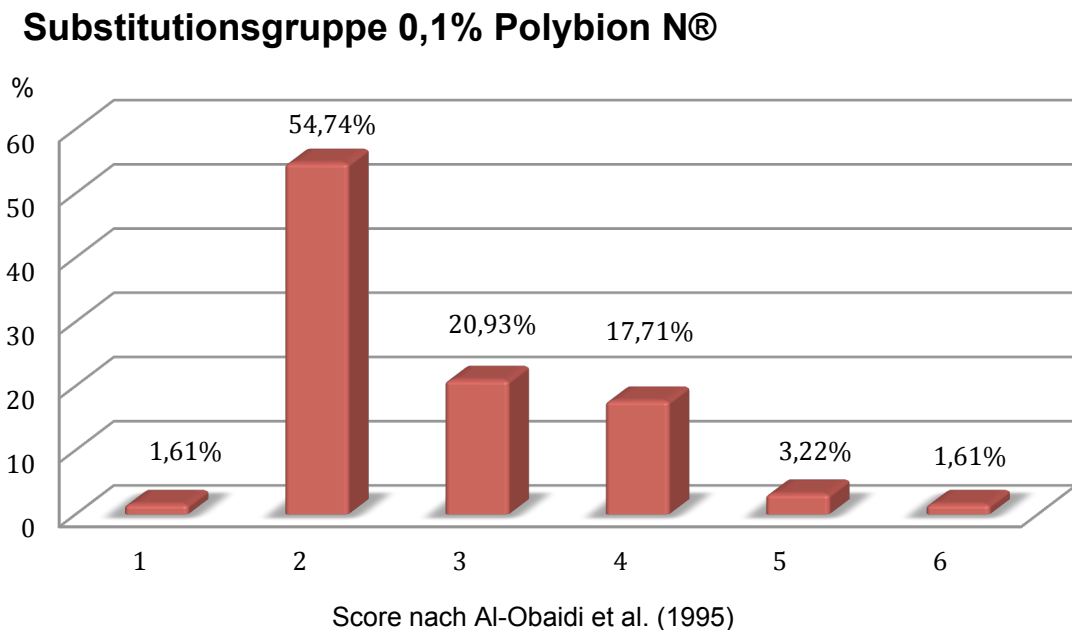


Abb.11: Endscores der Organkultur mit 0,1% PolybionN nach 72h Inkubation

In der Versuchsgruppe mit 1,0% B-Komplex im Medium war das Ergebnis differenzierter (Abb.11). 42,6% (26/61) der kultivierten Präparate waren weiter gewachsen, davon 13 um einen Score-Punkt (21,3%) und 12 um zwei Punkte (19,7%). Ein Gaumenpaar zeigte sogar einen Fortschritt von 3 Score-Punkten. Kein Wachstum zeigte sich in 27 der Kulturen (44%) und ein Rückschritt gar bei 8 von 61 (13,1%).

Auch hier war die Entwicklung in der Organkultur durch die Zugabe des Polyvitamin B-Präparates PolybionN® in einer Medienkonzentration von 1,0% signifikant positiv beeinflusst worden ($p_{1,0\%} \leq 0,000$).

Substitutionsgruppe 1% PolybionN®

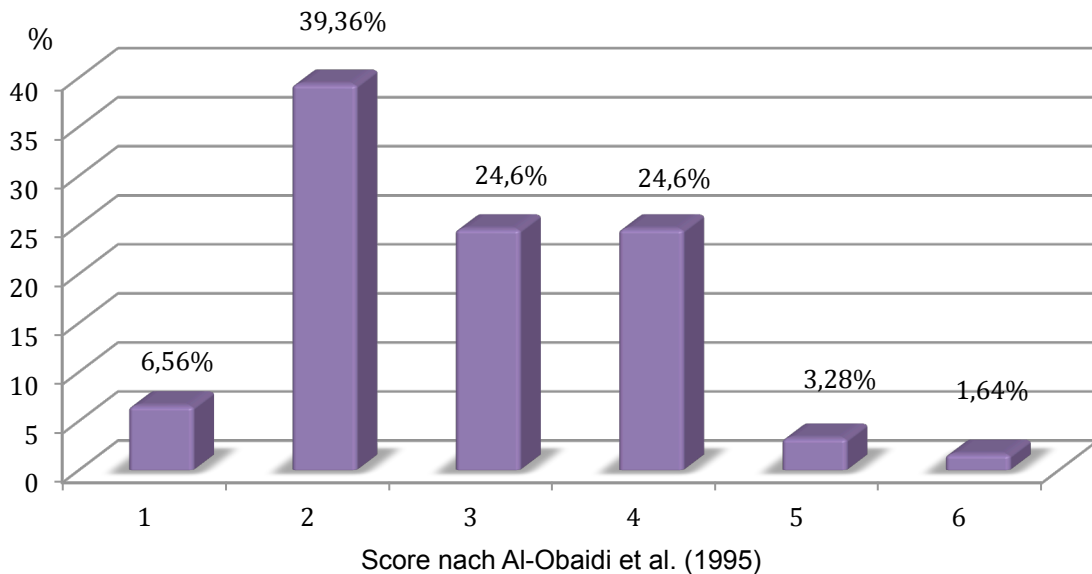


Abb.12: Endscores der Organkultur mit 1,0% PolybionN nach 72 h Inkubation

Zusammenfassend konnte in beiden mit dem Vitamin B-Komplex Präparat Polybion N® substituierten Versuchsgruppen ein signifikantes Wachstum der Gaumenplatten im Verlauf der Gewebekultur nach 72 Stunden Inkubation nachgewiesen werden ($p_{0,1\%} \leq 0,000$, $p_{1,0\%} \leq 0,000$). Im Mittel zeigte sich ein Wachstumsfortschritt um 3 Score Punkte nach der Klassifikation von Al Obaidi et al. (1995) ab einer Medienkonzentration von 0,1%. Eine weitere Steigerung der Konzentration im Medium führte zu keinem weiteren signifikanten Entwicklungsfortschritt. Somit war der Unterschied im Wachstumsverhalten der beiden Vitamin B-Gruppen (0,1% und 1,0%) nicht signifikant ($p=0,50$).

In der Kontrollgruppe ohne Vitaminsubstitution fand während der Inkubation kein signifikanter Entwicklungsfortschritt statt ($p=0,320$, Abb. 9).

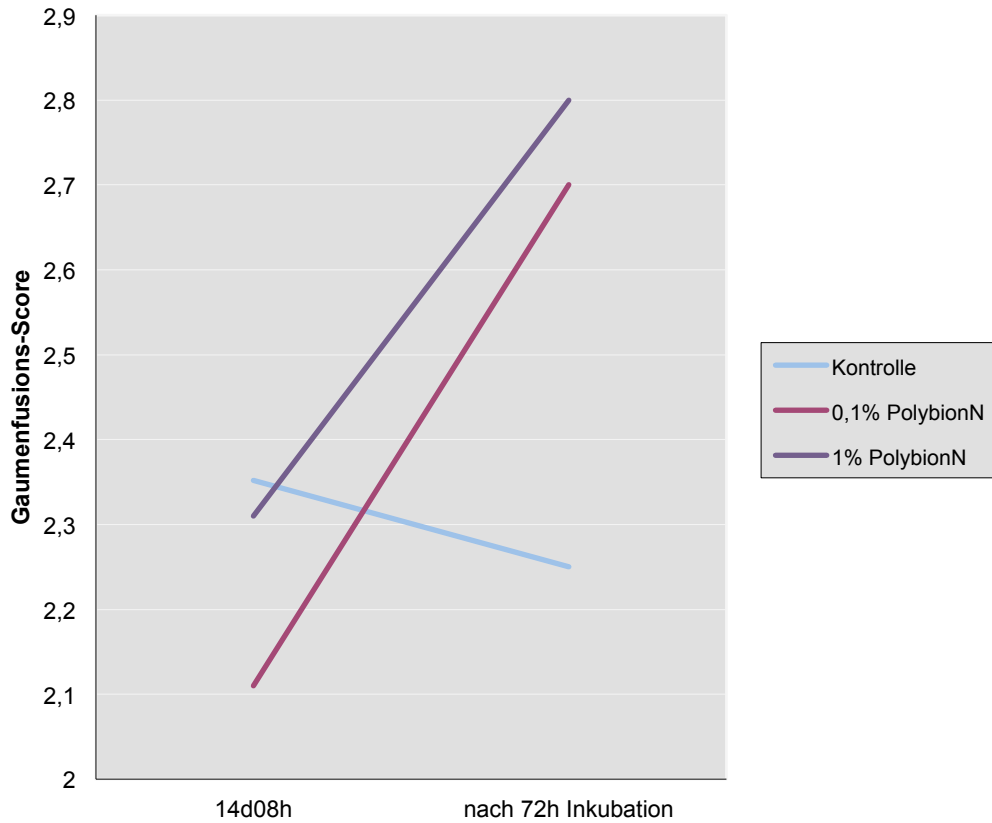


Abb. 13: Graphische Darstellung des mittleren Entwicklungsfortschritts des sekundären Gaumens über alle Versuchsgruppen.

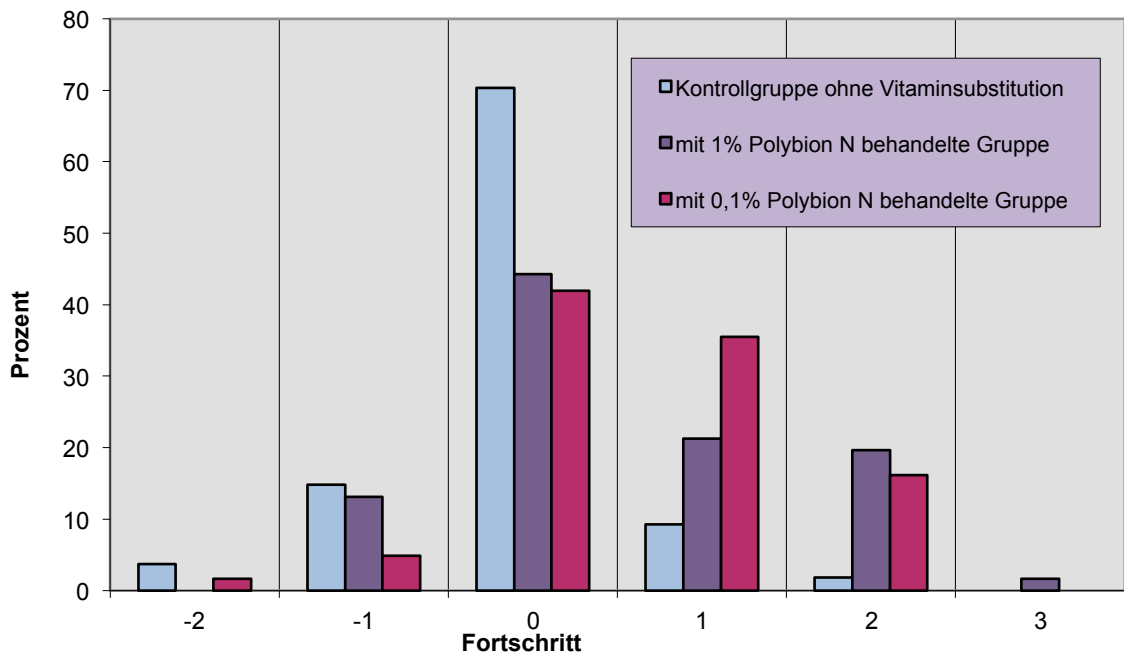


Abb.14: Verteilung des prozentual erreichten Entwicklungsfortschrittes in den einzelnen Versuchsgruppen.

6 Diskussion

Klinische Studien zur Prophylaxe von Spaltbildungen in betroffenen Familien werden seit vielen Jahren durchgeführt (Gundlach et al., 1986; Schubert et al., 1990; Tolarová und Harris, 1995; Czeizel et al., 1999; Bienengraber et al., 2001; Itikala et al., 2001). Viele dieser Studien zeigen vor allem für die Verabreichung von Vitamin B-Präparaten gute Ergebnisse hinsichtlich einer Vermeidung des Neuauftretens der Spaltbildung in spaltbelasteten Familien (Schubert et al., 1990; Tolarová und Harris, 1995). Der Mechanismus dieses möglichen protektiven Effekts ist bis heute allerdings nicht vollständig aufgeklärt (Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011).

Bis heute gibt es allerdings, ganz im Gegensatz zu Vermeidung von Neuralrohrdefekten, keinen internationalen Konsens hinsichtlich einer Empfehlung zur Prophylaxe für Schwangere in spaltbelasteten Familien. Auch bleibt unklar welches der erhältlichen Präparate zu bevorzugen ist. Unzweifelhaft ist die konsequente Substitution mit B-Vitaminen und insbesondere mit Thiamin (Vitamin B1) und Folsäure (Vitamin B9) sinnvoll, um das Auftreten von Spaltbildungen in diesen Familien zu verhindern (Schubert et al., 1990; Tolarová und Harris, 1995; Czeizel et al., 1999; Itikala et al., 2001; Schubert und Krost 2006).

Der Entwicklung einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte liegt eine komplexe multifaktorielle Ätiologie zugrunde. Präventive Maßnahmen zur Vermeidung dieser embryonalen Fehlbildung wirken vermutlich durch Eliminierung möglichst vieler exogener Einflüsse. Dennoch ist ihre Beeinflussung nur partiell möglich. Es interferieren unterschiedlichste exogene Faktoren wie Stress, Infektionen, Noxen (Alkohol, Nikotin etc.), Medikamente, Ernährung, Gewicht der Mutter, Lebensalter und genetische Herkunft usw. mit dem untersuchten Fokus. Klinische Vergleichsstudien müssen scheitern und sind ethisch nicht vertretbar. Dagegen kann eine Vielzahl der interessierenden exogenen Aspekte nur tierexperimentell untersucht werden. Nach Kappen (2013) ist das Mäusemodell unverzichtbar für ein besseres Verständnis besonders von Gen-Ernährungs-Interaktionen sowohl normaler Schwangerschaften, als auch in Riskoschwangerschaften bei Diabetes und/ oder Adipositas.

Mit der Verwendung des Organkultursystems der A/WySn-Maus, wurde es möglich, eine ätiologisch homogene Gruppe zu stellen, in der das Merkmal der LKGS genetisch determiniert ist und relativ konstant auftritt.

Somit konnte die direkte Beeinflussung der Entwicklung des sekundären Gaumens durch Vitamin B-Präparate bei der A/WySn-Maus untersucht werden. Das hierzu entwickelte und mittlerweile etablierte Verfahren der Gewebekultur bietet eine einfache, nachvollziehbare, kosten- und zeitsparende Möglichkeit, potentielle Präventiva in ihrer Wirkung qualitativ zu prüfen. In diesem Organkulturmodell können sowohl potentiell schädigende sowie auch potentiell präventive Einflüsse einem Screening unterzogen werden und die Zahl und die Belastung der Versuchstiere reduziert werden. Solche Einschränkungen sind nach § 7 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes wichtig und notwendig (TierSchG, §7). Es bietet darüber hinaus die Möglichkeit die Wirkung der Noxe direkt am Erfolgsorgan, hier den Gaumenplatten, zu untersuchen.

Trotz guter Voraussetzungen birgt jedoch jede *in vitro*-Kultur einige Gefahren, die stets bedacht und möglichst eliminiert werden müssen. Der regelmäßige Wechsel des Mediums, der mit einem Temperaturabfall und einer möglichen Kontaminationsgefahr verbunden ist, sollte gewissenhaft unter Reinraumbedingungen und laminarem Luftstrom durchgeführt werden. Eine mögliche Kontamination der Gewebekultur mit Mykoplasmen, welche als intrazelluläre Bakterien nicht immer makroskopisch erkennbare Effekte erzeugen sind gefürchtet, da sie vielfältig in den Stoffwechsel der Zellen eingreifen. Die Kontamination mit diesen Mykoplasmen sollte somit ebenfalls regelmäßig durch PCR ausgeschlossen werden.

Die Verwendung von Serum als Wachstumszusatz in der Organ- oder Zellkultur wird zudem kontrovers diskutiert. Birch und Pirt (1970) halten eine Supplementation mit Serum (10%) für notwendig, um eine Stabilisierung der Zelloberflächen, möglicherweise durch ausreichende Zuführung von Eisen zu erreichen. Der Nachteil bei der Verwendung von Seren besteht in der Tatsache, dass es sich hierbei um ein tierisches „Naturprodukt“ mit wechselnder Zusammensetzung und schwankendem Gehalt der Inhaltsstoffe handelt. Proteasen im Serum können erwünschte Proteine abbauen und Komplementbestandteile durch Immunreaktion zur Zell-Lyse führen (Martin, 1994). Seren können Inhibitoren des Zellwachstums und weitere Stoffe enthalten, die mit den Agenzien der Kultur toxische Produkte bilden und sich somit negativ auf das Wachstum auswirken (z.B. Polyamin- Oxydasen). Über den Zusatz von Serum können, trotz steriler Herstellung, Mikroorganismen in die Untersuchungskulturen gelangen und zu einem Versuchsabbruch führen. Dexamethason, Hydrocortison, Umweltgifte und andere toxische Stoffe können in diesen enthalten sein und unvorhersehbare Reaktionen verursachen (Martin, 1994).

Das verwendete fetale bovine Serum enthielt bereits B-Vitamine in geringer Konzentration (B12 500 ng/ml, Pantothensäure 200 ng/ml, Riboflavin 100 ng/ml, Thiamin 40 ng/ml, B6 40 ng/ml, Folsäure 10 ng/ml, Biotin 9 ng/ml). Für die Palatogenese wichtige Wachstumsfaktoren wie TGF β 1 (transforming growth factor), EGF (epidermal growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) werden ebenfalls durch das FBS zur Verfügung gestellt (Martin, 1994; Wang et al., 2013).

In dieser Arbeit wurden Mäuse als Versuchstiere verwendet, da die Gesichtsentwicklung bei Mäusen und Menschen in so ähnlicher Weise abläuft, dass dieses Tiermodell dazu geeignet ist Einflüsse auf die Entwicklung zu untersuchen (Jiang et al., 2006). Die dort ebenfalls gewonnenen Beobachtungen hinsichtlich Prävention oder Teratogenität lassen sich somit auf den Menschen übertragen (Juriloff und Harris, 2008). Auch hinsichtlich der Abläufe der Palatogenese bei der Maus und beim Menschen ergeben sich nur geringfügige, vor allem zeitbezogenen Unterschiede (Syska, 2000). Ein weiterer großer Vorteil von Mäusen als Untersuchungsobjekt liegt u.a. in ihrer schnellen Reproduktion und der kostengünstigen Haltung bei Beachtung der tierschutzrechtlichen Bestimmungen.

Der hier für die *in vitro*-Organkultur verwendete A/WySn-Mäusestamm weist mit einer konstanten Frequenz von 25-30% Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auf, die eine unvollständige Penetranz, eine variable Expressivität und überwiegend beidseitige Manifestation zeigen (Juriloff und Harris, 2008). Das *in vitro*-Modell stellt eine ideale Basis dar, um die direkte Wirkung verschiedener B-Vitamine auf die Entwicklung der Gaumenplatten ohne Steuerung oder Modifikation durch den Gesamtorganismus zu untersuchen. Somit eignet es sich hervorragend um Untersuchungen durchzuführen, die nicht von einer Modifikation zugeführter Stoffe über das Futter und die individuelle Metabolisierung im mütterlichen Organismus abhängig sind. Ebenfalls wird Stress der Versuchstiere und die damit verbundene Ausschüttung unterschiedlichster Nebennierenrindenhormone (Adrenalin, Cortisol), die hinsichtlich der Spaltenstehung eine bekannte teratogene Wirkung haben, eliminiert.

In den durchgeführten Versuchen in der Organkultur des sekundären Gaumens konnte ein deutlicher signifikanter Effekt der Substitution mit Polyvitamin B auf das Wachstum der Gaumenfortsätze gezeigt werden ($p_{0,1\%} \leq 0,000$, $p_{1,0\%} \leq 0,000$). Es fand sich ein Sättigungseffekt hinsichtlich der wachstumsfördernden Wirkung ab einer Konzentration von 0,1% im zugegeben Medium. Eine weitere Steigerung führte zu keinem weiteren wachstumsfördernden Effekt. Der Unterschied zwischen beiden Vitamin B-Substitutionsgruppen unterschied sich somit nicht signifikant ($p=0,5$).

In der Organkultur des sekundären Gaumens der genetisch belasteten A/WySn-Maus konnte letztendlich keine vollständige Fusion der Gaumenplatten erreicht werden. Das makroskopisch fusionierte Präparat aus jeweils beiden Untersuchungsgruppen wies bei histologischer Betrachtung noch einen epithelialen Saum zwischen den beiden Gaumenfortsätzen auf und konnte somit nur als partielle Fusion gewertet werden.

Die hier verwendete A/WySn-Maus zeigt bekanntermaßen schon *in vivo* stets eine wesentlich geringere Fusionsrate als die Wildtyp-Maus (Hallgrimsson et al., 2004). Eine Überschreitung der *in vivo* bekannten Fusionsrate in der Organkultur ist somit nicht realistisch. Ebenfalls liegen die verwendeten Mäuse in Körpergröße und Gewicht weit unter den Werten von in anderen Studien verwendeten Mäusestämmen. Die Eigenschaft der geringeren Fusionsrate des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus, verglichen mit einer Wildtyp-Maus (NMRI) in der Organkultur konnte zuvor eindeutig gezeigt werden (Schubert et al., 2009). Es zeigte sich, wie schon für die A/WySn-Maus *in vivo* beschrieben (Syska et al., 2004), ein verringertes Entwicklungsstadium des sekundären Gaumens bei Versuchsbeginn (14d06h) und eine deutlich inkomplettere Fusionstendenz nach 72h *in vitro*-Kultivierung.

Ein weiterer, wichtiger Grund für allgemeine, nicht Mäusestamm-spezifische geringere Fusionstendenz in der Organkultur liegt in dem technischen Verfahren, welches angewandt wird um diese Kultur herzustellen. Die Arbeit mit diesen sehr kleinen, instabilen Präparaten stellt hohe Ansprüche an den Versuchsdurchführenden und resultiert zwangsläufig in einer Traumatisierung des entnommenen Gewebes. Über die Wundflächen kommt es zudem zu einem Flüssigkeitsverlust der Explantate und durch die Freisetzung von Komplement-Bestandteilen zur unerwünschten Zell-Lyse und darauf folgendem Gewebeuntergang (Erfani et al., 2001). Ebenfalls kann durch die Positionierung der Probenexemplare auf dem Filtereinsatz das Gewicht des Schädels die Gaumenplatten auseinander drücken und zu einem schlechteren Ausgangs-Score führen, als er eigentlich dokumentiert wurde, und zudem das mögliche Wachstum verschleiern. Erfani et al. konnten in einem ähnlichen Versuch zeigen, dass nach Überschreiten einer kritischen Distanz zwischen den Gaumenplatten keine Fusion mehr auftreten konnte. Bis zu einer Distanz von 0,19 mm zwischen den Fortsätzen erfolgte die Fusion bei allen Exemplaren (n=30), doch über einer Distanz von 0,48 mm wurde kein Wachstum mehr verzeichnet. Erfani et al. begründeten dies mit einer Störung der Mikroumgebung, die zwischen den Platten herrscht und die jenseits einer kritischen Distanz nicht mehr funktioniert. Durch diese Distanz konnten der Hypothese zufolge die Signal- und Koordinationsfaktoren ihre Rezeptoren nicht mehr erreichen

und die Fusion der Gaumenplatten bleibt aus. Da im eigenen Versuch der Abstand der Gaumenplatten tendenziell durch die auf die Processus wirkende Schwerkraft erhöht wurde, stellt die Überschreitung der kritischen Distanz auch in der hier durchgeführten Versuchsreihe eine plausible Erklärung für die ausbleibende Fusion dar.

Da das primäre Interesse in unserem Versuchsaufbau nicht auf der vollständigen Fusion, sondern auf dem Vergleich der Entwicklung der Gaumenplatten unter direkter Wirkung von Vitamin B-Präparaten, lag, war dieses Modell dennoch geeignet. Als Grundlage für die vorliegende Studie dienten hier die Untersuchungen von Al Obaidi et al. (1995) an Wistar-Ratten und NMRI-Mäusen. Die Autoren präparierten ebenfalls die Gaumenplatten mit kranial liegenden Strukturen, entfernten aber zusätzlich das Hirngewebe. Die Explantate wurden dann, ähnlich der eigenen Methode, für 80 Stunden in BGJ-Medium kultiviert, welches jeweils nach 48h gewechselt wurde. Al Obaidi et al. (1995) beschrieben in Ihrem Artikel eine Fusionsrate von 90% bei Verwendung einer Rotationskultur. Zusätzlich erwähnten die Autoren jedoch auch die bekannten Schwierigkeiten bei der Präparation von NMRI-Mäusen im Gegensatz zu Ratten, welche ein Grund für die geringere *in vitro*-Fusionstendenz dieser Tierart aufweist. Die mangelnde Stabilität der kleinen Explantate stellte auch in dieser Studie eine beträchtliche Schwierigkeit dar, da die A/WY-Feten verglichen mit NMRI-Feten nur etwa halb so groß sind.

Zur Vermeidung eines zu großen Flüssigkeitsverlusts der Proben, der die intrinsische Kraft der Gaumenplatten vermindern könnte, wurden die Explantate in unseren Versuchsreihen weniger invasiv präpariert. Die Wundflächen waren durch das Belassen der Gaumenplatten im Verbund geringer und weiter von den zu untersuchenden Bereichen entfernt. Durch die Membraneinsätze wurden die Wundflächen zusätzlich vor Flüssigkeitsverlust geschützt.

Der Ablauf der Gaumenplattenfusion wurde durch Al Obaidi et al. (1995) in der Organkultur als in der Mitte der Processus beginnend und nach anterior und posterior fortschreitend beschrieben. Die gleiche Beobachtung konnte auch in unserer Studie gemacht werden. In weiteren Versuchen in der Organkultur wurde durch Kohlenstoff-Partikel-Markierung der Processus palatini des ICR-Mäusestammes die Art und Richtung der Entwicklung verfolgt (Chou et al., 2004). Die Kultivierung der Gaumenplatten mit angrenzendem Gewebe erfolgte in rollenden Flaschen für 48 Stunden. Chou et al. beschrieben eine Fusionsrate von 87% und kamen zu folgender Schlussfolgerung: die mittlere Region der Gaumenplatten fusioniert hauptsächlich aufgrund von Rotation und Verlängerung, während das anteriore und posteriore Gebiet

hauptsächlich durch Gewebeumbau und nur teilweise durch Verlängerung fusioniert. Diese These führt im Zusammenhang mit unseren Beobachtungen und den Ergebnissen von Al Obaidi et al. (1995) zu der Vermutung, dass in der Gewebekultur vor allem die Verlängerung in der medianen Region der Processus palatini unterstützt wird, während der Gewebeumbau möglicherweise durch die Kulturbedingungen verzögert ist.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen waren die Blasteme der Gaumenplatten zu Fusionsvorgängen noch in der Lage, da der Zeitpunkt vor dem Ende der genetischen Determinationsperiode für die Gaumenfusion lag. Die Ergebnisse liegen in Übereinstimmung mit denen von Paros und Beck (1999), die ebenfalls eine signifikante Senkung der Häufigkeit von LK(G) in der Nachkommenschaft der A/Wy-Maus unter kontinuierlicher Zuführung von Folsäure in der vulnerablen Phase der Palatogenese beschreiben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eindeutig, dass der positive Einfluss der B-Vitamine auf die Palatogenese durch eine direkte Wirkung auf das Gewebe des sekundären Gaumens bedingt ist. Dieser beruht wahrscheinlich auf beschleunigten Reparationsmechanismen und somit auch auf einer positiven Beeinflussung der Wachstumsphase.

Neuere Untersuchungen konnten die Abhängigkeit der Spaltbildung vom erniedrigten mütterlichen Serum- und Fruchtwassergehalt von Folsäure und Vitamin B1 nachweisen (Scheller et al., 2013). Dies unterstützt die in der Organkultur gefundenen Ergebnisse hinsichtlich der positiven Beeinflussung des Wachstums durch die direkte Wirkung der B-Vitamine.

Aufgrund der positiven Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchung in der Organkultur und der vielen weiteren beschriebenen experimentellen Untersuchungen hinsichtlich der positiven Wirkung von B-Vitaminen auf die Prävention einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sollte in Zukunft über eine konsequente Vitamin B-Substitution diskutiert werden, die sich auch in klinischen Untersuchungen stets als erfolgreich erwiesen hat (Schubert und Krost, 2006).

7 Zusammenfassung

Jährlich treten in Deutschland ca. 1300 Fälle von unterschiedlich ausgeprägten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auf, die die Patienten ästhetisch und funktionell beeinträchtigen. Diese Fehlbildung stellt viele Patienten und deren Angehörige vor psychische und soziale Probleme und die medizinische Rehabilitation verursacht alleine schon Kosten im sechsstelligen Bereich.

Somit erlangen Präventionsmöglichkeiten dieser Fehlbildung einen hohen Stellenwert.

Der Mechanismus der Fusion des sekundären Gaumens ist bei Säugetieren relativ gut untersucht. In vorangegangenen Untersuchungen wurde die Eignung eines Gewebekulturmodells zur Beobachtung der ungestörten Organogenese bestätigt. Es stellt eine einfach nachvollziehbare, kosten- und zeitsparende Möglichkeit dar, potentielle Präventiva in ihrer Wirkung zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung des Vitamin B-Komplexpräparates PoybionN® (Merck, Deutschland) auf die Fusionstendenz des sekundären Gaumens bei einem hinsichtlich der Spaltbildung genetisch prädisponierten Mäusestamm (A/WySn-Maus) in der Organkultur untersucht.

Die Entnahme und Präparation der Feten erfolgte am 14d8h post conceptionem. Die kaudal des Gaumens liegenden Anteile des Gesichtes wurden mit einem Horizontalschnitt auf Ebene der Mundhöhle entfernt und die präparierten Organproben auf Kultur-Membraneinsätzen in chemisch definiertem, serumhaltigem Medium für bis zu 72 Stunden inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurden die Präparate durch den von Al Obaidi et al. (1995) eingeführten Score klassifiziert und fotografiert.

Die Gaumenplatten der A/WySn-Maus zeigten in der unbehandelten Organkultur nach 72 Stunden kein signifikantes Wachstum. Durch Substitution des Kulturmediums mit Vitaminen des B-Komplexes konnte das Wachstum der Gaumenplatten jedoch signifikant gefördert werden ($p \leq 0,000$).

Letztendlich ließ sich eine positive, direkte Wirkung der B-Vitamine auf das Wachstum der Gaumenfortsätze in der Organkultur nachweisen. Das gewählte Versuchsmodell

eröffnet auch für die Zukunft noch weitere Möglichkeiten für die Untersuchung pathogenetischer und präventiver Aspekte.

Da die Palatogenese des Menschen sich über einen längeren Zeitraum erstreckt als bei der Maus, ist anzunehmen, dass dadurch die Möglichkeit der medikamentösen und auch der teratogenen Beeinflussung noch günstiger ist.

Die aktuell an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Halle-Wittenberg propagierte Polyvitamin B-Prophylaxe zur Spaltprävention stellt klinisch eine praktikable und nun auch durch die Versuche in der Organkultur nachgewiesene wirksame Methode ohne Nebenwirkungen dar.

8 Literaturverzeichnis

- Ács N, Bánhidly F, Horváth-Puhó E, Czeizel AE (2006) Population-based case-control study of the common cold during pregnancy and congenital abnormalities. *Europ J Epidemiol* 21:65-75.
- Al Obaidi N, Kastner U, Merker HJ, Klug S (1995) Development of a suspension organ culture of the fetal rat palate. *Arch Toxicol* 69:472-479.
- Al Omari F, Al Omari IK (2004) cleft lip and palate in Jordan: birth prevalence rate. In: *Cleft Palate Craniofac J* 41(6):609-612.
- Antoniadou K, Economou L, Sioga A, Vahtsevanos K, Manthos A (1995) Pathogenesis of bromodeoxyuridine-induced cleft palate in mice. *J Cranio Max Fac Surg* 23:252-255.
- Arbeitsgruppe "Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr"/ Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1.Aufl., 2001, Neuer Umschau Buchverlag: 101-131, 230-231.
- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC (1998) Association of genetic variation of the transforming growth factor- alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45:348-353.
- Beaty TH, Hetmanski JB, Zeiger JS, Fan YT, Liang KY, VanderKolk A, McIntosh I (2002) testing candidate genes for non-syndromic oral clefts using a case-parent trio design. *Genet Epidemiol* 22:1-11.
- Beaty TH, Maestri NE, Hetmanski JB, Wyszynski DF, VanderKolk CA, Simpsom JC, McIntosh I, Smith EA, Zeiger JS, Raymond GV, Panny SR, Tiffit CJ, Lewanda AF, Cristion CA, Wulfsberg EA (1997) Testing for Interaction between Maternal Smoking and TGFA Genotype among Oral Cleft Cases Born in Maryland 1992-1996. *Cleft Palate Craniofacial Journal* 34(5):447-454.
- Bellis TH, Wohlgemuth B (1999) The incidence of cleft lip and palate deformities in the south-east of Scotland (1971-1990). *Br J Orthodont* 26:121-125.
- Bethmann W, Koch J (1967) Das Thallwitzer Modell der Einteilung von Lippen-Kiefer-Gaumen-Segel-Spalten und die Häufigkeit dieser Missbildungen. *Z Ärztl Fortbild* 61(14): 733-738.
- Bienengräber V, Fanghänel J, Malek FA, Kundt G (1997) Application of Thiamine in Preventing Malformations, Specifically Cleft Alveolus and Palate, during the intrauterine Development of Rats. *Cleft Palate Craniofacial Journal* 34(4):318-324.
- Bienengräber V, Malek FA, Moritz KU, Fanghänel J, Gundlach KKH, Weingärtner J (2001) Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. *Cleft Palate Craniofacial Journal* 38(4):393-398.
- Bille C, Knudsen LB, Christensen K (2005a) Changing lifestyles and oral cleft occurrence in Denmark. *Cleft Palate Craniofac J* 42(3):255-259.
- Bille C, Skytthe A, Vach W, Knudsen LB, Nybo Andersen AM, Murray JC, Christensen K (2005b) Parent's Age and the Risk of Oral Clefts. *Epidemiology* 16(3):311-316.
- Birch JR, Pirt SJ (1970) Improvements in a chemically defined medium for the growth of mouse cells (Strain LS) in suspension organ culture. *J Cell Sci* 7:661-670.

- Bittencourt MAV, Bolognese AM (2002) Epithelial alterations in secondary palate formation. *Braz Dent J* 11(2):117-126.
- Blanco R, Suazo J, Santos JL, Paredes M, Sung H, Carreño H, Jara L (2004) Association between 10 microsatellite markers and nonsyndromic cleft lip palate in the Chilean population. *Cleft Palate Craniofac J* 41(2):163-167.
- Block SR, Watkins SM, Salemi JL, Rutkowski R, Tanner JP, Correia JA, Kirby RS (2013) Maternal pre-pregnancy body mass index and risk of selected birth defects: evidence of a dose-response relationship. *Paediatr Perinat Epidemiol* 27(6):521-31.
- Buselmaier W, Tariverdian G: *Humangenetik*. 3. Aufl., Springer, Berlin, 2004. S.180-396.
- Bush JO, Jiang R (2012) Palatogenesis: morphogenetic and molecular mechanisms of secondary palate development. *Development* 139(2): 231-43.
- Calzolari E, Bianchi F, Rubini M, Ritvanen A, Neville AJ (2004) EUROCAT working group. epidemiology of cleft palate in Europe: implications for genetic research. *Cleft Palate Craniofacial J* 41(3):244-249.
- Carinci F, Pezzetti F, Scapoli L, Martinelli M, Carinci P, Tognon M (2000) Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: a review of international studies and data regarding the Italian population. *Cleft Palate Craniofac J* 37(1):33-40.
- Carter CO (1969) An ABC of medical genetics, VI-Polygenic Inheritance and common diseases. *The Lancet* 1252-1256.
- Carter CO (1976) Genetics of common single malformations. *Br Med Bull* 32(1): 21-26.
- Chou MJ, Kosazuma T, Takigawa T, Yamada S, Takahara S, Shiota K (2004) Palatal shelf movement during palatogenesis: a fate map of the fetal mouse palate cultured in vitro. *Anat. Embryol* 208:19-25.
- Clark JD, Mossey PA, Sharp L, Little J (2003) Socioeconomic status and orofacial clefts in Scotland, 1989 to 1998. *Cleft Palate Craniofacial J* 40(5):481-485.
- Cleary RE, Lumeng L, Li TK (1975) Maternal and fetal plasma levels of pyridoxal phosphate at term: adequacy of vitamin B, supplementation during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 121:25.
- Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarová MM (1998) Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. *Am J Med Genet* 79:42-47.
- Czeizel AE, Tímár L, Sárközi A (1999) Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. *Pediatrics* 104:66-73.
- Czeizel AE, Toth M, Rockenbauer M (1996) Population-based control study of folic acid supplementation during pregnancy. *Teratology* 53:345-351.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC (2011) Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. Review. *Nat Rev Genet* 12:167-178.
- Dolk H, Loane M, Garne E. (2010) The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol* 686:349-64.
- Dronamraju KR, Bixler D, Majumder PP (1982) Fetal mortality associated with cleft lip and cleft palate. *Johns Hopkins Med J* 151(6):287-289.

- Eiberg H, Bixler D, Nielsen LS, Conneally PM, Mohr J (1987) Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clin Genet* 32:129-132.
- Erfani S, Maldonado TS, Crisera CA, Warren SM, Lee S, Longaker MT (2001) An in vitro mouse model of cleft palate: Defining a critical intersheaf distance necessary for palatal clefting. *Plast Reconstr Surg* 108(2):403-410.
- Ferguson MW (1978a) Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *J Anat* 125(3): 555-577.
- Ferguson MW (1978b) The teratogenic effects of 5-fluoro-2-desoxyuridine (F.U.D.R.) on the Wistar rat fetus, with particular reference to cleft palate. *J Anat* 126(1): 37-49.
- Ferguson MW (1988) palate development. *Development* 103: 41-60.
- Fitchett JE, Hay ED (1989) Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Develop Biol* 131: 455-74.
- Fogh-Andersen P (1961) Incidence of cleft lip and palate: constant or increasing? *Acta Chir Scand* 122:106-11.
- Forrester MB, Merz RD (2004) Descriptive epidemiology of oral clefts in a multiethnic population, Hawaii, 1986-2000. *Cleft Palate Craniofac J* 41(6):622-628.
- Gabka J (1981) Verhütung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. *Münch Med Wochenschr* 123:1139-1142.
- Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, Araújo BC, André M, Steman S, Otto PA, Goncalves Leite IC, Roma Paumgarten FJ, Koifman S (2002) Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. *Cad Saude Publica* 18:17-31.
- Goenjian HA, Chiu ES, Alexander ME, St Hilaire H, Moses M (2011) Incidence of cleft pathology in greater new orleans before and after hurricane katrina. *Cleft Palate Craniofac J* 48(6):757-61.
- Gundlach KKH, Abou Tara N, Kreybig T (1986) Tierexperimentelle Ergebnisse zur Entstehung und Prävention von Gesichtsspalten und anderen kraniofazialen Anomalien. *Fortschr Kieferorthop* 47:354-357.
- Hallgrimsson B, Dorval CJ, Zelditch ML, German RZ (2004) Craniofacial variability and morphological integration in mice susceptible to cleft lip and palate. *J Anat* 205:501-517.
- Hanhart E, Kälin A (1972) Heredity and empirical hereditary prognosis of cleft lip and palate in 326 cases out of 309 unselected Swiss families. *J Genet Hum* 20(2):93-134.
- Hintz JA, Lindner H (1987) Familienuntersuchungen am Spaltträgerkrankengut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter besonderer Berücksichtigung sogenannter Mikrosymptome bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Halle (Saale), Univ., Med. Fak. Diss.
- Holtgrave EA, Stoltenburg-Didinger G. (2002) Apoptotic epithelial cell death: a prerequisite for palatal fusion. An in vivo study in rabbits. *J Cranio Max Fac Surg* 30:329-336
- Ingalls T, Taube IE, Klingberg MA (1964) Cleft lip and cleft palate: epidemiologic considerations. *Plast Reconstr Surg* 34(1):1-10.
- Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, CA, Liu Y (2001) Maternal Multivitamin Use and Orofacial Clefts in Offspring. *Teratology* 63:79-86.

- Iwata J, Suzuki A, Pelikan RC, Ho TV, Sanchez-Lara PA, Chai Y (2014) Modulation of lipid metabolic defects rescues cleft palate in *Tgfr2* mutant mice. *Hum Mol Genet* 23(1):182-93.
- Jakobsen LP, Mølsted K, Christensen K (2003) Occurrence of cleft lip and palate in the Faroe Islands and Greenland from 1950 to 1999. In: *Cleft Palate Craniofac J* 40(4):426-430.
- Jiang R, Bush JO, Lidral AC (2006) Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn* 235:1152-1166. Review.
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Åbyholm F (2003) Variants of developmental genes (*TGFA*, *TGFB3*, and *MSX1*) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genet Epidemiol* 24:230-239.
- Juriloff DM, Harris MJ. (2008) Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82(2):63-77.
- Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ (2001) Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome* 12(6):426-35.
- Kalter H (1979) The history of the A family of inbred mice and the biology of its congenital malformations. *Teratology* 20(2):213-232.
- Kappen C (2013) Modeling anterior development in mice: Diet as modulator of risk for neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163(4):333-56.
- Kasirsky G, Gautieri RF, Mann DE (1967) Inhibition of cortisone-induced cleft palate in mice by cobaltous chloride. *J Pharmaceut Sci* 56:1330-1332.
- Khoury J, Gomez-Farias M, Mulinare J (1989) Does maternal cigarette smoking during pregnancy cause cleft lip and palate in offspring? *Am J Dis Child* 143:333-37.
- Kreybig, von T (1981) Erweiterung der Lippen-Kiefer-Gaumen-Spaltprävention zur Verhütung auch anderer Fehlbildungen. *Münch Med Wochenschr* 123:1151-1152.
- Krost B. Saisonale Einflüsse bei der Entstehung von Lippen- Kiefer-Gaumenspalten. (2001) Halle (Saale), Univ., Med. Fak. Diss.
- Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Scheerer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W (1997) Studies of the candidate genes *TGFB2*, *MSX1*, *TGFA*, and *TGFB3* in the etiology of cleft lip and palate in the philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 34(1):1-6.
- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschmann T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JLR, Murray JC (1998) Association of *MSX1* and *TGFB3* with nonsyndromic clefting in humans. *Am. J. Hum. Genet* 63:557-568.
- Lindl T, Bauer J. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 3. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1994: 1-79.
- Longo L (1982) Some health consequences of maternal smoking: issues without answers. *Birth Defects* 18:13-31.
- Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, AlChawa T, Nasser E, Böhmer AC, Mattheisen M, Alblas MA, Barth S, Kluck N, Lauster C, Braumann B, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Daratsianos N, Kreuzsch T, Murray JC, Marazita ML, Ruczinski I, Scott AF, Beaty TH, Kramer FJ, Wienker TF, Steegers-Theunissen RP, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Lange C, Cichon S, Propping P, Knapp M, Nöthen MM (2012)

Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet* 44(9):968-71.

- Lumeng L, Cleary RE, Wagner R, Yu PL, Li TK (1976) Adequacy of vitamin B6 supplementation during pregnancy: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 29:1376-1383.
- Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, Smith EA, McIntosh I, Wyszynski DF, Liang KY, Duffy DL, VanderKolk C (1997) Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet* 73:337-344.
- Markovic M, Ceran S: Genetics of cleft lip and palate studied in twins In: Kriens, O. (ed): *What is a cleft lip and palate? A multidisciplinary update*. Thieme, Stuttgart-New York, 1989, pp. 22-161.
- Martin BM: *Tissue culture techniques: an introduction*. 1. Auflage, Birkhäuser, Boston, 1994, S. 35-40.
- McKinney CM, Chowchuen B, Pitiphat W, Derouen T, Pisek A, Godfrey K (2013) Micronutrients and Oral Clefts: A Case-Control Study. *J Dent Res*. (Epub).
- Mcleod NMH, Arana Urioste ML, Saeed NR (2004) Birth prevalence of cleft lip and palate in Sucre, Bolivia. *Cleft Palate Craniofac J* 41(2):195-198.
- McNulty H (1995) Folate requirements for health in different population groups. *Br J Biomed Sci* 52(2):110-9.
- Millicovsky G, Johnston MC (1981) Maternal hyperoxia greatly reduces the incidence of phenytoin-induced cleft lip and palate in A/J mice. *Science* 212:671-672
- Moore KL: *Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen*. 3. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 1990, S. 220-237.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC (2009) Cleft lip and palate. *Lancet* 374:1773-1785.
- Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP (2006) Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the polish population. *Clin Genet* 69:512-517.
- MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council vitamin study. *Lancet*, 1991; 338:131-137.
- Munger G, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J (1996) Maternal Alcohol Use and Risk of Orofacial Cleft Birth Defects. *Teratology* 54:27-33.
- Murray JC, Daack-Hirsch S, Buetow KH, Munger R, Espina L, Paglinawan N, Villaneuva E, Rary J, Magee K, Magee W (1997) Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines. In: *Cleft Palate Craniofac J* 34(1):7-10.
- Natsume N, Nagatsu Y, Kawai T (1998) Direct effect of vitamins at the time of palatal fusion. *Plast Reconstr Surg* 102(7):2512-3.
- Neiswanger K, Deleyiannis FWB, Avila JR, Cooper ME, Brandon CA, Vieira AR, Noorchashm N, Weinberg SM, Bardi KM, Murray JC, Marazita ML (2006) Candidate genes for oral-facial clefts in guatemalan families. *Ann Plast Surg* 56:518-521.
- Palomino HM, Palomino H, Cauvi D, Barton SA, Chakraborty R (1997) Facial Clefting and Amerindian Admixture in Populations of Santiago, Chile. *Am J Hum Biol* 9:225-232.
- Paros A, Beck SL (1999) Folic Acid Reduces Cleft Lip [CL(P)] in A/WySn Mice. *Teratology* 60:344-347.

- Peanchitlertkajorn S, Cooper ME, Liu YE, Field LL, Marazita ML (2003) Chromosome 17: Gene mapping studies of cleft lip with or without cleft palate in chinese families. *Cleft Palate Craniofac J* 40(1):71-79.
- Penrose LS (1953) The genetical background of common diseases. *Acta Genet Stat Med* 4(2-3):257-65.
- Peters S, Strassburg M (1968) Erzeugung von Gaumenspalten durch Lärm und Hunger. *Dtsch Zahnärztl Z* 8:843-847.
- Pickerill HP (1914) The anatomy and physiology of cleft palate and a new method of treatment. *Transactions of the sixth International Dental Congress, London* 453-469.
- Pötzsch O (2012) Geburten in Deutschland. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Bestellnummer: 0120007-12900-1.
- Prescott NJ, Malcolm S (2002) Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development. *Cleft Palate Craniofac J* 39:327-331.
- Rajabian MH, Sherkat M (2000) An epidemiologic study of oral clefts in Iran: analysis of 1669 cases. *Cleft Palate Craniofac J* 37(2):191-196.
- Raupach HW (1987) Untersuchungen zum Einfluss von Thiamin (Vitamin B1) auf die Palatogenese der Hausmaus. Halle (Saale), Univ., Med. Fak. Diss.
- Rehner G, Daniel H: *Biochemie der Ernährung*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010, S. 355-358.
- Romitti P, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC (1999) Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59:39-50.
- Rozendaal AM, van Essen AJ, Te Meerman GJ, Bakker MK, van der Biezen JJ, Goorhuis-Brouwer SM, Vermeij-Keers C, de Walle HE (2013) Periconceptional folic acid associated with an increased risk of oral clefts relative to non-folate related malformations in the Northern Netherlands: a population based case-control study. *Eur J Epidemiol* 28(11):875-87.
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Vaccari C, Marchesini J, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E, Carinci P, Carinci F (2006) Study of the PVRL1 gene in Italian nonsyndromic cleft lip patients with or without cleft palate. *Ann Hum Genet* 70:410-413.
- Scheller K, Röckl T, Scheller C, Schubert J (2013) Lower concentrations of B-vitamin subgroups in the serum and amniotic fluid correlate to cleft lip and palate appearance in the offspring of A/WySn mice. *J Oral Maxillofac Surg.* 71(9):1601
- Schubert A (2009) Entwicklung eines Organkulturmodells des embryonalen Gaumens der Maus. Halle (Saale), Univ., Med. Fak. Diss.
- Schubert J. (1980) Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung experimenteller Gaumenspalten an der Hausmaus. Halle (Saale), Univ., Med. Fak. Diss.
- Schubert J: Missbildungen und Anomalien des Kiefers und des Gesichtes; Genetische Aspekte. In: Hochstein HJ (Hrsg): *Rosenthals Spezielle Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. 4. Aufl., Verlag J.A.Barth Leipzig, 1991 S.15-30.
- Schubert J, Krost B (2006) Prevention of cleft lip and palate. Reducing risk of recurrence-a 25-year clinical experience. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10(5):301-5.

- Schubert J, Schmidt R, Raupach HW. (1990) New findings explaining the mode of action in prevention of facial clefting and first clinical experience. *J Craniomaxillofac Surg* 18:343.
- Schubert J, Schmidt R, Syska E (2002) B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surgery* 31(4): 410-413.
- Schulze C (1981) Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. *Münch Med Wochenschr* 123:1145-1150.
- Schulze C (1986) Über genetische Faktoren bei der Ätiologie von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten. *Fortschr Kieferorthop*, 47(5):346-355.
- Selye H (1953) The present state of stress conception. *Münch Med Wochenschr* 95(15):426-33.
- Sepulveda W, Wong AE, Martinez-Ten P, Perez-Pedregosa J (2010) Retronasal triangle: a sonographic landmark for the screening of cleft palate in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 35:7-13.
- Shaw W (2004) Global strategies to reduce the health care burden of craniofacial anomalies: report of WHO meetings on international collaborative research on craniofacial anomalies. *Cleft Palate Craniofac J* 41(3):238-243.
- Shimizu N, Aoyama H, Hatakenaka N, Kaneda M, Teramoto S (2001) An in vitro screening system for characterizing the cleft palate-inducing potential of chemicals and underlying mechanisms. *Reprod Toxicol* 15(6):665-72.
- Strafgesetzbuch StGB § 218a
- Strauss OA (1914) Predisposing causes of cleft palate and harelip. *Transactions of the sixth International Dental Congress* 470-471.
- Syska E (2000) Experimentelles Modell der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten als pathogenetisches Äquivalent der Fehlbildung des Menschen. Halle (Saale), Univ., Med. Fak. Diss.
- Syska E, Schmidt R, Schubert J. (2004) The time of palatal fusion in mice: a factor of strain susceptibility to teratogens. *J Craniomaxillofac Surg* 32(1):2-4.
- Tierschutzgesetz (TierSchG) §7
- Tolarová M, Cervenka J (1998) Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet* 75:126-137.
- Tolarová M, Harris J (1995) Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and Multivitamins. *Teratology* 51:71-78.
- Vallino- Napoli LD, Riley MM, Halliday J (2004) An epidemiologic study of isolated cleft lip, palate, or both in Victoria, Australia from 1983 to 2000. *Cleft Palate Craniofac J* 41(2):185-194.
- Vanderas AP (1987) Incidence of cleft lip, cleft palate, and cleft lip and palate among races: a review. *Cleft Palate J* 24(3):216-225.
- Voet D, Voet JG: Aminosäuren als Vorstufen bei Biosynthesen. In: Maelicke A, Müller IK (Hrsg): *Biochemie*. VHC Weinheim, NewYork, 1992, S. 703–717.
- Waitzman NJ, Scheffler RM, Romano PS (1995) The Cost of Birth Defects. *University Press of America* 44(37): 694-9.
- Wang C, Chang JY, Yang C, Huang Y, Liu J, You P, McKeehan WL, Wang F, Li X (2013) Type 1 fibroblast growth factor receptor in cranial neural crest cell-derived mesenchyme is required for palatogenesis. *J Biol Chem* 288(30):22174-83.

- Woelk H: Eigenschaften, Wirkung und Therapie der Vitamine B₁, B₆, B₁₂. In: Einhorn-Press, Reinbek, 1989, S. 4-111.
- Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, Hamel BC, Blom HJ, Steegers-Theunissen RP (1999) Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology* 60(5):253-7.
- Woolf CM, Woolf RM, Broadbent TR (1963) Genetic and nongenetic variables related to cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg* 32(1):65-74.
- Wyszynski DF, Beaty TH (1996a) Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts. *Teratology* 53:309-317.
- Wyszynski DF, Beaty TH, Maestri NE (1996b) Genetics of Nonsyndromic Oral Clefts Revisited. *Cleft Palate Craniofac J* 33(5):406-416.
- Wyszynski DF, Lewanda AF, Beaty TH (1996c) Phenotypic discordance in a family with monozygotic twins and non-syndromic cleft lip and palate. *Am J Med Genet* 66:468-470.
- Zenk W, Wagner TH, Möckel M (1987) Die teratogen beeinflusste Palatogenese bei der Uje: Wistar-Ratte. 2. Mitteilung: der Einfluss von Thiamin auf die Frequenz von Lippen-Kiefer-Gaumen-Segel-Spalten. *Zahn-Mund-Kieferheilkd* 75:562-565.
- Zhang Z, Wang J, Dai X, Ding Y, Li Y (2011) Prevention of retinoic Acid-induced early craniofacial abnormalities by vitamin B12 in mice. *Cleft Palate Craniofac J* 48(4):355-62.
- Zieglowski V, Hemprich A (1999) Spaltgeburtenrate der ehemaligen DDR vor und nach dem Reaktorunfall in Tschernobyl. *Mund-Kiefer- Gesichtschirurgie* 3(4):195-199.

9 Thesen

1. Das Organkulturmodell ist geeignet die direkte Beeinflussung der Organogenese durch exogene Faktoren zu untersuchen.
2. Die räumliche Orientierung und der Abstand der Gaumenfortsätze hat einen Einfluss auf die Palatogenese *in vitro*.
3. Durch das entwickelte Organkulturmodell können Tierversuche auf ein nötiges Maß eingeschränkt werden.
4. Die Substitution des Kulturmediums mit B-Vitaminen hat einen signifikanten positiven Einfluss auf die Palatogenese im Organkulturmodell.
5. Die unspezifische Prävention von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auf Basis der Substitution des mütterlichen Organismus durch B-Vitamine in der vulnerablen Phase ist sinnvoll.
6. Es kann angenommen werden, dass durch die Substitution von B-Vitaminen eine Reparation bereits eingetretener Entwicklungsstörungen erfolgt.
7. Die *in vitro* erreichte Fusionsrate ist der beobachteten Spalthäufigkeit im unbeeinflussten A/WySn-Stamm proportional.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Orce y Tigges
Adresse: Dohne 50, 45468 Mülheim/ Ruhr
julia.orce@stein-site.de
Geburtsdatum/ -Ort: 25.11.1974/ Wuppertal
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1981 - 1985 städtische Grundschule Am Dohr in Wuppertal.
1985 – 1994 allgemeine Hochschulreife städtische Gesamtschule „Erich-Fried“.

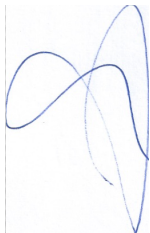
Berufsausbildung

1994 – 1997 Deutsche Paracelsus-Schule für Naturheilverfahren in Düsseldorf
1997 – 2005 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Dezember 2005 Staatsexamen der Zahnmedizin an Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Mai 2012 Anerkennung zur Fachzahnärztin für Oralchirurgie durch ZÄK Westfalen-Lippe

Berufliche Laufbahn

2006 – 2008 Weiterbildungsassistentin bei Fr. Dr. med. dent. C. Schoenebeck, Graf-Adolf-Str. 24, Düsseldorf

2009 – 2010	Weiterbildungsassistentin in der chirurgischen Praxis Dr. med. Dr. med. dent. C.O.Keller und Dr. med. Dr. med. dent. I.Kitner, Gerberstr.10-12, Bochum
2010 – 2012	Weiterbildungsassistentin in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Diakonie Klinikum Jung-Stilling, Siegen bei Prof. Dr. med. Dr. med. dent. B.H. Hell
2012 - 2014	Funktionsoberärztin in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Diakonie Klinikum Jung-Stilling, Siegen bei Prof. Dr. med. Dr. med. dent. B.H. Hell
Seit 09/ 2014	angestellte Fachzahnärztin für Oralchirurgie in der Praxis von Dr. med. Dr. med. dent. Th. Betz in Oberhausen



Julia Orce y Tigges, Mülheim, 3.3.2015

**Selbständigkeitserklärung
und
Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die diesem Antrag beiliegende Dissertation mit dem Titel " Medikamentöse Beeinflussung der Entwicklung des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus in der Gewebekultur" noch nie, weder ganz noch teilweise, im Rahmen eines anderen Promotionsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht habe. an keiner anderen Fakultät oder Universität ist ein Promotionsverfahren anhängig.

Die vorliegende Arbeit habe ich ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and curves, positioned above the name and date.

Julia Orce y Tigges, Siegen, 30.05.2014

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit wahrnehmen, all denen zu danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Dr. Schubert gilt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die vielen Hinweise und Ratschläge.

Ich bedanke mich auch für die gute Betreuung bei meinen Mentoren, Dr. Dr. Markus Berginski und vor allem Frau Dr. Dr. Konstanze Scheller.

Besonderen Dank auch an Dr. Frank Wossal, Leiter des Universitätsrechenzentrums und seiner Mitarbeiterin Frau Haufe für die Hilfestellungen bei statistischen Fragestellungen sowie Frau Dr. Ilona Wolff vom Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der MLU und ihren Mitarbeitern für die Vorbereitung der Mäuse.

Dr. Herbert Neuhaus ist als interdisziplinärer Ratgeber an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt.

Nicht unerwähnt möchte ich die Motivation seitens meiner Familie lassen, ohne die es diese Arbeit und vieles Andere nicht geben würde.

Vor allem widme ich diese Arbeit meinem Bruder Jochen und meiner Schwägerin Gabi.