

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik  
für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(komm. Direktor: apl. Prof. Dr. Dr. A.W. Eckert)

**In vivo Untersuchung des Einflusses von Thiamin auf die genetisch determinierte  
Lippen-, Kiefer- und Gaumenspaltbildung der A/WySn-Maus**

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

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

von Florian Kalmring  
geboren am 10.09.1987 in Blankenburg

Betreuerin: PD Dr. Dr. K. Scheller

Gutachter: 1. PD Dr. Dr. K. Scheller  
2. apl. Prof. Dr. S. Bartel  
3. Prof. Dr. Dr. A. Hemprich (Leipzig)

08.11.2016

28.09.2017

# Widmung

Meinen Eltern und  
meiner Schwester Marie

# Referat

## Zielsetzung

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) gehören zu den häufigsten Fehlbildungen des Menschen weltweit. Die Entstehung von LKGS zu verhindern (Prävention) ist eine besondere Herausforderung der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Seit mehr als 70 Jahren beschäftigten sich klinische und experimentelle Studien mit der Prävention von LKGS und seit den 1980er Jahren wird an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die klinische Spaltprävention mit Polyvitamin B-Präparaten in der Frühschwangerschaft bei risikobehafteten Familien mit großem Erfolg durchgeführt. Untersuchungen in der Organkultur des spaltbelasteten Mäusestamms A/WySn bestätigten eine positive direkte Wirkung von B-Vitaminen auf die embryonale Entwicklung des Gaumens. Ziel der Arbeit war es, die Wirkung des oral verabreichten B-Vitamins Thiamin (Winthrop®, Deutschland) auf die Spaltprävention bei der A/WySn Maus zu untersuchen.

## Methoden

72 von insgesamt 90 schwangeren Muttermäusen des A/WySn-Maus-Inzuchtstammes wurden zu vier unterschiedlichen Zeiten der embryologischen Gesichtsentwicklung hohe Dosen von Thiamin (80mg/kg KG) oral verabreicht. Nach Opferung der Muttermäuse wurde die Konzentration von Thiamin im Serum und im Fruchtwasser in Bezug auf die geschlechtsbezogene Spaltbildung analysiert. 435 Nachkommen wurden präpariert, das Geschlecht und die Spaltform bestimmt, fotografiert und zur histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet.

## Ergebnisse

Die genetisch determinierte Spaltbildung der A/WySn-Maus konnte durch die orale Thiaminsubstitution nicht gesenkt werden. Eine geschlechterabhängige Spaltmanifestation fand sich nicht. Die Konzentration von Thiamin im Blutserum stieg durch Thiamingabe signifikant an ( $p < 0,05$ ), nicht jedoch im Fruchtwasser. Die Rate an Resorptionen unter den Nachkommen konnte durch die Thiaminsubstitution deutlich gesenkt werden.

## Folgerung

Die positive Wirkung der klinischen Prophylaxe mit Poly B-Vitaminen konnte in der A/WySn-Maus nicht bestätigt werden und die propagierte direkte Beeinflussung der kraniofazialen Strukturen war durch die erniedrigten Thiaminwerte im Fruchtwasser nicht gegeben.

Kalrmring, Florian: In vivo Untersuchung des Einflusses von Thiamin auf die genetisch determinierte Spaltbildung der A/WySn-Maus, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 61 Seiten, 2016

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	III
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten .....	1
1.1.1 Häufigkeiten .....	1
1.1.2 Sozioökonomische Faktoren .....	2
1.2 Klassifizierung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten .....	4
1.3 Das multifaktorielle Schwellenwertmodell .....	5
1.4 Physiologie der Entwicklung der Lippen-Kiefer- und Gaumenregion.....	6
1.4.1 Die Gesichtsentwicklung.....	6
1.4.2 Die Entwicklung des primären Gaumens .....	8
1.4.3 Die Entwicklung des sekundären Gaumens .....	9
1.5 Pathogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.....	11
1.5.1 Genetische Faktoren.....	12
1.5.2 Umweltfaktoren.....	14
1.6 Das Mausmodell zur Ätiologie- und Präventionsforschung .....	17
1.7 Untersuchungen zur Fehlbildungsprävention.....	18
1.7.1 Protektionsfaktoren .....	19
1.7.2 Klinische Untersuchungen .....	24
1.7.3 Experimentelle Untersuchungen .....	24
<b>2 Zielstellung.....</b>	<b>26</b>
<b>3 Material und Methodik.....</b>	<b>27</b>
3.1 Versuchstiere .....	27
3.1.1 A/WySn-Maus.....	27
3.1.2 Haltung .....	28

3.1.3	Verpaarung.....	28
3.2	Vitaminsubstitution .....	28
3.3	Untersuchungen der Feten.....	29
3.3.1	Entnahme von Vollblut und Fruchtwasser .....	29
3.3.2	Geschlechtsbestimmung der Feten.....	30
3.4	Herstellung der Präparate .....	31
3.5	Statistische Auswertung .....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4.1	Untersuchung der Nachkommen .....	33
4.2	Analyse der Thiaminkonzentration im Serum und im Fruchtwasser .....	34
4.3	Geschlechtsspezifische Analyse der Spaltfrequenz.....	38
4.4	Geschlechtsspezifische Analyse der Spaltformen .....	39
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>61</b>
9	Lebenslauf.....	V
10	Selbstständigkeitserklärung.....	VI
11	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	VII
12	Danksagung.....	VIII

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
APAF 1	Apoptotic protease activating factor 1
A/WySn	Inzuchtmausstamm A Woolley Snell
bzw.	beziehungsweise
CI	Konfidenzintervall
Bmp	bone morphogenetic protein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DDR	Deutsche Demokratische Republik
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EUROCAT	European Surveillance of Congenital Anomalies
EZM	extrazelluläre Matrix
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
FGF	Fibroblastic growth factor
FW	Fruchtwasser
GAG	Gykosaminoglykan
GS	(isolierte) Gaumenspalte
i.p.	intraperitoneal
IAP	Intracisternaler A-Partikel
IRF	interferon regulating factor
JAG 2	jagged 2-Protein
KG	Körpergewicht
LS / LKS / LKGS	Lippen- / Lippen-Kiefer- / Lippen-Kiefer-Gaumenspalte
max.	maximal
MES	midline epithelial seam
mg	Milligramm
min	Minuten
mio	Millionen
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Mittelwert
p.c.	post conceptionem
sec	Sekunden
SHH	sonic hedgehog
SNP	single nucleotide polymorphism

SSL	Scheitel-Steiß-Länge
STAW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
VAX1	ventral anterior homeobox 1
♂ / ♀	männlich / weiblich

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

### 1.1.1 Häufigkeiten

Nicht-syndromale Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS - Cheiloganathopalatoschisis) treten mit einer Häufigkeit von weltweit ca. 1:700 auf und gehören somit zu den häufigsten Fehlbildungen des Menschen (Dixon et al., 2011). Die nicht-syndromalen isolierten Gaumenspalten (GS - Palatoschisis) sind mit einer Häufigkeit von ca. 1:1100 deutlich seltener (Abb. 1; Mossey und Modell, 2012).

Beide Formen dieser orofazialen Spaltbildung entstehen schon früh während der menschlichen Embryonalentwicklung. Während die Lippen-Kieferspalten (LK) als Fehlbildungen des primären Gaumens bereits in der 5.-6. Embryonalwoche (EW) entstehen, treten die Gaumenspalten (GS), als eine Fehlbildung des sekundären Gaumens, um die 8.-9. Embryonalwoche auf.

Insgesamt wird die Häufigkeit der LKGS durch Unterschiede in der ethnischen Zugehörigkeit, aber auch durch Umwelteinflüsse und den sozioökonomischen Status beeinflusst. Asiaten und amerikanische Ureinwohner haben die höchste Prävalenz von über 1:500, während für Europäer die Häufigkeit auf 1:1000 und für Afrikaner auf 1:2500 geschätzt wird (Dixon et al., 2011). Selbst bezogen auf Europa zeigen sich starke regionale Schwankungen (Abb. 1) mit einem deutlichen Nord-Süd-Gefälle mit den höchsten Werten im Norden und den niedrigsten im Süden (Mossey und Modell, 2012). Weil diese Fehlbildung jedoch sehr früh in der Embryonalentwicklung mit einer komplexen Ätiologie durch genetische Faktoren, als auch durch Umwelteinflüsse beeinflusst auftritt, sind bis heute die genauen Ursachen, die zu einer Ausprägung einer LKGS führen, weitgehend unbekannt (Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011).

Das europäische Register für angeborene Fehlbildungen EUROCAT (european surveillance of congenital anomalies), erfasst jährlich an die 1,5 Millionen Geburten in 22 Ländern (Dolk et al., 2010). Hier wurde über den genannten Beobachtungszeitraum von 2008 bis 2012 die Prävalenz von nicht-syndromalen LKGS und GS mit ungefähr 1 zu 833 angegeben (EUROCAT, 2015). Auffallend war im europäischen Vergleich eine der höchsten Prävalenzen für nicht-syndromalen LKGS in Deutschland (Abb. 1). Deutschland wird bei EUROCAT u.a. durch das Fehlbildungsmonitoring Sachsen-Anhalt repräsentiert. Es erfasst Daten und erstellt Auswertungen zu Fehlbildungen und Anomalien im Bundesland Sachsen-Anhalt. Im aktuellen Fehlbildungsmonitoring von 2014 ist in Sachsen-Anhalt für LKGS eine Prävalenz von

9,3/10000 (1/1077) und für isolierte GS eine Prävalenz von 7,5/10000 (1/1326) mit sinkender Tendenz zu den Vorjahren angegeben (Fehlbildungsmonitoring Sachsen-Anhalt, 2014).

Nach der Gesundheitsberichterstattung des Bundes, die aufgrund der Diagnosedaten der Krankenhäuser ausgewertet wird, wurden im Jahr 2014 bei den unter Einjährigen beider Geschlechter 2310 Patienten behandelt, wobei aus den Daten nicht hervorgeht, ob Mehrfachbehandlungen in die Zählung eingeschlossen wurden (GBE des Bundes, 2014).

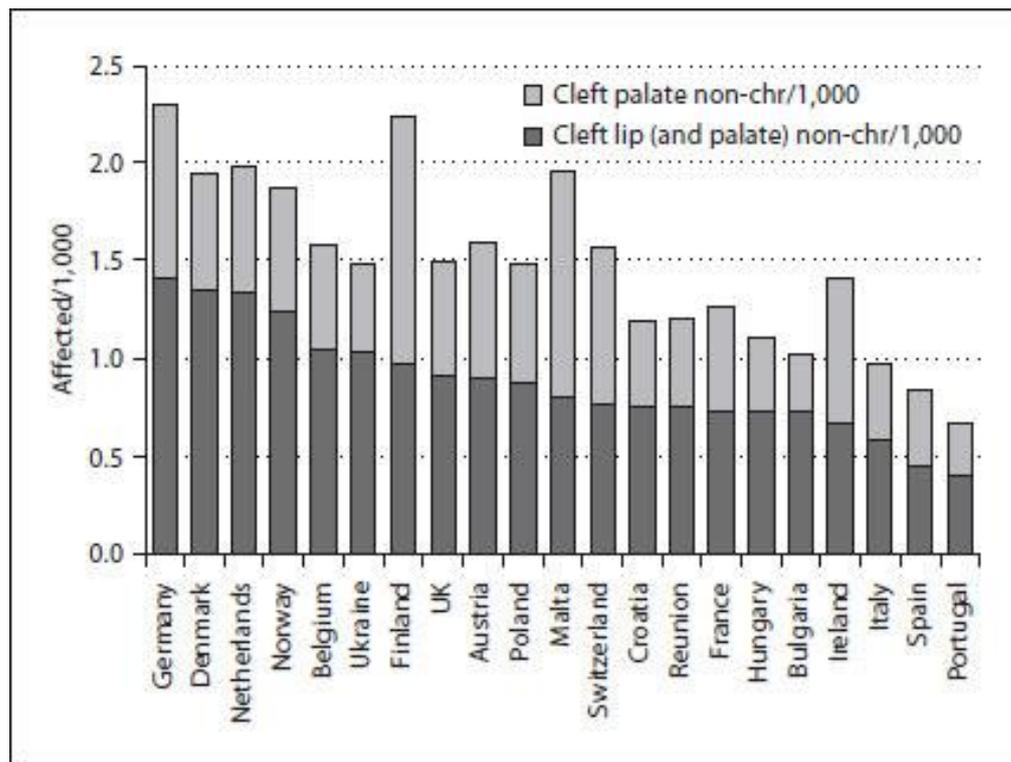


Abb. 1: Prävalenz von nicht syndromalen LK(G)S und GS in Europa (aus: Mossey und Modell, 2012)

### 1.1.2 Sozioökonomische Faktoren

Sowohl für die Betroffenen, als auch für die Eltern und Angehörigen der betroffenen Kinder, ist diese Fehlbildung mit einem hohen psychosozialen Belastungsdruck verbunden. Trotz der frühzeitigen und sehr guten operativen Versorgung in Deutschland ist eine Stigmatisierung immer noch vorhanden. Schulkinder mit einer kompletten LKGS weisen demnach im Alter von 8-12 Jahren eine geringere Lebensqualität auf, als Patienten mit isolierter Lippen- oder Gaumenspalte (Kramer et al., 2009). Männliche Patienten mit einer orofazialen Spaltbildung werden in diesem Alter (8-12 Jahre) häufiger das Opfer von Mobbing und weisen im Vergleich zu gleichaltrigen Mädchen mit derselben Erkrankung eine deutlich geringere Lebensqualität auf. Diese Beobachtung kann in gewissem Umfang durch die Häufung der LKGS beim männlichen

Geschlecht und das ausgeprägte männliche Dominanzverhalten erklärt werden (Kramer et al., 2009).

Die häufigen Arztbesuche, die sich von der Geburt bis zum Erwachsenenalter erstrecken und die zahlreichen operativen Eingriffe, die bis zur vollständigen Rehabilitation der Patienten erfolgen, werden oftmals ebenfalls als belastend empfunden. Diese medizinischen Maßnahmen stellen allerdings eine nicht zu vernachlässigende hohe finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme dar. Die Kosten für die stationären und ambulanten Aufenthalte in den USA wurden für die ersten 18 Lebensmonate eines Patienten mit LKGS auf durchschnittlich 35.826 \$ bis 56.611 \$ geschätzt (Abbott et al., 2014). Der Mehrheit der Weltbevölkerung ist der Zugang zu einer derartig spezialisierten medizinischen Versorgung jedoch nicht möglich. Durch die Folgen dieser Fehlbildung, wie Ess-, Sprech-, und Hörprobleme der Neugeborenen, sind die soziale Integration, sowie die psychomotorische Entwicklung, v.a. in den Entwicklungsländern, erschwert (Dixon et al., 2011).

An spezialisierten Zentren können wir jedoch, aufgrund der hervorragenden Behandlungsmaßnahmen und Therapieergebnisse durch eine jahrelange interdisziplinäre Behandlung unterschiedlicher Fachdisziplinen (Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kieferorthopädie, Kinderzahnheilkunde, Logopädie), gute funktionelle und ästhetische Ergebnisse erzielen und eine vollwertige Integration des Patienten in die soziale Gesellschaft zumeist als selbstverständlich ansehen (Abb. 2a und b).



a



b

Abb. 2: Klinisches Erscheinungsbild einer doppelseitigen, durchgängigen Lippen-Kiefer-Gaumenspalte bei einem 3 Monate alten Patienten (a) und nach abgeschlossener kompletter Rehabilitation im Alter von 4 Jahren (b)

## 1.2 Klassifizierung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Die Einteilung der nicht-syndromalen Spalten wird aufgrund von genetischen, epidemiologischen und embryologischen Erkenntnissen in die LKGS und in die isolierte GS vorgenommen (Fogh-Andersen, 1942; Mossey et al., 2009). Insgesamt existieren mindestens 30 ätiologisch und klinisch unterschiedliche Ausprägungsformen der orofazialen Spaltbildung, deren Schweregrade von Mikrosymptomen bis hin zur totalen doppelseitigen LKGS reichen können und eine genaue Charakterisierung ist für jeden Fehlbildungstyp unerlässlich (Neumann, 1996). Verschiedenste Klassifikationssysteme sollen dabei die Einordnung der unterschiedlichen Spaltformen ermöglichen.

Die von Fogh-Andersen (1942) vorgeschlagene Einteilung in Spalten des primären und/oder sekundären Gaumens (Fogh-Andersen, 1942) wurde in der Internationalen Klassifikation der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten von Rom 1967 berücksichtigt (Tab. 1). Zu Spalten des primären Gaumens gehören somit die jeweils ein- oder doppelseitig auftretende Lippen- (LS) und Lippen-Kieferspalte (LKS). Die Spalten des sekundären Gaumens manifestieren sich klinisch in ein- oder doppelseitig auftretenden LKGS, die median verlaufende isolierte Gaumenspalte (GS) sowie die Segelspalte.

Tab. 1: Klassifikation von Rom 1967 (modifiziert nach Pfeifer et al., 1981)

Gruppe 1	Spalten des vorderen embryonalen Gaumens a) Lippe: rechts und/oder links b) Kiefer: rechts und/oder links
Gruppe 2	Spalten des vorderen und hinteren embryonalen Gaumens a) Lippe: rechts und/oder links b) Kiefer: rechts und/oder links c) Harter Gaumen: rechts und/oder links d) Weicher Gaumen: medial
Gruppe 3	Spalten des hinteren embryonalen Gaumens Harter Gaumen: rechts und/oder links Weicher Gaumen: medial
Gruppe 4	Seltene Gesichtsspalten

1968 wurde von **Koch** der LAHS-Kode entwickelt, der von **Kriens** erweitert und später von der WHO übernommen wurde (Koch, 1968; Kriens, 1989). Hier bezeichnen die Buchstaben die jeweils betroffene anatomische Struktur: L = Lippe, A = Kiefer (Alveolus), H = Hartgaumen,

S = Weichgaumen (Segel). In dieser sehr bildlichen Einteilung werden um das median stehende „S“ je nach Seitenverteilung der Spaltform die Buchstaben rechts und/oder links davon geschrieben, sodass eine schnelle Unterscheidung zwischen uni- und bilateraler Spalte durch einen Blick möglich ist.

Die Ausprägungsform der Spalte wird durch die Wahl der Buchstabengröße gekennzeichnet. Ein Großbuchstabe beschreibt eine komplette, ein Kleinbuchstabe eine partielle Spalte. Nicht betroffene anatomische Strukturen werden durch ein Minuszeichen dargestellt. Der linke Teil des Codes bezeichnet die rechte Gesichtshälfte und umgekehrt. So ist ein Patient mit dem Code LAHSHAL von einer totalen bilateralen Lippen-Kiefer-Gaumenspalte betroffen, bei dem Code la - -al von einer partiellen bilateralen Lippen-Kieferspalte.

Nach aktueller ICD-GM-Version 2016 der WHO werden zurzeit alle LKGS nach dem LAHS-Kode klassifiziert (Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information, 2015).

### 1.3 Das multifaktorielle Schwellenwertmodell

Das multifaktorielle Schwellenwertmodell (Abb. 3), das u.a. von Falconer (1965), Carter (1969) und Fraser (1976) entwickelt wurde (Schubert, 1991), gehört zu den anerkanntesten ätiologischen Modellen der Spaltentstehung (Schubert und Krost, 2006).

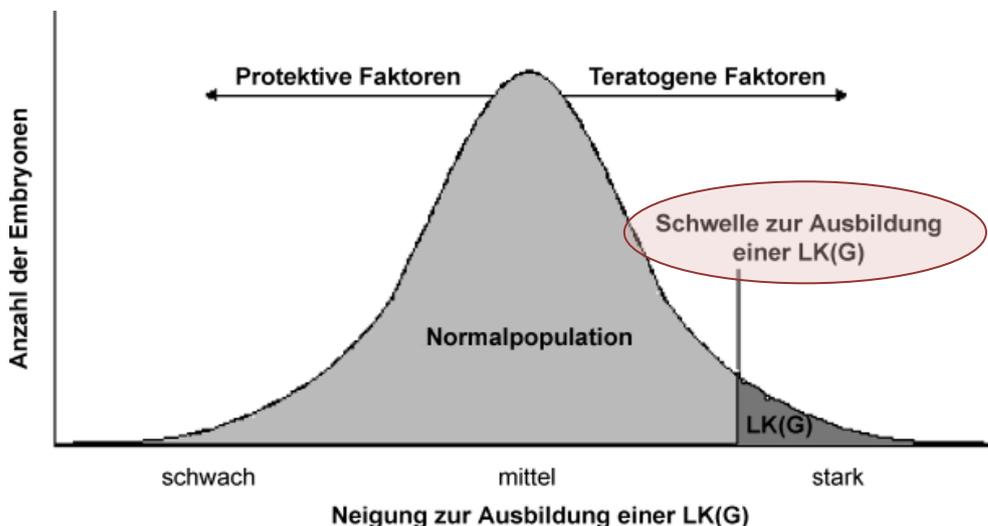


Abb. 3: Das multifaktorielle Schwellenwertmodell mit dem Einfluss protektiver und teratogener Faktoren (aus Schubert und Krost, 2006)

Die Neigung zur Ausprägung einer Spaltfehlbildung folgt in der Bevölkerung einer Gauß'schen Verteilungskurve (Normalverteilung), die durch protektive und teratogene Faktoren beeinflusst wird.

Der Begriff multifaktoriell bezieht sich hierbei zum einen auf die konstanten, endogenen, genetischen und zum anderen auf die beeinflussbaren, exogenen Umweltfaktoren, die auf ein Individuum einwirken. Kommt es durch den Additionseffekt zur Summation von vermehrt teratogenen Faktoren und zur Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes (rote Markierung in Abb. 3), manifestiert sich die Erkrankung bei Individuen mit einer bestehenden starken Neigung. Einige Individuen befinden sich somit stets nahe an diesem Schwellenwert und kleine Veränderungen der Umwelt, wie z.B. die Ernährung der Mutter, würden ausreichen, um die Schwelle hin zur Manifestation einer Fehlbildung nach links zu verschieben (Fraser, 1971).

Durch gezielten Einsatz von protektiven Faktoren und durch den Ausschluss bzw. die Reduktion von teratogenen Faktoren besteht allerdings die Möglichkeit, diese Schwelle nach rechts zu verschieben und somit einer Krankheitsmanifestation zu entgehen.

Die Idee hinter der medikamentösen Prävention von LKGS besteht nun darin, den Einfluss der negativen (z.T. auch teratogenen) exogenen Faktoren so zu reduzieren, dass sie trotz bestehenden endogenen Faktoren zu keiner Ausprägung einer Fehlbildung führen können (Schubert et al., 1990). Genetische Faktoren lassen sich allerdings nicht beeinflussen.

## **1.4 Physiologie der Entwicklung der Lippen-Kiefer- und Gaumenregion**

### **1.4.1 Die Gesichtsentwicklung**

Embryonen von Mensch und Maus weisen während der frühen kraniofazialen Entwicklung morphologisch eine verblüffende Ähnlichkeit auf (Diewert und Wang, 1992). Die zeitliche Entwicklung findet allerdings zu unterschiedlichen Zeiten statt (Tab. 2).

Die Lippen- und Gaumenentwicklung läuft in den beiden Spezies grundsätzlich ähnlich ab (Gritli-Linde, 2012) und Mensch und Maus teilen sich rund 99 % ihrer Gene. Zahlreiche Gene, welche als Kausalfaktoren für LKGS identifiziert worden sind, verursachen LKGS sowohl beim Menschen als auch bei der Maus (Gritli-Linde, 2008). Ein eindeutiges „Spaltgen“ konnte bis heute allerdings nicht identifiziert werden (Mehrotra, 2015).

Die allgemeine Gesichtsentwicklung wurde in der Vergangenheit an verschiedenen Tierarten wie Reptilien, Vögel und Mäusen untersucht (Ferguson et al., 1984; Jiang et al., 2006). Hierbei kristallisierte sich heraus, dass das Mausmodell besonders gut geeignet für die Untersuchung

von Gaumenfehlbildungen ist. Die folgenden zeitlichen Angaben zu den einzelnen Entwicklungsschritten beziehen sich auf den Menschen.

Die Entwicklung des Gesichtes wird durch den Kopf- und Rumpf-Schwanz-Organisator gesteuert (Spemann, 1936). So gibt es, nach Pfeifer (1991), zwei Impulszentren zur Modellation des Kopfes und der Gesichtsregion: aus dem prosencephalen Impulszentrum entstehen Stirnhirn, frontale Schädeldächer, Nasenrücken, Oberlippenmitte, Zwischenkiefer und Nasenseptum. Aus dem rhombencephalen Impulszentrum entstehen das seitliche Hinterhaupt, das seitliche Mittelgesicht, sowie das untere Gesichtsdrittel (Pfeifer, 1991). Die Bildung dieser Strukturen hängt von einem koordinierten Ablauf der drei zellulären Prozesse ab: der Zellmigration, der Zell-Differenzierung und der gezielten Apoptose (Mossey et al., 2009).

Tab. 2: Zeitlicher Vergleich der intrauterinen Entwicklung der A/WySn Maus und des Menschen (modifiziert nach Raupach, 1987)

	Embryonal- periode	Frühe Fetalperiode	Späte Fetalperiode	Fusion d. Gaumenplatten abgeschlossen
Maus	10.-12. Tag	12.-14. Tag	15. Tag- Geburt	15. Tag, 6 Stunden <sup>(1)</sup>
LK-Spalten	9,5-11,5 Tag			
Gaumenspalten		11,5.-15,5.Tag		
Mensch	26.-42. Tag	42.-90. Tag	90. Tag- Geburt	57.-84. Tag <sup>(2)</sup>
LK-Spalten	36.-42. Tag			
Gaumenspalten		44.-56./58. Tag		

<sup>(1)</sup> Syska, Schmidt et al. 2004

<sup>(2)</sup> Moore, 1990

Gegen Ende der vierten Entwicklungswoche bilden sich nun durch eine ungleichmäßige Verteilung des Neuralleistenmesenchyms die mit Epithel überzogenen Gesichtswülste. Diese werden durch Furchen begrenzt, an deren Boden es zu einer sukzessiven Mesenchymanlagerung kommt und sich die Vertiefungen nivellieren (Neumann, 1996). Während sich die Unterkieferwülste kaudal entwickeln, entstehen die Oberkieferwülste lateral und der Stirnfortsatz kranial vom Stomatodeum (siehe Abb. 4).

Das Prosenzephalon induziert dann die Riechplakoden, die sich an den lateralen Seiten des Stirnwulstes befinden. Diese senken sich ab der fünften Woche zu Riechgruben ein und werden jeweils von einem medialen und einem lateralen Nasenwulst umgeben.

#### 1.4.2 Die Entwicklung des primären Gaumens

Die nachfolgenden Wachstumsprozesse bewirken nun v.a. eine Vergrößerung der Oberkieferwülste. Durch das gleichzeitige Wachstum der Oberkieferwülste nach medial kommt es zu einem engen Kontakt der Epithelien zwischen Oberkiefer- und medialem Nasenwulst sowie zwischen lateralem und medialem Nasenwulst, unter Ausbildung der Hochstetter'schen Epithelmauer. Diese löst sich nach ca. 5-8 Tagen auf und wird durch Mesenchym ersetzt. Epithelreste im hintersten Bereich der Nasenwülste bleiben erhalten und werden durch das expansive Wachstum des embryonalen Kopfes und der Ausformung der Nasenhöhle zu einer dünnen Lamelle, der Lamina buconasalis, auseinandergezogen. Mit dem physiologischen Einriss dieser kommt es zur Entstehung der primitiven Choanen (Töndury, 1955).

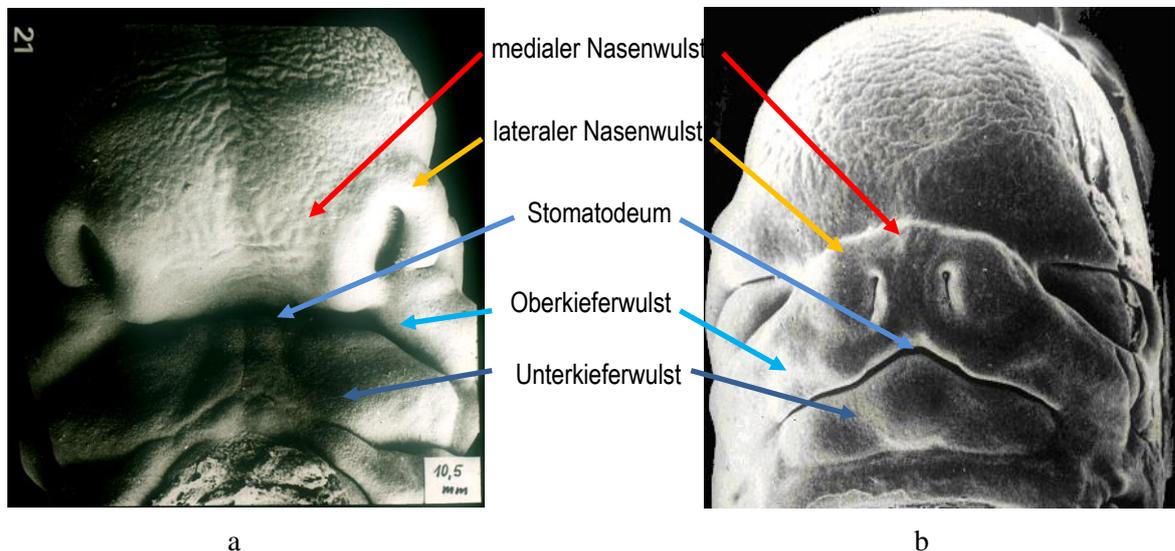


Abb. 4: Anlagen des Gesichtes eines 5 Wochen alten 10,5 mm großen (Gesamtgröße) menschlichen Embryos (a) verglichen mit einem 7 Wochen alten 17,5 mm (SSL) großen menschlichen Embryo (b) nach Verschmelzung der Gesichtswülste (aus Hinrichsen, 1985)

Um die sechste Embryonalwoche fusionieren die Oberkieferwülste und der mediale Nasenwulst und bilden den medialen Lippenanteil mit Philtrum und den Zwischenkiefer mit den vier Schneidezähnen. Diese Strukturen werden als primärer Gaumen bezeichnet. Der Nasenrücken und die Nasenspitze werden vom medialen Nasenwulst gebildet, die lateralen Nasenwülste sind an der Bildung der Nasenflügel beteiligt (siehe Abb. 4).

Die Unterlippe und der Unterkiefer entstehen durch Wachstum der Unterkieferwülste zur Mittellinie mit anschließender Fusionierung.

### 1.4.3 Die Entwicklung des sekundären Gaumens

Zur gleichen Zeit treten an den Oberkieferwülsten Gaumenfortsätze auf (Sadler, 2008). Folgende Entwicklungsprozesse zur Bildung des sekundären Gaumens sind nun kennzeichnend: Wachstum, Elevation und Fusion. Die Gaumenfortsätze, die aus den Oberkieferwülsten hervorgehen, befinden sich lateral der Zunge, die zu diesem Zeitpunkt schon weit entwickelt ist und die gemeinsame Mund- und Nasenhöhle größtenteils ausfüllt, und wachsen, geleitet von dieser großen Zunge, schräg nach kaudal.

Die Gaumenfortsätze bestehen aus einem zentralen Mesenchymkern, umgeben von einem einfachen undifferenzierten Epithel, das aus einer isoprismatischen Basalschicht mit einer Basalmembran und einer bedeckenden, von Fruchtwasser umspülten, abgeflachten Peridermzellschicht besteht (Holtgrave und Stoltenburg-Didinger, 2002). Während der embryonalen Entwicklung signalisiert das Mesenchym dem Epithel die anstehende Differenzierung (Ferguson et al., 1984). Das vertikale Wachstum der Fortsätze wird nun durch komplexe Signalkaskaden aus Transkriptions- und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren (z. B.: *Msx1*, *Fgf10*, *Fgfr 2b*, *Tgfb2* und *Tgfbr2*) kontrolliert (Gritli-Linde, 2007). Die zelluläre Kommunikation zwischen Mesenchym und Epithel spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

Diese Signalwege können durch Rezeptorfehlregulationen beeinflusst werden. So resultiert eine geringere Mesenchymproliferation und eine höhere Apoptoserate, wenn der im Mesenchym gebildete *FGF10* (*Fibroblast growth factor 10*) nicht an seinen im Epithel exprimierten Rezeptor *FGFR2b* (*Fibroblast growth factor receptor 2b*) binden kann. Die Aktivierung dieses Rezeptors ist jedoch entscheidend für die Expression des Wachstumsfaktors *SHH* (*sonic hedgehog-Protein*). Die fehlende Wirkung von *SHH* soll durch eine Fortsatzverkürzung der Gaumenplattenpaare zur Bildung einer Gaumenspalte führen (Murray et al., 2004; Rice et al., 2004; Han et al., 2009). Zhang et al. (2002) hatten allerdings schon vorher gezeigt, dass *Msx1* (*Msh homeobox 1*) die Expression von *Bmp2* (*bone morphogenic protein*) und *Bmp4* im Mesenchym sowie *SHH* und *Bmp4* im Epithel reguliert. Bei einem *Msx1*-Knock-out Mausmodell resultieren somit komplette nicht-syndromale LKGS (Zhang et al., 2002).

Ab der siebten Entwicklungswoche kommt es zu einem Absinken der Zunge, sodass die Gaumenfortsätze die Möglichkeit haben sich aufzurichten und um 90° einzuschwenken. In der Literatur existieren viele verschiedene Arbeiten, die zur Klärung dieses komplexen Elevationsvorgangs beitragen möchten. Nach Little (1963) gibt es im Mausembryo einen prominenten Gefäßplexus an der medialen Seite der Oberkieferfortsätze, dessen „Blutfülle“ der Gefäße zur Anhebung der Gaumenfortsätze beitragen soll (Little, 1963). Ferguson (1984) hingegen verweist auf die eng gepackten Mesenchymzellen, die vor der Elevation vorhanden sind. Zudem beschrieb er eine höhere Zellzahl in der zu letzt fusionierenden posterioren Region des sich entwickelnden Gaumens (Ferguson, 1984). Die Dichte der Mesenchymzellen scheint sich somit

während der Palatogenese zu verändern und die Variation der Zellzahl trägt somit zur Fortsatzelelevation bei. So zeigten Brinkley und Bookstein (1986), dass die Gaumenfortsatzausrichtung von Veränderungen der mesenchymalen Zelldichte und Verteilung begleitet ist. Sie stellten die These auf, dass eine hohe lokale Zelldichte durch Hyperplasie der einzelnen Zellen hervorgerufen wird. Eine Abnahme der Zelldichte soll somit mit der Verdrängung von Zellen durch die Ausdehnung der EZM (extrazellulären Matrix) einhergehen (Brinkley und Bookstein, 1986). Neuere Untersuchungen aus dem Jahr 2007 zeigen, dass es durch die EZM zu einer regionalen Akkumulation und Hydratation von Glykosaminoglykanen, v.a. Hyaluronsäure, kommt und durch diese „Schwellung“ aufgrund der Bindung von Wasser im Extrazellularraum zur Aufrichtung der Gaumenfortsätze (Gritli-Linde, 2007).

Der sich nun anschließende Fusionsvorgang unterliegt ebenfalls einer molekularen Steuerung. Interessanterweise ändert sich während der Elevation die Adhäsionskompetenz der Fortsätze: vertikale Fortsätze, die sich in einem engen Kontakt zu Nachbarstrukturen befinden, sind adhäsionsinkompetent - richten sie sich auf, erwerben sie äußerst schnell die Adhäsionsfähigkeit. Dieser Vorgang wird über die Differenzierung des Periderms durch das membrangebundene Signalmolekül *JAG 2 (Jagged 2-Protein)* gesteuert (Casey et al., 2006). Von Bedeutung für eine regelrechte Fusion ist die Spezifität der Adhärenz des medialen Epithelrandes, da das Gaumenepithel nicht mit einem Epithel anderer Herkunft fusionieren würde (Ferguson et al., 1984). Die Voraussetzung für die folgende anterior-posteriore Fusion der Gaumenfortsätze ist der Abbau des isoprismatischen Epithels, des MES (midline epithelial seam), durch Apoptose und Redifferenzierung der Epithelzellen (Moxham, 2003).

Es folgt die Ausdünnung des MES zu 2-3 Schichten (Mato et al., 1966; Ferguson, 1988).

Dafür gibt es 3 Gründe (Moxham, 2003):

1. Wachstum des Gaumens
2. Apoptose (Martinez-Alvarez et al., 2000b)
3. Migration der Epithelzellen vom MES in das Mesenchym der Gaumenfortsätze. Diese Epithelzellen sind dann vom Mesenchym nicht zu unterscheiden.

Folgende mesenchymal und epithelial produzierte Moleküle sind am Fusionsprozess der Gaumenfortsätze beteiligt: Adhäsionsmoleküle (*nectin 1*), Desmosomen und Wachstumshormone wie *TGF $\alpha$*  (*Transforming growth factor alpha*), *EGFR* (*Epidermal growth factor receptor*) und Faktoren der *TGF $\beta$*  Superfamilie (Mogass et al., 2000). V.a. *TGF $\beta$ 3* spielt bei der Gaumenfusion eine entscheidende Rolle: Es stimuliert die Adhäsion, führt zur Oberflächenvergrößerung durch Ausbildung von Zellvorwölbungen (Martinez-Alvarez et al., 2000a) und fördert den Abbau des MES.

Für den Abbau des Epithels ist u.a. der *APAF 1* (*Apoptotic protease activating factor 1*) verantwortlich. Bei einem Defekt dieses Gens kann somit zwar die Adhäsion stattfinden, aber es kann zu keinem Abbau des MES kommen (Cecconi et al., 1998).

Der sukzessive Epithelabbau wird nun weiter realisiert, indem Peridermzellen und einige Zellen des MES auf die orale und nasale Oberfläche der entstehenden Gaumenplatte migrieren und trianguläre Epithelflächen bilden. Der MES des adhären Gaumens wird einschichtig und es kommt zur Ausbildung einzelner Epithelzellinseln. Letztendlich führt der programmierte Zelltod (Apoptose) des Epithels zu einem Abbau der Basalmembran (Cuervo und Covarrubias, 2004).

Fitschett und Hay konnten Ende der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts entlang des MES jedoch keine apoptotischen Zellen nachweisen. So wurde dann die Theorie der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) aufgestellt, die seitdem kontrovers diskutiert wird (Fitschett und Hay, 1989). Da es bis heute keine validierte Methode gibt die postulierte EMT *in vivo* nachzuweisen, ist eine Transformation von Epithel hin zu Mesenchym, zuletzt auch aufgrund genetischer Analysen, eher unwahrscheinlich.

Die vollständige Apoptose der Epithelzellen des MES wird heute somit allgemein anerkannt (Dudas et al., 2007) und bildet die notwendige Voraussetzung für die Fusion der Gaumenfortsätze in der 9. - 12. Woche entlang der Mittellinie.

Letztendlich fusionieren die Gaumenfortsätze sowohl mit dem vorderen primären Gaumen (Zwischenkiefer) als auch mit dem Nasenseptum, sodass eine Trennung von Mund- und Nasenhöhle stattfindet. Mastikation und Atmung sind dadurch gleichzeitig möglich. Schlussendlich führt die Differenzierung des Mesenchyms zur knöchernen Durchbauung des harten Gaumens.

### **1.5 Pathogenese der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten**

LKGS sind auch auf zellulärer Ebene das Resultat von Entwicklungsstörungen. Hier betrifft diese v.a. die Zellmigration, die Zellproliferation, die Apoptose, die Zusammensetzung der EZM-Ablagerung sowie die spezielle Differenzierung der mesenchymalen und epithelialen Vorläuferzellen (Gritli-Linde, 2012).

Verschiedene Theorien beschäftigen sich mit dem Pathomechanismus der Spaltentstehung. So propagierte Töndury (1955) die Unterscheidung in zwei Spaltformen, die sich durch das klinische Erscheinungsbild unterscheiden lassen: Die primäre Form soll in der 5. bis 6.

Embryonalwoche durch Ausbleiben der Verschmelzung und die sekundäre Form durch Einreißen der epithelialen Verschmelzungsnaht entstehen (Starck, 1975).

Bei der **primären** Spalte kommt es somit nicht oder nur zu einer mangelhaften Ausbildung der Hochstetter'schen Epithelmauer. Aufgrund des Wachstumsdefizits, der zu keinem Kontakt der epithelbedeckten Fortsätze führt, können sich die Epithelien nicht auflösen und das Mesenchym kann nicht wandern. Diese Patienten fallen klinisch meist durch eine große Spaltbreite, schmale Spaltränder und dem gewöhnlich bis zum Naseneingang verlaufenden Lippenrot auf (Abb. 5a). Die sog. **sekundären** Spalten treten dann auf, wenn die Epithelmauer nicht oder nur unvollständig von Mesenchym durchwachsen wird. Durch das intrauterine Gesichtswachstum kann es dann zur partiellen oder auch totalen Trennung des Epithels kommen. Klinisch dominieren eher wulstige Spaltränder mit geringeren Spaltbreiten und das Lippenrot verläuft nur bis zur Hälfte der Oberlippenhöhe (Pfeifer, 1968; Abb. 5b).

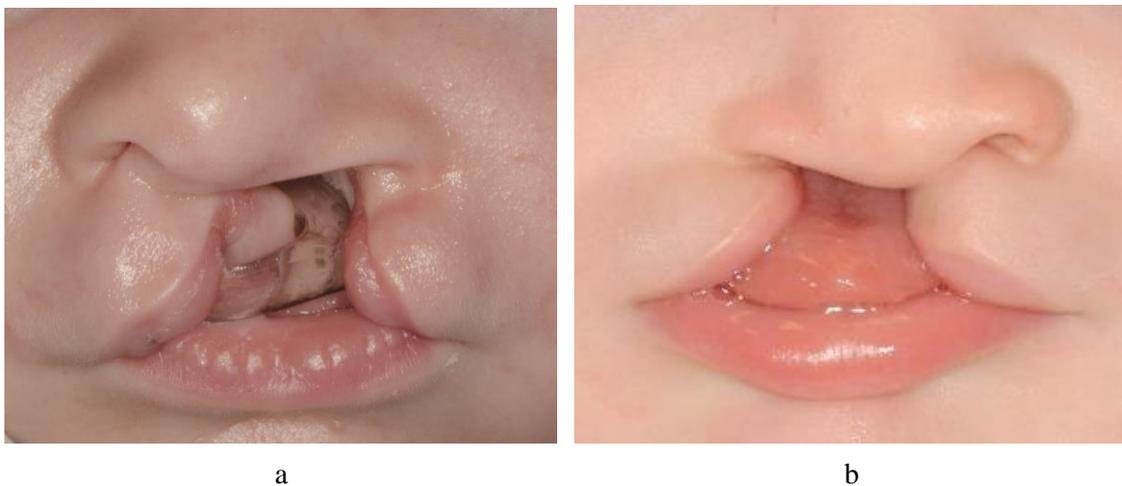


Abb. 5: Einseitige primäre (a) und sekundäre (b) totale LKGS bei einem jeweils 3 Monate alten Jungen

### 1.5.1 Genetische Faktoren

Die Häufung von nicht-syndromalen LKGS in einigen Familien, und der innerhalb der Familie anzutreffende vorwiegend gleichartige Spalttyp, legen die Vermutung eines genetischen Einflusses auf die Ausbildung einer Spalte nahe (Neumann, 1996). Untersuchungen an dänischen Zwillingspaaren konnten eine 60% höhere Konkordanzrate für LKGS bei eineiigen Zwillingen, als bei zweieiigen Zwillingen (10%) feststellen. Weitere epidemiologische Untersuchungen beschrieben einen Anstieg für das Wiederholungsrisiko bei Verwandten ersten Grades um das 10- bis 32-fache bei gleicher Spaltform der Nachkommen (Christensen und Fogh-Andersen, 1993). So können die genetische Prädisposition (Mossey et al., 2009) und viele andere Faktoren, die das intrauterine Nährstoffangebot oder embryologische

Entwicklungsprozesse beeinflussen, mitverantwortlich sein. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Spalterkrankung liegt bei Verwandten 1. Grades von Spaltträgern von 2-4%. Für ein drittes Kind steigt das Risiko von phänotypisch gesunden Eltern, die schon zwei an Spalten erkrankten Kindern haben, auf 9%. Das höchste Risiko für das Auftreten einer erneuten Spaltbildung mit 13-14% besteht für ein Kind, das in eine Familie hineingeboren wird, in der ein Elternteil und ein Kind eine Spalterkrankung aufweist. Insgesamt besteht das höchste Risiko für eine Spaltbildung bei männlichen Nachkommen von betroffenen Müttern (Tolarová, 1987; Mossey et al., 2009; Abb. 6).



Abb. 6: Familiäre Häufung einer nicht-syndromalen Spaltbildung. Vater mit rechtsseitiger LKGS und Sohn mit beidseitiger LKGS.

Diese Zahlen zeigen, dass eine Weitergabe der nicht-syndromalen LKGS durch die Mendel'sche Vererbungslehre nicht zu erklären ist (Juriloff, 2008). Ein Hauptgen, welches eindeutig mit einer nicht-syndromalen Spaltbildung assoziiert ist, konnte bisher nicht bestätigt werden (Mehrotra, 2015). Darüber hinaus wurden genetische Varianten (u.a. an den Loci 1p36, 2p21, 3p11.1, 8q21.3, 13q31.1 und 15q22) beschrieben, die mit einem erhöhten Risiko zur Ausprägung von LKGS assoziiert sein können (Mangold et al., 2010; Ludwig et al., 2012).

Defekte in Genen, die für die Entwicklung des sekundären Gaumens kodieren, wie Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie deren Rezeptoren (wie in 1.4.3), können auch zur Entstehung von LKGS beitragen (Gritli-Linde, 2007). *IRF6* ist diesbezüglich ein Kandidatengen auf Chromosom 1q32.3-q41, welches durch eine Mutation nicht nur an der Ausprägung des Van der Woude-Syndroms, gekennzeichnet durch Unterlippenfisteln, LS/GS und Hypodontie, sondern durch Polymorphismen auch mit hoher Wahrscheinlichkeit zu nicht-syndromalen LKGS beitragen kann (Mossey et al. 2009; Mijiti et al., 2015). So soll eine Veränderung in diesem Gen

bei Familien mit einem an einer Spalte erkrankten Kind das Risiko für eine erneute Spaltbildung um das Dreifache erhöhen (Zuccherro et al., 2004). Eine *IRF6*-Mutation ruft im Mausmodell eine Hyperproliferation der Epidermis hervor, welche zu multiplen epithelialen Adhäsionen führen kann und die Formation des Periderms beeinträchtigt, sodass dadurch auch eine Spaltbildung resultieren könnte (Dixon et al., 2011).

Auch Varianten des *VAX1*-Gens (*Ventral anterior homeobox 1*), einem Transkriptionsfaktor mit DNS-Bindungsdomäne auf Chromosom 10q25, sind bei Patienten mit LKGS überrepräsentiert (Mangold et al., 2010).

Weitere diskutierte Kandidatengene sind u.a. *MSX1*, *TGFA* und *TGFB3* (Mehrotra, 2015).

Die meisten dieser Untersuchungen basieren auf den genomweiten Assoziationsstudien (GWAS). Diese Untersuchungen haben die Anzahl neuer Loci, die mit LKGS assoziiert sein sollen, ansteigen lassen, sind aber von der Fokussierung auf ein ursächliches Gen zurzeit noch weit entfernt (Dixon et al., 2011).

### 1.5.2 Umweltfaktoren

Epidemiologische und experimentelle Daten deuten darauf hin, dass umweltbedingte Risikofaktoren zur Spaltmanifestation beitragen. Unterschiedliche Umweltfaktoren, die auf die Mutter in der frühen Schwangerschaft einwirken können, wie Tabakrauch, Alkoholkonsum, Mangelernährung oder auch virale Infektionen, Medikamenteneinnahme, Stress und Teratogene (ionisierende Strahlung), wurden hinsichtlich ihrer Auswirkung auf eine Spaltbildung untersucht (Mossey et al., 2009).

#### *Tabakrauch*

Der Einfluss des mütterlichen Rauchens während der Schwangerschaft auf eine mögliche Spalterkrankung wurde in zahlreichen Arbeiten analysiert. Eine Metaanalyse mit 24 eingeschlossenen Fall-Kontroll- und Kohortenstudien, insgesamt über 15.500 Spaltfälle und 8 Mio. Kontrollen, zeigte, dass eine Frau unter Nikotinabusus während der Schwangerschaft ein erhöhtes relatives Risiko von etwa 30% (Odds ratio: 1,34; 95% CI 1.25–1.44) hat, ein Kind mit einer nicht-syndromalen LKGS zu bekommen, während das relative Risiko für eine nicht-syndromalen GS 20% beträgt (Odds ratio: 1,22; 95% CI 1.10–1.35) (Little et al., 2004). Da Passivrauchen in einigen Studien nicht berücksichtigt wurde, könnten die Wahrscheinlichkeiten allerdings noch höher liegen (Mossey et al., 2009).

Eine neue Metaanalyse hinsichtlich des mütterlichen Passivrauchens und einer möglichen Spaltmanifestation schätzt das erhöhte Risiko für eine Spaltmanifestation in der Nachkommenschaft auf das 1,5-Fache (Sabbagh et al., 2015). Aufgrund der starken Heterogenität der Studien sind diese Untersuchungen nur schwer vergleichbar.

Der mögliche Pathomechanismus des im Tabak enthaltenen Nikotins wird durch eine Gefäßverengung und somit durch eine Minderperfusion der sich entwickelnden embryonalen Strukturen (Hypoxie) erklärt. Die verminderte Oxygenierung des proliferierenden Gewebes führt dann zu Wachstumsverzögerungen.

Durch eine DNS-Methylierung aufgrund der im Tabak enthaltenen Alkylantien kann somit auch die genetische Komponente beeinflusst werden (Vieira, 2012).

### *Alkohol*

Bekannt durch einen Alkoholabusus während der Schwangerschaft ist das fetale Alkoholsyndrom. Charakteristische Symptome sind eine geistige Retardierung, vermindertes Wachstum mit Mikrozephalie und Mikrognathien, verkürzte Lidspalte und abgeflachter Nasenwinkel. Auch Herz- und Gefäßfehlbildungen, Dismorphien an Gelenken und Händen sowie am Genitale wurden diesbezüglich beschrieben (Neumann, 1996). Welche Rolle der Alkohol bei der Spaltgenese spielt, ist weiterhin unsicher. So existieren Studien, die einen negativen Einfluss von Alkohol auf die Gesichtsentwicklung bekräftigen, aber auch solche, die keinen Hinweis auf die Spaltgenese erkennen lassen (Mossey et al., 2009).

In einer norwegischen Fall-Kontroll-Studie wurde eine Variation im ADH1C-Gen (Alkohol Dehydrogenase 1C Gen) beschrieben, die möglicherweise einen Zusammenhang von Alkoholkonsum während des ersten Trimesters und einer Spaltentstehung bei den Nachkommen erklären könnte.

Alkohol wird unter physiologischen Bedingungen in zwei Schritten oxidiert. Im ersten Schritt erfolgt die Oxidierung zu Acetaldehyd durch die Alkoholdehydrogenase, im zweiten zu Acetat durch die Aldehyddehydrogenase. Eine Veränderung im Gen der Alkoholdehydrogenase würde somit den Alkoholmetabolismus reduzieren und zu einem Anstieg der Teratogenität des Alkohols beitragen. Der teratogene Effekt hängt dabei von der genetischen Kapazität der Mutter und des Embryos ab, den Alkohol zu oxidieren und zu eliminieren (Boyles et al., 2010).

### *Mangelernährung*

Während einer Schwangerschaft existiert ein bis zu 10-fach höherer Bedarf an Vitaminen (Knapp, 1983) und Mineralien. Selbst unter den in unserer Region herrschenden guten Ernährungsbedingungen weisen ca. 10-25% der Mütter eine Vitaminunterversorgung auf (Baker et al., 1981; Schubert et al., 1990).

Vor allem zu Beginn einer Schwangerschaft ist der Vitaminmangel hinsichtlich einer erhöhten Fehlbildungs- und Frühabortalrate von hoher Bedeutung und kann so bei einer ungeplanten Schwangerschaft aufgrund der mangelnden Substitution rapide einsetzen. Veränderte Essgewohnheiten oder das bekannte Schwangerschaftserbrechen (Hyperemesis gravidarum) können den Vitaminmangel forcieren (Weingärtner et al., 2007).

Vitaminreiche Nahrung hat einen protektiven Effekt auf die Entstehung von LKGS (Tolarová, 1982; Natsume, 1998). Hier sind die wasserlöslichen Vitamine der B-Gruppe von besonderer Bedeutung für die effektive Nutzung der Kohlenhydrate und die Synthese von Proteinen.

Das teratogene Potential eines Mangels an B-Vitaminen hinsichtlich einer orofazialen Spaltentstehung ist schon seit 1914 bekannt und konnte auch tierexperimentell nachgewiesen werden (Schubert et al., 2002). Die ausreichende Substitution mit B-Vitaminen zeigt hingegen nicht nur im Tierversuch eine deutliche protektive Wirkung. So wurde auch in klinischen Studien ein deutlich reduziertes Wiederauftreten der Spaltrate nach mütterlicher perikonzeptioneller Folsäure- und Multivitaminsubstitution beobachtet (Tolarová und Harris, 1995; Schubert und Krost, 2006).

### *Medikamente*

Bis zu 80% aller schwangeren Frauen nehmen Medikamente ein (Lüllmann et al., 2010). Mehr als 25% dieser nehmen im Verlauf der Schwangerschaft sogar über sechs verschiedene Medikamente ein, deren Spektrum von Mineralien über Analgetika, Laxantien, Antiemetika bis hin zu Sexualhormonen reicht (Kunze, 2014).

Hierbei gelten als sicher teratogen Medikamente wie Thalidomid, unter dem Handelsnamen Contergan® ( $\alpha$ -Phthalimidoglutaramid) bekannt, welches fetale Wachstumsverzögerungen hervorruft. Androgene Hormone und Folsäure-Antagonisten, wie Methotrexat und Aminopterin, und regelmäßig eingenommene Antikonvulsiva sind ebenfalls als teratogen einzustufen, während Salizylate, Cumarinderivate und einige Antibiotika nur unter bestimmten Umständen eine teratogene Wirkung aufweisen sollen. Generell sollte nur bei dringlicher Indikation und unter Beachtung der Organentwicklung des Embryos bzw. des Fetus ein Medikament verordnet werden (Neumann, 1996).

Cyclophosphamid, ein Chemotherapeutikum mit alkylierender Wirkung (Schubert, 1977), und das Steroid Cortison (Baxter und Fraser, 1950; Schubert, 1980) zeigten im Tierversuch an Mäusen eine sehr deutliche teratogene Wirkung und Dexamethason (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon), ein künstliches Glukokortikoid, stellte sich hierbei als reines „Spalt-Teratogen“ dar (Schubert, 2001).

### *Virale Infektionen*

Eine klassische Folge einer Virusinfektion, die zu einer Embryopathie führen kann, ist die Röteln-Embryofetopathie, die durch das Rubella-Virus, ein RNA-Virus aus der Togaviren-Gruppe, verursacht wird. Je früher die Infektion in der Schwangerschaft erfolgt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für eine Schädigung und desto schwerwiegender der eintretende Schaden (Neumann, 1996). Die Manifestation zeigt sich in der typischen Trias einer Retinopathie, einer Katarakt und einer Innenohrtaubheit. Herzanomalien und zerebrale Schäden

mit geistiger Retardierung sowie ein vermindertes Geburtsgewicht können neben dem seltenen Auftreten von Spaltbildungen des primären und sekundären Gaumens beobachtet werden (Neumann, 1996; Herold et al., 2015).

Weitere Viren, die mit Fehlbildungen des infizierten Neugeborenen assoziiert sein sollen, sind Hepatitisviren, das Herpes simplex und Varizella-Zoster-Virus, das HI-Virus sowie das Cytomegalovirus (Neumann, 1996). Die hierbei auftretenden Fehlbildungen betreffen zumeist ganze Organsysteme und sind nicht nur auf orofazialen Strukturen beschränkt. Allerdings wurde 2010 in einem Fallbericht erstmals eine mögliche durch das Cytomegalovirus induzierte Mikrognathie mit LKGS beschrieben (Weichert et al., 2010).

### *Distress*

Negativer Stress, auch Distress genannt (Selye, 1975), wird ebenfalls als möglicher mitverursachender Grund einer Spaltbildung diskutiert. Zugrunde liegt die Vorstellung, dass durch physischen oder emotionalen Stress eine oxidative Schädigung auf zellulärer Ebene auftreten kann, die mit einer Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, mit Folge einer erhöhten Cortisol-, Katecholamin- und Zytokinausschüttung, verbunden ist (Wallace et al., 2011). Der Übertritt von mütterlichem Cortisol über die Plazentaschranke soll somit eine direkte Wirkung auf den sich entwickelnde Embryo haben und dessen Hormonachse beeinflussen (Weerth und Buitelaar, 2005). Durch die Aktivierung dieser mütterlichen Hormonachse soll die Durchblutung der Muskulatur der Mutter auf Kosten der Blutversorgung des Embryos via Plazenta verbessert werden, sodass ein möglicher embryonaler Nährstoff- und Sauerstoffmangel mit einer einhergehenden Wachstumsretardierung resultieren kann (Wallace et al., 2011).

## **1.6 Das Mausmodell zur Ätiologie- und Präventionsforschung**

Ein anerkanntes Modell zur Erforschung von nicht-syndromalen LKGS und kraniofazialen Dysmorphien ist das Mausmodell. Die stets diskutierte Frage nach der Übertragbarkeit der am Säugetier gewonnenen Forschungsergebnisse auf den Menschen ist seit jeher von besonderer Bedeutung.

Schon 1911 konnte von Peter gezeigt werden, dass die Entwicklungsvorgänge des primären und sekundären embryonalen Gaumens beim Menschen und anderen Säugetieren identisch ablaufen (Peter, 1911). Die Entwicklung der Nasenhöhle und des sekundären Gaumens (Hart- und Weichgaumen) sind ebenfalls gleich, sodass ein Vergleich mit dem Menschen gestattet ist (Töndury, 1955), auch wenn die Gaumentwicklung der Maus nur mit Vorsicht auf die des Menschen übertragen werden kann (Hinrichsen, 1991).

Bei den durch Teratogene verursachten orofazialen Spaltformen fällt die Gleichheit zu den klinischen Formen der LKGS des Menschen auf (Schubert, 2001). Somit wird nicht nur eine ähnliche Entwicklung, sondern auch eine ähnliche Pathogenese der beiden Spezies angenommen. Tierversuche lassen somit Einblicke in die komplexen Mechanismen von Fehlentwicklungen zu und liefern wertvolle Erkenntnisse zur Entwicklung von Therapieansätzen und Präventionsmaßnahmen.

Zur Erforschung verschiedenster angeborener Krankheitsbilder wie die Retinoidembryopathie existieren mittlerweile genetisch veränderte Mausmodelle, die aufgrund eines bestimmten Gendefekts diese Erkrankung konstant ausbilden, so wie der Mausstamm C57B1/6J ein Tiermodell zur Untersuchung des fetalen Alkoholsyndroms lieferte (Johnston und Bronsky, 1995).

LKGS werden beim Menschen und beim Tier einerseits durch teratologische Noxen induziert (Baxter und Fraser, 1950; Schubert, 1977) und andererseits genetisch determiniert gefunden. Die genetisch determinierte Spaltentwicklung, u.a. bei der A/WySn-Maus, zeigt sich durch den von außen unbeeinflusst stabilen homogenen genetischen Hintergrund. Der A-Mausstamm ist ein Inzuchtstamm, der vom Genetiker Leonell C. Strong in den 1920er Jahren durch einen vermeintlichen Zwischenfall etabliert wurde: In einem ehemaligen Hühnerstall untergebracht, starben durch Austritt von Verbrennungsgasen aus einem Kohleofen alle Nachkommen der 7. Generation, bis auf eine schwangere Maus, von der jetzt alle „A/-“ Stamm-Mäuse abstammen. Seitdem werden sie in der medizinischen Forschung auf der ganzen Welt eingesetzt (Strong, 1978). Die bei den A-Stämmen und einigen Verwandten auftretenden orofazialen Fehlbildungen ähneln den menschlichen, nicht-syndromalen LKGS hinsichtlich genetischer Ätiologie und Umweltempfindlichkeit. Alle Untergruppen, wie z.B. A/J, A/WySnJ, A/HeJ, bringen Spaltträger in ihrer Nachkommenschaft hervor, die sich in ihrer Spaltfrequenz durch epigenetische Effekte unterscheiden (Juriloff und Harris, 2008). So entwickelte der CL/Fr Stamm, der von F. C. Fraser in den 1960er Jahren etabliert wurde, sowie ein weiteres Derivat des A-Stammes, eine spontane LKGS-Häufigkeit von 20-25% (Juriloff und Fraser, 1980). Bei unserem in Halle etablierten A/WySn-Stamm zeigt sich bis heute eine relativ hohe konstante Häufigkeit spontaner LKS und LKGS von 20 bis ca. 44% (Juriloff et al., 1982; Schubert et al., 2002).

### **1.7 Untersuchungen zur Fehlbildungsprävention**

Das höchste wissenschaftliche und humanitäre Ziel bei vermeidbaren Erkrankungen ist die Primärprävention (Mossey und Modell, 2012). Dabei ist „Primärprävention als eine Vorbeugung einer Erkrankung definiert, bevor diese eintritt. Sie sucht stets nach Ursachen und Risikofaktoren, um diese zu vermeiden“ (DGNP e.V.).

### 1.7.1 Protektionsfaktoren

Protektionsfaktoren, die in der Lage sind, eine Krankheitsmanifestation vorzubeugen, sind in der Präventionsforschung von großem Interesse. Am Schwellenwertmodell (siehe Abb. 3) orientierend ist es möglich, durch deren gezielten Einsatz die Schwelle zur Ausbildung einer Spaltform nach rechts zu verschieben, sodass die Wahrscheinlichkeit zu einer Ausprägung einer Fehlbildung geringer wird (Schubert et al., 1990). In den 80er Jahren beschäftigte man sich vielseitig mit protektiven und teratogenen Faktoren und beschrieb, dass unterschiedlichste Vitamine, v.a. die wasserlöslichen Vitamine der B-Reihe, zu einer ungestörten Entwicklung der kraniofazialen Strukturen des Menschen beitragen können (Tolarová, 1982, 1987; Tolarová und Harris, 1995).

#### *Thiamin*

Thiamin (Vitamin B1), früher Aneurin genannt, wurde Anfang des 20. Jh. entdeckt. Chemisch besteht es aus einem Pyrimidinring, der über eine Methylenbrücke mit einem Thiazolring verbunden ist (Biesalski et al., 2002). Die positive Wirkung von Thiamin auf die orofaziale Entwicklung unter Vermeidung der Spaltbildung wurde in mehreren tierexperimentellen (Schubert, 1980; Raupach, 1987) und klinischen Arbeiten (Kreybig, 1976, 1977) beschrieben. Schubert (1980) konnte im Tierversuch bei Verabreichung von Thiamin während der Schwangerschaft die teratogen induzierten Gaumenspalten um etwa ein Drittel reduzieren (Schubert, 1980). Klinisch zeigte sich eine Reduktion des Wiederauftretens von Spalterkrankungen durch hochdosierte Thiaminsubstitution zusammen mit anderen B-Vitaminen in der Frühschwangerschaft (Kreybig, 1976). Thiamin, aber auch andere Vitamine der B-Gruppe, wie Niacin (Vitamin B3) und Pyridoxin (Vitamin B6) scheinen zusammen mit einer Folsäuresubstitution (Vitamin B9) während der Schwangerschaft zu einer Prävention der orofazialen und anderer Fehlbildungen (Spina bifida) beizutragen (Krapels et al., 2004).

Das wasserlösliche Thiamin mit einer Halbwertszeit von 10-18 Tagen hat eine entscheidende Bedeutung im Kohlenhydratstoffwechsel und zur Bereitstellung von Energie, vor allem in der Herz- und Skelettmuskulatur, in der Leber, im Gehirn und in den Nieren. Außerdem ist es im Nervensystem an der Reizweiterleitung und an der Bereitstellung der wichtigen Neurotransmitter wie Serotonin und Acetylcholin beteiligt. Thiamin kommt in geringen Mengen in tierischen, hier in der aktiven phosphorylierten Form (TPP-Thiaminpyrophosphat), und in pflanzlichen Lebensmitteln, vor allem in Vollkornprodukten und Nüssen, vor. Die empfohlene tägliche Tagesdosis eines Erwachsenen von Thiamin beträgt 1,2 mg (DGE, 2015). Die Resorption erfolgt im proximalen Jejunum unter Abspaltung des Phosphatrestes durch Pyrophosphatasen und ist dosisabhängig. Unterhalb der physiologischen Thiaminkonzentration von 2 µmol/l erfolgt der Transport carriervermittelt, natrium- und energieabhängig entgegen des Konzentrationsgefälles. Bei einer Konzentration über 2 µmol/l wird Thiamin durch passive

Diffusion aufgenommen (Biesalski et al., 2002). In den Mitochondrien der Leber überführt die Thiaminkinase das aufgenommene Thiamin wieder in seine aktive Form TPP. In diesem Zustand wirkt es als Coenzym an drei zentralen Enzymen im Stoffwechsel:

- a) Die Pyruvat-Dehydrogenase als Bindeglied zwischen Glykolyse und Citratzyklus liefert Acetyl-CoA.
- b) Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase als wichtiges Enzym im Citratzyklus stellt Succinyl-CoA bereit, welches in weiteren Zyklen Energie liefert oder zusammen mit Glycin zu Häm und weiter zum wichtigen Sauerstofftransporter Hämoglobin reagiert.
- c) Die Transketolase, ein Enzym des Pentosephosphatwegs, ist an der Bereitstellung von NADPH für die Fettsäure-, Cholesterin-, Steroidhormonsynthese und die Bereitstellung von Ribosephosphaten für Nukleotidsynthesen beteiligt (Rassow et al., 2008).

Allen diesen Schritten gemeinsam ist die Umwandlung von Nährstoffen in Energieäquivalente als Voraussetzung für Differenzierung und Wachstum eines Organismus.

### *Pyridoxin*

Das seit Ende der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts bekannte Pyridoxin (Vitamin B6) ist ein Sammelbegriff für die 3-Hydroxy-2-methylpyridine. Je nach Substituent wird zwischen dem Alkohol Pyridoxol/Pyridoxin, dem Aldehyd Pyridoxal, dem Amin Pyridoxamin sowie deren Phosphorsäure-Estern unterschieden. Alle diese Derivate können ineinander überführt werden und sind als Vitamin B6 gleich wirksam. Pyridoxin ist in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln weit verbreitet und somit kann der tägliche Bedarf durch eine ausgewogene Ernährung leicht gedeckt werden.

Vitamin B6 wird durch die interstinalen Phosphatasen durch passive Diffusion v.a. im Jejunum resorbiert und im Blut, nach Hydrolyse durch die interstinalen Phosphatasen, sowohl an Erythrozyten als auch im Plasma an Albumin gebunden zur Leber transportiert. In der Leber und im peripheren Gewebe werden die B6-Derivate durch Kinasen rephosphoryliert. Die rephosphorylierten Metabolite, insbesondere die Pyridoxalphosphate, sind als Coenzyme an ca. 100 verschiedenen enzymatischen Reaktionen und hier überwiegend am Aminosäurestoffwechsel, v.a. an Transaminierungen, Decarboxylierungen und Dehydrierungen, beteiligt. Aus diesem Grund hängt der Bedarf an Vitamin B6 auch von der Proteinzufuhr ab (Biesalski et al., 2002). Der Abbau des im Methioninstoffwechsel entstehenden zelltoxischen Homocysteins zu Cystathionin wird ebenfalls durch das Vitamin B6 katalysiert. Durch die relativ kurze Halbwertszeit (ca. 30 Tage) kann bei Vitamin B6-Mangel eine Hyperhomocysteinämie induziert werden (Weingärtner et al., 2007). Des Weiteren hat Vitamin B6 eine wichtige Funktion bei der Hämsynthese und dem Glykogenabbau. 80% des gespeicherten Vitamins B6 sind in der Muskulatur an die Glykogenphosphorylase, dem Leitenzym der Glykogenolyse, gebunden und essentiell bei der Mobilisierung von Energie.

Der Vitamin B6-Bedarf liegt bei 20 µg/g Protein (Biesalski et al., 2002) und wird mit einer täglichen Zufuhr von 1,2 mg/d für Frauen, 1,5 mg/d für Männer und 1,9 mg/d für Schwangere angegeben (DGE, 2015). Für ein wasserlösliches Vitamin eher ungewöhnlich ist die Möglichkeit einer Überdosierung, die mit unspezifischen Wirkungen wie Lethargie, Atemschwierigkeiten und Nystagmus, aber auch mit sensibler Neuropathie einhergehen kann, welche vor allem auf die Bildung von Schiff-Basen des Pyridoxals mit Konformations- und somit Funktionsänderungen von Enzymen zurückzuführen sind (Biesalski et al., 2002).

### *Cobalamin*

Cobalamin (Vitamin B12), erstmals 1948 beschrieben, ist ein komplex aufgebautes Molekül, bestehend aus einem zentralen Kobaltkomplex, in dem das Kobaltkation von fünf Stickstoffatomen und einem substituierbaren Liganden umgeben ist. Vier der Stickstoffatome werden von vier Pyrrolringen bereitgestellt, die annähernd in einer Ebene liegen und als Grundgerüst das Corrinringsystem bilden.

Nur an zwei enzymatischen Reaktionen ist Cobalamin als Coenzym beteiligt. Cobalamin wirkt im Methylierungszyklus mit Pyridoxin und Folsäure synergistisch indem es als Methionin-Synthase Homocystein zu Methionin remethyliert. Als Methylgruppendonator fungiert in dieser Reaktion N-Methyl-Tetrahydrofolsäure (THF). Bei Mangel an Cobalamin reichert sich N-Methyl-THF an und ein sekundärer THF-Mangel resultiert (Rassow et al., 2008). Das dabei entstehende S-Adenosylmethionin liefert die Methylgruppen zur Methylierung von DNS, Lipiden und Proteinen (Weingärtner et al., 2007).

Als Coenzym der Methylmalonyl-CoA-Mutase ist Cobalamin bei der Einschleusung der Abbauprodukte ungeradzahliger Fettsäuren sowie der Aminosäuren Valin, Isoleucin, Threonin und Methionin im Citratzyklus beteiligt. Das über einen Zwischenschritt gebildete Methylmalonyl-CoA reagiert mit Cobalamin zu Succinyl-CoA. Ist dieser Stoffwechselweg gestört, fällt der Ausgangsstoff vermehrt an und ist für neurologische Störungen der Pyramidenbahn und der Hinterstränge verantwortlich (Rassow et al., 2008).

Cobalamin, als essentielles Vitamin, kann nur von Mikroorganismen synthetisiert werden und weder der menschliche Organismus noch Pflanzen sind zu einer Synthese in der Lage. Das durch die Darmflora des Dickdarms gebildete Vitamin B12 kann den täglichen Bedarf des Menschen nur unzureichend decken, sodass der Mensch auf zusätzliche Quellen aus der Nahrung angewiesen ist. So wird der Bedarf v.a. durch tierische Produkte wie Leber, Nieren, Eier und Milch im täglichen Leben gedeckt (Biesalski et al., 2002). Cobalamin wird hierbei frei oder proteingebunden mit der Nahrung aufgenommen. Nach Proteinabspaltung im Magen und Darm wird es, als Extrinsic Factor bezeichnet, an den von den Parietalzellen des Magens gebildeten Intrinsic Factor gebunden und im terminalen Ileum resorbiert (Rassow et al., 2008). Empfohlen wird eine tägliche Zufuhr für den gesunden Erwachsenen von 3,0 µg, für

Schwangere von 3,5 µg und für Stillende von 4,0 µg (DGE, 2015). Die tatsächliche Zufuhr beträgt allerdings mehr (5-6 µg/d), sodass auch bei vegetarischer und veganer Ernährung ein Cobalaminmangel durch die lange Halbwertszeit von 1-4 Jahren, sowie durch die großen Speicher wie Leber und Muskel eher selten eintritt. Erst 1-2 Jahre nach radikaler Ernährungsumstellung kann dieser Vitamin B12-Mangel als hyperchrome makrozytäre Anämie symptomatisch werden. Zusätzlich geht dem Körper, bedingt durch die biliäre Ausscheidung durch den enterohepatischen Kreislauf, weniger als 0,1 µg/d Cobalamin verloren. Vorsicht ist allerdings bei Säuglingen von seit langer Zeit streng vegan lebenden Müttern geboten, da die mütterlichen Vitaminspeicher so entleert sein können, dass die Vitaminversorgung des Kindes über die Muttermilch nicht mehr gewährleistet ist und ggf. eine Entwicklungsretardierung des Kindes resultieren kann (Biesalski et al., 2002).

### *Folsäure*

Folsäure (Vitamin B9-Pteroylmonoglutamat) spielt eine wichtige Rolle in der Prävention von Neuralrohrdefekten (Spina bifida). Bei Kinderwunsch sollten 400 µg/d in Form von synthetischer Folsäure zusätzlich zu einer folatreichen Ernährung vier Wochen vor Konzeption bis zum Ende des ersten Trimenons substituiert werden (MRC Vitamin Study Research Group, 1991; DGE, 2015). Die tägliche Dosis von Folsäure, die eine HWZ von ca. 100 Tagen aufweist (Weingärtner et al., 2007), beträgt bei Erwachsenen 300 µg/d. Nach der Nationalen Verzehrstudie 2008 wird dieser Wert von 79% der Männer und 86% der Frauen *nicht* erreicht. Zudem steigt der Anteil der an Folsäure unterversorgten Bevölkerungsanteile mit höherem Alter, sodass ein Großteil der Bevölkerung mit Folsäure unterversorgt ist (Nationale Verzehrstudie, 2008).

Folsäure wurde erstmals 1941 aus Spinatblättern (folium = Blatt) isoliert und neben Salat, Spargel und Getreide kommt es in tierischen Lebensmitteln als Polyglutamatverbindung vor und wird auch durch Bakterien der Darmflora synthetisiert. Folsäure ist licht- und hitzeempfindlich und besteht aus einem Pteridinringsystem, das mit Glutamat über die p-Aminobenzoesäure verbunden ist. Die Resorption erfolgt als Monoglutamatverbindung pH-abhängig im Duodenum und proximalen Jejunum. Nach anschließendem hämatogenem Transport zur Leber wird Folsäure durch die Folsäure-Reduktase zu Dihydrofolsäure und weiter durch die Dihydrofolsäure-Reduktase zum aktiven Coenzym Tetrahydrofolsäure (THF) reduziert. Nach der Sezernierung in die Galle (200µg/d) unterliegt Folsäure dem enterohepatischen Kreislauf. Kleinere Schwankungen können durch die renale tubuläre Rückresorption ausgeglichen werden (Biesalski et al., 2002).

Wichtige Funktionen von THF und deren Derivate sind die C1-Gruppenübertragungen im Stoffwechsel:

- a) die Methylierung von Homocystein zu Methionin zusammen mit Vitamin B12 und B6
- b) die Umwandlung von Serin in Glycin und umgekehrt
- c) der Stoffwechsel des Histidins
- d) die Bereitstellung von Purinen und Pyrimidinen zur Biosynthese von DNS- und RNS-Molekülen

Diese Funktionen sind die Grundvoraussetzung für jegliche Replikation während der Wachstums- und Entwicklungsvorgänge und essentiell zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (Rassow et al., 2008). Klinisch wird sich so in der Therapie von einigen Neoplasien, die mit einer erhöhten und unkontrollierten Zellteilung einhergehen, die Hemmung der THF-Synthese durch Gabe von Dihydrofolsäure-Reduktaseinhibitoren zunutze gemacht. So zeigte sich auch, dass Folsäureantagonisten, in der Schwangerschaft verabreicht, das Risiko von Herz- und Gefäßfehlbildungen, orofazialen Spaltbildungen und Fehlbildungen des Urogenitaltrakts erhöhen (Hernández-Díaz et al., 2000).

Die erfolgreiche Prävention von Neuralrohrdefekten durch die Folsäuresubstitution forcierte die Forschung, inwiefern eine Folsäuresubstitution auch zu einer Prävention von orofazialen Spaltbildungen beitragen kann (Mossey et al., 2007). Neben positiven Ergebnissen im Tierexperiment (Natsume et al., 1998; Paros und Beck, 1999; Bienengraber et al., 2001) existieren klinische (nicht randomisierte) Studien, die ein verringertes Wiederauftreten einer Spaltbildung unter Substitution mit Folsäure enthaltenden Multivitaminen zeigen (Tolarová, 1982; Czeizel und Dudás, 1992; Tolarová und Harris, 1995). In Analogie der Folsäuregabe zur Vermeidung des Neuralrohrdefektes gibt es jedoch keinen evidenten Beleg über die Wirksamkeit dieser Prävention bei LKGS (Mossey et al., 2007). Bis heute ist „der eigentliche Wirkmechanismus noch umstritten“ (Weingärtner et al., 2007) und Einzelnachweise der Wirkung von Vitamin B9 sind schwierig, da Studienprotokolle weitere Vitamine der B-Reihe enthalten und synergistische Effekte dabei nicht auszuschließen sind (Czeizel und Dudás, 1992; Mossey et al., 2007). So soll nicht die Vitamingabe selbst zur Risikoreduktion führen, sondern die Bereitstellung von Methionin durch die Vitamine B6, B9 und B12 mit Senkung des Homocysteins (Weingärtner et al., 2007). Die kürzlich publizierte Risikoerhöhung von Spaltmanifestationen unter perikonzeptioneller Folsäuresubstitution in der nordniederländischen Bevölkerung (Rozendaal et al., 2013) muss wegen verschiedener Bias (suboptimale Kontrollgruppe, Synergismus von Vitamin B9 und anderen Vitaminen, Komorbidität der Schwangeren) allerdings sehr kritisch betrachtet werden (Czeizel, 2013).

### 1.7.2 Klinische Untersuchungen

Forschungen zum Thema der Fehlbildungsprävention von LKGS durch „unspezifische symptomatische“ Medikation beim Menschen existieren bereits seit dem Ende der 40er Jahre des letzten Jahrhunderts (Schubert, 1980, 1981). So berichten Douglas und Conway (1958) sowie später Peer (1964) aus den USA über eine Senkung der Spalthäufigkeit durch Multivitaminsubstitution der Schwangeren. In Europa begann Gabka (1960) mit der prophylaktischen Gabe von Multivitaminpräparaten bei Familien, in denen es zuvor schon zu einem Auftreten von LKGS kam (Schubert, 1982). V. Kreybig postulierte 1976 eine „Umwelt-Psychohygiene“ und die Applikation von täglich 300 bis 600 mg Thiamin (B1) evtl. zusammen mit anderen Vitaminen der B-Gruppe vom 25. bis 50. Schwangerschaftstag und stellte eine Reduktion des Wiederauftretens von Spalterkrankungen fest (Kreybig, 1976). Weitere Forschungsarbeiten zu Präventionsmaßnahmen finden sich im Laufe der Jahre immer wieder. Tolarová (1982) beschrieb ebenfalls eine Senkung der Spaltrate durch Multivitaminangabe bei 85 Schwangerschaften (Tolarová, 1982). In der DDR erfolgte die Einführung der Spaltprävention bei Patientinnen 1980 auf Grundlage richtungsweisender experimenteller Arbeiten von Schubert (1986). Die Vitamin B-Komplexgabe zusammen mit Actovegin®, einem Ultrafiltrat aus Kälberserum, zeigte positive klinische Ergebnisse bei 63 Risikoschwangerschaften (Schubert et al., 1990). Über einen Zeitraum von 25 Jahren konnte im Verlauf durch die Behandlung bei 71 Frauen mit positiver Familien- oder Eigenanamnese die Spaltbildungsrate von 4,9% (Tolarová, 1987) auf 2,9% gesenkt werden, wobei nur „Mikroformen in Form von einseitigen Lippenkerben“ und keine Gaumenspalten beobachtet wurden (Schubert und Krost, 2006). Aktuell wird an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) bei Frauen mit Kinderwunsch und einem erhöhten Risiko für eine Spaltmanifestation in der Nachkommenschaft zwei Monate vor der geplanten Schwangerschaft mit der 20-fachen empfohlenen täglichen Dosis (DGE, 2015) von Vitamin B-Komplex substituiert.

### 1.7.3 Experimentelle Untersuchungen

Seit der Arbeit von Baxter und Fraser (1950) ist es möglich, teratologische Fragestellungen am Mausmodell zu erforschen (Baxter und Fraser, 1950; Schubert, 2001). Zusammen mit der Übertragung auch auf andere Spezies konnten Fragen zur Pathologie dieser Fehlbildung beantwortet werden. Mit der Etablierung der exogen zugeführten Noxe Dexamethason in der kritischen Phase der Organentwicklung war es möglich, teratogene Spalten am Mausmodell zu induzieren und Untersuchungen zur Fehlbildungsprävention durch „Schutzstoffe“ durchzuführen (Schubert, 2001).

1984 wurde erstmals die Möglichkeit beschrieben, Mausembryonen in einem chemisch definierten, serumfreien Medium als Organkultur zu kultivieren. Damit stand erstmals ein

Modell zur Untersuchung und experimentellen Beeinflussung der physiologischen Gaumenentwicklung ohne mütterlichen Einfluss zur Verfügung (Ferguson et al., 1984). Schubert et al. (2002) untersuchten die Auswirkungen von Nahrungs- und Vitaminmangel auf die Gaumenentwicklung im Mausmodell. Das teratogene Potential des Vitaminmangels (einzelne B-Vitamine und Vitamin B-Komplex) wurde während der gesamten Gestationszeit (1.-18. Tag) und der Nahrungsmangel während des kritischen Zeitpunktes der Palatogenese (12. und 13. Tag) an zwei genetisch unterschiedlichen Mausstämmen NMRI (Auszuchtstamm) und an dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm A/WySn (Inzuchtstamm) untersucht.

Im Gegensatz zum resistenteren A/WySn-Stamm zeigt der NMRI-Stamm eine höhere Spaltrate bei Vitaminmangel, wohingegen die Nahrungsrestriktion bei keinem der beiden Mausstämme einen Anstieg der Spaltbildung zeigt. Die Vitamin B-Gabe an schwangere A/WySn-Mäuse beeinflusste die Spaltrate in der Nachkommenschaft nicht (Schubert et al., 2002). Die durch Dexamethason induzierte hohe Spaltrate der AB-Maus konnte allerdings durch die Verabreichung von Vitamin B-Komplex reduziert werden (Schubert et al., 1990).

Scheller et al. (2011) untersuchten die physiologische Entwicklung des sekundären Gaumens an einem Gaumenorganmodell *in vitro* an zwei verschiedenen Mausstämmen (NMRI und A/WySn). Hier war bei der NMRI-Maus die Gaumenentwicklung schon bei Isolation und Präparation weiter fortgeschritten als bei der A/WySn-Maus. 62% der Gaumenkulturen der A/WySn-Maus zeigten *in vitro* keine signifikante Entwicklung, während die genetisch nicht beeinflussten NMRI-Präparate sich auch in den Organkulturen weiterentwickelten. Das geringere Wachstumspotential der A/WySn-Maus wurde durch die schlechteren Ausgangsbedingungen, wie die geringere Körpergröße und die verlangsamte Gesichts- und Gaumenentwicklung im Vergleich zur NMRI-Maus, erklärt (Scheller et al., 2011). Dass es durchaus eine positive Beeinflussbarkeit des Gaumenwachstums der A/WySn-Maus durch Vitamin B-Komplexgabe gibt, bestätigen weitere Untersuchungen am Gaumenmodell (Scheller et al., 2013a). Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten Organkulturen unter Vitamin B-Komplexsubstitutionen ein signifikantes Gaumenwachstum. Um den natürlichen Einfluss von B-Vitaminen auf die Gaumenspaltrate *in vivo* zu untersuchen, wurden die Konzentrationen verschiedener B-Vitamine im Serum und Fruchtwasser in Bezug auf die Gaumenspaltfrequenz der A/WySn-Maus analysiert. Speziell für Thiamin zeigte sich eine höhere Konzentration im Serum als im Fruchtwasser. Bei den Müttern mit Nachkommen mit einer Spaltmanifestation ergaben sich signifikant geringere Serum- und Fruchtwasserkonzentrationen von Thiamin, verglichen mit Müttern der Nachkommen, bei denen eine Spaltbildung ausblieb. Histologische Schnitte in koronarer Richtung von Gaumenplatten der Feten mit LKGS präsentierten eine hohe Thiamin-1-Rezeptor Expression (Scheller et al., 2013b).

## 2 Zielstellung

Die AB/Jena-Maus, bei der durch Dexamethason- und Cyclophosphamidgabe während der embryonalen Entwicklung u.a. orofaziale Spaltbildungen induziert werden konnten, zeigten eine signifikante Senkung der Spaltrate durch Thiamin- und Vitamin B-Komplexsubstitution (Schubert, 1986).

So wie 1980 von Schubert vorgeschlagen, eröffnet sich mit dem Zugang zu einem genetisch determinierten Stamm die Möglichkeit, durch die Teratogenresistenz des Stammes hervorgerufen (Schubert, 1982), von außen möglichst unbeeinflusste stabile und höhere Spaltraten zu erhalten. Somit ergab sich die einzigartige Möglichkeit die Beeinflussung durch exogene Faktoren, die dazu beitragen, das Risiko von LKGS zu erhöhen, genau zu untersuchen. Nach den vorliegenden positiven experimentellen Ergebnissen am Gaumenmodell des genetisch determinierten Mausstamms *A/WySn in vitro* (Scheller et al., 2011, 2013a) und der Konzentrationsanalyse von verschiedenen B-Vitaminen im Serum und Fruchtwasser (Scheller et al., 2013b), soll es nun Ziel der Arbeit sein, die Beeinflussung des protektiven Faktors Thiamin (Vitamin B1) *in vivo* zu untersuchen. Hierbei soll ein besonderes Augenmerk auf die Spalthäufigkeit, die Geschlechterverteilung und die Spaltform an diesem Mausstamm untersucht werden. Die Konzentration von Thiamin im Serum und im Fruchtwasser von *A/WySn*-Muttermäusen mit und ohne Substitution wird hinsichtlich eines möglichen Effekts der oralen Substitution untersucht. Die analysierten Thiamin-Konzentrationen der unterschiedlichen Versuchsgruppen sollen dann mit der Spaltmanifestation in der Nachkommenschaft, der Geschlechterverteilung unter den Nachkommen und dem Applikationszeitpunkt in Korrelation gebracht werden.

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Versuchstiere

#### 3.1.1 A/WySn-Maus

A/WySn (A Woolley Snell) ist eine Untergruppe der A/J-Maus, die 1921 von Leonell Strong durch die Kreuzung der Cold Spring Harbor Albino- und der Bagg Albino-Maus gezüchtet wurde (279 Generationen am 13.12.13). Die Mäuse werden durch konsequente Inzuchtpaarung bei minimaler genetischer Variation bis heute weiter vermehrt (<http://jaxmice.jax.org>). Der Stamm wurde seit 1995 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg etabliert (Syska, 2000). Nach dem Import aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) und Haltung im Tierstall des Instituts für Humangenetik und medizinische Biologie der Universität in Halle, konnte eine relativ hohe konstante Häufigkeit spontaner LKS und LKGS von 20-44% nachgewiesen werden (Juriloff et al., 1982; Schubert et al., 2002).

Die genetische Ursache für das Auftreten von LKGS bei diesem Mäusestamm ist jedoch sehr komplex. Juriloff et al. identifizierte zwei auf sich gegenseitig einwirkende Loci, die dafür verantwortlich sein könnten: Der rezessive Locus *clf 1* verursacht eine Mutation von Gen *Wnt9b* auf Chromosom 11 (homolog zum Chromosom 17q21 des Menschen) und der semidominante Locus *clf 2* ein Polymorphismus auf Chromosom 13 (Juriloff und Fraser, 1980; Juriloff et al., 2004; Juriloff und Harris, 2008).

Dieses Mausmodell entwickelt die Spaltbildung mit einem variablen Expressionsmuster und unvollständiger Penetranz bei einem homogenen genetischen Hintergrund. Die Basis für diese Variation in der Expression ist unbekannt, aber hoch signifikant für das Verstehen solcher Expressionsmuster beim Menschen (Parsons et al., 2008). Die phänotypische Heterogenität der LKGS in diesem Stamm, mit Häufung der beidseitigen Form, sei eine Folge von mangelnder Koordination der kranialen Wachstumsprozesse (Hallgrímsson et al., 2004).

Die Tierversuche wurden beim zuständigen Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat 203 Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten, als anzeigepflichtige (K9M2) und genehmigungspflichtige (K9G5, K9G6) Tierversuche vor Versuchsbeginn nach § 8 Abs. 1 TierSchG angezeigt. Die Genehmigung des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt lag für die durchgeführten Untersuchungen vor.

Der Durchführende hatte die Sachkunde „Tierschutz/Versuchstierkunde“ 2012 und die Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an lebenden Wirbeltieren vom Landesverwaltungsamt, Referat Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten Sachsen-Anhalt.

### 3.1.2. Haltung

Aufzucht und Haltung der Labortiere erfolgten unter den Bedingungen der standardisierten Koloniezucht im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (Tierlabor im Universitätsklinikum Kröllwitz, FG5, U03, Halle/Saale) unter Leitung von Herrn PD Dr. B. Hiebl, wo der Stamm seit Anfang 2009 wieder neu aufgebaut wurde. Die Raumtemperatur betrug konstant 22°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 65%. Beleuchtet wurde mit zwei Leuchtstoffröhren mit einer Leistung von je 50 Watt und 70 Lux Leuchtstärke. Der Beleuchtungsrythmus wechselte im 12h Tag-Nacht-Rhythmus.

Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfige der Marke Ehret mit den Maßen 207 x 140 x 265 mm (B x H x T) von bis zu fünf Tieren unter strikter Geschlechtertrennung gehalten. Die Käfige waren in einem fahrbaren Gestell zu je 35 Stück aufgestellt. Nahrung in Form von Altromin®-Pellets (Altromin-Spezialfutter GmbH & CoKG, Lage, Deutschland) als Standardkost für Mäuse und Frischwasser waren für die Tiere im Fütterungsschlitze des Käfigdachs (Edelstahldeckel mit Fallbügelverschluss) *ad libitum* vorhanden.

### 3.1.3. Verpaarung

Die Inzucht wurde durch strenge Bruder-Schwester-Verpaarung realisiert. Die Verpaarung der Tiere fand konsequent zwischen 8:00 und 9:30 Uhr MEZ statt, um jeweils einen möglichst ähnlichen Schwangerschaftszeitpunkt und damit eine Vergleichspräzision zu gewährleisten (Schmidt, 1985). 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 bis zur Vitaminsubstitution und Untersuchung zu viert in Standard-Käfigen untergebracht. Ein vorhandener Vaginalpfropf bei der morgendlichen Kontrolle wurde als Nachweis der Trächtigkeit gewertet.

## 3.2 Vitaminsubstitution

Die Mäuse wurden nach statistischer Fallanalyse zu je 18 Stück in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt ( $\alpha=0.05$ , Power 85%).

Den Gruppen A-D wurde Thiamin (Vitamin B1) der Marke Winthrop® (Berlin, Deutschland) zu unterschiedlichen Zeiten der Gaumenentwicklung mittels Omnifix® – F Insulin-Spritze 1 ml (B. Braun Medical AG, Sempach, Schweiz) *per os* verabreicht. Zu den „prophylaktischen“ Gaben zählten die Gruppen A und B. Der Gruppe A wurde das Vitamin zu Beginn der Schwangerschaft am ersten Tag nach der Verpaarung (1d), der Gruppe B zu Beginn der Gaumenfusion am 15. Tag (15d) appliziert. Zu den „therapeutischen“ Gaben zählten die

Gruppen C und D, wobei das Vitamin der Gruppe C am 15. Tag und 6 Stunden (15d6h) zum Ende der physiologischen Gaumenfusion und der Gruppe D nach weiteren 6 Stunden (15d12h) nach Abschluss der Gaumenentwicklung verabreicht wurde (Tab. 3). Grundlage für die Einteilung in Sechsstundenabschnitte bildeten Untersuchungen zur Gaumenfusion (Syska et al., 2004).

Tab. 3: Zuordnung der Substitutionszeiten zu den Gruppen A-D

Zeitpunkt der Fütterung p.c.	1.d	15.d	15.d+6h	15.d+12h
Gruppe	A	B	C	D

Die Dosis des p.o. eingesetzten Thiamins (100mg/2ml) beträgt 80 mg/kg KG (Schubert et al., 2002). Bei einem Gewicht einer schwangeren Maus von 25-30 g beträgt die zu applizierende Masse von Thiamin 2 mg. In unseren Untersuchungen verabreichten wir das Volumen von 0,1 ml (5 mg). Thiamin ist ein wasserlösliches Vitamin, kumuliert nicht und der Überschuss wird renal ausgeschieden. Der Kontrollgruppe wurde kein Thiamin verabreicht.

### 3.3 Untersuchungen der Feten

Nach dem 18. Tag p.c. erfolgte die Tötung der Muttertiere durch zervikale Dislokation (Genickbruch), gemäß den Richtlinien über das fachgerechte und tierschutzkonforme Töten von Versuchstieren (Bundesamt für Veterinärwesen, Bern, Schweiz, Richtlinie Tierschutz 3.01, 1993). Nach Gewichtsdocumentation des Muttertieres wurde die mit 100%iger Ethanollösung desinfizierte Bauchdecke mittels eines Einmalskalpells eröffnet und der Uterusschlauch dargestellt.

#### 1.3.1 Entnahme von Vollblut und Fruchtwasser

Es erfolgte die Vollblutentnahme durch Punktion der Aorta abdominalis sowie die Fruchtwasserentnahme durch Punktion des Uterusschlauches mittels 2 ml Spritze (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien, Abb. 7) und einer 27G<sup>3/4</sup> - Nr. 20 Einmalinjektionskanüle Microlance<sup>TM3</sup> (Braun, Melsungen, Deutschland) zur Vitaminbestimmung. Fruchtwasser und Vollblut wurden bis zur Analyse bei -20°C in Microvetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gelagert. Die Vitaminbestimmung erfolgte im Medizinisches Labor Bremen unter Prof. Dr. med. W.N. Kühn-Velten (Quantifizierung als Gesamt-Thiamin nach Hydrolyse mit Phosphatase, isokratische HPLC-Trennung, Nachsäulenderivatisierung mit Kaliumhexacyanoferrat, Fluoreszenzdetektion).



Abb. 7: Entnahme von Fruchtwasser aus dem Uterus bicornatus einer schwangeren Maus

### 1.3.2 Geschlechtsbestimmung der Feten

Lebende und resorbierte Feten wurden gezählt. Erstere wurden sukzessive innerhalb von 60 Minuten präpariert, gewogen, nummeriert und insgesamt pro Wurf mit der Kamera Canon PowerShot G5 fotografiert. Das Geschlecht wurde anhand des unterschiedlichen Abstandes Geschlecht-Anus bestimmt (Abb. 8).

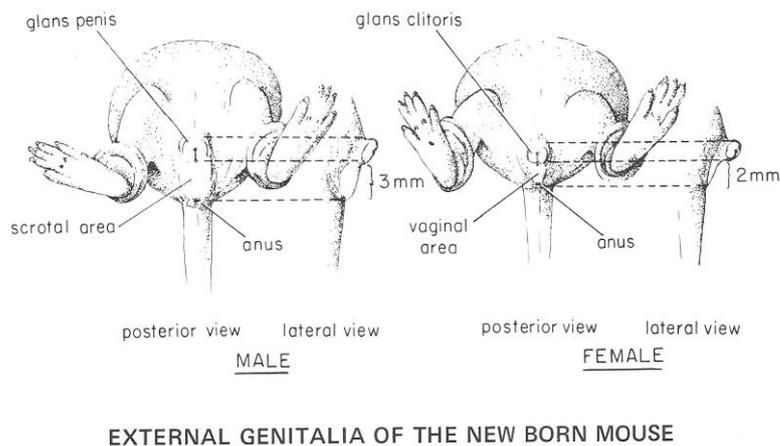


Abb. 8: Äußere Genitalien der neugeborenen Maus (aus Rugh, 1990)

### 3.4 Herstellung der Präparate

Die Feten wurden mit dem Einmalskalpell dekapitiert. Es erfolgte die Entfernung der Mandibel unter Mitnahme der Zunge, um die Sicht auf den Gaumen zu gewährleisten. Jeder Gaumen eines Fetus mit einer Spaltform wurde unter dem Stereomikroskop Stemi 2000 - C unter zusätzlicher zweiarmiger Kaltlichtquelle KL 1500 LCD (beide Marke ZEISS) mit zugehöriger Nummer fotografiert (Abb. 9). Unter dem Mikroskop erfolgte die Bestimmung der Spaltform. Die Gaumen wurden in Einbettkassetten in 4,5%iger Formaldehydlösung fixiert. Die Präparate durchliefen zur Dehydrierung die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 99,8%). Im Anschluss folgten die Durchtränkung der Präparate mit Xylol sowie die Einbettung in Paraffin. Nach dem Gießen und Aushärten der Blöcke wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms 2-5 µm dicke Gewebepräparate in koronarer Ebene in sechser Serien geschnitten und auf Objektträgern aufgezogen. Nach Trocknung erfolgten die Hydrierung in umgekehrter Reihenfolge zur beschriebenen Dehydrierung sowie die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. Dazu wurden die Objekte für 10 min in Hämatoxylin eingelegt, danach für 10 min in Leitungswasser gebläut. Nachdem die Präparate für 5 min im Eosinbad gefärbt und wieder dehydriert wurden, folgte das Eindecken. Die Einbettung sowie die Präparateherstellung erfolgten am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktorin: Frau Prof. Dr. Wickenhauser). Die Plazentas wurden zur späteren Untersuchung in 4,5%ige Formaldehydlösung konserviert, getrennt in Plazenta eines Fetus mit und ohne Spaltbildung.

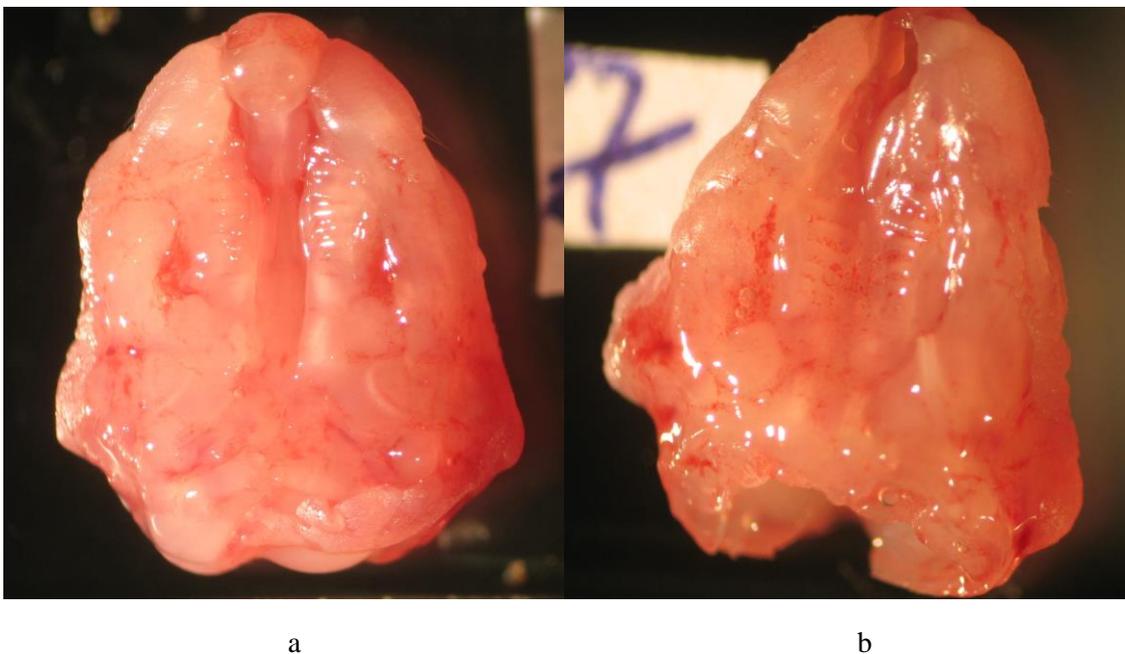


Abb. 9: Bilaterale LKGS des Fetus 296 des Muttertieres C14 (a) und unilaterale LKS rechts des Fetus 187 des Muttertieres Kontrolle Nr. 8

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die Anzahl der in dieser Arbeit benötigten Versuchstiere wurde durch eine Fallzahlenberechnung auf Signifikanzniveau von  $\alpha=5\%$  und einer Power von 85% ermittelt (nQueryAdvisor® 7.0 + nTerim 2.0, Statistical Solutions, Boston, USA).

Zur statistischen Auswertung dieser Ergebnisse wurde das Programm SPSS Statistics, Version 12 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) verwendet.

Der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ ) wurde angewandt, um zu prüfen, ob zwei Untersuchungsergebnisse voneinander unabhängig sind. Signifikant wurde das Ergebnis bezeichnet, wenn Chi-Quadrat bei 3,84 ( $p < 0,05$ ) und sehr signifikant, wenn Chi-Quadrat bei 6,63 ( $p < 0,01$ ) lag (Pearson, 1900).

Der t-Test wurde angewandt, um die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben zu vergleichen. Hier wurden die Ergebnisse als signifikant gewertet, wenn sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$  ( $p < 0,05$ ) bei der statistischen Analyse ergab.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der Nachkommen

Diese Arbeit stützt sich auf die Untersuchung von 435 Feten von 90 Muttermäusen des Mausstammes A/WySn. Die durchschnittliche Wurfgröße einer Maus lag bei 4,8 Nachkommen und die durchschnittliche Spaltrate bei 140 aufgetretenen Spalten betrug 32,2%. Bei 17 Würfen, verteilt auf alle fünf Gruppen, blieb die Spaltbildung aus (Tab. 4).

Resorbierte Feten (Autolyse) wurden in allen fünf Gruppen beobachtet (Tab. 5), wobei die absolute Anzahl der Resorptionen in der Kontrollgruppe verglichen mit denen der Substitutionsgruppen doppelt so hoch ist (Abb. 10). Wird die Resorptionsrate der Kontrollgruppe auf die einzelnen Substitutionsgruppen bezogen, sind die Unterschiede sehr signifikant.

Tab. 4: Übersicht dokumentarischer Werte der A/WySn Maus

Anzahl der Muttermäuse	Anzahl der Feten	Durchschnittliche Wurfgröße	Durchschnittliche Spaltrate
90	435	4,8	32,2%

Tab. 5: Absolute und relative Zahl der Resorptionen bezüglich der Gesamtzahl (n= Lebendgeburten + Resorptionen) von Feten einer Gruppe

Anzahl	Gruppe A (n=94)	Gruppe B (n=99)	Gruppe C (n=79)	Gruppe D (n=96)	Kontrolle (n=84)
Lebendgeburten	91	97	76	94	77
absolut	3	2	3	2	7
relativ (in %)	3,2	2,0	3,8	2,1	8,3
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

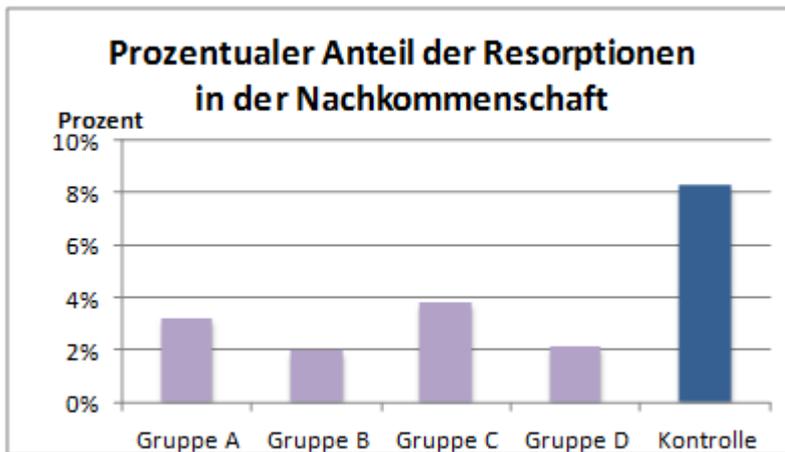


Abb. 10: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der intrauterinen Aborte

#### 4.2 Analyse der Thiaminkonzentration im Serum und im Fruchtwasser

Die gemessenen Thiaminkonzentrationen im Serum und im Fruchtwasser aller untersuchten Gruppen sind in Tabelle 8 numerisch dargestellt, aus denen die Kenngrößen zur Erstellung eines Boxplots gewonnen wurden (Tab. 6).

Im Serum war in den substituierten Gruppen A-D eine signifikant höhere Thiaminkonzentration zu messen als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ , Abb. 11a). Die Thiaminkonzentration im Fruchtwasser der substituierten Gruppen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Abb. 11b und Tab. 7).

Eine Analyse der Thiaminkonzentration im Serum und im Fruchtwasser bezogen auf die Schwere der Spaltform erbrachte in keiner Gruppe einen signifikanten Unterschied.

Tab. 6: Ermittelte Kenngrößen aus den Messwerten von Tab. 8 zur Erstellung eines Boxplots

	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C		Gruppe D		Kontrolle	
	Serum	FW	Serum	FW	Serum	FW	Serum	FW	Serum	FW
Median	283,5	126	198	107,5	235,5	107	259,5	151	164,5	140
oberes Quartil	319	206	252	133,3	306	176,8	291,3	198,8	207,5	205,3
Maximum	598	295	437	169	669	247	512	285	345	428
Minimum	152	30	120	45	129	40	101	76	108	11
unteres Quartil	229,3	89,75	176	77,5	177,3	88,5	235,5	123,5	139,5	84,75

Tab. 7: Vergleich der Signifikanz zwischen der Thiaminkonzentration im Serum und im Fruchtwasser der Gruppen A-D bezogen auf die jeweiligen Konzentrationen der Kontrollgruppe

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Serum	p= 0,0002	p= 0,039	p= 0,016	p= 0,002
Fruchtwasser	p= 0,23	p= 0,23	p= 0,12	p= 0,36

Tab. 8: Messwerte der Konzentrationen von Thiamin im Serum und Fruchtwasser aller untersuchten Muttermäuse in µg/l

Gruppe	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	MW	STAW
Serum	500	598	307	505	323	297	305	307	270	249	230	189	226	211	152	260	229	386	308,00	118,92
FW	122	254	173	145	264	194	108	87	130	225	295	100	30	74	47	65	210	98	145,61	79,09

Gruppe	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	MW	STAW
Serum	437	198	335	261	177	120	425	252	228	169	185	249	176	181	933	244	148	120	229,71	93,45
FW	112	162	123	45	53	102	131	134	82	169	154	66	76	101	74	111	104	142	107,83	36,85

Gruppe	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	MW	STAW
Serum	422	669	129	150	150	150	230	418	325	340	249	241	184	175	190	243	199	241	261,39	134,21
FW	142	88	40	75	75	90	226	180	206	247	226	109	74	167	94	100	105	143	132,61	62,25

Gruppe	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	MW	STAW
Serum	232	352	274	297	248	248	246	259	189	512	260	450	101	173	272	337	122	269	268,94	100,75
FW	157	195	147	184	138	219	87	112	76	123	129	155	227	125	243	200	79	285	160,06	59,10

Kontrolle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	MW	STAW
Serum	210	345	299	208	130	281	155	169	136	163	151	150	131	108	126	167	206	166	183,39	65,00
FW	76	99	217	170	140	68	11	408	60	394	160	140	259	126	103	428	150	80	171,61	124,13

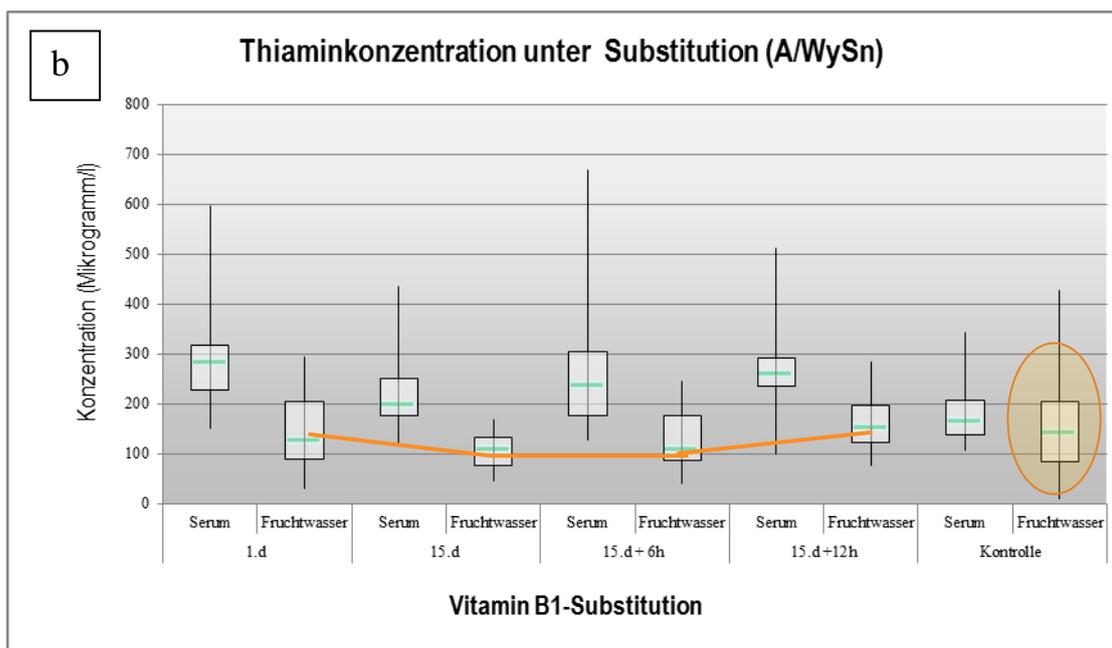
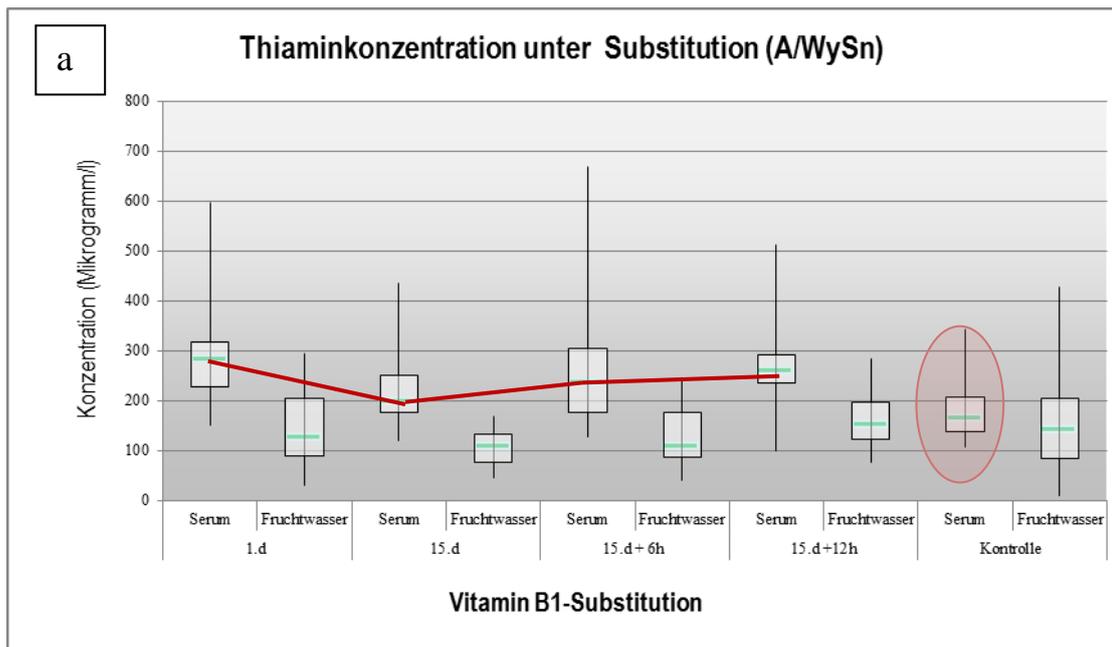


Abb. 11: Thiaminkonzentration der verschiedenen Untersuchungsgruppen im Serum und im Fruchtwasser unter Substitution (A-D) und Kontrolle. Der Medianwert ist zur besseren Veranschaulichung im Verlauf graphisch verbunden (Serum: rot, FW: orange).

## 4.2 Geschlechtsspezifische Analyse der Spaltfrequenz

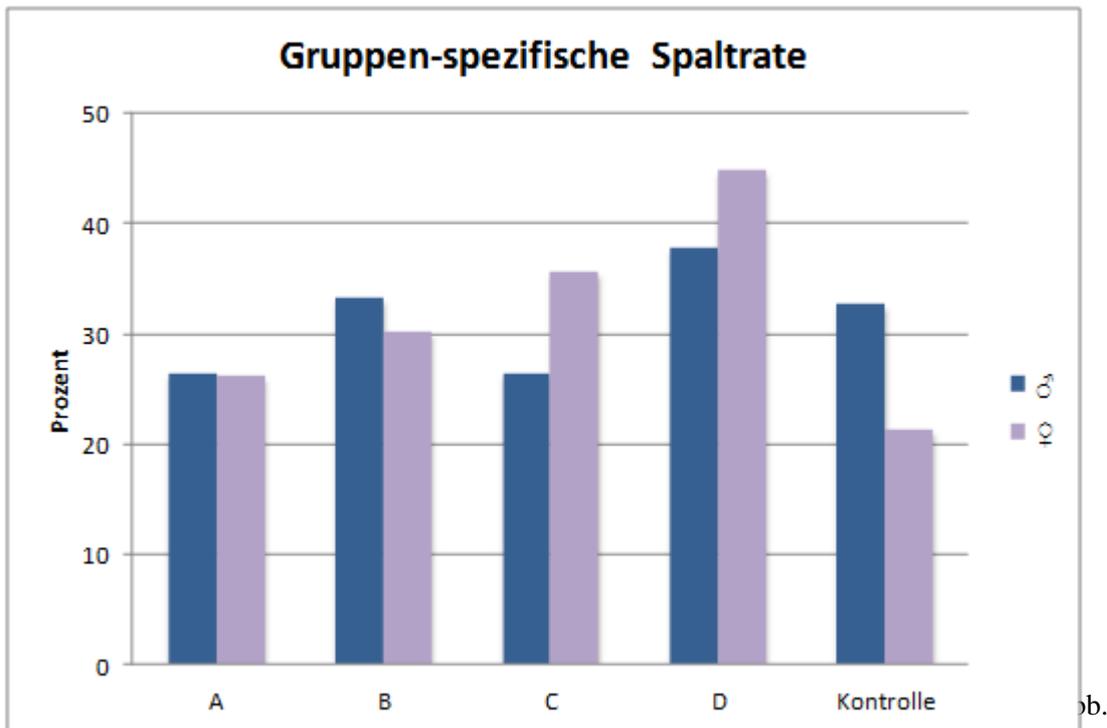
Insgesamt wurden in den Substitutionsgruppen A bis D 358 Feten geboren, von denen 118 eine Spaltbildung aufwiesen (Tab. 9). Bei 22 von 77 Feten kam es innerhalb der Kontrollgruppe, ohne Substitution, zur Ausbildung einer Spalte. Die Spaltrate betrug in den Substitutionsgruppen 33,3%, in der Kontrollgruppe 28,6%.

Das Geschlechtsverhältnis ( $\text{♂}:\text{♀}$ ) aller Feten der Substitutionsgruppen betrug 1:0,97 (182/176) gegenüber 1:0,6 (49/28) in der Kontrollgruppe. Das Überwiegen des männlichen Geschlechts in der Kontrollgruppe ohne Vitaminsubstitution war signifikant ( $p=0,041$ ;  $\chi^2=4,168$ ).

Hinsichtlich der geschlechtsspezifischen Verteilung der Spalten bei den Feten zeigten sich folgende Muster: In der Substitutionsgruppe fand sich eine Geschlechterverteilung von 1:1,07 (57/61) und in der Kontrollgruppe von 1:0,38 (16/6). Es gab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Geschlechtsverteilung der Spalten in den Substitutionsgruppen. Dort waren 31,3% der männlichen Nachkommen und 34,7% der weiblichen Nachkommen spaltbehaftet ( $p=0,47$ ;  $\chi^2=0,515$ ). Innerhalb der Kontrollgruppe lagen die Spaltraten bei 32,7% ( $\text{♂}$ ) und 21,4% ( $\text{♀}$ ) und unterschieden sich somit, bezogen auf die Verteilung von männlichen zur weiblichen Nachkommen, nicht signifikant ( $p=0,29$ ;  $\chi^2=1,100$ ). Insgesamt zeigen sich ähnlich hohe Spaltraten sowohl unter den Gruppen als auch weitgehend zwischen beiden Geschlechtern (Abb. 12).

Tab. 9: Geschlechtsspezifische Analyse hinsichtlich der Spaltfrequenz unter Thiamin-substitution im Vergleich mit der Kontrollgruppe in Prozent (%)

Gruppe	Anzahl der Nachkommen			Anzahl der Spaltbetroffenen			$\text{♂}:\text{♀}$	Spaltrate (%)		
	$\text{♂}$	$\text{♀}$	insgesamt	$\text{♂}$	$\text{♀}$	insgesamt		$\text{♂}$	$\text{♀}$	insgesamt
A	49	42	91	13	11	24	1,2	26,5	26,2	26,4
B	54	43	97	18	13	31	1,3	33,3	30,2	32,0
C	34	42	76	9	15	24	0,8	26,5	35,7	31,6
D	45	49	94	17	22	39	0,9	37,8	44,9	41,5
Summe	182	176	358	57	61	118	1,0	31,3	34,7	33,3
Kontrolle	49	28	77	16	6	22	1,8	32,7	21,4	28,6



12: Darstellung der Gruppen-spezifischen Spaltrate

#### 4.4 Geschlechtsspezifische Analyse der Spaltformen

Die geschlechtsspezifische Analyse nach der Spaltform ergab ein geschlechtsunabhängiges Überwiegen der doppelseitigen LKGS sowohl in der Substitutions- als auch in der Kontrollgruppe. Hierauf folgten linksseitige LKGS und doppelseitige LKS. Einseitige LKS traten nur vereinzelt auf (Tab. 10a und b, Abb. 13). Sowohl isolierte Lippen- als auch isolierte Gaumenspalten wurden in keinem Wurf beobachtet.

Tab. 10: Geschlechtsspezifische Analyse der Spaltform unter Thiaminsubstitution im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Angabe absoluter (a) und relativer Häufigkeiten (b)

<b>a</b> Absolute Häufigkeit				Spaltform									
				schwere Form – LKG					leichtere Form - LK				
Gruppe	bds.		gesamt	links		rechts		bds.		Links		rechts	
	♂	♀		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
A	13	11	24	9	8	3	2	1	1				
B	18	13	31	15	10	1	2	1	1			1	
C	9	15	24	5	13			1	1	2	1	1	
D	17	22	39	13	16	1	1	2	3	2	1		
Summe	57	61	118	42	47	5	5	1	5	7	2	2	
Kontrolle	16	6	22	10	5	1	1		2	2		1	

<b>b</b> Relative Häufigkeit (in %)				Spaltform									
				schwere Form - LKG					Leichtere Form – LK				
Gruppe	bds.		gesamt	links		rechts		bds.		links		rechts	
	♂	♀		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀		
A	26,5	26,2	26,4	18,4	19,0	6,1	4,8	2,4	2,0				
B	33,3	30,2	32,0	27,8	23,3	1,9	4,7	2,3	1,9			1,9	
C	26,5	35,7	31,6	14,7	31,0			3,0	2,4	5,9	2,4	3,0	
D	37,8	44,9	41,5	28,9	32,7	2,2	2,0	4,1	6,7	4,1	2,0		
Summe	31,3	34,7	33,3	23,1	26,7	2,8	2,8	0,6	2,8	3,8	1,1	1,1	
Kontrolle	32,7	21,4	28,6	20,4	17,9	2,0	3,6		4,1	4,1		2,0	

Nach Ermittlung der Spaltrate der einzelnen Spaltformen zeigte sich bei beiden Geschlechtern ein deutliches Überwiegen der schwereren Spaltform (Abb. 13, Tab. 11, Abb. 14a und b).

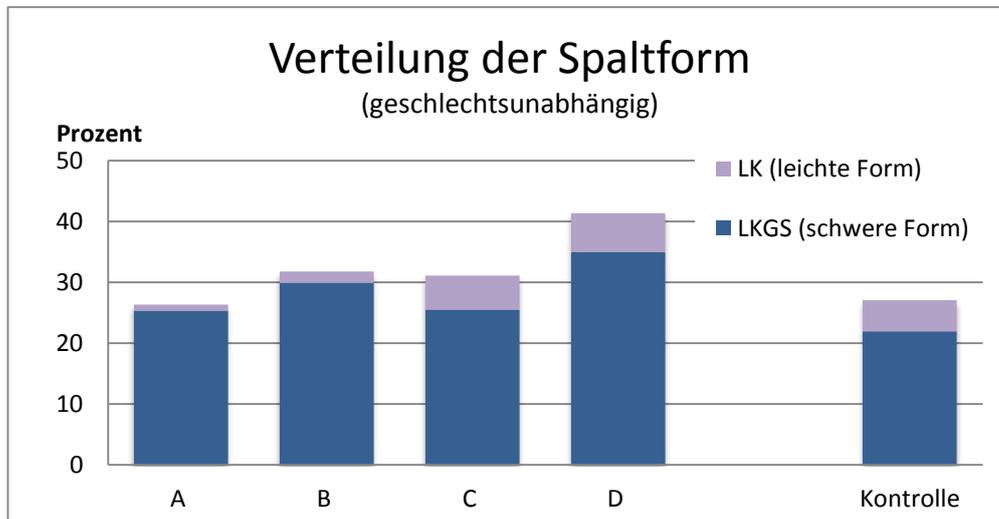


Abb. 13: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Spaltformen (geschlechtsunabhängig)

Tab. 11: Prozentuale Spaltrate der Spaltformen LKGS (schwere Form) und LKS (leichte Form) bei männlichen und weiblichen Nachkommen

Gruppe	♂		♀	
	LKGS	LKS	LKGS	LKS
A	24,5	2	26,2	0
B	29,6	3,7	30,2	0
C	17,7	8,8	33,3	2,4
D	31,1	6,7	38,8	6,1
Summe	26,4	4,9	32,4	2,3
Kontrolle	22,5	10,2	21,4	0

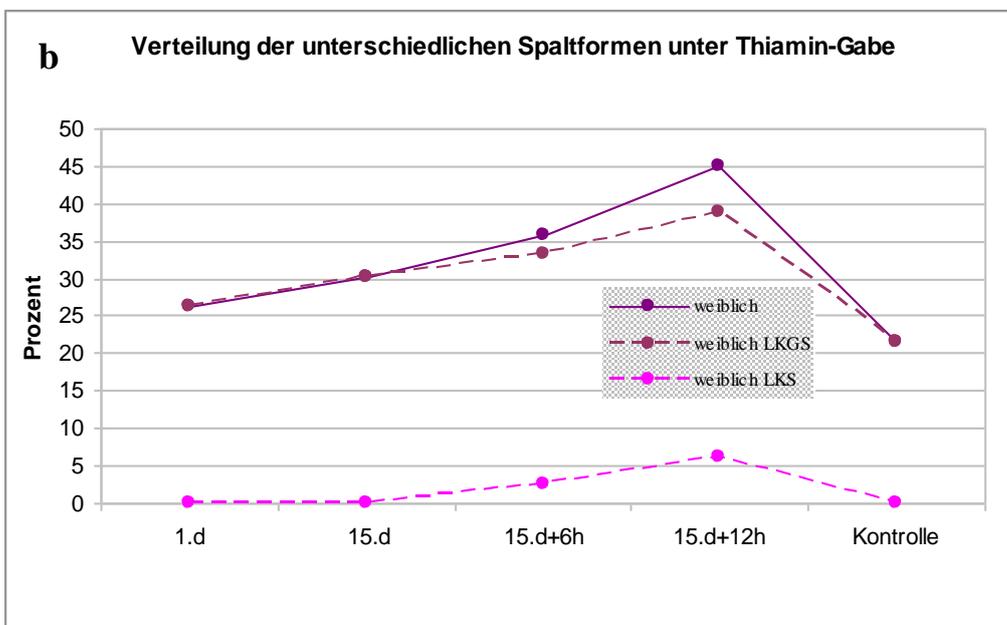
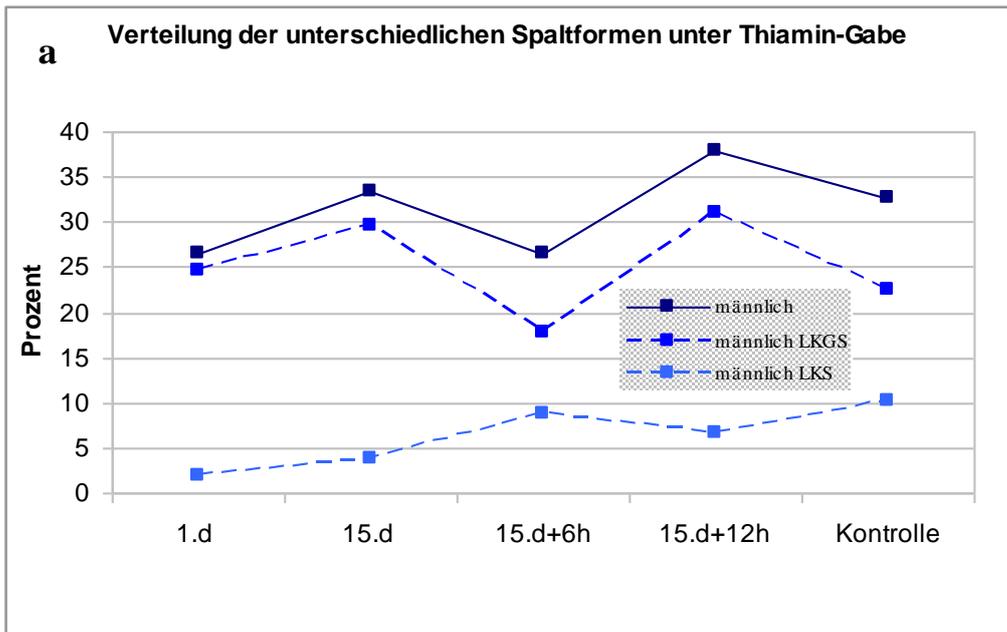


Abb. 14: Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Spaltformen der A/WySn-Maus unter Thiamingabe bei männlichen (a) und weiblichen (b) Nachkommen. Die jeweils obere Linie stellt die Gesamtpaltrate dar, die darunter liegenden die unterschiedlichen Schweregrade der Spaltbildung (LKGS - schwere Form, LKS - leichtere Form).

## 5 Diskussion

Nicht-syndromale LKGS gehören zu den häufigsten Fehlbildungen des Menschen und entstehen durch das fehlende Verschmelzen zweier Epithelmauern der Gesichtswülste während der frühen Embryonalentwicklung (Dixon et al., 2011). Vor allem durch eine verbesserte Diagnostik und eine verringerte Säuglingssterblichkeit (Weingärtner et al., 2007), möglicherweise auch durch die Zunahme teratogener Noxen, lässt sich ein Anstieg der Spalthäufigkeit im letzten Jahrhundert beobachten (Neumann, 1996). Die genauen Ursachen für die Entstehung können abschließend allerdings noch nicht genau geklärt werden (Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011). Der Ausprägung einer LKGS liegt somit am ehesten ein multifaktorielles Geschehen zugrunde, in dem variable exogene Umweltfaktoren und konstante endogene, genetische Faktoren auf den heranwachsenden Organismus einwirken. Zur Aufklärung des Entstehungsmechanismus von LKGS existieren seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts viele experimentelle (Baxter und Fraser, 1950; Schubert, 1980; Ferguson et al., 1984; Schubert et al., 2002; Syska et al., 2004; Scheller et al., 2011, 2013a,b) und klinische Arbeiten (Kreybig, 1976; Tolarová, 1982, 1987; Schubert et al., 1990; Schubert und Krost, 2006). Das etablierte multifaktorielle Schwellenwertmodell, welches primär von Carter (1969) und Fraser (1976) beschrieben und von Schubert modifiziert wurde, veranschaulicht dabei die komplexe Ätiologie dieser Fehlbildung (Schubert und Krost, 2006).

Bisher konnte kein ursächliches Gen, das zur Manifestation von nicht-syndromalen orofazialen Spalten führt, gefunden werden (Mehrotra, 2015).

Vor allem das Mausmodell wurde in oben genannten experimentellen Arbeiten zur Klärung des Pathomechanismus sowie für Forschungen zur Ätiologie und Prävention von LKGS genutzt. Durch morphologische und ätiopathogenetische Ähnlichkeiten der Spaltbildung von Maus und Mensch ist das Mausmodell zur Klärung dieser Fragestellung gut geeignet (Syska, 2000; Schubert, 2001; Kap.1.6). Die bei der Maus sporadisch auftretenden Anomalien sind dem Menschen hinsichtlich Morphologie und Entwicklung ähnlich und weisen ebenfalls ein multifaktorielles Geschehen auf (Kalter, 1979). Der in dieser Arbeit verwendete Inzuchtmausstamm A/WySn hat in der Nachkommenschaft eine hohe spontane Spaltrate von 20-44% (Juriloff et al., 1982; Schubert et al., 2002).

Juriloff et al. (2004) identifizierte in diesem Mausstamm zwei auf sich gegenseitig einwirkende Loci: Der rezessive Locus *clf 1* verursacht eine Mutation von Gen *Wnt9b* auf Chromosom 11 (homolog zum Chromosom 17q21 des Menschen) und der semidominante Locus *clf 2* einen Polymorphismus auf Chromosom 13. Ein scheinbar maternaler genetischer Effekt überlagert die Effekte von *clf 1* und *2* in den Embryonen und ändert so die Penetranz der LKGS. Ursache für eine Mutation im Gen *Wnt9b* sei eine verminderte Methylierung des IAP Transposons (Juriloff

und Fraser, 1980; Juriloff et al., 2004; Juriloff und Harris, 2008). Durch exogene Substanzen, wie die Folsäurezufuhr der Mutter, läuft der Methylierungsschritt dennoch ab, sodass diese Mutation durch ein Exogen kompensiert werden kann (Juriloff und Harris, 2008) und somit Folsäure das Auftreten von LKGS in der A/WySn Maus reduziert (Paros und Beck, 1999).

Es ist nicht bekannt, warum einige Nachkommen Spalten entwickeln und bei anderen die Spaltmanifestation ausbleibt (Hallgrímsson et al., 2004). Die verlangsamte embryonale Entwicklung könnte einer der Gründe für das vermehrte Auftreten von LKGS sein. Untersuchungen von Schubert und Raupach (1991) zeigen in weiteren Mausstämmen, dass bei teratogen induzierter Spaltbildung eine zeitliche Vorverlegung des Gaumenverschlusses durch B-Vitamingabe um 6 Stunden erfolgen kann. Diese Vorverlegung und Beschleunigung der Embryonalentwicklung führt zu einer geringeren Spaltbildungsrate. Mausstämmen, bei denen die Palatogenese somit früher in der Embryonalentwicklung abgeschlossen ist, erweisen sich als weniger sensibel gegenüber den nun kürzer einwirkenden potentiell teratogenen Noxen im Vergleich zu Mausstämmen mit spätem Gaumenverschluss, wie bei dem A/WySn-Mausstamm (Schubert und Raupach, 1991; Schubert, 2001). Die durch Wachstumsverzögerung resultierende Reduktion der Körpergröße, der Somitenzahl, des Geburtsgewichts der Mäusenachkommen und die Möglichkeit der Noxeneinwirkung über einen längeren Zeitraum sind somit möglicherweise Ursachen für die vermehrte Spaltentstehung. Eine „therapeutische“ Option wäre die medikamentöse Beschleunigung der verlangsamten Entwicklung *in utero*.

Grundlage hierfür sind tierexperimentelle Arbeiten, die den genauen Fusionszeitpunkt der Gaumenfortsätze ermitteln konnten. So wurde bei der A/WySn-Maus ein Fusionsbeginn der Gaumenfortsätze am 15. Tag und ein kompletter Gaumenverschluss nach weiteren 6 Stunden bestimmt (Syska et al., 2004). Die positive Wirkung von Thiamin (Vitamin B1) auf das Gaumenwachstum in der Embryogenese (Schubert, 1980; Scheller et al., 2013a,b) sollte nun *in vivo* am genetisch determinierten Mausstamm A/WySn untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte die Frequenz der Gaumenspaltbildung der A/WySn-Maus durch die Thiaminsubstitution nicht gesenkt werden (Spaltfrequenz in den Substitutionsgruppen: 33,3%; Spaltfrequenz in der Kontrollgruppe: 28,6%). Auch die Spaltfrequenz der einzelnen Substitutionsgruppen lag ähnlich oder höher als die der Kontrollgruppe. Die häufigste Spaltmanifestation unter den Nachkommen in den Substitutionsgruppen war die bilaterale LKGS (24,9%) gefolgt von der linksseitigen LKGS (2,8%), der bilateralen LKS (2,5%) und der rechtsseitigen LKGS (1,7%). Eine ähnliche Rangfolge der Spaltformen fand sich in der Kontrollgruppe. Insgesamt war das Geschlechterverhältnis bezogen auf eine Spaltmanifestation annähernd ausgeglichen (♂ mit 31,3% im Vergleich zu ♀ mit 34,7%), sodass die Häufung des männlichen Geschlechts bei der LKGS, wie aus der Literatur bekannt (Tolarová, 1987; Dixon et al., 2011), in diesem Tierexperiment nicht nachgewiesen werden konnte (Scheller et al., 2016).

Ein beobachtetes Überwiegen der Spaltrate bei männlichen Nachkommen in der Kontrollgruppe (♂ mit 32,7% im Vergleich zu ♀ mit 21,4%) ist durch die geringe Anzahl der Nachkommen in dieser Gruppe (n=77) zu relativieren.

Die Häufung der linken LKGS im Vergleich zur rechtsseitigen (11:6) wie aus der Literatur bekannt (Tolarová, 1987), konnte nicht eindeutig bestätigt werden. In keinem Wurf wurde eine isolierte Lippen- oder eine isolierte Gaumenspalte beobachtet.

In allen Gruppen fanden sich hinsichtlich der Lippen-, Kiefer- und Gaumenspaltrate ähnliche Prozentsätze, sodass weder eine Reduktion, noch eine Abschwächung der Spaltbildung bei den Nachkommen beider Geschlechter zu verzeichnen war. Übereinstimmende Ergebnisse sind insofern beschrieben worden, als dass die genetisch determinierte nicht-syndromale Spaltbildung dieses Stammes als so stabil zu betrachten ist, dass, auch durch unterschiedliche Art und Weise der Applikation, substituierte B-Vitamine die Spaltrate nicht reduzieren konnten und es somit relativ schwierig zu sein scheint, die embryonale Entwicklung des Stammes zu beeinflussen. Die Applikationsarten erfolgten dabei i.p., per Magensonde und durch Aufnahme von Trinkwasser (Schubert et al., 2002), wobei die ersten beiden Methoden hinsichtlich der standardisierten Aufnahme von Vitaminen der letzteren überlegen sind. Dass das Gaumenwachstum direkt durch Vitamin B-Komplexsubstitution positiv beeinflusst werden kann, wenn auch einschränkend eine komplette Fusion der Gaumenfortsätze ausblieb, wurde eindeutig am Organkulturmodell des sekundären Gaumens der A/WySn Maus gezeigt (Scheller et al., 2013a). Zwei Dinge sind in diesem Zusammenhang hinsichtlich der positiven Wirkung im Organkulturmodell und der ausbleibenden Wirkung im Tiermodell in dieser Untersuchung zu berücksichtigen. Zum einen wurden zur Substitution in der *in vitro* Untersuchung Vitamin B-Komplexe verwendet. Eine vierfach stärkere Schutzwirkung ist für Vitamin B-Komplex bei dem AB-Stamm, dessen Gaumenspaltrate durch Dexamethason induziert wurde, nachgewiesen worden (Schubert, 1986), sodass die Einzelapplikation von Thiamin allein nicht effizient genug sein könnte. Im Gegensatz dazu stehen allerdings Ergebnisse aus früheren Arbeiten, die eine eindeutige Wirkung von Thiamin bei teratogen induzierten Spaltmäusen nachweisen konnten (Schubert, 1980). Zum anderen werden maternale Einflüsse bei dem Gaumenorganmodell umgangen, die in dieser *in vivo* Untersuchung jedoch wieder eine wesentliche Rolle spielen. Es ist zu postulieren, dass der maternale Einfluss auf die kraniofaziale Entwicklung eine entscheidende Bedeutung bezüglich der Spaltgenese hat. So soll beim Menschen erst nach Sättigung der Vitaminrezeptoren in der vitaminspeichernden Plazenta ein adäquater Vitamintransfer zum Fetus erfolgen (Baker et al., 1981), sodass ein Unterschied in der Anflutung und Konzentration der Vitamine zwischen den *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen diskutiert werden kann.

In vorhergehenden Untersuchungen wurden annähernd gleich hohe Serum- und Fruchtwasserkonzentrationen von Thiamin bei Muttermäusen ohne Spaltmanifestation in ihrer Nachkommenschaft gemessen, wohingegen bei den Müttern mit Spaltbildungen unter den Nachkommen eine signifikant niedrigere Thiaminkonzentration in beiden Körperflüssigkeiten nachgewiesen wurde (Scheller et al., 2013b). Die Korrelation von einer Spaltmanifestation und niedriger Thiaminkonzentration im Fruchtwasser lässt vermuten, dass das im Fruchtwasser befindliche Thiamin direkt auf wachsende Strukturen des sich entwickelnden primären und sekundären Gaumens wirkt und das embryonale Wachstum positiv beeinflussen kann. Diese Untersuchungen führten zur Überlegung, die Thiaminkonzentration im Blutserum und Fruchtwasser durch orale Substitution zu erhöhen. So konnte in unseren Substitutionsversuchen mit hochdosiertem Thiamin ein signifikanter Anstieg der Thiaminkonzentration im Blutserum in allen vier Substitutionsgruppen ( $p < 0,05$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe hervorgerufen werden. Die effektive Thiaminkonzentration im Fruchtwasser konnte allerdings nicht angehoben werden. Lediglich drei Thiaminkonzentrationen im Fruchtwasser der Kontrollgruppe sind mit ungefähr 400  $\mu\text{g/l}$  ungewöhnlich hoch, sodass es sich am wahrscheinlichsten um einen Entnahmefehler oder einen Messfehler handelt.

Die Maßnahmen bei der Fruchtwasserentnahme sind insofern von Bedeutung, als dass ein versehentliches Punktieren des Fetus mittels Kanüle zu einer Blutkontamination des Fruchtwassers führen kann. War das der Fall, wurde die Fruchtwasserpunktion abgebrochen und mit neuen Instrumenten an unversehrter Stelle punktiert. Anschließend erfolgte die Farbbeurteilung des Fruchtwassers. Ein sehr geringer Konzentrationswert von Thiamin im Fruchtwasser bei einer Maus in der Kontrollgruppe (11  $\mu\text{g/l}$ ) ist vermutlich durch einen Messfehler aufgrund einer zu geringen Fruchtwassermenge zurückzuführen. Bei Ausschluss der hohen Ausreißer sinkt der Mittelwert der Fruchtwasserkonzentration in der Kontrollgruppe von 171,61  $\mu\text{g/l}$  auf 123,9  $\mu\text{g/l}$ . Damit ließe sich in der Kontrollgruppe eine geringere Thiaminkonzentration im Fruchtwasser im Vergleich zu den Gruppen A, C und D nachweisen, sodass ein Thiaminanstieg im Fruchtwasser durch Substitution doch möglich erscheinen könnte. Die unveränderte Spaltrate bestätigt auch im Hinblick auf die *in vivo* Untersuchungen zu Vitaminkonzentrationen im Blutserum und Fruchtwasser dieses Argument nicht (Scheller et al., 2013b).

Die dosisabhängige Resorption von Thiamin ist weiterhin zu diskutieren. Die Resorption niedriger Konzentrationen erfolgt carriervermittelt gegen einen Konzentrationsgradienten. Bei höheren Konzentrationen erfolgt die Resorption von Thiamin durch passive Diffusion (Biesalski et al., 2002). Da es sich hierbei um keine Sättigungsreaktion handelt, scheint die Hochdosisgabe sinnvoll. Die erfolgreiche orale Substitution des Vitamins B1 und die ermöglichte intestinale Aufnahme über den Darm in das Blutserum werden durch die deutliche

Konzentrationserhöhung im Blutserum der Substitutionsgruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe gezeigt. Eine mögliche Unsicherheit der oralen Substitution der Muttermaus mittels Spritze ist insofern gegeben, als dass die Maus durch Speicherung der Vitaminlösung in den Backentaschen und mögliches anschließendes Ausspeien nicht die gewünschte Vitaminmenge erhalten könnte. Dies wird aber durch den nachgewiesenen Thiaminanstieg im Serum in unseren Versuchsgruppen nicht bestätigt.

Des Weiteren vermindern geringe Veränderungen im Molekulaufbau des Thiamins dessen Wirksamkeit bis hin zur antagonistischen Wirkung (Biesalski et al., 2002). Inwiefern Veränderungen der Thiaminstruktur durch den Metabolismus des mütterlichen Organismus während des Transfers durch die Plazenta und durch den fetalen Organismus zur verminderten Wirksamkeit beitragen können, lässt sich nur spekulieren und kann Anstoß für weitere Untersuchungen in naher Zukunft sein.

Die mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch unkontrollierte externe Thiaminzufuhr durch das Altromin-Spezialfutter wurde vor Versuchsbeginn bedacht und als unbedeutend erachtet. Die Haltungsdiät ist aus pflanzlichen Nebenerzeugnissen, Getreide, Mineralstoffen, Ölen und Fetten zusammengesetzt und enthält als Zusatzstoffe die Vitamine A und D3 als Cholecalciferol, sodass eine Basisversorgung mit essentiellen Nährstoffen gewährleistet ist. Eine zusätzliche höher dosierte Thiamingabe durch das Futter kann bei einer Konzentration von Vitamin B1 mit 18 mg/kg Futter und der täglichen Nahrungsaufnahme von 3-6 g bei einer Maus zwischen 25-30 g nahezu ausgeschlossen werden ([www.altromin.de/produkte/standarddiäten/spezifikationen-standarddiäten](http://www.altromin.de/produkte/standarddiäten/spezifikationen-standarddiäten)). Diskutiert werden muss zudem die Beeinflussung durch den Fütterungsvorgang an sich. Die orale Thiamingabe erfolgte bei den Gruppen A und B jeweils 8 Uhr und bei den Gruppen C und D ab dem 15. Tag p.c. nach den angegebenen Zeiten bei sichtbar schwangeren Mäusen, meistens ca. 2-5 Stück pro Verpaarungskohorte von knapp über 20 befruchteten Mäusen. Es zeigte sich, dass eine durch einen vorhandenen Vaginalpfropf bestätigte Befruchtung nicht zwangsläufig mit einer Schwangerschaft einhergehen muss. Bei der Gruppe A jedoch, bei der nach dem ersten Tag p.c. die Thiamingabe erfolgte, mussten meist über 20 Muttermäuse nacheinander gefüttert werden. So konnte bei den Muttermäusen eine Vitaminapplikation nicht immer um genau 8 Uhr gewährleistet werden. Die Verzögerung von ca. 30 - 45 min ist im Zusammenhang mit dem 90-minütigen Verpaarungszeitraum als gering einzuschätzen und damit sicher nicht auf das Ergebnis Einfluss nehmend. Blieb eine Schwangerschaft einer Maus der Gruppe A aus, wurde sie unter Beachtung der Halbwertszeit von Thiamin (10-18 Tage) wieder verpaart.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Spalten durch den Stressfaktor „Füttern“ aufgrund der teratogen und vasokonstriktorisch wirkenden Nebennierenhormone (Cortisol, Adrenalin) induziert werden können. Der Stressfaktor scheint auf den ersten Blick aufgrund der

beobachteten gleichen Spaltrate zwischen der Kontroll- und den Applikationsgruppen von untergeordneter Bedeutung. Nimmt man aber an, dass die Spaltrate in den Applikationsgruppen aufgrund des Fütterungsstresses generell höher liegen würde als in der Gruppe ohne Thiaminsubstitution, hätte das Vitamin seine Wirkung bestätigt. Diese These ließe sich an einer Placebogruppe mit der Applikation von Frischwasser überprüfen, wobei zur Vergleichbarkeit vier Placebogruppen mit den unterschiedlichen Applikationszeiten nötig wären. Die erforderliche höhere Tierzahl wäre dabei sicher nicht im Einklang mit dem 3R-Prinzip von Russel und Burch mit den Forderungen Vermeidung, Verfeinerung und Verringerung von Tierstudien, bei dem schon im Vorfeld durch statistische Analysen und entsprechenden Studiendesigns eine unnötig hohe Tierzahl vermieden werden soll (Russel und Burch, 1959). In der Scapularegion subkutan implantierte Minipumpen, wie im Tierversuch angewendet (Paros und Beck, 1999), wären theoretisch in der Lage das Problem zu umgehen. Bei nicht erfolgter Schwangerschaft wären diese umsonst implantiert worden und dem Tier unnötig Leiden zugefügt. Beachtet man die Halbwertszeit von Cortisol mit 80-150 min beim Menschen (Lüllmann et al., 2010) lässt sich das mögliche teratogene Potential durch den Stress des Fütterungsvorgangs ausschließen. Eine Studie zu fetalen Stressantworten beim Menschen zeigte interessanterweise eine 13-mal niedrigere Cortisolkonzentration des Fetus im Vergleich zur Schwangeren (Gitau et al., 2001), sodass natürlich ausgeschüttetes Cortisol, auch bedingt durch den enzymatischen Besatz der Plazenta, den Fetus wohl nicht frei erreichen kann (Weerth und Buitelaar, 2005).

Werden die Resorptionsraten von der Kontrollgruppe mit den Substitutionsgruppen verglichen, fällt auf, dass die absolute Zahl der Resorptionen doppelt so hoch ist. Wird die Resorptionsrate der Kontrollgruppe auf die einzelnen Substitutionsgruppen bezogen, sind die Unterschiede sehr signifikant. Die Resorptionsraten der Substitutionsgruppen sind untereinander annähernd gleich niedrig (Abb. 10). Erhöhte Thiaminwerte im Serum scheinen protektiv auf das Verhindern eines intrauterinen Fruchttodes zu wirken. Ein mögliches Schutzpotential vor Embryoletalität durch die Vitaminzufuhr ist somit denkbar, wobei frühere Arbeiten keine Reduktion der Resorptionsrate durch Thiamingabe beschrieben (Schubert et al., 2002).

Die Reduktion des Wiederauftretens bei einer Spalterkrankung wurde in empirischen Studien festgestellt (Tolarová und Harris, 1995; Schubert und Krost, 2006). Idealerweise sollte, wie auch an dieser Klinik durchgeführt, die Vitaminapplikation präkonzeptionell erfolgen. Interessant wäre die Spaltrate einer Gruppe zu analysieren, bei der die Vitaminapplikation an einem definierten Zeitpunkt vor der Verpaarung durchgeführt wird. Bei niedriger Anzahl an sich einstellenden Schwangerschaften sind jedoch größerer Aufwand und Vitaminmengen nötig.

Weitere Gründe für das Ausbleiben der Spaltreduktion müssen in Zukunft untersucht werden, um mögliche Pathomechanismen zu beleuchten. Zu klären ist, warum ein Thiaminanstieg im Fruchtwasser ausbleibt und es somit nicht zu einer direkten Beeinflussung der heranwachsenden Strukturen kommt. Dazu sollen Transportprozesse des Thiamins näher beleuchtet werden.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen bei Mäuse-Feten mit LKGS eine erhöhte Expression des Thiamin Transporters-1 (ThTr-1), bei Feten ohne Spaltbildung ist dieser geringer exprimiert. Ursächlich dafür könnte die geringe Thiaminkonzentration im Fruchtwasser bei Muttermäusen mit Spaltbildungen in der Nachkommenschaft sein (Scheller et al., 2013b).

Das ThTr-1 Protein wird durch das Gen SLC19A2 der Familie der *solute carriers* 19 (SLC19) synthetisiert. Die SLC19 Gen-Familie ist eine Familie von drei Transportproteinen mit struktureller Ähnlichkeit. SLC19A1 codiert für einen Folsäuretransporter (RFC - reduced folate carrier), SLC19A2 und SLC19A3 für den Thiamin Transporter-1 und -2. Die transmembranös lokalisierten Transporter kommen vor allem in absorbierenden Geweben wie Darm, Niere und Plazenta vor. Die Thiaminabsorption erfolgt bei niedrigen und physiologischen Konzentrationen aktiv und pH-abhängig durch einen Thiamin/H<sup>+</sup> Antiport, wobei Thiamin durch extrazellulären höheren pH-Wert nach intrazellulär im Austausch mit einem Proton transportiert wird (Ganapathy et al., 2004). Liegen, wie in dieser Arbeit, höhere Thiaminkonzentrationen vor, erfolgt der Transport entlang des Konzentrationsgradienten passiv über die Darmmukosa in das Blut (Biesalski et al., 2002), sodass angenommen werden kann, dass die Thiaminabsorption in das Serum der A/WySn Maus durch die hochdosierte Thiamingabe passiv entlang des Konzentrationsgradienten und unter Umgehung des aktiven Transportes über die Thiamin-Rezeptoren gelungen ist. Obwohl die Thiaminkonzentration im Blutserum anstieg, blieb eine Konzentrationserhöhung im Fruchtwasser allerdings aus. Vermutlich spielt die Plazenta in dieser Hinsicht die entscheidende Rolle. Ein passiver Transport bedingt durch die hohe Konzentration analog zur Aufnahme im Darm findet hier wahrscheinlich nicht statt. Zu überlegen wäre eine unzureichende Sättigung der Rezeptoren in der Plazenta (Baker et al., 1981), was aufgrund der hohen Thiaminkonzentration eher unwahrscheinlich ist. Als weitere Ursache ist eine Verstärkung der plazentaren Schranke zu diskutieren.

Hier sind vor allem mögliche Variationen der Thiamin-Transporter zu diskutieren, die durch ihre verminderte Funktion oder einen Funktionsverlust zu Einschränkungen der Thiaminabsorption führen könnten (Ganapathy et al., 2004; Zhao und Goldman, 2013). Interessant wären weitere Studien, die Veränderungen von diesen Transportproteinen untersuchen und Aufschluss darüber geben, inwiefern solche Varianten auch beim Menschen vorliegen und inwieweit eine Korrelation zwischen Rezeptorvarianz und Spaltmanifestation besteht.

Eine Senkung der Spaltrate durch die hochdosierte Thiaminsubstitution blieb am genetisch determinierten Stamm A/WySn aus. Entweder lässt sich der Stamm durch die starke genetische Determination per se nicht beeinflussen, oder das fehlende Thiaminangebot in unmittelbarer Umgebung zu den sich entwickelnden Gaumenstrukturen ist als Ursache für die fehlerhafte kraniofaziale Entwicklung denkbar.

Abschließend bleibt zu bedenken, dass die Ätiologie von nicht-syndromalen LKGS - als multifaktorielle Erkrankung - sehr komplex ist. Exogene beeinflussbare Umweltfaktoren und endogene genetische Faktoren können und dürfen hierbei nicht isoliert betrachtet werden, sondern als ein sich gegenseitig beeinflussbares Netzwerk und eine mögliche Gen-Umwelt-Interaktion. Ein Beispiel hierzu ist das Rauchen, das Veränderungen im Kandidatengen IFR6 auslösen kann, sodass sich dadurch eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Spaltentstehung in der Nachkommenschaft ableiten ließe (Dixon et al., 2011). Umso wichtiger ist es zu versuchen, die schädlichen Umweltfaktoren zu vermeiden oder zumindest zu reduzieren. Bezogen auf das Beispiel sollen Antirauchkampagnen weiter unterstützt und insgesamt die perikonzeptionelle Aufklärung werdender Mütter bezüglich medikamentöser Präventionsmöglichkeiten und Schwangerschaftshygiene weiter forciert werden.

## 6 Zusammenfassung

LKGS treten syndromal und nicht-syndromal durch eine Fehlentwicklung des Gesichtes auf. Für die Entstehung der nicht-syndromalen LKGS werden multiple Faktoren aus äußeren beeinflussbaren Umweltfaktoren und endogenen genetischen Faktoren diskutiert. Die Fehlbildungen treten sehr früh während der Embryonalentwicklung auf (6.-9. Entwicklungswoche) und lassen sich durch bestimmte Vitaminsubstitutionen (Vitamin B-Komplex, Thiamin, Folsäure) im Tierversuch (Schubert et al., 1990; Paros und Beck, 1999; Scheller et al., 2011, 2013a,b) und im klinischen Alltag (Schubert und Krost, 2006) vermeiden. Die genaue Ätiologie der LKGS und die Wirkung von Präventiva sind dennoch weitgehend unbekannt (Weingärtner et al., 2007; Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011). Ein etabliertes Modell zur Klärung der Fragestellung ist das Mausmodell.

Mit dem Zugang zu einem genetisch determinierten Mäusestamm besteht die Möglichkeit, stabile und hohe Spaltraten zu erhalten, um die Beeinflussbarkeit durch exogene Faktoren genau zu untersuchen. Der in dieser Arbeit verwendete genetisch determinierte Inzuchtstamm A/WySn kann eine relativ hohe und konstante Häufigkeit spontaner LKS und LKGS von 20-44% aufweisen (Juriloff et al., 1982; Schubert et al., 2002).

Die berichtete positive Wirkung von Thiamin (Vitamin B1) auf das Gaumenwachstum in der Embryogenese (Schubert, 1980; Scheller et al., 2013a,b) sollte hier *in vivo* untersucht werden.

Durch die hochdosierte orale Thiaminsubstitution (Vitamin B1) konnte die Spaltrate der genetisch determinierten A/WySn-Maus in der vorliegenden Versuchsreihe nicht gesenkt werden. Eine geschlechterabhängige Spaltmanifestation, wie beim Menschen beschrieben, fand sich nicht. Die Konzentration von Thiamin im Blutserum stieg durch Substitution verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant an, nicht jedoch im Fruchtwasser. Die persistierende niedrige Thiaminkonzentration im Fruchtwasser konnte somit die Entwicklung der kraniofazialen Strukturen nicht positiv beeinflussen.

Beeinflussbar war allerdings die intrauterine Resorptionsrate, die eindeutig eine Reduktion unter Thiaminsubstitution mit reduzierter Embryoletalität aufzeigte.

Weitere Untersuchungen sollen nun die Gründe für ein Ausbleiben des Thiaminanstiegs im Fruchtwasser klären. Denkbar ist eine Variation der Thiamintransporter, sodass sich nun immunhistochemische Analysen zur Rezeptorlokalisation und molokulargenetische Rezeptoranalysen anschließen können.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott MM, Rosen H, Kupfer P, Meara JG (2014) Measuring value at the provider level in the management of cleft lip and palate patients. *Ann Plast Surg* 72:312-317.
- Baker H, Frank O, Deangelis B, Feingold S, Kaminetzky HA (1981) Role of placenta in maternal-fetal vitamin transfer in humans. *Am J Obstet Gynecol* 141:792-796.
- Baxter H, Fraser FC (1950) The production of congenital defects in the offspring of female mice treated with cortisone. A preliminary report. *McGill Med J* 19:245-249.
- Bienengräber, V, Malek FA, Möritz KU, Fanghänel J, Gundlach KK, Weingärtner J (2001) Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. *Cleft Palate Craniofac J* 38:393-398.
- Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K: Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, S. 80-94.
- Boyles AL, DeRoo LA, Lie RT, Taylor JA, Jugessur A, Murray JC, Wilcox AJ (2010) Maternal alcohol consumption, alcohol metabolism genes, and the risk of oral clefts: a population-based case-control study in Norway, 1996-2001. *Am J Epidemiol* 172:924-931.
- Brinkley LL, Bookstein FL (1986) Cell distribution during mouse secondary palate closure. II. Mesenchymal cells. *J Embryol Exp Morphol* 96:111-130.
- Bundesamt für Veterinärwesen Schweiz (1993): Richtlinien über das fachgerechte und tierschutzkonforme Töten von Versuchstieren, Richtlinie Tierschutz 3.01, Bern, S.1-17.
- Casey LM, Lan Y, Cho ES, Maltby KM, Gridley T, Jiang R (2006) Jag2-Notch1 signaling regulates oral epithelial differentiation and palate development. *Dev Dyn* 235:1830-1844.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94:727-737.
- Christensen K, Fogh-Andersen P (1993) Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. *Am J Med Genet* 47:910-916.
- Cuervo R, Covarrubias L (2004) Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis. *Development* 131:15-24.
- Czeizel AE, Dudás I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327:1832-1835.
- Czeizel AE (2013) Is folic acid a risk factor for oral clefts? *Eur J Epidemiol* 28:841-843.
- Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information (2015) unter: <https://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2015/block-q35-q37.htm> (abgerufen am 22.01.2015).

- DGE-Deutsche Gesellschaft für Ernährung: Referenzwerte für Nährstoffzufuhr. 2. Aufl. Neuer Umschau, Bonn, 2015.
- DGNP e.V. - Deutsche Gesellschaft für Nährstoffmedizin und Prävention (2016) unter: <http://www.dgnp.de/wir-ueber-uns/definition-der-paeventionsmedizin.html> (abgerufen am 06.03.2016).
- Diewert VM, Wang KY (1992) Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:111-130.
- Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC (2011) Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 12:167-178.
- Dolk H, Loane M, Garne E (2010) The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol* 686:349-364.
- Dudas M, Li WY, Kim J, Yang A, Kaartinen V (2007) Palatal fusion - where do the midline cells go? A review on cleft palate, a major human birth defect. *Acta Histochem* 109:1-14.
- European surveillance of congenital anomalies (2015) unter: <http://www.eurocat-network.eu/accessprevalencedata/prevalencetables> (abgerufen am 20.01.2015).
- Fehlbildungsmonitoring Sachsen-Anhalt (2014) Jahresbericht 2014. unter: [http://www.angeborene-fehlbildungen.com/monz\\_mm/Dokumente/Jahresberichte/Bericht\\_2014\\_WEB.pdf](http://www.angeborene-fehlbildungen.com/monz_mm/Dokumente/Jahresberichte/Bericht_2014_WEB.pdf) (abgerufen am 01.09.2016).
- Ferguson MWJ, Honig LS, Slavkin HC (1984) Differentiation of cultured palatal shelves from alligator, chick, and mouse embryos. *Anat Rec* 209:231-249.
- Ferguson MWJ (1988) Palate development. *Development* 103:41-60.
- Fitchett JE, Hay ED (1989) Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 131:455-74.
- Fogh-Andersen P (1942) Inheritance of harelip and cleft palate. Copenhagen: Munksgaard.
- Fraser FC (1971) Developmental thresholds and teratogenetics. *Fed Proc* 30:100-101.
- Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD (2004) SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch* 447:641-646.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2014) unter: [https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/\\_XWD\\_](https://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_) (abgerufen am 22.01.2015).
- Gitau R, Fisk NM, Teixeira JM, Cameron A, Glover V (2001) Fetal hypothalamic-pituitary-adrenal stress responses to invasive procedures are independent of maternal responses. *J Clin Endocrinol Metab* 86:104-109.
- Gritli-Linde A (2007) Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol* 301:309-326.
- Gritli-Linde A (2008) The etiopathogenesis of cleft lip and cleft palate: usefulness and caveats of mouse models. *Curr Top Dev Biol* 84:37-138.

- Gritli-Linde A (2012) The mouse as a developmental model for cleft lip and palate research. *Front Oral Biol* 16:32-51.
- Hallgrímsson 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.
- Han J, Mayo J, Xu X, Li J, Bringas P Jr, Maas RL, Rubenstein JL, Chai Y (2009) Indirect modulation of Shh signaling by Dlx5 affects the oral-nasal patterning of palate and rescues cleft palate in Msx1-null mice. *Development* 136:4225-4233.
- Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA (2000) Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 343:1608-1614.
- Herold G und Mitarbeiter: *Innere Medizin* 2015, Herold, 2015, S. 846-847.
- Hinrichsen K (1985) The early development of morphology and patterns of the face in the human embryo. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 98:1-79.
- Hinrichsen K: Early Development and Morphology of the Human Head. In: Pfeifer G (ed): *Craniofacial Abnormalities and Clefts of the Lip, Alveolus and Palate*. 4th Hamburg International Symposium. Thieme, Stuttgart- New York, 1991, pp. 16-23.
- Holtgrave EA, Stoltenburg-Didinger G (2002) Apoptotic epithelial cell death: a prerequisite for palatal fusion. An in vivo study in rabbits. *J Craniomaxillofac Surg* 30:329-336.
- Jiang R, Bush JO, Lidral AC (2006) Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn* 235:1152-1166.
- Johnston MC, Bronsky PT (1995) Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 6:368-422.
- Juriloff DM, Fraser FC (1980) Genetic maternal effects on cleft lip frequency in A/J and CL/Fr mice. *Teratology* 21:167-175.
- Juriloff DM (1982) Differences in frequency of cleft lip among the A strains of mice. *Teratology* 25:361-368.
- Juriloff DM, Harris MJ, Dewell SL (2004) A digenic cause of cleft lip in A-strain mice and definition of candidate genes for the two loci. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70:509-518.
- Juriloff DM, Harris MJ (2008) Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82:63-77.
- Kalter H (1979) The history of the A family of inbred mice and the biology of its congenital malformations. *Teratology* 20:213-232.
- Knapp A (1983) Vitaminmangel und Missbildungen. *Wiss. Z. Univ. Greifswald* 32:60-64.
- Koch J: On the Diagnostics of Clefts of the Lip, Alveolus and Palate. In: Celesnik F (ed): *Clefts of the Lip, Alveolus and Palate*. Maribor, 1968, pp. 99-106.

- Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC, van Cleef BA, Kuijpers-Jagtman AM, Steegers-Theunissen RP (2004) Maternal dietary B vitamin intake, other than folate, and the association with orofacial cleft in the offspring. *Eur J Nutr* 43:7-14.
- Kramer FJ, Gruber R, Fialka F, Sinikovic B, Hahn W, Schliephake H (2009) Quality of life in school-age children with orofacial clefts and their families. *J Craniofac Surg* 20:2061-2066.
- Kriens O: LAHSHAL - A concise Documentation System for Cleft Lip, Alveolus and Palate Diagnoses. In: Kriens O (ed): *What is a Cleft Lip and Palate? Proceedings of an Advanced Workshop*, Bremen 1987. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1989.
- Kreybig T v. (1976) Zur Teratologie der Hydroxamsäuren. *Med. Klin.* 71:844.
- Kreybig T v., Ostermann R, Pfeifer G (1977) Verringerung und Veränderung der Teratogenität von Hydroxamsäuren durch Thiamin (Vitamin B1) bei der Maus. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1:41-50.
- Kunze J (2014) Persönliche Mitteilungen.
- Little JS: *A Vital Morphological Study of Normal Palatal Closure in A/jax Mice*. 90 page typed thesis, The University of Michigan School of Dentistry, 1963.
- Little J, Cardy A, Munger RG (2004) Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* 82:213-218.
- 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, Kreusch 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* 44:968-971.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L: *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2010, S. 416.
- Mangold E, Ludwig KU, 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, Kreusch 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 (2010) Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet* 42:24-26.

- Martinez-Alvarez C, Bonelli R, Tudela C, Gato A, Mena J, O'Kane S, Ferguson MW (2000a) Bulging medial edge epithelial cells and palatal fusion. *Int J Dev Biol* 44:331-335.
- Martinez-Alvarez C, Tudela C, Pérez-Miguelsanz J, O'Kane S, Puerta J, Ferguson MW (2000b) Medial edge epithelial cell fate during palatal fusion. *Dev Biol* 220:343-357.
- Mato M, Aikawa E, Katahira M (1966) Appearance of various types of lysosomes in the epithelium covering lateral palatine shelves during a secondary palate formation. *Gunma J Med Sci* 15:46-56.
- Mehrotra D (2015) Genomic expression in non syndromic cleft lip and palate patients: A review. *J Oral Biol Craniofac Res* 5:86-91.
- Mijiti A, Ling W, Guli, Moming A (2015) Association of single-nucleotide polymorphisms in the IRF6 gene with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate in the Xinjiang Uyghur population. *Br J Oral Maxillofac Surg* 53:268-274.
- Mogass M, Bringas P Jr, Shuler CF (2000) Characterization of desmosomal component expression during palatogenesis. *Int J Dev Biol* 44:317-322.
- Moore KL: Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. 3. Aufl. Schattauer, Stuttgart, 1990. S. 220-237.
- Mossey PA, Davies JA, Little J (2007) Prevention of orofacial clefts: does pregnancy planning have a role? *Cleft Palate Craniofac J* 44:244-250.
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC (2009) Cleft lip and palate. *Lancet* 374:1773-1785.
- Mossey PA, Modell B (2012) Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Front Oral Biol* 16:1-18.
- Moxham BJ (2003) The development of the palate - a brief review. *Eur J Anat* 1:53-74.
- MRC Vitamin Study Research Group (1991) Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338:131-137.
- Murray JC, Schutte BC (2004) Cleft palate: players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest* 113:1676-1678.
- Nationale Verzehrstudie II: Ergebnisbericht, Teil 2. Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe, 2008.
- Natsume N, Nagatsu Y, Kawai T (1998) Direct effect of vitamins at the time of palatal fusion. *Plast Reconstr Surg* 102:2512-2513.
- Neumann HJ: Entstehung, Prävention und klinisches Bild der Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten. In: Andrä A, Neumann HJ (Hrsg.): Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Einhorn-Press Verlag, Reinbeck, 1996, S. 13-91.
- Paros A, Beck SL (1999) Folinic acid reduces cleft lip [CL(P)] in A/WySn mice. *Teratology* 60:344-347.

- Parsons TE, Kristensen E, Hornung L, Diewert VM, Boyd SK, German RZ, Hallgrímsson B (2008) Phenotypic variability and craniofacial dysmorphology: increased shape variance in a mouse model for cleft lip. *J Anat* 212:135-143.
- Pearson K (1900) On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *Philosophical Magazine Series 5*. 50:157-175.
- Peter K (1911) Modelle zur Entwicklung des menschlichen Gesichts. *Anat. Anz.* 39:41-46.
- Pfeifer G: Entwicklungsstörungen und Anomalien der Zähne, des Mundes und der Kiefer. In: Opitz H, Schmid F (Hrsg): *Handbuch der Kinderheilkunde*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968, S. 371-372.
- Pfeifer G, Pirsig W, Wulff J, Wulff H: *Lippen-Kiefer-Gaumenspalten: chirurgische, otologische und sprachliche Behandlung*. Ernst Reinhardt Verlag, München, 1981, S. 12.
- Pfeifer G: Craniofacial Anomalies - The Key to a Surgical Classification of Human Malformations. In: Pfeifer G (ed): *Craniofacial Abnormalities and Clefts of the Lip, Alveolus and Palate*. 4th Hamburg International Symposium. Thieme, Stuttgart-New York, 1991, pp. 27-40.
- Rasso J und Mitarbeiter: *Biochemie*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2008, S. 119, 234-239, 272-305.
- Raupach HW (1987) *Untersuchungen zum Einfluss von Thiamin (Vitamin B1) auf die Palatogenese der Hausmaus*. Halle, Univ., Med. Fak., Diss.
- Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C, Thesleff I, Rice DP (2004) Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial- mesenchymal interactions causes cleft palate. *J Clin Invest* 113:1692-1700.
- Rozendaal AM, 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* 28:875-887.
- Rugh R: *The Mouse - Its Reproduction and Development*. Oxford University Press, New York, 1990, p. 294.
- Russell WMS, Burch RL: *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959.
- Sabbagh HJ, Hassan MH, Innes NP, Elkodary HM, Little J, Mossey PA (2015) Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10:e0116963.
- Sadler TW: *Medizinische Embryologie*. 11. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2008, S. 369-377.

- Scheller K, Schubert A, Schubert J (2011) In vitro investigation of the secondary palate development in two strains of mice. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:737-742.
- Scheller K, Orce y Tiggers J, Schubert J (2013a) Vitamin B-complex application promotes secondary palate development in a palate organ model of the A/WySnJ mouse. *J Oral Maxillofac Surg* 71:143-150.
- Scheller K., Röckl T, Scheller C, Schubert J (2013b) 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* 71:1601-1607.
- Scheller K, Kalmring F, Schubert J (2016) Sex distribution is a factor in teratogenically induced clefts and in the anti-teratogenic effect of thiamine in mice, but not in genetically determined cleft appearance. *J Craniomaxillofac Surg* 44:104-109.
- Schubert J (1977) Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der medikamentösen Prophylaxe kongenitaler Spaltbildungen. II Untersuchungen an durch Cyclophosphamid erzeugten Gaumenspalten bei Mäusen. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 65:638-641.
- Schubert J (1980) Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung experimenteller Gaumenspalten an der Hausmaus. Halle, Univ., Med. Fak., Diss. B.
- Schubert J (1981) Prävention von Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten im Tierexperiment. *Fortschr Kieferorthop* 42:278-284.
- Schubert J (1982) Prevention of experimentally induced cleft palate in mice. *Cleft Palate J* 19:83-88.
- Schmidt R (1985) A modified mating regimen for the laboratory mouse. *Z Versuchstierkd.* 27:206-208.
- Schubert J (1986) Zur Wertigkeit verschiedener Medikamente in der Missbildungsprävention. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 74:43-46.
- 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* 18:343-347.
- Schubert J, Raupach HW: Mode of Action of Drug-Related Prevention of Malformations in Animal Experiments. In: Pfeifer G (ed) *Craniofacial Abnormalities and Clefts of the Lip, Alveolus and Palate*. 4th Hamburg International Symposium. Thieme, Stuttgart-New York, 1991, pp. 161-162.
- Schubert J: Missbildungen und Anomalien des Kiefers und des Gesichts. In: Hochstein HJ (Hrsg): *Rosenthals spezielle Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. Barth, Leipzig, Heidelberg, 1991, S. 15-30.

- Schubert J: Versuch eines Klinikums zur Überwindung der Empirie. In: Parthier B (Hrsg): Jahrbuch 2000 der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, Halle (Saale), 2001, S. 263-286.
- Schubert J, Schmidt R, Syska E (2002) B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:410-413.
- Schubert J, Krost B (2006) Prevention of cleft lip and palate. Reducing risk of recurrence-a 25-year clinical experience. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10:301-305.
- Selye H (1975) Stress and distress. *Compr Ther* 1:9-13.
- Spemann H: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Springer-Verlag, Berlin, 1936.
- Starck D: Embryologie, ein Lehrbuch auf allgemein biologischer Grundlage. 3. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 1975, S. 442-454.
- Strong LC: Inbred Mice in Science. In: Morse HCI (ed): *Origins of Inbred Mice*. Academic Press, New York, London, 1978, pp. 43-67.
- Syska E (2000) Experimentelles Modell der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten als pathogenetisches Äquivalent der Fehlbildung des Menschen. Halle, 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* 32:2-4.
- Tolarová M (1982) Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip. *Lancet* 2:217.
- Tolarová M (1987) A study of the incidence, sex-ratio, laterality and clinical severity in 3,660 probands with facial clefts in Czechoslovakia. *Acta Chir Plast* 29:77-87.
- Tolarová M, Harris J (1995) Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 51:71-78.
- Töndury G: Über die Genese der Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten. In: Schuchardt K (Hrsg): *Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie*, Thieme, Stuttgart, 1955, S. 1-8.
- Vieira AR (2012) Genetic and environmental factors in human cleft lip and palate. *Front Oral Biol* 16:19-31.
- Wallace GH, Arellano JM, Gruner TM (2011) Non-syndromic cleft lip and palate: could stress be a causal factor? *Women Birth* 24:40-46.
- Weerth C de, Buitelaar JK (2005) Physiological stress reactivity in human pregnancy-a review. *Neurosci Biobehav Rev* 29:295-312.
- Weichert A, Vogt M, Dudenhausen JW, Kalache KD (2010) Evidence in a human fetus of micrognathia and cleft lip as potential effects of early cytomegalovirus infection. *Fetal Diagn Ther* 28:225-228.

- Weingärtner J, Lotz K, Fanghänel J, Gedrange T, Bienengräber V, Proff P (2007) Induction and prevention of cleft lip, alveolus and palate and neural tube defects with special consideration of B vitamins and the methylation cycle. *J Orofac Orthop* 68:266-277.
- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y (2002) Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 129:4135-4146.
- Zhao R, Goldman ID (2013) Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Mol Aspects Med* 34:373-385.
- Zucchero TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC (2004) Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *N Engl J Med* 351:769-780.

## 8 Thesen

1. Die Spaltrate unter den Nachkommen der A/WySn-Maus, die eine genetisch determinierte Spaltbildung aufweist, wird durch die orale Thiaminsubstitution nicht gesenkt.
2. Insgesamt war das Geschlechtsverhältnis unter den Nachkommen gleich ( $\text{♂}:\text{♀} = 1:0,97$ ).
3. Das Auftreten von orofazialen Spaltbildungen ist geschlechtsunabhängig ( $\text{♂}:\text{♀} = 1:1,07$ ).
4. Die Rate an Resorptionen, hervorgerufen durch den intrauterinen Fruchttod, wird durch die Thiaminsubstitution deutlich gesenkt.
5. Durch die Hochdosissubstitution von Thiamin *per os* kann die Thiaminkonzentration im Serum bei der A/WySn-Maus erhöht werden.
6. Trotz erhöhter Serumwerte zeigt sich keine Erhöhung der Thiaminkonzentration im Fruchtwasser.
7. Durch die niedrige Thiaminkonzentration im Fruchtwasser kann die kraniofaziale Entwicklung nicht positiv beeinflusst werden.
8. Ein gestörter Thiamintransport könnte Ursache für den fehlenden Thiaminanstieg im Fruchtwasser sein.

## 9 Lebenslauf

**Name:** Florian Kalmring  
**Geburtsdatum:** 10.09.1987  
**Geburtsort:** Blankenburg  
**Familienstand:** ledig  
**Wohnort:** Röderberg 19, 06114 Halle (Saale)  
**Email:** [florian.kalmring@web.de](mailto:florian.kalmring@web.de)

### Schulbildung und Zivildienst:

1994-1998 Grundsule „Ferdinand Freiligrath“ Rieder  
1998-2000 „Sekundarschule Hagenberg“ Gernrode  
2000-2007 Abitur am „Wolterstorff- Gymnasium“ Ballenstedt  
08/2007-04/2008 Zivildienst am Klinikum „Dorothea Christiane Erxleben“  
Quedlinburg

### Universitätsausbildung:

2008-2013 Studium der Zahnmedizin an der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
10/2012 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg im Fach Humanmedizin  
11/2013 Staatsexamen der Zahnmedizin an der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
12/2013 Approbation als Zahnarzt  
24.06.-27.06.2015 Präsentation des Promotionsthemas in Form eines  
Referates auf dem ECC 2015 in Göteborg

### Berufsausübung:

seit 09/2014 Zahnarzt im zahnärztlichen Bereitschaftsdienst an der  
Universitätsklinik und Poliklinik für Kieferorthopädie des  
Universitätsklinikums Halle (Saale) der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg

## 10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale) erstellten klinischen Bilder sind mit ausdrücklichem Einverständnis der Patienten, bzw. ihrer Erziehungsberechtigten, in dieser Arbeit verwendet worden.

Halle (Saale), den

Florian Kalmring

## 11 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich die diesem Antrag beiliegende Dissertation mit dem Titel "In vivo Untersuchung des Einflusses von Thiamin auf die genetisch determinierte Lippen,- Kiefer- und Gaumenspaltbildung der A/WySn-Maus" noch nie, weder ganz noch teilweise, im Rahmen eines anderen Promotionsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht habe. An keiner anderen Fakultät oder Universität ist ein Promotionsverfahren im Gang.

Halle (Saale), den

Florian Kalmring

## Danksagung

„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge so sind, wie sie sind.“

Aristoteles

(384-322 v. Chr.), griechischer Philosoph und Schüler Platons

In diesem Sinne möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Schubert für die Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dr. Konstanze Scheller. Ohne ihre unermüdliche Geduld, ihre Art zu motivieren, ihren Sinn für die wesentlichen Dinge und ihre zeitnahen Korrekturen bei der Überarbeitung des Manuskripts hätte die Arbeit so nicht entstehen können.

Danken möchte ich dem Leiter der Zentralen Tierhaltung und Tierschutzbeauftragten der Medizinischen Fakultät am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Herrn PD Dr. Bernhard Hiebl für die Demonstration der Probengewinnung, der technischen Ausstattung und den zahlreichen motivierenden Ratschlägen, sowie den Mitarbeiterinnen Frau Gottschalk und Frau Henicke für die Demonstration des Umgangs mit den Tieren.

Frau Jana Beer und Frau Bettina Ernst von dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät danke ich für die technische Umsetzung des Einbettens und Schneidens der Präparate.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die unentwegte Unterstützung.