

Aus der Abteilung für Orale Anatomie
(Leiter: Prof. Dr. med. J. Fanghänel)
der Poliklinik für Kieferorthopädie, Präventive
Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde
(Direktor: Prof. Dr. med. dent. T. Gedrange)
im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. dent. G. Meyer)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

**Zum Einfluss von Folsäure und Thiozyanat auf
die Knochenreifung der LEW.1A-Ratte unter
Procabazinapplikation in zytostatischer Dosierung.**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Zahnmedizin
(Dr. med. dent.)
der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2006

vorgelegt von:
Susan Liefländer
geb. am: 21.09.1976
in: Bergen

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Gutachter: Prof. Dr. J. Fanghänel
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. K. Gundlach
(3. Gutachter:) -
Ort, Raum: Greifswald, Hörsaal Institut für Anatomie
Tag der Disputation: 06.11.2006

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	4
2. Literaturübersicht	6
2.1. Folsäure	6
2.2. Thiozyanat	15
2.3. Procarbazin	23
2.4. Methotrexat	26
3. Material und Methode	30
3.1. Material	30
3.2. Methode	31
4. Ergebnisse	35
4.1. Gewicht, Scheitel-Steiß-Länge, Kopf und Hals	36
4.2. Rumpf	38
4.3. Vordere Extremität	40
4.4. Becken und hintere Extremität	43
5. Diskussion	47
6. Zusammenfassung	59
7. Schrifttum	61
Eidesstattliche Erklärung	97
Lebenslauf	98
Danksagung	99
Anhang	100

1. Einleitung und Fragestellung

Die klassische Definition des Begriffes „Fehlbildung“ wurde von *Schwalbe* (1913) geprägt: „*Fehlbildung ist eine während der intrauterinen Entwicklung zustande gekommene, also angeborene Veränderung der Morphologie eines oder mehrerer Organe oder Organsysteme oder des gesamten Körpers, welche außerhalb der Variationsbreite der Spezies gelegen ist*“. Etwa 10% aller Fehlbildungen beruhen auf erblichen bzw. endogenen Faktoren. Weitere 10% sind auf exogene Ursachen zurückzuführen. Der Hauptanteil (80%) wird durch komplizierte Wechselwirkungen exogener und endogener Einflüsse hervorgerufen (*Rosenbauer 1973*).

Zu Fehlbildungen und Fehlfunktionen kommt es, wenn die Grenze der ontogenetischen Adaptation erreicht ist (*Fanghänel und Schumacher 1984*).

Störungen in der embryonalen Entwicklung rufen in bestimmten Zeitabschnitten ganz bestimmte Schädigungsmuster hervor. Man spricht dabei von teratologischen Determinationsperioden, welche für jedes Organsystem spezifisch sind. Eine Reihe von Noxen schädigt während bestimmter Abschnitte der Embryonal- bzw. Fetalentwicklung spezifische Organanlagen. Dieser Organotropismus ist u. a. nach einer Applikation der teratogenen Substanz Procarbazin (Natulan®) an Ratten zu beobachten. Am 14. Tag post conceptionem verabreicht, kommt es zur Ausbildung typischer Skelettfehlbildungen, vornehmlich im Schädel-Gesichts-Bereich. Mit dieser Arbeit sollte der möglicherweise präventive Einfluss eines separaten sowie kombinierten Einsatzes von Folsäure und Thiozyanat auf durch Procarbazin induzierte Fehlbildungen geprüft werden. Im Vordergrund stand dabei die Betrachtung der embryonalen Skelettentwicklung von LEW.1A-Ratten. Der Einsatz von Folsäure und Thiozyanat ist insofern interessant, als dass beide Substanzen in verschiedene Stoffwechselwege und -prozesse eingreifen und diese steuern. Die Folsäurekoenzyme dienen der Aktivierung und Übertragung von C1-Einheiten, was sie u. a. für die DNA-Synthese und -Methylierung, für Zellteilungsvorgänge und das Gewebewachstum essentiell macht.

Thiozyanat beeinflusst die Zellmembranpermeabilität und fördert Enzymaktivitäten, besonders in proliferierenden Geweben. Es sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern sich die Gabe des zytostatisch wirksamen Natulans® nicht nur auf den Schädelbereich, sondern auf die gesamte Knorpel-Knochen-Entwicklung der Rattenfeteten auswirkt.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Skelettreife am 21. Trächtigkeitstag zu charakterisieren und Aussagen über deren Beeinflussung am 14. Trächtigkeitstag zu treffen.

Anhand weiterer Studien zur Fehlbildungsinduktion des Skelettes am 14. Tag sollte eine noch umfassendere Beschreibung und Analyse der Embryogenese möglich sein.

2. Literaturübersicht

2.1. Folsäure

Folat (Vitamin B₁₁) ist ein wasserlösliches Vitamin. Die Bezeichnung stammt aus dem Lateinischen (*folium* = Blatt), welche auf das reichliche Vorkommen in grünen Blättern hindeutet. Als folatreich gelten außerdem Leber, Hefe und Hefeprodukte, Eier, Bohnen, Orangen, Spinat und Rüben. In Lebensmitteln zusätzlich verabreichte Ascorbinsäure verhindert die Oxidation und damit den Verlust von Tetrahydrofolsäure (*Butterworth* und *Bendich* 1996).

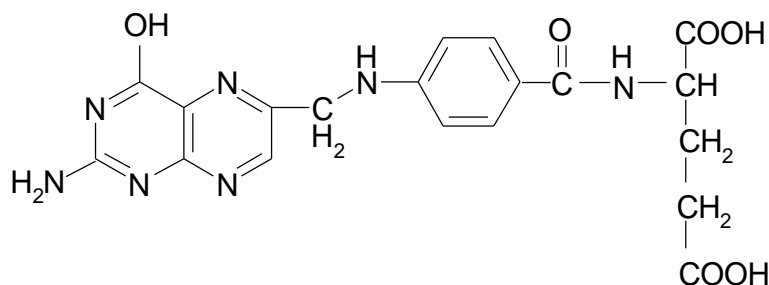


Abb. 1. Strukturformel der Folsäure

Als Folsäure werden alle Verbindungen bezeichnet, die einen Pteridinring, eine p-Aminobenzoesäure sowie einen oder mehrere Glutaminsäurereste enthalten (*Buddecke* 1989). Folat und Folsäure sind verschiedene Bezeichnungen für dasselbe B-Vitamin, die häufig nicht korrekt verwendet werden. Während Folat die natürlich vorkommende Verbindung des B-Vitamins ist, kann Folsäure nur synthetisch hergestellt werden. Letztere ist vom Dünndarm leichter und schneller absorbierbar (*Yoder* 1999). Folat wird von Mikroorganismen im Darm von Mensch und Tier als auch in Geweben höherer Pflanzen synthetisiert. In der Natur kommt Folat als Konjugat mit mehreren Glutaminsäuremolekülen ($n = 2-7$) vor. Nach der Aufnahme mit der Nahrung wird es im Mukosaepithel des Dünndarms zu Pteroylmonoglutaminsäure hydrolysiert. In der Darmwand erfolgt die Reduktion und

Methylierung zu N⁵-Methyltetrahydrofolsäure, welche in die Blutbahn abgegeben und mit den Erythrozyten zur Leber transportiert wird. Unter Mitwirkung von Vitamin B₁₂ entsteht daraus Tetrahydrofolsäure, ein Koenzym zahlreicher Stoffwechselreaktionen. Steht nicht ausreichend Vitamin B₁₂ zur Verfügung, wird die Folsäurewirkung beeinträchtigt. Etwa 50% des Gesamtfolats im Körper werden in der Leber in Konjugation mit Polyglutamat gespeichert. Mehr als 95% des Folates im Blut sind in den Erythrozyten lokalisiert. Folatbindende Proteine wurden auch im Gehirn und im Rückenmark entdeckt. Die Folatkonzentration in der Zelle ist ähnlich wie die Konzentration folatutilisierender Enzyme. Dies hat zur Folge, dass kein freies intrazelluläres Folat vorhanden ist. Die Ausscheidung erfolgt über Harn, Galle und Stuhl (*Snodgrass* 1992). Die Folsäure wird während der Erythropoese in die roten Blutzellen eingebaut. Der Folatstatus wird durch Serum- und Erythrozytenkonzentration reflektiert. Dabei lässt der Serumspiegel Rückschlüsse auf kürzliche Folateinnahmen zu, wohingegen sich der Spiegel der roten Blutzellen erst nach 16 bis 18 Wochen Folsäuremangel ändert. Die Halbwertszeit von Folsäure beträgt im menschlichen Körper 100 Tage (*Butterworth* und *Bendich* 1996). Die Folatausscheidung im Urin wird durch den Grad der Folatreabsorption in den proximalen Tubuluszellen der Niere reguliert. Somit spielt die Niere eine wichtige Rolle für die Folaterhaltung (*Sikka* und *McMartin* 1998).

Die Folsäurekoenzyme dienen der Aktivierung und Übertragung von Einkohlenstoffgruppen (C₁-Einheiten), was sie u. a. für die DNA-Synthese und -Methylierung, Zellteilungsvorgänge und das Gewebewachstum essentiell macht. Es existieren verschiedene Formen der Folsäure, wovon hauptsächlich die Tetrahydro-Derivate mit vielen Glutaminsäureeinheiten in den γ -Peptidketten biologisch wirksam sind. Diese Konfigurationen sind resistent gegen α -Peptidasen, wie z. B. Trypsin. Um Folsäure intestinal absorbierbar und damit optimal wirksam zu machen, ist die vorherige Spaltung durch Konjugasen (Pteroyl-Polyglutamyl-Hydrolase) notwendig (*Butterworth* und *Bendich* 1996). Da die Folsäurekonjugase ein Zink-Metalloenzym ist, wird Folsäurepolyglutamat im Intestinum bei Zinkmangel vermindert absorbiert (*Czeizel* 1995).

Barber et al. (1999) wiesen auf das Vorhandensein verschiedener Folatezeptoren (FR) im Körper hin. Demnach befinden sich in der Plazenta auf der maternalen Seite FR- α und FR- β . Der FR- α ist weiterhin im Bronchiolen- und Bronchusepithel, in den Pneumozyten der Lunge, im Bürstensaum des proximalen Tubulus der Niere, im Plexus choroideus, in der Schilddrüse und im Eileiterepithel anzutreffen. Die höchste Bindungsaffinität für 5-Methyltetrahydrofolat besitzt der FR- α . Außerdem existieren ein FR- γ und ein Folatezeptorpseudogen, über die bisher jedoch wenig bekannt ist. Die hohe Konzentration der Folatezeptoren in der mütterlichen Plazenta, im Synzytiotrophoblasten und im fetalen Neuroepithel weist auf die bedeutende Rolle des Folsäure in der Embryogenese hin. Methionin ist eine essentielle Aminosäure, aus der nach Abgabe der C₁-Gruppe Homozystein hervorgeht. Die dabei frei werdende Methylgruppe dient u. a. der Methylierung von DNA, Proteinen und Lipiden, wobei das S-Adenosylmethionin der wichtigste Methylgruppendonator ist. Homozystein kann bei Vorhandensein von 5-Methyltetrahydrofolat und Vitamin B₁₂ zu Methionin remethyliert werden. Durch Fehler bei dieser Regeneration ist eine Akkumulation von potentiell toxischem Homozystein (sowohl Homozystein als auch Homozystin) möglich. Ein alternativer Reaktionsweg wäre die Umwandlung von Homozystein zu Zystein mit Hilfe von Vitamin B₆ als Kofaktor (*Butterworth und Bendich* 1996, *Eskes* 1997). In der Schwangerschaft führt die verminderte Methioninsynthaseaktivität zu Wachstumsretardation und erhöhtem Auftreten von Fehlbildungen beim Fetus. Nach *Fujinaga und Baden* (1994) kann hier Methionin, aber nicht Folsäure, präventiv wirken. Zu einem Anstieg des Homozysteinspiegels im Blut kommt es durch Folsäuremangel, Mutation des Enzyms 5,10-Methyltetrahydrofolatreduktase (5,10-MTHFR), oder beides (*Eskes* 1998). Es sind mehrere Polymorphismen (z. B. 677 C \rightarrow T, 1298 A \rightarrow C, 919 Aspartat \rightarrow Glyzin) im Gen für das Enzym 5,10-MTHFR bekannt. Dadurch können 25 bis 50% aller Neuralrohrdefekte erklärt werden (*Ou et al.* 1996, *Copp* 1998, *Eskes* 1998, *Hol et al.* 1998, *Molloy et al.* 1998). An Hühnerembryonen konnte festgestellt werden, dass Homozystein Neuralrohrdefekte induziert. Dieser teratogene Effekt wurde an Ratten bislang nicht nachgewiesen. Bei Frauen, deren geborene Feten

Neuralrohrdefekte aufwiesen, war die Homozysteinkonzentration im Blut und im Fruchtwasser leicht erhöht (*Copp* 1998). *Eskes* (1997) und *Hol* et al. (1998) bestätigen das vermehrte Auftreten von Neuralrohrdefekten bei Neugeborenen, wenn deren Mütter in der Schwangerschaft eine Hyperhomozysteinämie zeigen. *Eskes* (1998) beschrieb einen gestörten Homozysteinmetabolismus bei mindestens 22% der Mütter, die bereits ein Kind mit einer Form des Neuralrohrdefektes zur Welt gebracht hatten. Diese Hyperhomozysteinämie könne mit der täglichen Gabe von 0,5 bis 1,0mg Folsäure behandelt werden. Laut *Pietrzik* et al. (1997) erlitten 50% der Frauen mit genetisch bedingter Hyperhomozysteinämie Fehlgeburten. Eine erhöhte Homozysteinkonzentration kann embryonale Zellen schädigen bzw. die Transmethylierung von S-Adenosylmethionin zu S-Adenosylhomozystein hemmen, wodurch die Methylierung verschiedener Methylakzeptoren (DNA, tRNA, Proteine) verhindert wird (*Stegers-Theunissen* et al. 1993). Der gesteigerte Blutplasmahomozysteinspiegel ist gleichzeitig ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (*Sikka* und *McMartin* 1998). Die Niere als Hauptort für die Exkretion von Blutplasmahomozystein besitzt die Kapazitäten für die Metabolisierung akut erhöhter Blutplasmahomozysteinkonzentrationen (*House* et al. 1998). Allerdings ist diese Metabolisierung im Vergleich zu anderen Stoffen eingeschränkt, da es sich hier um eine mit Schwefel substituierte Verbindung handelt. *Tamura* et al. (1999) ermittelten an Sprague-Dawley-Ratten eine Reduzierung der hepatischen Methioninsynthaseaktivität um 21% bei Kupfermangel. Die Folatkonzentrationen in Blutplasma, Erythrozyten und Leber waren dabei nicht verändert, jedoch zeigte sich ein Anstieg der Blutplasmahomozysteinkonzentration, weshalb Kupfermangel als ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen wird. *Hishida* und *Nau* (1998) machen die Produktion reaktiven Sauerstoffes während der Autooxidation für den toxischen Effekt des Homozysteins verantwortlich. Sie untersuchten an der Maus die Wirkungen des antiepileptischen Medikamentes Valproat®, welches in der Lage ist, Neuralrohrdefekte hervorzurufen. Durch die intraperitoneale Injektion von 2,1mmol Valproat®/kg Lebendmasse (LM) kam es zum Anstieg der Blutplasmahomozysteinkonzentration. Diese wurde bei gleichzeitiger Gabe

von 4mg Folat/kg LM gesenkt. Valproat® induzierte eine Stunde nach Applikation einen Methioninmangel, die Hemmung des Folatmetabolismus und der Homozysteinremethylierung, den Anstieg von Aminothiol und die Suppression des reduzierten Glutathions im mütterlichen Blut. Die Teratogenität des Medikamentes wird durch Folatmangel potenziert und durch Folatergänzung reduziert. Ähnliche Ergebnisse erzielten *Alonso-Apperte et al.* (1999) bei der Untersuchung von Wistar-Ratten. Nach *Lucock et al.* (1994) vermag Pteroylmonoglutamat das endotoxische Homozystein zu reduzieren, die Methenyltetrahydrofolatreduktase zu hemmen und C₁-Einheiten in DNA-Thymin weiterzuleiten. Darauf beruht der präventive Effekt des Pteroylmonoglutamat auf Neuralrohrdefekte.

Folsäure spielt eine wichtige Rolle für die Organogenese und damit für den Neuralrohr- und Gaumenschluss während der ersten Schwangerschaftswochen. Daher ist ein adäquates Folatangebot vor, während und nach der Konzeption, d. h. perikonzeptionell (drei Monate vor und drei Monate nach Befruchtung) von großer Bedeutung (*Koletzko und von Kries* 1995, *Butterworth und Bendich* 1996). Der Folsäurebedarf ist während der Schwangerschaft doppelt so hoch (300µg) wie unter normalen Umständen (150µg). Gründe dafür sind das Wachstum mütterlicher Gewebe (Uterus, Plazenta, Mammae, Blutzellen), die Entwicklung des Fetus, eventuell erhöhte renale Verluste sowie die eventuell verminderte Folatabsorption in der Schwangerschaft (*Pietrzik et al.* 1997, *Barber et al.* 1999).

Czeizel (1995) nannte als weitere Ursache für den gesteigerten Folatverbrauch während der Schwangerschaft den verstärkten Zerfall von Folat zu p-Aminobenzoylglutamat und p-Azetamidobenzoylglutamat.

Durch die Gabe von Folsäure werden ein höheres Geburtsgewicht sowie ein Rückgang der Frühgeburten erreicht (*Heid et al.* 1992, *Hall und Solehdin* 1998). Der Folatspiegel im Fruchtwasser, mütterlichen und fetalen Blut unterschied sich nicht zwischen Schwangerschaften mit Neuralrohrdefekten und Kontrollgruppe. Dafür zeigte sich eine niedrigere Vitamin B₁₂-Konzentration im Fruchtwasser der Frauen, deren Feten Neuralrohrdefekte aufwiesen. Die Vitamin B₁₂-Konzentration im mütterlichen Serum war hingegen nicht reduziert (*Magnus et al.* 1986, *Economides et al.* 1992). Die Blutplasmakonzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆

unterschieden sich nach Angaben von *Eskes* (1997) nicht zwischen Schwangerschaften mit und ohne Neuralrohrdefekte. Nach *Thorand et al.* (1996) liegen bei Feten mit Neuralrohrdefekten der Serumfolatspiegel und die Folatkonzentration der Erythrozyten deutlich über denen der Mütter. *Butterworth* und *Bendich* (1996) sowie *Dawson et al.* (1998) beschrieben durchschnittlich niedrigere Vitamin B₁₂- und Folatkonzentrationen in Schwangerschaften mit Neuralrohrdefekten als normal. Die Senkung der Konzentration von Vitamin B₁₂ und Folat im Fruchtwasser mit fortschreitender Schwangerschaft ist auf die progressive Akkumulation von Wasser in der Amnionflüssigkeit zurückzuführen. Daher wird die Konzentration beider B-Vitamine zwar niedriger, die Menge aber bleibt zwischen 12. und 20. Schwangerschaftswoche wahrscheinlich gleich. Da während der Schwangerschaft die Blutmenge zunimmt, kommt es zu geringeren Folatkonzentrationen bei gleicher Mengenaufnahme.

Folsäuremangelerscheinungen können durch inadäquate Aufnahme (besonders bei Alkoholismus), Absorptionsstörungen (Erkrankungen, Medikamente), unzulängliche Utilisation (Folsäureantagonisten, Enzymmangel, Vitamin C- oder Vitamin B₁₂-Mangel), erhöhten Verbrauch (Schwangerschaft, Säuglinge) oder erhöhte Ausscheidung (Nierendialyse, Vitamin B₁₂-Mangel) verursacht werden (*Swain* und *Clair* 1997). Nach *Hibbard et al.* (1965) existieren verschiedene Gründe für die Manifestation eines Folsäuredefizits. So steigt das Risiko, in einen Mangelzustand zu geraten, bei Multigravidität um das dreifache im Vergleich zu Erstgebärenden. Auch jüngere Frauen, die sich nicht ausgewogen ernähren und erst spät zur pränatalen Vorsorgeuntersuchung erscheinen, leiden häufiger unter Folatmangel. Bei Schwangerschaften, die innerhalb eines kurzen Zeitraumes liegen, können die Folatreserven nicht schnell genug aufgebaut werden. Eine ähnliche Situation ist während bzw. kurz nach der Pubertät gegeben (*Pietrzik et al.* 1997). Bei Zwillingsgeburten besteht in 56% der Fälle ein Folatmangel, bei Drillingen sogar in 100% der Schwangerschaften. Weiterhin können die Absorption und der Metabolismus von Folat gestört sein. Der Folatmetabolismus wird unter anderem durch antiepileptische Medikamente, Barbiturate, langwirksame Sulfonamide sowie Bakterienintoxikation und Helmintheninfektionen im

Darm beeinträchtigt (*Hibbard et al. 1965*). Das krampflösende Carbamazepin z. B. bewirkt die Inhibition der Reaktion: Folat? β -Methyltetrahydrofolat (*Lucock et al. 1994*).

Frauen mit Folsäuremangel haben bereits Symptome, bevor sich die Anämie manifestiert. Dazu zählen Müdigkeit, Lustlosigkeit, Anorexie und Veränderungen des Kopfhaares (Glanzverlust, Tendenz zu brechen). Ein defekter Folatmetabolismus während der Schwangerschaft kann sich u. a. in Plazentaablösung, Abort oder Fehlbildung des Embryos/Fetus äußern. Bei 65% der Mütter mit fehlgebildeten Feten wurde ein Folsäuremangel nachgewiesen (*Hibbard et al. 1965, Stone 1968*). Im Histidinstoffwechsel wird Formiminoglutaminsäure durch Abspaltung von C₁ (Formiminorest) unter Mitwirkung von Tetrahydrofolsäure in Glutaminsäure umgewandelt. Bei Folsäuremangel ist diese Reaktion beeinträchtigt. Formiminoglutaminsäure wird unter diesen Umständen akkumuliert und verstärkt mit dem Urin ausgeschieden. Dies gilt als sensibelster und zuverlässigster Index für Folsäuremangel (*Stone 1968*).

Im Tierexperiment wurde die Wirkung eines Folsäuremangels auf verschiedene Spezies untersucht. Bei Mäusen zeigte sich, dass ein Folsäuremangel allein nicht in der Lage ist, Neuralrohrdefekte hervorzurufen (*Heid et al. 1992*). In Rattenembryonen kam es durch Folatmangel zu Wachstumsstörungen, geknickten Neuralrohren und einer schlechten Entwicklung von Vorder- und Mittelhirn. Neuralrohrdefekte fand man bei 20% der Embryos, andere kongenitale Anomalien bei 60% der untersuchten Tiere. Ein kombinierter Folat- und Zinkmangel rief mehr Anomalien hervor, als die Summe der beiden einzelnen Mangelzustände (*Heid et al. 1992*). Folatmangel und -überschuss bewirkten bei trächtigen Nagern reduzierte Wurfgrößen und Entwicklungsstörungen der Gehirne der Feten. Das bedeutet, dass die Symptome von Hyper- und Hypovitaminose ähnlich sind (*Snodgrass 1992*).

Ebenso wie die Folsäure ist auch das Vitamin B₁₂ unerlässlich im Methylierungszyklus. Das Vitamin B₁₂ (Kobalamin) ist in zahlreichen Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs enthalten. Mangelsituationen findet man bei strengen Vegetariern, Patienten mit Gastrektomie, Morbus Crohn

und anderen Erkrankungen, welche die Absorption im Dünndarm negativ beeinflussen.

Seltener sind Störungen des Vitamin B₁₂-Metabolismus und -Transports. Die Hauptmerkmale des Vitamin B₁₂-Mangels sind makrozytäre megaloblastische Anämie und Neuropathie. Folsäure kann den Effekt des B₁₂-Mangels auf die Methylierung von Methionin nicht korrigieren. Wichtig ist die Erkenntnis, dass Folsäure die Neuropathie bei Vitamin B₁₂-Mangel zwar nicht verhindert, sie aber auch nicht beschleunigt (*Bower und Wald* 1995).

Mills et al. (1989) fanden keine Beeinflussung des Vorkommens von Neuralrohrdefekten durch die perikonzeptionelle Einnahme von Folsäure. Auch die Untersuchungsergebnisse von *Hayes et al.* (1996) deuten nicht auf einen protektiven Zusammenhang zwischen der perikonzeptionellen Folsäuregabe und dem Risiko orofazialer Spalten hin. Im Gegensatz dazu berichten *Bower und Stanley* (1989) von einer sinkenden Zahl der Neuralrohrdefekte mit steigendem Folatangebot in der frühen Schwangerschaft. Laut *Essien und Wannberg* (1993) soll Methionin, und nicht Folsäure oder Vitamin B₁₂, die Frequenz von Neuralrohrdefekten beeinflussen. Durch Zufuhr von Methionin konnte das Auftreten von Neuralrohrdefekten an Mäusen um 41% reduziert werden. Die Einnahme eines Vitaminpräparates ohne Folsäure sowie die alleinige Gabe von Mineralien sind laut MRC ineffektiv in Bezug auf die Prävention von Neuralrohrdefekten (*Hall und Solehdin* 1998). Andere Autoren befürchten die Verschleierung der perniziösen Anämie bei älteren Menschen mit Vitamin B₁₂-Mangel ab Folatkonzentrationen von 200µg/d (*Skeaff und Mann* 1998). Auch *Bower* (1995) sieht in der Anreicherung von Lebensmitteln eine mögliche Gefahr für Menschen mit unbehandeltem Vitamin B₁₂-Mangel und Patienten mit Epilepsie, die mit krampflösenden Mitteln behandelt werden. *Czeizel* (1998) hält bei Folsäuresupplementationen in physiologischen Dosen (<1mg/d) eine Maskierung der perniziösen Anämie für relativ unwahrscheinlich. Zudem kommt diese Erkrankung nur mit einer Prävalenz von 1:1000 und hauptsächlich im höheren Alter vor. Frauen im gebärfähigen Alter sind nur sehr selten betroffen. Außerdem sei die perniziöse Anämie komplett reversibel durch parenterale Gabe von Vitamin B₁₂.

Da Vitamin C der Oxidation von Tetrahydrofolsäure entgegenwirken kann und dadurch das Auftreten von Neuralrohrdefekten reduziert wird, ist es empfehlenswert, ein folsäurereiches Multivitamin anstelle isolierter Folsäure zu verabreichen (*Czeizel* 1995). Die Gabe von Folsäure zusammen mit Eisen und Vitamin C wirkt vorbeugend bzw. therapeutisch auf die megaloblastische Anämie bei schwangeren Frauen, schützt jedoch nicht ausreichend vor Aborten, Fehlbildungen des Embryos/Fetus und Plazentaablösungen (*Hibbard et al.* 1965). Die Behandlung von Folsäuremangelzuständen sollte mit 1mg Folsäure/Tag erfolgen (*Swain und Clair* 1997).

Durch die Einnahme eines folsäurehaltigen Multivitaminpräparates können totale Fehlbildungen um 50% und Defekte des Urogenitaltraktes um 78% reduziert werden (*Butterworth und Bendich* 1996). Das Auftreten kardiovaskulärer Defekte wird nach *Czeizel et al.* (1994) um 52% und nach *Shaw et al.* (1994, 1995b) um 35% reduziert. Extremitätenfehlbildungen gehen um 35% zurück (*Shaw et al.* 1994, 1995b).

Da die Nebenwirkungen der Folsäure noch nicht ausreichend bekannt sind, sollten Frauen, die zu keiner Risikogruppe zählen, Folat nicht in großen Mengen, sondern in physiologischen Dosen konsumieren. Bei exzessiver Folsäureaufnahme besteht die Gefahr, dass die Absorption anderer Nährstoffe kompetitiv gehemmt wird (*Murphy* 1992). *Achon et al.* (1999) untersuchten die Wirkung langanhaltender Einnahmen hoher Folsäurekonzentrationen an Ratten. Es gab zwei verschiedene Diäten (2mg Folsäure/kg LM und 40mg Folsäure/kg LM), die jeweils über einen Zeitraum von drei Wochen verabreicht wurden. Dabei waren Gewicht und Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Feten der 40mg-Gruppe niedriger als in der 2mg-Gruppe.

Hypervitaminosen sind bei Folsäure kaum bekannt. Erst durch eine intravenöse Injektion von 15mg Folsäure wurden epileptiforme Aktivitäten beim Menschen festgestellt, weil Folat mit antiepileptischen Agenzien um Bindungsstellen im Gehirn konkurriert (*Swain und Clair* 1997). Weiterhin ist die Interaktion mit Folatantagonisten (Methotrexat) bekannt. Im Gegensatz dazu bewirkte die Verabreichung von 1mg Folsäure/Tag über sechs Monate eine Verminderung der Methotrexattoxizität (ohne Beeinflussung

der Therapiewirksamkeit) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit niedrigen Dosen Methotrexat behandelt wurden (*Hathcock 1997*).

2.2. Thiozyanat

Aus der chemischen Reaktion von Schwefel mit Zyanid resultiert Thiozyanat (Rhodanid). Es wird zur Gruppe der Vitaminoide gezählt (*Kramer und Böhland 1996*).

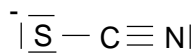


Abb. 2. Strukturformel des Thiozyanat

Thiozyanat (SCN^-) kann zu 60 bis 70% endogen gebildet sowie mit der Nahrung aufgenommen werden (*Weuffen und Kramer 1987, Thürkow et al. 1992, Kramer und Böhland 1996*). Besonders thiozyanathaltig sind Brassicapflanzen wie Wirsing Kohl, Brokkoli, Chinakohl, Meerrettich und Kohlrabi. Auch in der Kuhmilch, im Speisesenf, im Sauerkraut und in unterschiedlichen Milcherzeugnissen ist der SCN^- -Gehalt relativ hoch (*Thürkow und Weuffen 1981, Weuffen et al. 1990a, Thürkow et al. 1992*). Die durchschnittliche alimentäre Aufnahme von Natriumthiozyanat (NaSCN) beträgt etwa 3mg/d, jedoch sollten nach *Kramer et al. (1998)* 6-8mg/d angestrebt werden. Dieser Wert wird z. B. durch laktovegetabile Kost, vorzugsweise in Form von Rohkost, und durch Rauchen erreicht. Durch das Erhitzen der Lebensmittel mit Wasser werden Zellwände zerstört, sodass das wasserlösliche SCN^- in Lösung geht (*Leitzmann und Watzl 1986, Grisk 2004, Thürkow und Weuffen 2004*). Thiozyanat kommt in der Natur ubiquitär, d. h. in Mikroorganismen, Pflanzen, Tier, Mensch, Boden, Luft und Wasser, vor (*Weuffen et al. 1990a, b*).

Thiozyanat hat keine direkte oder spezifische Wirkung auf die Immunantwort, sondern verursacht die Beeinflussung der Zellmembranpermeabilität und die Förderung von Enzymaktivitäten. Dieser Effekt ist besonders an

proliferierenden Geweben nachweisbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Thiozyanat zur Aufrechterhaltung von Zellfunktionen essentiell ist (*Kramer und Böhland 1996*). Die Penetration von Thiozyanat durch Zellmembranen ist spezies- und organspezifisch. Sie erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten. Thiozyanat ist in der Lage, mit Ausnahme der Blut-Hirn-Schranke, alle Kapillaren zu passieren (*Grisk 2004*).

Zu den physiologischen Wirkungen des Thiozyanats zählen außerdem die potenzierende Wirkung auf muskelkontraktionsauslösende Reize, sowie die aktivierende Beeinflussung von Östrogen- und Androgenrezeptoren. Thiozyanat wirkt durch die Verstärkung des Norepinephrin-induzierten vaskulären, glatten Muskeltonus vasoregulierend, was auf eine veränderte Aktivität der Kalzium-Kanäle durch SCN^- zurückzuführen ist (*Engström und Sehlin 1996*).

Eine Vielzahl biologischer Effekte von Thiozyanat geht mit einer Änderung der Wasserstruktur einher. Dies geschieht als Folge der Anionenbindung mit der kationischen Bindungsstelle im Rezeptorareal von Enzymen (*Fridovich 1963*). SCN^- wird im Serum hauptsächlich an Albumin gebunden (*Scatchard et al. 1950, Scatchard und Yap 1964, Jess und Weuffen 1984*). Die Bindung des Thiozyanats an Proteine erfolgt vorwiegend durch elektrostatische Anziehungskräfte. Diese zumeist schwachen Bindungen werden bei der Denaturierung des Proteins größtenteils gelöst (*Vaney et al. 2001, Below und Weuffen 2004*).

SCN^- kann als Brückenglied zwischen organischer und anorganischer Materie angesehen werden (*Schulz 1997*). Im Bereich der Körperöffnungen, welche eine Eintrittspforte für Mikroorganismen darstellen, ist die SCN^- -Konzentration besonders hoch (*Weuffen et al. 1984c*). Thiozyanat ist durch sein Vorkommen in Sekreten (Speichel, Milch, Nase, Tränen), in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie in Makrophagen an der unspezifischen Immunantwort beteiligt (*Paetzelt et al. 1984, Paetzelt und Lüdde 1987*). Als bedeutungsvoll erwies sich der Einfluss des Thiozyanatgehaltes auf die Konsistenz von Körperflüssigkeiten und Geweben. So wirkt es z. B. auf die Sekrete der Atemwege verflüssigend (*Jülich et al. 1990*). Auch am Auge ist die Aufrechterhaltung der Konsistenz zur Gewährung der Sehleistung von funktioneller Bedeutung (*Weuffen et al.*

1990c). Der menschliche Körper verfügt über vier Peroxidasen: die Thyroid-Peroxidase, die Laktoperoxidase, die eosinophile Peroxidase und die Myeloperoxidase. Alle benötigen für ihre Funktion Halogenide bzw. das Pseudohalogenid (Chlorid, Bromid, Iodid und Thiozyanat) als Kosubstrat. Während die Thyroid-Peroxidase an der Produktion der Schilddrüsenhormone beteiligt ist, spielen die anderen drei bei der Abwehr körperfremder Stoffe eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage, die Halogenide bzw. Thiozyanat in starke Oxidationsmittel umzuwandeln, die dann eingedrungene Krankheitserreger zerstören (*Decker 2004*). Auch *Vobis (1992)* weist auf die antimikrobielle Effektivität des Laktoperoxidase- H_2O_2 -Thiozyanat-Systems hin, wobei die biologische Wirkung des Thiozyanats stark vom Verhältnis $\text{H}_2\text{O}_2:\text{SCN}^-$ abhängt. HO_3SCN gilt als mikrobizides Agens (*Weuffen et al. 1987*). Mikroorganismen besitzen eine unterschiedliche SCN^- -Toleranz. Daher ist es möglich, dass die Proliferation bestimmter Mikroorganismen durch SCN^- gefördert wird. So spielt die Stabilisierung der Kolonisationsresistenz bei der Förderung der physiologischen Darmflora eine Rolle (*Kramer und Weuffen 1990*). Nach einer intravenösen bzw. intraperitonealen Applikation kommt es zur Anreicherung des Thiozyanats an den Wänden der Blutgefäße. Von dort gelangt es in geringem Ausmaß in das ZNS (besonders hohe Konzentration in der Hypophyse), in verschiedene Gewebe des Auges (Retina, Sklera, Kornea, periphere Linsenanteile) sowie in Knorpel und Knochen. In Knochenmark, Zähnen und Lymphgewebe konnte keine SCN^- -Akkumulation nachgewiesen werden (*Weuffen und Kramer 1987*). Histochemische Untersuchungen der Enzyme Thiosulfat-Zyanid-Sulfurtransferase (Rhodanase) und Cytochromoxidase im Knorpel- und Knochengewebe zeigten, dass deren Aktivität in ruhenden Zellen geringer ist als in proliferierenden. Die Thiosulfat-Zyanid-Sulfurtransferase katalysiert die Bildung von SCN^- aus endogenem CN^- . Die verminderte Menge an endogenem CN^- führt zur Aktivitätserhöhung der Cytochromoxidase. Dies bewirkt eine Steigerung der terminalen Oxidation und damit eine Erhöhung des oxidativen Stoffwechsels. Bei Chinchillahäsinnen, deren Hüftgelenksregionen untersucht wurden, nahm die Aktivität in der Reihenfolge: Gelenknorpel, neugebildetes Knochengewebe, junges präexistierendes

lamelliertes Knochengewebe, altes präexistierendes lamelliertes Knochengewebe ab (Bély und Tanka 1984). Die menschliche Rhodanase zeigt eine 90,2%ige Identität in der Sequenz im Vergleich mit der Rhodanase bei Ratten (Aita et al. 1997). Unterschiedliche Faktoren können zum Anstieg bzw. zum Abfall des SCN⁻-Serumspiegels bei Säugetier und Mensch führen. Erhöht ist die Thiozyanatkonzentration bei Immunisierung, Fieber nach Pyrogenapplikation, Infektionen, Gestosen, Tumoren (Jülich und Weuffen 1984), Aufenthalt in industriellen Ballungsgebieten, SCN⁻-reicher Ernährung und durch Rauchen (Depersdorff und Augsten 1984). Eine Senkung des Thiozyanatspiegels erfolgt durch hormonelle Antikonzeption, Gravidität, zystische Fibrosen, starken Stress, Kachexie und Muskeldystrophie, postoperativ bei parenteraler Ernährung, Hämodialyse und durch thiozyanatarme Ernährung (Kramer et al. 1996a). Starker Stress (experimentelle Brandwunde) führt beim Meerschweinchen zu einer Erniedrigung des Thiozyanat-Serumspiegels, wohingegen schwacher Stress (wiederholte Blutentnahme) dessen Erhöhung verursacht (Kramer et al. 1979). Einige Thiozyanatwirkungen, z. B. die antimikrobielle, die thyreostatische oder die toxische, werden u. a. auf ihre Metabolite wie das Thiozyanogen ([SCN]₂), das Hypothiozyanat (OSCN⁻) oder das Zyanid (CN⁻) zurückgeführt (Grisk 2004).

Lange Zeit wurde Thiozyanat als metabolisch passiv angesehen, weil der größte Teil renal unverändert ausgeschieden wird. Es wurde jedoch anhand radioaktiver Methoden nachgewiesen, dass ein Teil des zugeführten Thiozyanats zu Zyanid und Sulfat metabolisiert wird. Zwischen Thiozyanat und Zyanid besteht ein metabolisches Gleichgewicht, d. h. vom Zyanid-Pool des Organismus wird ein Teil wieder zu Thiozyanat umgewandelt (Detoxikation). Der dafür benötigte Schwefel ist endogener Herkunft (Schwefel-Pool). Der Kohlenstoff aus dem Zyanid wird zu ca. einem Drittel in Kohlendioxid umgewandelt, teilweise tritt er in den Kohlenstoff-Pool ein. Dieser metabolische Kreislauf wird als Thiozyanat-Zyanid-Zyklus bezeichnet (Grisk 2004).

SCN⁻ wird in der Schilddrüse kaum gespeichert, jedoch metabolisiert und synthetisiert, was durch die hohe Aktivität der Thiosulfat-Zyanid-Sulfurtransferase zum Ausdruck kommt. Eine strumigene Wirkung kann nur

durch toxische SCN^- -Dosierungen hervorgerufen werden (*Kramer et al. 1998*). Es wird zwischen einer zentralen und einer peripheren Wirkung des Thiozyanats auf die Schilddrüse unterschieden, deren komplexe Einflüsse und Wechselwirkungen jedoch bis heute nicht vollständig geklärt sind (*Jülich et al. 1987*). Noch 1984 wies *Michajlovskij* auf die strumigene Wirkung von SCN^- besonders bei Iod-Mangel hin. Auch er beschrieb, wie *Kramer et al. (1998)*, eine Adaptation des Organismus bei chronischer SCN^- -Gabe durch verminderte tubuläre Reabsorption in der Niere (*Michajlovskij 1984*). Beim Meerschweinchen bewirkte die 100fache Dosis der alimentären SCN^- -Aufnahme (32mg NaSCN/kg LM oral, 21 Tage lang) weder histologisch, morphometrisch noch klinisch eine thyreostatische Wirkung. Diese Ergebnisse stützen die Auffassung, wonach SCN^- in physiologisch angepasster Dosierung nicht strumigen wirkt, sondern vielmehr eine regulatorische Bedeutung für die Schilddrüsenfunktion besitzt (*Kramer et al. 1990*). Untersuchungen von *Höbel et al. (1967)* zufolge verdrängt Thiozyanat das Iodid in den Iod-speichernden Organen (Schilddrüse, Speicheldrüsen, Magendrüse und Bronchialdrüsen), was mit der größeren Assoziationskonstante des Thiozyanats erklärt werden kann (*Azzone und Massari 1973*). Da das Thiozyanat durch den Na^+/I^- -Symporter des Schilddrüsengewebes entgegen einem elektrischen Gradienten transportiert wird, hemmt es kompetitiv die Iodid-Aufnahme (*Carrasco 1993*). Ein Hyperthyreodismus, durch Thyroxin oder Triiodthyronin verursacht, führt zu einem Anstieg des Serum-Thiozyanats. Als Auslöser kommen hier Verdrängungsprozesse in Frage (*Jirousek 1956*). Viele einwertige Ionen, darunter Thiozyanat, können die Iodid-Aufnahme aus dem Plasma in die Schilddrüse konzentrationsabhängig kompetitiv hemmen und dadurch die Bildung der Schilddrüsenhormone auf der ersten Synthesestufe vermindern (*Wood und Kingsland 1950, Wyngaarden et al. 1952, 1953, Wolff 1964, Alexander und Wolff 1966, Greer et al. 1966, Jülich et al. 1987, Ekholm 1990*). Demnach lässt sich die strumigene Thiozyanatwirkung durch zusätzliche Iodidzufuhr aufheben (*Delange et al. 1978, Saarivirta und Kreula 1982*).

In der Umwelt und der Nahrung von Mensch und Tier kommt Thiozyanat in Konzentrationen vor, die um Zehnerpotenzen niedriger sind als diejenigen,

die aus pharmakologischer und toxikologischer Sicht eine Rolle spielen würden. Da Thiozyanat-Ionen renal schnell ausgeschieden werden, ist bei natürlicher Einwirkung von SCN^- keine Überdosierung oder Kumulation zu erwarten (Grisk 2004).

Die letale Dosis beträgt bei der Ratte 765mg/kg LM (Nichols 1925). Beim Menschen wird die akute Dosis letalis mit 0,3 bis 100g angegeben (Grisk 2004). Bancroft und Rutzler (1932) beobachteten bereits bei einer Dosierung des Natriumthiozyanat von drei mal 100mg/d in der 1. Woche und zwei mal 100mg/d in der 2. und 3. Woche Schwindel, Schwäche, Kopfschmerz, Brechreiz, Atembeschleunigung, Halluzinationen, sogenannte Thiozyanat-Psychosen, spastische Paresen, Krämpfe, Hör- und Sehstörungen bei Thiozyanatspiegeln von höher als 150mg/l. Eine erythrostatische Wirkung beginnt bei einem Thiozyanatserumspiegel zwischen 100 und 150mg/l (Jorke und Beickert 1955).

Weuffen et al. (1980) stellten allerdings bei einer Gabe von 600mg NaSCN täglich für die Dauer von fünf Tagen an zwölf freiwilligen ärztlichen Probanden keine subjektiven Nebenwirkungen fest.

In der Tierhaltung kommt Thiozyanat u. a. zur Förderung der Infektionsabwehr und Körpermassezunahme, Verbesserung der Qualität von Schlachtfleisch und Rohmilch beim Rind, Verbesserung der Fertilität und Wurfsergebnisse, Förderung der Wollbildung beim Schaf (Kramer et al. 1996b) und Verbesserung des Gesundheitszustandes beim Schwein (Bredereck et al. 1977) sowie der Förderung der humoralen Antikörperbildung zur Anwendung (Weuffen et al. 1975, Jülich et al. 1984, Kramer und Böhland 1996). Die Unterstützung der Wundheilung könnte möglicherweise auf die proliferationsfördernde Eigenschaft des Thiozyanats zurückgeführt werden (Koch et al. 1990). Beim Menschen bewirkt SCN^- die Regenerationsförderung von Zellen und Geweben, die Stimulierung von Resistenz und Immunität, die adjuvante Beeinflussung von Entzündungsprozessen (Kramer et al. 1994) sowie von chronisch verlaufenden Organerkrankungen.

Weiterhin wurde eine protektive Wirkung bei Stress, Exposition gegenüber Radikalen, lokaler und systemischer Einwirkung chemischer Noxen bzw. Mutagene und Teratogene sowie bei Zytostatikatherapie nachgewiesen

(Nagasawa et al. 1980, Grisk et al. 1982, Böhland 1982, 1986, Kramer et al. 1987b, Weuffen et al. 1990b, Kramer und Böhland 1996). Als Gifte kamen u. a. Formaldehyd, Schwefeldioxyd, Phosphorsäure, Tetrachlorkohlenstoff, phenolische Desinfektionsmittel, Ethanol und die Zytostatika Cyclophosphamid und Procarbazinehydrochlorid (Natulan®) zum Einsatz (Weuffen und Weingärtner 2004). Die Mutationsrate wurde im Tierversuch (bone-marrow-Test an der Maus) durch Thiozyanat herabgesetzt (Kramer et al. 1983). Darüber hinaus zeigte sich eine Schutzwirkung bei experimenteller Mutagenese anhand des Spermakopftestes an der Maus (Koch 1989, Koch et al. 1989). Kramer et al. (1987a) und Kühn (1998) wiesen den antiteratogenen Effekt von SCN^- unter Cyclophosphamidapplikation bei den Spezies Maus und Meerschweinchen nach. Die Verabreichung von SCN^- bewirkte eine Verringerung der durch Cyclophosphamid induzierten Fehlbildungen und ein Absinken der Fruchtresorptionsrate (Neumann und Frömmel 1986). Zur Entfaltung seines protektiven Effektes benötigt das Thiozyanat eine gewisse „Vorlaufzeit“. Es sollte schon einige Zeit vor Einwirkung der Noxe eine Vitalisierung mit SCN^- stattfinden, um den Körper gegen Infektionen gefeit zu machen. Steht Thiozyanat bereits in ausreichendem Maße zur Verfügung, ist durch weitere Zufuhr nicht mit einem augenscheinlichen Anstieg der protektiven Wirkung zu rechnen (Weuffen 2004).

Durch Stimulation des aktiven Na^+/K^+ -Transports weist Thiozyanat einen hypotensiven Effekt auf und kann somit zur Hypertoniebehandlung genutzt werden (Weuffen et al. 1990b). Da die individuelle Ansprechbarkeit jedoch starken Schwankungen unterliegt und die Möglichkeit der Kropfbildung besteht, wird heute von einer Anwendung als Antihypertonikum abgeraten (Grisk 2004). Hochkonzentrierte Thiozyanatlösungen führen aufgrund der chaotropen Wirkung des SCN^- zu einer Inaktivierung von lebenden Strukturen, z. B. von Mikroorganismen. Daher wird Thiozyanat u. a. als Wirkstoff in Mucida®-Präparaten zur Behandlung von Stomatitis, Gingivitis und Alveolarpyorrhoe sowie in Zahnpasten (Midda und Cooksey 1986, Lenander-Lumikari et al. 1993, Kirstila et al. 1994, 1996, Rosin et al. 2001, 2002) und Hautantiseptika eingesetzt (Kramer und Böhland 1996). In der Magenschleimhaut von Ratten verhindert Thiozyanat durch Aspirin

verursachte Hämorrhagien (*Whithouse* und *Rainsford* 1983). Die wachstumsfördernde Wirkung des SCN^- auf rasch proliferierende Gewebe wurde sowohl in Untersuchungen an Pflanzen als auch in Tierexperimenten nachgewiesen (*Grisk* et al. 1982, *Weuffen* et al. 1984b, *Burth* et al. 1986, *Adam* et al. 1987, *Kramer* et al. 1987b, *Jahn* und *Müller* 1990, *Kramer* und *Weuffen* 1990). Die bedeutende Rolle von Thiozyanat bei der Reifung des zentralen Nervensystems junger Ratten wird diskutiert (*Hamida* et al. 2003). Durch physiologische Konzentrationen wird die Ertragsleistung durch Erhöhung des Resistenzniveaus und Stimulierung der Pflanzenentwicklung stabilisiert (*Weuffen* et al. 1984a).

Am Meerschweinchen wurde die Stimulierung des Titers humoraler Antikörper bei täglicher Zufuhr von 215mg SCN^- /kg LM nachgewiesen. Bei höheren Dosierungen sanken der SCN^- -Serumspiegel und der Antikörpertiter. Das heißt, dass durch Überdosierung von SCN^- die Ausscheidung und/oder die Metabolisierung aktiviert werden muss. Bei oraler Thiozyanatapplikation wurden fast 100% höhere SCN^- -Werte im Serum gemessen als bei gleichdosierter subkutaner SCN^- -Gabe (*Kramer* et al. 1987c).

Thiozyanat passiert die Plazentaschranke. Die fetale Thiozyanatkonzentration beträgt etwa ein Drittel der mütterlichen (*Grisk* 2004). Während der Schwangerschaft wurden die höchsten SCN^- -Konzentrationen in Plazenta, Knochen- und Knorpelgewebe, Haut und quergestreifter Muskulatur des Fetus gemessen, da diese Gewebe schon in frühen Entwicklungsphasen eine hohe Stoffwechselaktivität aufweisen (*Weuffen* et al. 1990b). Mit fortschreitender Schwangerschaft kommt es zum Absinken des SCN^- -Serumspiegels der werdenden Mutter. Ursachen dafür sind wahrscheinlich die zunehmende Hydrämie, die Vergrößerung des Kompartiments durch Fruchtwasser und Flüssigkeitsvolumen des Fetus sowie ein möglicher diaplazentarer Ionenaustausch. Der SCN^- -Serumspiegel beträgt bei nichtrauchenden Schwangeren durchschnittlich 3,8mg/l und bei rauchenden Schwangeren 5,5mg/l. Der Thiozyanatgehalt der Milch ist in der ersten Laktationsperiode, besonders im Kolostrum (5mg/l), hoch und nimmt mit dem zeitlichen Abstand von der Geburt ab (*Prott* und *Prott* 1983, *Prott* et al. 1984, 1990).

Eine intravenöse Injektion von 20mg NaSCN hatte keinen schädigenden Einfluss auf den Fetus (*Boulos et al. 1973*) und wirkte auch nicht teratogen (*Ivankovic 1979*).

2.3. Procarbazin

Der Wirkstoff Procarbazin ist ein N-methyliertes und mit Isopropylbenzamid substituiertes Hydrazin.

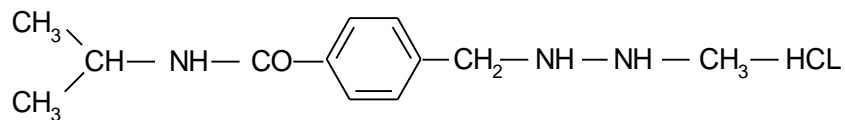


Abb. 3. Strukturformel des Natulan®

Der zytostatische Effekt beruht in erster Linie auf der Freisetzung von Wasserstoffperoxid, das die DNA und RNA fragmentiert. Hydrogenperoxide, Formaldehyd und andere Stoffwechselprodukte des Procarbamins, wie N-Hydroxymethyl-derivate und Formylhydrazin, hemmen die DNA- und RNA-Polymerase (*Moser und Stacher 1986*).

Der antimetabolitische Charakter der Hydrazine basiert biochemisch auf der Öffnung des Pyrimidinringes und der Trennung der Pyrimidinbase von der Nukleinsäure (*Kreybig 1975*). Methylhydrazine führen zum Abfall des Mitoseindex, zur Verschiebung der Mitosephasen sowie zu Chromatidbrüchen (*Rutishauser und Bollag 1963, Weitzel et al. 1964*). Zellzyklusstudien zeigen, dass Procarbazin die Mitose in der prolongierten Interphase (G₂-Phase) unterdrückt (*Dorr und Fritz 1980, Dold et al. 1993*).

Hydrazin hemmt die Bildung der Purindesoxyriboside. Der aus der CH₃-Gruppe von Methylhydrazinen entstehende Formaldehyd hemmt die Bildung der Di- und Triphosphate von Desoxynukleosiden. Die Benzylsubstitution mit N-Isopropyl-carbonamid in p-Stellung hemmt den Eintritt von Nukleosiden und Purinbasen in die Zellen, so dass eine intrazelluläre Verminderung des Gehalts an Nukleosiden und Purinbasen erfolgt. Dies ist

z. B. an der Herabsetzung des Uridin-Einbaus erkennbar (*Weitzel et al. 1967*).

Das systemische Zytostatikum Natulan® wird u. a. zur Therapie der Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin) und anderer Lymphome in der Humanmedizin erfolgreich eingesetzt. Aufgrund seiner teratologischen Wirksamkeit darf Procarbazin nicht an schwangere Frauen verabreicht werden. Bei stark herabgesetzter Anzahl der weißen Blutkörperchen und Blutplättchen sowie schweren Leber- und Nierenschäden ist eine Therapie mit Natulan® ebenfalls kontraindiziert. Die vielfältigen Nebenwirkungen umfassen sowohl Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Anämie als auch gastrointestinale, neurologische und dermatologische Symptome (*Moser und Stacher 1986*).

Die höchste Empfindlichkeit während der embryonalen Gesichtsentwicklung wird bei der Ratte am 11. bis 15. Tag der Gestation erreicht, mit einem Maximum am 13./14. Tag. Während dieser Zeit werden die Primitivanlagen der Gesichtregion ausgebildet (*Hackenberger und Kreybig 1965, Kreybig 1965*).

Procarbazin erzeugt an Ratten Fehlbildungen bei einer Dosis von 150 bis 300mg/kg LM. Am 14. Trächtigkeitstag verabreicht, hat es eine teratogene (schwere Fehlbildungen der Extremitäten und des Gesichtsschädels) sowie eine embryozide Wirkung (Zahl der resorbierten Früchte erhöht) (*Gundlach et al. 1986*). Auch *Stadtkus und Miek (1999)* stellten in ihren Untersuchungen eine erhöhte Resorptionsquote von Feten fest, wenn den Muttertieren Natulan® verabreicht wurde. Die embryotoxische Wirkung war hierbei in der Ruhephase (Natulan®-Tag-Gruppe) stärker als in der Aktivphase (Natulan®-Nacht-Gruppe).

Die Dosis letalis media (DL₅₀) von Natulan® beträgt bei Ratten 350mg/kg LM. Während der embryonalen Entwicklungsphase einmalig verabreicht, beeinträchtigen erst 60-70% der DL₅₀ die Makromorphogenese, jedoch abhängig vom Tag der Applikation auf unterschiedliche Intensität und Art (*Kreybig et al. 1970b*). Die Injektion von 50mg Natulan®/kg LM bewirkt am 14. Trächtigkeitstag, abgesehen von der Wachstumsretardation, keine makroskopischen Fehlbildungen der Feten. Allerdings ist die Entwicklung der Feten post partum (Eruption der Inzisivi, Augenöffnung, Entfaltung der

Ohren) verzögert (*Malek et al. 1996*). *Tuchmann-Duplessis* und *Mercier-Parot* (1967) verabreichten am 8. bis 14. Trächtigkeitstag 5-10mg Procarbazin/kg LM oral an Ratten. Dabei rief die Behandlung vor dem 12. Trächtigkeitstag fast ausschließlich Augendefekte hervor, wohingegen nach dem 12. Tag auch Extremitätenmissbildungen nachgewiesen wurden. An Wistar-Ratten verursachte die Gabe von 200mg Natulan®/kg LM am 14. Trächtigkeitstag eine verzögerte Ossifikation (94% der Feten), Fehlbildungen der Rippen (82% der Feten), Extremitätenfehlbildungen (71% der Feten), Fehlbildungen der Wirbelsäule (35% der Feten) und Fehlbildungen des Beckens (24% der Feten) (*Bienengräber et al. 1996, 1997*). Aufgrund seines Wirkungsmechanismus besitzt Natulan® zytostatische Effekte auch auf Körpergewebe, die sich in schnellerer Proliferation befinden, wie z. B. das hämatopoetische System, Haut und Fortpflanzungsorgane (*Gläser 1980*). Dagegen ist der Einfluss von Procarbazin auf die proliferierenden Zellen der gastrointestinalen Mukosa gering.

Procarbazin wird bei oraler Gabe schnell und vollständig resorbiert. Radioaktiv markiert, wird es nach 30 bis 60 Minuten in Leber, Niere und Haut gefunden (*Schwartz et al. 1967*). Der in der Leber gebildete Hauptmetabolit ist Azoprocarbazin (*Dunn et al. 1979*).

2.4. Methotrexat

Methotrexat (MTX) ist ein orange-braunes, kristallines Pulver. Es ist praktisch unlöslich in Wasser, Äthanol, Äther und Chloroform, jedoch leicht löslich in verdünnten Lösungen von Alkalihydroxid und Alkalicarbonat.

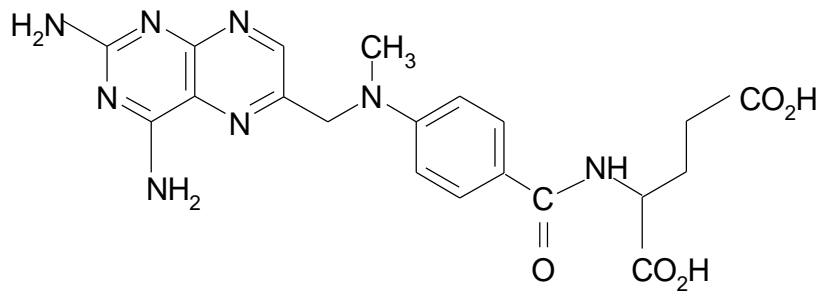


Abb. 4. Strukturformel des Methotrexat

MTX besteht aus einem Pteridinring, p-Aminobenzoesäure und Glutaminsäure.

Methotrexat (Amethopterin) zählt zu den Folsäureantagonisten. Es ist ähnlich strukturiert wie das Vitamin Folsäure und nutzt aufgrund der chemischen Verwandtschaft dieselben energieabhängigen Transportmechanismen für den intrazellulären Übertritt (*Goldmann 1975b, Horne 1993*). MTX bindet mit hoher Affinität an das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR), welches die NADH-abhängige Reduktion der Folsäure in ihre aktive Form Tetrahydrofolsäure (THF) katalysiert. Bei einem pH-Wert von sechs ist die Affinität des MTX zur DHFR 100 000fach größer als die der physiologisch vorliegenden Dihydrofolsäure (DHF). Aufgrund der kleinen Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor-Komplexes muss die Hemmung der DHFR als praktisch irreversibel angesehen werden (*Werkheiser 1963*). Daher gehört diese Substanz zu den stark wirksamen Inhibitoren der DHFR. Das Resultat ist die Verminderung der THF und entsprechender Koenzyme und damit die Hemmung des C₁-Metabolismus (*Juchau 1993, 1997*). Die zytostatische Aktivität wird wesentlich von der intrazellulären Konzentration an freiem MTX bestimmt, da ein niedrig-affines DHFR-Enzym nachgewiesen werden konnte, welches nur durch

hohe MTX-Konzentrationen gesättigt wird (*Borsa und Whitmore 1969, Goldman 1975a*). Einen weiteren wichtigen Faktor stellt der Zellmembrantransport dar, der an Carrier-Systeme gebunden ist und sowohl von Methotrexat als auch von tetrahydrierten Folsäurederivaten in Anspruch genommen wird. In niedriger Dosierung ist dieser Membrantransport energieabhängig, während bei hohen MTX-Dosen zusätzlich eine passive Diffusion stattfindet (*Wilmanns et al. 1980*). Die hohe extrazelluläre Konzentration des Antimetaboliten verhindert gleichzeitig durch Konkurrenz am Carrier den Einstrom der reduzierten Folsäurederivate (*Bender 1975, Goldman 1975b*).

MTX unterliegt einer biphasischen Elimination. Die initiale Phase ist durch eine zweistündige Halbwertszeit (HWZ) gekennzeichnet. In der zweiten Phase, nach ca. 30 bis 48h, verringert sich der Serumspiegel mit einer HWZ von etwa zehn Stunden. Durch den Übertritt des MTX in den sogenannten „third space“ (interstitielle Gewebeflüssigkeit) kann eine vorübergehende Senkung des Plasmaspiegels erreicht, aber durch verzögerte Freisetzung aus diesen Räumen eine erhöhte Toxizität hervorgerufen werden. Es ist also weniger die Überschreitung einer kritischen Schwellendosis, als die zeitliche Exposition gegenüber MTX für dessen toxische Wirkung von Bedeutung (*Chabner und Young 1973, Bleyer 1978, Relling et al. 1988*).

Methotrexat (4-Desoxy-4-amino-N¹⁰-methylfolsäure) kommt bei der Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie, Meningiosis leucaemica, Chorionepitheliom, Tumoren im Kopf- und Halsbereich, kleinzelligem Bronchialkarzinom sowie Mammakarzinom zur Anwendung. Da MTX vorwiegend über die Niere ausgeschieden wird, ist bei eingeschränkter Nierenfunktion mit dessen verzögerter Entfernung aus dem Körper zu rechnen, die schwere Nebenwirkungen zur Folge haben kann. Mundschleimhautschädigungen vom WHO-Grad drei bis vier machten in den Untersuchungen von *Hinz (1997)* eine temporäre intravenöse Ernährung erforderlich. Bei bereits bestehendem Folsäuremangel ist die Toxizität von Methotrexat gesteigert, die Wirksamkeit der Therapie kann durch Tetrahydrofolsäurepräparate beeinträchtigt werden. Als spezifisches

Antidot zur Neutralisierung toxischer Nebenwirkungen von MTX steht Kalziumfolinat (Leucovorin®) zur Verfügung (*Lederle* 1985).

Die teratogene Wirkung von MTX wurde durch zahlreiche Tierversuche, bei denen die Inzidenz von Aborten und Deformationen stark erhöht war, nachgewiesen.

De Sesso und *Jordan* (1977) verabreichten am 12. Tag p. c. 19,2mg MTX/kg LM an Kaninchen. Bei 95% der Feten konnten bereits nach sechs Stunden Strukturveränderungen an den Extremitäten beobachtet werden. Es resultierten fehlende oder überzählige Finger, Syndaktylien und verkümmerte Extremitäten bei relativ normaler proximaler Anatomie. Für eine durch MTX herbeigeführte Inhibition der DHFR sprechen die Studien von *Sutton* et al. (1998). Über die Expression einer MTX-resistenten Form der DHFR an genetisch veränderten Embryonen wurde eine signifikante Reduktion von MTX-induzierten Abnormitäten erreicht.

Das funktionelle Analogon des Tetrahydrofolat-vermittelten C₁-Transportes (1-(p-tosyl)-3,4,4-trimethylimidazolidin) konnte die Teratogenität von MTX bei Kaninchen signifikant reduzieren (*De Sesso* und *Goeringer* 1992). Methotrexat hemmt in einer Konzentration von 15mg/kg LM die Aufnahme und Umwandlung von THF zu Polyglutamatderivaten in der Rattenleber und -niere. Bei höheren Dosen an MTX (300mg/kg LM) verblieben 24h nach Gabe mehr als 30% im Gewebe. Dies konnte auf einen Metaboliten des MTX, welcher unter Vorbehalt als Methotrexatdiglutamat identifiziert wurde, zurückgeführt werden (*Buhring* et al. 1977). *Marcondes* et al. (2002) beobachteten an Ratten eine Hemmung der Heparinsynthese nach MTX-Applikation.

Neben tierexperimentellen Versuchen existieren zahlreiche humanmedizinische Studien. *Luijsterburg* et al. (1997) wiesen auf die Möglichkeit hin, dass MTX seine teratogene Wirkung anders als durch die Blockade der DHFR entfaltet, da ähnliche Fehlbildungen wie bei einer generalisierten fetalen Hypoxie auftraten. Die THF-Bildung bleibt solange erhalten, bis ca. 95% der DHFR-Aktivität gehemmt werden. Dies geschieht oberhalb einer MTX-Dosis von 80 bis 100mg/m² Körperoberfläche (*Josting* 1998). Die Eiweißbindung von Methotrexat liegt bei etwa 50%. Pharmaka mit stärkerer Bindung an das Serumprotein (Salicylate, Phenytoin, Tetrazykline,

Sulfonamide) können den Antimetaboliten aus seiner Eiweißbindung verdrängen und damit eine indirekte Dosiserhöhung bewirken (*Henderson et al. 1965*). Eine Anreicherung von MTX im Organismus findet bevorzugt in Niere, Milz und Leber statt, wo das Zytostatikum über Tage bis Wochen retiniert wird (*Johns et al. 1964, Henderson et al. 1965, Anderson et al. 1970, Bischoff et al. 1971*).

Während der Schwangerschaft und Stillzeit darf Methotrexat nicht angewendet werden, da es schwere Defekte an Schädel, Gesicht und Extremitäten verursacht (*Milunsky et al. 1968, Powell und Ekert 1971*). Der teratogenetische Effekt von MTX kann durch Leucovorin® (Produkt des inhibierten Enzyms DHFR) gelindert werden. Das Wirkungsprinzip beruht auf der Konkurrenz von MTX und Leucovorin® um dasselbe Membranprotein. Leucovorin® wird in reduzierte THF-Derivate umgewandelt, die die Bereitstellung von aktivierten C₁-Einheiten für die Purin- und Pyrimidinsynthese gewährleisten (*De Sesso und Goeringer 1991*). Die Untersuchungen von *Wilmanns et al. (1980)* zeigten, dass die Leucovorin®-Konzentration mindestens zehnmals höher als die des MTX sein muss, um einen effektiven Schutz zu erzielen.

Eine weniger wichtige Rolle als der Leucovorin®-Rescue spielen in der Praxis der Thymidin-Rescue (*Howell et al. 1978, Schornagel et al. 1984*) und der Carboxypeptidase-G2-Rescue (*Rowsell et al. 1997, Widemann et al. 1997*). Die Carboxypeptidase besitzt einen selektiven Rescue-Effekt bei der Behandlung von Lymphomen des ZNS, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passiert (*De Angelis et al. 1996*).

3. Material und Methode

3.1. Material

Für die Untersuchungen kamen sowohl männliche als auch weibliche Ratten des Inzuchtstammes LEW.1A zum Einsatz, wobei die Böcke lediglich zum Decken der weiblichen Tiere benötigt wurden.

Die Ratten wurden in einer Klimabox (Life-Islandbox) bei einer Temperatur von 22 bis 24°C, einer Luftfeuchte von 50 bis 60% und einem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Zeit von 13.00 Uhr bis 1.00 Uhr war die Dunkelphase, d. h. die aktive Zeit der Tiere. Als Nahrung erhielten sie pelletiertes V-Alleinfutter für Rattenzucht ad libitum (Hersteller: ssniff Spezialdiäten GmbH) mit folgender Zusammensetzung (auf 15 kg): 21% Rohprotein, 3,80% Rohfett, 4,40% Rohfaser, 6,70% Rohasche, 1,20% Lysin, 0,40% Methionin, 1% Kalzium, 0,70% Phosphor, 0,20% Magnesium, 0,25% Natrium sowie als Zusatzstoffe 15000 IE Vitamin A (=4,5mg), 1000 IE Vitamin D3 (=0,025mg) und 100mg Vitamin E. Die Tränkung erfolgte mit Wasser ad libitum, unter Zusatz von HCl im Verhältnis von etwa 1:167. Die Einstreu (nicht kontaminierte Hobelspäne aus Kiefernholz) wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die männlichen und weiblichen Tiere wurden außerhalb der Paarung getrennt gehalten, in Kunststoffschalen mit Metallgitteraufsatz der Größe K3 und zu maximal vier Tieren.

3.2. Methode

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zwei Wochen lang an die Haltungsbedingungen adaptiert. Die Körpermasse der dem Decken zugeführten erstgebärenden Weibchen betrug ca. 220g. Drei Tage vor der Begattung wurde in die Gruppenboxen der Weibchen Bockmist zur Zyklussynchronisation bzw. -induktion gegeben. Zur Paarung wurden je zwei weibliche Tiere mit einem männlichen Tier in eine Box in der Zeit von 18.00 Uhr bis 22.00 Uhr verbracht. Nach der Paarung erfolgte die Trennung der Geschlechter und die Deckkontrolle mittels Vaginalabstrich. Bei positivem Befund galt dieser Tag als Tag 1 und die positiven Tiere wurden dem in Tabelle 1 aufgeführten Behandlungsschema unterzogen.

Tabelle 1. Behandlungsschema

Gruppe	Behandlung	
	Prävention	Fehlbildungsinduktion
FP	Folsäure	Procarbazin
TP	Thiozyanat	Procarbazin
FTP	Folsäure und Thiozyanat	Procarbazin
MP	-	Methotrexat und Procarbazin
M	-	Methotrexat
F	Folsäure	-
T	Thiozyanat	-
P	-	Procarbazin
K	-	-

Jede der aufgeführten Gruppen enthielt mindestens zehn trächtige, erstgebärende Ratten. Am 21. Trächtigkeitstag erfolgte die Hysterektomie der Muttertiere unter Vollnarkose. Die Anzahl der Feten und Resorptionen wurde protokolliert. Die Darstellung der Implantationsorte erfolgte mittels Ammoniumsulfid. Anschließend wurden drei Feten pro Muttertier entnommen und durch eine Überdosis Äther euthanasiert. Vor der Aufbereitung der Feten für die Skelettfärbung wurden das Gewicht und die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) bestimmt.

Medikamentenapplikation

Die Medikamente wurden jeweils zur gleichen Stunde des entsprechenden Behandlungstages - um 7.00 Uhr - nach folgendem Schema appliziert:

Folsäure (Folsäure forte-Hevert®, Fa. Hevert Arzneimittel) wurde an die Gruppen FP, FTP und F je Tier mit einer Dosis von 0,016mg/100g Lebendmasse am 1., 4., 7., 10., 13., 16. und 19. Trächtigkeitstag subkutan injiziert.

Thiozyanat (SCN⁻) wurde an die Gruppen TP, FTP und T je Tier mit einer Dosis von 3,2mg/100g Lebendmasse subkutan am 10. und 13. Trächtigkeitstag appliziert.

Procarbazin (Natulan®, Fa. Sigma-Tau Arzneimittel) wurde an die Gruppen FP, TP, FTP, MP und P in einer Dosis von 20mg/100g Lebendmasse je Tier intraperitoneal appliziert.

Methotrexat (Methotrexat>Lederle<Lösung 5, Fa. Lederle) wurde an die Gruppen MP und M am 1., 7. und 14. Trächtigkeitstag mit einer Dosis von 0,0026mg/100g Lebendmasse je Tier intraperitoneal appliziert.

In der **Kontrollgruppe** K wurden alle Applikationen subkutan mit derselben Applikationsmenge wie bei den übrigen Gruppen mit 0,9%iger NaCl-Lösung durchgeführt.

Die **Vollnarkose** der Muttertiere erfolgte mittels intraperitonealer Applikation eines Ketamin-Rompun®-Wasser-Gemisches im Verhältnis 1:2:2 bei 0,1ml/100g Lebendmasse. Dabei wurde das Ketamin 10%ig (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Fa. Essex Tierarznei) und das Rompun® 2%ig (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Fa. Bayer) eingesetzt. Die Schlafzeit beträgt bei diesem Verfahren etwa 30 bis 60 Minuten. Die zur Anwendung gekommene Narkose bewirkt einen ruhigen Muskeltonus.

Knorpel-Knochen-Färbung

Für die Beurteilung des Verknöcherungsgrades des Skelettes kam die Knorpel-Knochen-Färbung nach *Brylla* und *Wendler* (1979) zur Anwendung. Nach Schnittentbindung und Euthanasierung der Feten mittels einer Überdosis Äther erfolgte deren Häutung und Eviszeration. Die so gewonnenen Skelette wurden für 24h in 96%igem Alkohol fixiert. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Färbung in einem Gemisch aus einem Teil 0,1%igem Alizarinrot in 96%igem Alkohol, einem Teil 0,3%igem Alcianblau 8 GS in 70%igem Alkohol, einem Teil Eisessig und 17 Teilen 70%igem Alkohol. Nach gründlichem Spülen unter fließend Wasser wurden die Feten in 1%iger Kalilauge mazeriert. Die anschließende Spülung erfolgte mit destilliertem Wasser. Die Skelette wurden für 48h in ein 1:1-Gemisch aus Glycerin und 70%igem Alkohol verbracht und danach definitiv in Glycerin konserviert.

Quantifizierung der Skelettreifung und Statistikverfahren

Die Auswertung der gefärbten Skelette erfolgte mit Hilfe einer Lupe. Auf Grund der Eigenschaften der Knorpel-Knochen-Färbung konnte eine sehr genaue Unterscheidung zwischen Knorpel und Knochen vorgenommen werden. Alle Bestandteile des Skelettes wurden hinsichtlich ihrer Reife eingeschätzt. Die unterschiedlichen Stadien der Reifung wurden wie folgt festgehalten: 0 = fehlend; 1 = knorpelig; 2 = knorpelig mit Ossifikationszentren; 3 = ossifiziert.

Bei der Auswertung der Befunde wurden in jeder Gruppe für alle untersuchten Parameter die Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt.

Das Gewicht und die Scheitel-Steiß-Länge wurden gegen sämtliche Knochen auf Korrelation überprüft (r = Korrelationskoeffizient). Die Korrelationen galten auf dem Niveau von 0,01 als signifikant, d. h. die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 1%.

Mittels des SPSS-Verfahrens (Mann-Whitney-Test), auch als U-Test (*Weber 1972*) bekannt, wurden alle Mittelwerte mit allen Parametern zwischen den Gruppen verglichen.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p=0,05$) konnte die Abweichung eines Parameters als signifikant angesehen werden. Die kursiv gedruckten Signifikanzen beschreiben Grenzfälle mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 5 und 6%.

4. Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse basieren auf der Auswertung von insgesamt 233 gefärbten fetalen Skeletten, die sich auf die Behandlungsgruppen FP, TP, FTP, F, T und P sowie die unbehandelte Kontrollgruppe K verteilen. Die Feten der mit MTX substituierten Gruppen M und MP wurden ausnahmslos im Mutterleib resorbiert. Dies wurde nach Hysterektomie und anschließender Darstellung der Implantationen mittels Ammoniumsulfid nachgewiesen. Eine Auswertung der Skelette war für diese Gruppen daher nicht möglich.

Die gewonnenen Ergebnisse werden nachfolgend durch die Tabellen 2 bis 5 und die Abbildungen 5 bis 8 veranschaulicht. In den Tabellen sind ausschließlich die Mittelwerte der Gruppen für die einzelnen Parameter dargestellt, welche signifikante Unterschiede aufweisen. Jede Gruppe erhält in ihrer Spalte zudem eine spezifische Spaltenbezeichnung in Form kleiner Buchstaben von a bis g. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bei einem Parameter wurden durch exponentielle Kleinbuchstaben der Gruppen (resultieren aus der Gruppenbezeichnung) dargestellt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p=0,05$ festgelegt.

Die kursiv gedruckten exponentiellen Buchstaben kennzeichnen sich andeutende signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen $p>0,05$ und $p=0,06$. Die Standardabweichungen sowie alle Einzelergebnisse sind, wie auch ein Abkürzungsverzeichnis, aus Gründen der besseren Übersicht im Anhang aufgelistet.

4.1. Gewicht, Scheitel-Steiß-Länge, Kopf und Hals

Bezüglich der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) und des Gewichtes traten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit Procarbazinapplikation (Gruppen FP, TP, FTP und P) im Vergleich mit den Gruppen ohne Fehlbildungsinduktion (Gruppen F, T und K) auf. Die Tiere, denen Natulan® verabreicht wurde, hatten eine geringere Wachstumsrate mit niedrigerem Gewicht und kleineren Werten der SSL. Diese Ergebnisse konnten durch die zusätzliche Applikation von Thiozyanat bzw. Folsäure oder deren Kombination nicht kompensiert werden.

Die Gruppen mit alleiniger Folsäure- bzw. Thiozyanatgabe (Gruppen F und T) unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Hinsichtlich der Ossifikation nahm die Knochenreife prinzipiell von kranial nach kaudal und von proximal nach distal ab. Dies äußerte sich in der fast vollständigen Verknöcherung des Schädels in allen Gruppen. Im Gegensatz dazu waren die distalen Skelettanteile wie Ossa metacarpalia, Ossa metatarsalia und Ossa digitorum überwiegend knorpelig.

Tabelle 2. Mittelwerte (MW) mit signifikanten Unterschieden für Gewicht, SSL, Kopf und Hals

Gruppe	FP	TP	FTP	F	T	P	K
	a	b	c	d	e	f	g
Tierzahl n	22	30	23	30	35	28	37
Parameter	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW
GEW	1,78 ^{d,e,g}	1,83 ^{d,e,g}	1,74 ^{d,e,g}	3,33 ^f	3,17 ^f	1,83 ^g	3,35
SSL	27,23 ^{d,e,g}	26,53 ^{d,e,g}	27,09 ^{d,e,g}	36,06 ^f	35,89 ^f	26,79 ^g	36,32
CAPNASLI	2,23 ^{d,e,g}	2,13 ^{d,e,g}	1,96 ^{d,e,g}	2,83 ^f	2,74 ^{f,g}	2,00 ^g	2,95
CAPNASRE	2,23 ^{d,e,g}	2,13 ^{d,e,g}	2,00 ^{d,e,g}	2,83 ^f	2,74 ^{f,g}	2,00 ^g	2,95
CAPOCC	2,14 ^{b,d,e,f,g}	2,00 ^{d,e,g}	2,00 ^{d,e,g}	2,53 ^f	2,71 ^f	2,00 ^g	2,57
HALS 1	2,00	2,00 ^e	2,00	2,03	2,11	2,00	2,03

Am Kopf wurden lediglich geringe signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wahrgenommen. Die meisten Schädelknochen (Os frontale, Os parietale, Os zygomaticum, Maxilla, Mandibula, Os incisivum, Os palatinum, Os interparietale, Os sphenoidale, Os praesphenoidale) waren

in allen Gruppen vollständig verknöchert. Das Os temporale stellte sich ausnahmslos knorpelig dar.

Das Os occipitale wies in den Gruppen ohne Procarbazineinfluss (Gruppen F, T und K) eine signifikant fortgeschrittenere Knochenreife auf als in den Gruppen FP, TP, FTP und P. Unter den Gruppen mit Natulan®-Gabe waren die Ossa occipitalia der Gruppe FP signifikant weiter ossifiziert als die der Gruppen TP und P.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit (FP, TP, FTP, P) und ohne Procarbazinapplikation (F, T, K) wurden auch für das Os nasale festgestellt. Die Ossa nasalia der Feten, die präventiv Thiozyanat erhielten, waren signifikant weniger ossifiziert, als die der Kontrollgruppe. Die Ossifikation begann jeweils deutlich erkennbar im anterioren Bereich und setzte sich nach dorsal bis zum Erreichen der vollständigen Ossifikation fort.

Das Os hyoideum verfügte über ein ventrales Ossifikationszentrum (OZ). Lediglich bei präventiver Anwendung von Folsäure, Thiozyanat und deren Kombination im Zusammenhang mit Natulan® (Gruppen FP, TP und FTP) fehlte in wenigen Fällen ein Knochenkern, was jedoch nicht statistisch signifikant nachweisbar war.

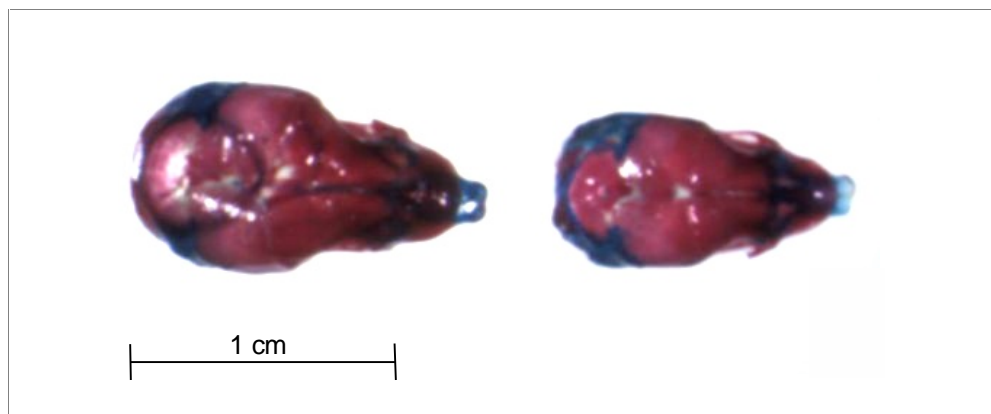


Abb. 5. Fetale Rattenschädel nach Knorpel-Knochen-Färbung: links - Fet der Kontrollgruppe K, rechts - Fet der Gruppe P; rot = Knochen, blau = Knorpel

Alle mit Natulan® behandelten Feten wiesen eine Hypogenie (verkürzte Unterkiefer) auf. Der Proc. condylaris und der Proc. coronoideus sowie der ventrale Anteil (Knorpelspange) der Mandibula waren bei allen untersuchten Feten knorpelig.

Die Halswirbel verfügten über je zwei Ossifikationszentren. Die von kranial nach kaudal fortschreitende Ossifikation war anhand der sich andeutenden, statistisch jedoch nicht signifikanten, stärkeren Verknöcherung der oberen beiden Halswirbel, besonders des Atlas, in den Gruppen ohne Natulan®-Applikation sichtbar. Am 3. bis 7. Halswirbel existierten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ossifikation zwischen den einzelnen Gruppen. Alle besaßen zwei Knochenherde.

4.2. Rumpf

Das Sternum enthielt in der Kontrollgruppe K sowie in den mit Folsäure bzw. Thiozyanat substituierten Gruppen F und T fünf bis sieben Ossifikationszentren zwischen den Rippenansätzen. In den Gruppen mit Natulan®-Applikation (FP, TP, FTP und P) war die Anzahl der OZ des Sternum auf vier bis fünf verringert. Nach der präventiven, kombinierten Gabe von Thiozyanat und Folsäure zusammen mit Natulan® war das Sternum signifikant geringer ossifiziert als in den Gruppen F, T, P und K.

Tabelle 3. Mittelwerte (MW) mit signifikanten Unterschieden für Rumpf

Gruppe	FP a	TP b	FTP c	F d	T e	P f	K g
Tierzahl n	22	30	23	30	35	28	37
Parameter	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW
STERNUM	1,95	1,97	1,83 ^{d,e,f,g}	2,00	2,00	2,00	2,00
COSTLI 13	2,91 ^c	2,90 ^c	2,26 ^{d,e,f,g}	3,00	3,00	3,00	3,00
COSTRE 13	2,91 ^c	2,90 ^c	2,26 ^{d,e,f,g}	3,00	3,00	3,00	3,00

Die 1. bis 12. Rippe und die Clavicula zeigten sich in allen Gruppen vollständig verknöchert. Die Gruppe FTP unterschied sich in Bezug auf die 13. Rippe signifikant von allen anderen Gruppen. Teilweise war sie noch knorpelig ausgebildet oder fehlte in 17,4% der Fälle gänzlich. Die Brust-, Lenden- und Sakralwirbelkörper verfügten in allen Gruppen über drei OZ (je zwei OZ an den Procc. transversus und ein OZ am Wirbelkörper), während die Caudalwirbel ausnahmslos knorpelig vorlagen. Die Ossifikation erfolgte demnach von kranial nach kaudal.

Die Brustkörbe der Feten aller mit Natulan® behandelten Muttertiere waren im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr schmal und deformiert, die Rippen nur rudimentär angelegt. Die Caudae stellten sich bei diesen Feten verkürzt dar.

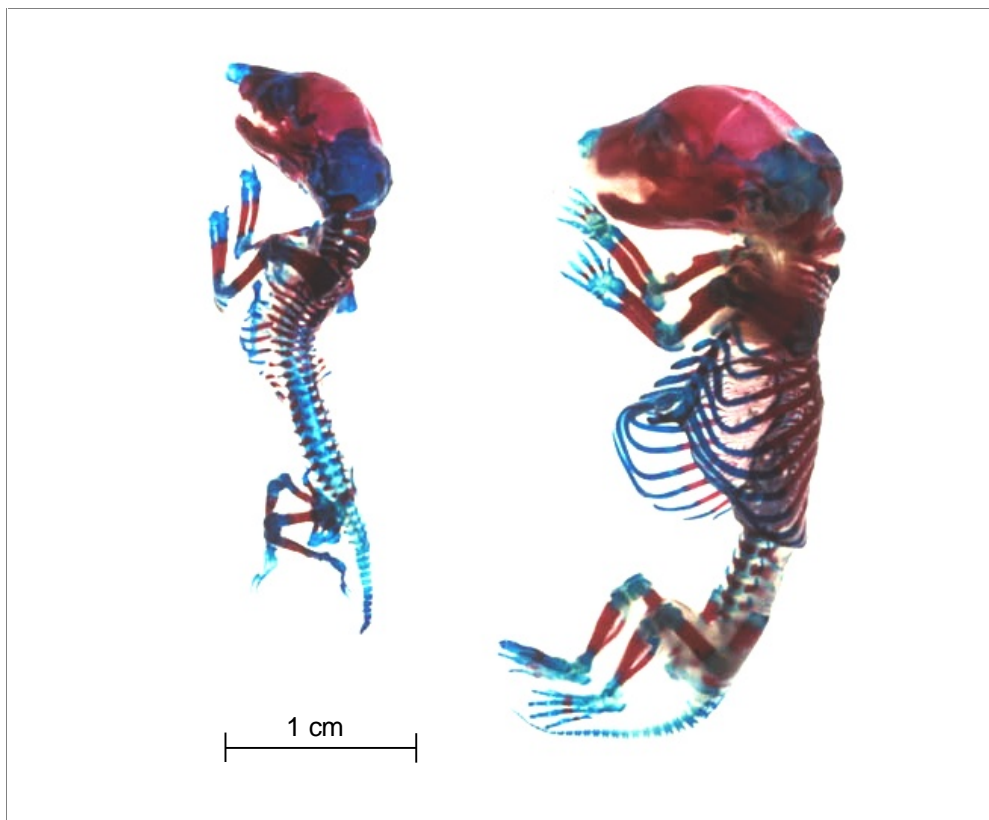


Abb. 6. Fetale Rattenskelette nach Knorpel-Knochen-Färbung: links - Fet der Gruppe TP, rechts - Fet der Kontrollgruppe K; rot = Knochen, blau = Knorpel

4.3. Vordere Extremität

An Scapula, Humerus und Ulna konnte in allen Gruppen eine vollständige Verknöcherung nachgewiesen werden. Der Radius war in den Gruppen F, T, K und P bei allen Feten, in den restlichen Gruppen (FP, TP und FTP) zu mehr als 90% ganz ossifiziert. Diese Abweichung war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Ossa carpalia stellten sich in allen Untersuchungsgruppen knorpelig dar. Die langen Röhrenknochen der mit Natulan® behandelten Feten waren kürzer und zierlicher als die der Kontrollgruppe.

Tabelle 4. Mittelwerte (MW) mit signifikanten Unterschieden für vordere Extremität

Gruppe	FP a	TP b	FTP c	F d	T e	P f	K g
Tierzahl n	22	30	23	30	35	28	37
Parameter	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW
METACALI 1	0,18 ^{d,e,g}	0,03 ^{c,d,e,g}	0,30 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,07 ^g	1,00
METACALI 2	0,45 ^{c,d,e,g}	0,63 ^{c,d,e,g}	0,96 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	0,57 ^g	2,00
METACALI 3	1,41 ^{d,e,f,g}	1,20 ^{d,e,f,g}	1,17 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,71 ^g	2,00
METACALI 4	1,00 ^{d,e,g}	1,37 ^{c,d,e,g}	0,78 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,39 ^g	2,00
METACALI 5	0,55 ^{d,e,g}	0,53 ^{d,e,g}	0,39 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,09 ^f	0,64 ^g	1,00
METACARE 1	0,18 ^{d,e,g}	0,03 ^{c,d,e,g}	0,30 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,07 ^g	1,00
METACARE 2	0,45 ^{c,d,e,g}	0,63 ^{c,d,e,g}	0,96 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	0,57 ^g	2,00
METACARE 3	1,36 ^{d,e,f,g}	1,23 ^{d,e,f,g}	1,17 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,71 ^g	2,00
METACARE 4	1,00 ^{d,e,g}	1,33 ^{c,d,e,g}	0,74 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,39 ^g	2,00
METACARE 5	0,55 ^{d,e,g}	0,53 ^{d,e,g}	0,35 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,09 ^f	0,64 ^g	1,00
DIGVOLI 1	0,05 ^{d,e,g}	0,03 ^{d,e,g}	0,17 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGVOLI 2	0,18 ^{d,e,g}	0,03 ^{c,d,e,g}	0,26 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGVOLI 3	0,50 ^{b,d,e,g}	0,07 ^{c,d,e,f,g}	0,39 ^{d,e,g}	1,03 ^f	1,00 ^f	0,46 ^g	1,00
DIGVOLI 4	0,45 ^{d,e,g}	0,60 ^{d,e,g}	0,39 ^{d,e,f,g}	1,03 ^f	1,00 ^f	0,68 ^g	1,00
DIGVOLI 5	0,50 ^{b,d,e,g}	0,17 ^{d,e,f,g}	0,35 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,46 ^g	1,00
DIGVORE 1	0,05 ^{d,e,g}	0,03 ^{d,e,g}	0,17 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGVORE 2	0,18 ^{d,e,g}	0,03 ^{c,d,e,g}	0,26 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGVORE 3	0,50 ^{b,d,e,g}	0,07 ^{c,d,e,f,g}	0,39 ^{d,e,g}	1,03 ^f	1,00 ^f	0,46 ^g	1,00
DIGVORE 4	0,45 ^{d,e,g}	0,60 ^{d,e,g}	0,36 ^{d,e,f,g}	1,03 ^f	1,00 ^f	0,68 ^g	1,00
DIGVORE 5	0,50 ^{b,d,e,g}	0,17 ^{d,e,f,g}	0,35 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,46 ^g	1,00

Die auffälligsten Unterschiede wurden an den Endphalangen der Extremitäten in den Gruppen mit Natulan®-Gabe beobachtet. Grundsätzlich unterschieden sich alle Ossa metacarpalia und Ossa digitorum manus der Gruppen mit Procarbazinapplikation (Gruppen FP, TP, FTP und P) hinsichtlich der Knochenreife signifikant von denen der Kontrollgruppe. Die erwähnten Knochen fehlten nach Natulan®-Gabe zu einem hohen Prozentsatz vollständig, was zur Ausbildung von Syndaktylien führte. Bei den untersuchten Ossa metacarpalia und Ossa digitorum lag das Stadium der Ossifikation deutlich hinter dem der Kontrollgruppe zurück. Zwischen der Kontrollgruppe K und den Gruppen mit präventiver Thiozyanat- bzw. Folsäuregabe (Gruppen F und T) traten keine signifikanten Unterschiede auf. Unter den Gruppen mit Procarbazinapplikation wurden zusätzlich folgende signifikante Unterschiede beobachtet:

Das Os metacarpale I fehlte in den Gruppen TP und P signifikant häufiger als in der Gruppe FTP.

Beim Os metacarpale II konnte in der Gruppe FTP eine signifikant stärkere Ossifikation im Vergleich mit den verbleibenden Procarbazingruppen (Gruppen FP, TP und P) festgestellt werden. Darüber hinaus wurde ein Fehlen des Os metacarpale II in der Gruppe FTP signifikant seltener beobachtet als in den Gruppen FP, TP und P.

Hinsichtlich des Os metacarpale III war die Gruppe mit alleiniger Natulan®-Gabe (Gruppe P) signifikant weiter verknöchert als die Gruppen mit zusätzlicher präventiver Applikation von Folsäure und Thiozyanat (Gruppen TP, FTP und FP).

Das Os metacarpale IV fehlte in der Gruppe FTP nicht nur signifikant häufiger als in den Gruppen TP und P, sondern war auch weniger stark verknöchert.

Am Os metacarpale V der rechten Seite stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen P und FTP dar, wobei der genannte Knochen in der Gruppe P signifikant seltener fehlte als in der Gruppe FTP. Die wenigen zu verzeichnenden Asymmetrien traten ausschließlich an den Extremitäten und hier nur in den Gruppen FP, TP und FTP auf.

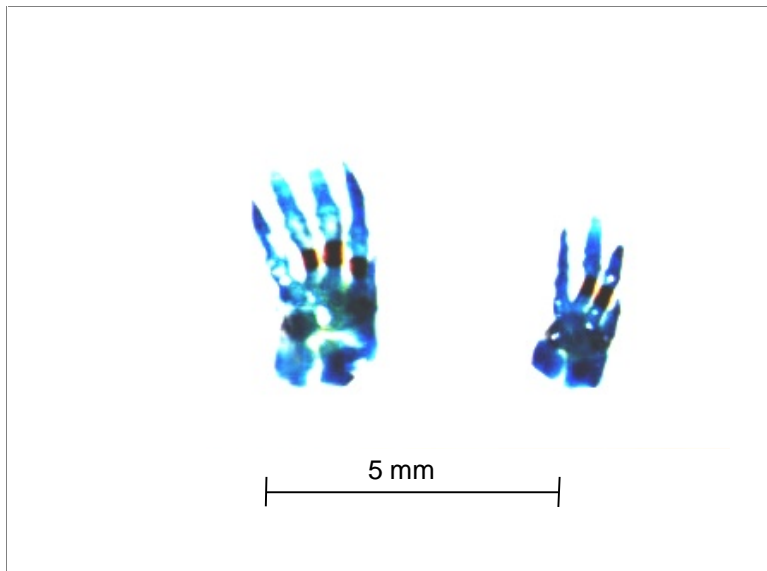


Abb. 7. Fetale vordere Rattenphalangen nach Knorpel-Knochen-Färbung: links - Fet der Kontrollgruppe K, rechts - Fet der Gruppe P; rot = Knochen, blau = Knorpel

An den Ossa digitorum wurden ähnlich große Schwankungen hinsichtlich der Knochenreife wie an den Ossa metacarpalia beobachtet.

Das Os digitale II trat in der Gruppe FTP signifikant häufiger auf als in den Gruppen TP und P.

Für das Os digitale III zeigte sich ein signifikant häufigeres Fehlen in der Gruppe TP im Vergleich mit allen anderen Gruppen, die durch Procarbazin beeinflusst wurden (Gruppen FP, FTP und P).

Das Os digitale IV fehlte in der Natulan®-Gruppe signifikant seltener als in der Gruppe mit zusätzlicher kombinierter Gabe von Thiozyanat und Folsäure (Gruppe FTP).

Ein Fehlen des Os digitale V wurde in der Gruppe TP signifikant öfter als in den Gruppen FP und P beobachtet.

4.4. Becken und hintere Extremität

Femur und Tibia zeigten sich in allen Gruppen vollständig verknöchert, wohingegen Patella und Ossa tarsalia knorpelig ausgebildet waren.

Das Os pubis wies in allen Gruppen ein OZ auf. Das Os ilium war in der Gruppe FTP signifikant stärker verknöchert als in den Gruppen TP, F und T. Die Tendenz eines signifikanten Unterschiedes im Vergleich mit der Procarbazingruppe P deutete sich lediglich an.

Das Os ischii war in der Untersuchungsgruppe mit präventiver Gabe von Folsäure und Thiozyanat neben einer Natulan®-Applikation (Gruppe FTP) signifikant geringer ossifiziert als in den Gruppen ohne Procarbazineinfluss (Gruppen F, T und K). Ein signifikanter Unterschied zur Procarbazingruppe P lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen $p > 0,05$ und $p = 0,06$.

Für das Os ischii wurde ein Unterschied im Seitenvergleich beobachtet. Während auf der rechten Seite zwischen Gruppe TP und FTP kein signifikanter Unterschied auftrat, war das linke Os ischii in der Gruppe TP signifikant weiter ossifiziert als in der Gruppe FTP. Bei beiden Beckenknochen entsprachen die Entwicklungsstufen der Knochenreife in den Gruppen FP, P, F und T denen der Kontrollgruppe. Das Os ilium war unter den Knochen des Pelvis am weitesten verknöchert.

In den Gruppen ohne Natulan®-Applikation (Gruppen F, T und K) konnte die vollständige Ossifikation der Fibula nachgewiesen werden, welche sich damit signifikant von den durch Procarbazin beeinflussten Gruppen (FP, TP, FTP und P) unterschieden. Die Gruppe mit alleiniger Natulan®-Gabe (Gruppe P) zeigte eine signifikant weitere Ossifikation der Fibula gegenüber den Gruppen FP, TP und FTP.

Tabelle 5. Mittelwerte (MW) mit signifikanten Unterschieden für Becken und hintere Extremität

Gruppe	FP a	TP b	FTP c	F d	T e	P f	K g
Tierzahl n	22	30	23	30	35	28	37
Parameter	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW
ILILI	2,00	2,00 ^c	2,13 ^{d,e,f}	2,00	2,00	2,00	2,03
ILIIRE	2,00	2,00 ^c	2,13 ^{d,e,f}	2,00	2,00	2,00	2,03
ISCHLI	2,00	2,00 ^c	1,87 ^{d,e,f,g}	2,00	2,00	2,00	2,00
ISCHRE	2,00	1,97	1,87 ^{d,e,f,g}	2,00	2,00	2,00	2,00
FIBULLI	1,41 ^{d,e,f,g}	1,43 ^{d,e,f,g}	1,48 ^{d,e,f,g}	3,00 ^f	3,00 ^f	2,07 ^g	3,00
FIBULRE	1,41 ^{d,e,f,g}	1,37 ^{d,e,f,g}	1,48 ^{d,e,f,g}	3,00 ^f	3,00 ^f	2,07 ^g	3,00
METATLI 1	0,00 ^{d,e,g}	0,00 ^{c,d,e,g}	0,13 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,00 ^g	1,00
METATLI 2	0,00 ^{b,c,d,e,g}	0,27 ^{d,e,f,g}	0,48 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	0,07 ^g	2,00
METATLI 3	1,00 ^{d,e,g}	1,03 ^{d,e,g}	1,13 ^{d,e,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,04 ^g	2,00
METATLI 4	1,14 ^{d,e,g}	1,30 ^{d,e,g}	1,30 ^{d,e,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,43 ^g	2,00
METATLI 5	0,09 ^{d,e,g}	0,03 ^{d,e,g}	0,26 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	0,00 ^g	2,00
METATRE 1	0,00 ^{d,e,g}	0,00 ^{c,d,e,g}	0,13 ^{d,e,f,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,00 ^g	1,00
METATRE 2	0,00 ^{b,c,d,e,g}	0,27 ^{d,e,f,g}	0,48 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	0,07 ^g	2,00
METATRE 3	1,00 ^{d,e,g}	1,00 ^{d,e,g}	1,13 ^{d,e,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,04 ^g	2,00
METATRE 4	1,14 ^{d,e,g}	1,27 ^{d,e,g}	1,30 ^{d,e,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	1,43 ^g	2,00
METATRE 5	0,05 ^{d,e,g}	0,03 ^{d,e,g}	0,26 ^{d,e,f,g}	2,00 ^f	2,00 ^f	0,00 ^g	2,00
DIGHILI 1	0,00 ^{d,e,g}	0,00 ^{c,d,e,g}	0,13 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGHILI 2	0,09 ^{d,e,g}	0,27 ^{d,e,g}	0,30 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,11 ^g	1,00
DIGHILI 3	0,91	0,97	0,87 ^{d,e,f,g}	1,00	1,00	1,00	1,00
DIGHILI 4	0,91	0,90 ^{e,g}	0,91	1,00	1,00	0,93	1,00
DIGHILI 5	0,00 ^{c,d,e,g}	0,07 ^{d,e,g}	0,17 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGHIRE 1	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00 ^{c,d,e,g}	0,17 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00
DIGHIRE 2	0,09 ^{d,e,g}	0,27 ^{d,e,g}	0,30 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,11 ^g	1,00
DIGHIRE 3	0,91	0,97	0,87 ^{d,e,f,g}	1,00	1,00	1,00	1,00
DIGHIRE 4	0,91	0,87 ^{d,e,g}	0,91	1,00	1,00	0,93	1,00
DIGHIRE 5	0,00 ^{c,d,e,g}	0,07 ^{d,e,g}	0,22 ^{d,e,g}	1,00 ^f	1,00 ^f	0,04 ^g	1,00

Große Differenzen traten an den Ossa metatarsalia und den Ossa digitorum pedis zwischen den Gruppen mit Natulan®-Applikation auf, während sich die Ergebnisse der Gruppen ohne Procarbazineinfluss (Gruppen F, T und K) bezüglich der Knochenreife nicht signifikant unterschieden. In diesem Bereich wurden auch die meisten Asymmetrien gefunden. In den mit Natulan® substituierten Gruppen war die Nichtanlage des Os metatarsale I, II und V besonders ausgeprägt, wodurch es zur Ausbildung von Syndaktylien kam.

Das Os metatarsale I fehlte in der Gruppe FTP signifikant seltener als in der Gruppe TP. Ein signifikanter Unterschied der Gruppe P im Vergleich zur Gruppe FTP deutete sich lediglich an.

Das Os metatarsale II fehlte in der Gruppe FP bei allen untersuchten Feten und unterschied sich dadurch signifikant von allen anderen Untersuchungsgruppen, mit Ausnahme der Gruppe P. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen TP und P lag mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen $p > 0,05$ und $p = 0,06$ vor. Das häufigere Fehlen des letztgenannten Knochens in der Gruppe P verglichen mit Gruppe FTP war statistisch signifikant.

Das Os metatarsale V war nach präventiver Gabe von Thiozyanat und Folsäure neben der Fehlbildungsinduktion durch Natulan® (Gruppe FTP) signifikant stärker ossifiziert als in der Gruppe mit alleiniger Procarbazingabe (Gruppe P).

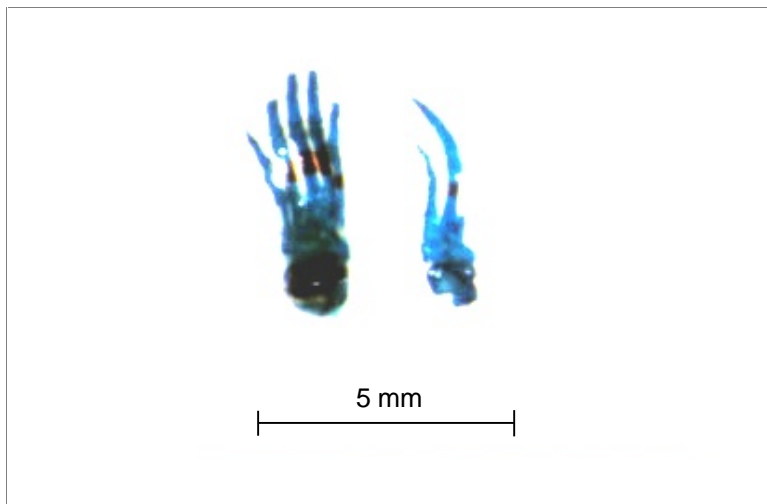


Abb. 8. Fetale hintere Rattenphalangen nach Knorpel-Knochen-Färbung: links - Fet der Kontrollgruppe K, rechts - Fet der Gruppe P; rot = Knochen, blau = Knorpel

Das Os digitale I der linken Seite fehlte in der Gruppe FTP signifikant seltener als in der Gruppe TP. Für das Os digitale I der rechten Seite konnte ein signifikanter Unterschied der Gruppe FTP zu den Gruppen TP und FP beobachtet werden.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Procarbazineinfluss waren am Os digitale III und IV nur gering ausgeprägt. Das Os digitale III unterschied sich lediglich in der Gruppe FTP aufgrund seines häufigeren Fehlens signifikant von den Gruppen ohne Natulan®-Gabe (Gruppen F, T und K). Eine statistisch signifikante Abweichung deutete sich zwischen Gruppe FTP und Gruppe P an.

Das Os digitale IV der linken Seite zeigte in der Gruppe TP eine tendenziell geringere Verknöcherung als in den Gruppen T und K. Auf der rechten Seite unterschied sich die Gruppe TP signifikant von den Gruppen F, T und K, was auf eine gehäufte Nichtanlage in der Gruppe TP zurückzuführen war. Das komplette Fehlen des Os digitale V in der Gruppe FP bewirkte die signifikante Abweichung dieser Gruppe im Vergleich zur Gruppe FTP.

5. Diskussion

Das Schrifttum zeigt, dass Procarbazin eine teratogene Wirkung auf die Skelettentwicklung hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein eventuell vorhandener präventiver Effekt der Wirksubstanzen Folsäure und Thiozyanat, separat wie auch kombiniert verabreicht, auf die durch Procarbazin hervorgerufenen Fehlbildungen der Skelettsysteme untersucht werden. Die Injektionen von Folsäure erfolgten sowohl vor als auch nach der Procarbazinapplikation. Ebenso wurde Thiozyanat bereits vor einer Fehlbildungsinduktion durch Natulan® präventiv verabreicht.

Die Gruppen mit alleiniger Folsäure- bzw. Thiozyanatapplikation (Gruppen F und T) wiesen im Vergleich mit der Kontrollgruppe K keine signifikanten Unterschiede auf. Eine Ausnahme stellte lediglich das Os nasale dar, welches in Gruppe T signifikant geringer ossifiziert war als in Gruppe K. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Applikation beider Wirkstoffe weder einen negativen noch einen positiven Einfluss auf die Skelettreifung ausübte. Anhand der Untersuchungsergebnisse ließ sich ein vermuteter kumulativer Wirkeffekt auf die Skelettreifung durch den kombinierten Einsatz von Folsäure und Thiozyanat nicht signifikant nachweisen.

Dieser Sachverhalt steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie von *Weingärtner et al. (2004b)*, bei der durch die Gabe niedriger Folsäure- bzw. Thiozyanatdosen kein protektiver Effekt auf exogen induzierte Störungen der embryonalen kranialen Entwicklung erzielt werden konnte. Eine alleinige Thiozyanatgabe führte sogar zu einem unerwarteten Anstieg von Spalten des sekundären Gaumens (*Martens 2003*). Die kombinierte Anwendung von Folsäure und Thiozyanat bewirkte jedoch eine Spaltenprävention im sekundären Gaumen sowie einen Wachstumsschutz des primären Gaumens. Es besteht daher Grund zu der Annahme, dass Thiozyanat während der postsensiblen Phase der Embryogenese einen positiven Effekt auf das Knorpel-Knochen-Wachstum des Gaumens ausübt, während es in der sensiblen Phase als Carrier für teratogene und toxische Substanzen fungieren kann.

Zwischen orofazialen Spalten und Neuralrohrdefekten gibt es eine Reihe von Gemeinsamkeiten. Beide Fehlbildungen entstehen während der frühen Embryogenese und sind durch einen fehlerhaften Verschluss zwischen epithelialen Geweben gekennzeichnet. Sie folgen dem Modell der polygenetischen Vererbung mit einem Risiko des Wiederauftretens von 4%, wenn Vater, Mutter oder Geschwister betroffen sind. Neuralrohrdefekte sowie Lippen- und Gaumenspalten können durch prä- oder perikonzeptionelle Supplementation von Nahrungsmitteln mit Multivitaminen und/oder Folsäure vorgebeugt werden (*Hörsten und Pelz 1996, Hol et al. 1998*). Folgende Ergebnisse verdeutlichen dies:

- 10mg Folsäure/Tag bewirken eine 65,4%ige Reduktion des Wiederauftretens von Lippenspalten mit oder ohne Gaumenspalten in Familien mit hohem Risiko (*Tolarova 1982, Tolarova und Harris 1995, Hall und Solehdin 1998*)
- Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) werden durch Multivitamine mit Folsäure um 65% reduziert (*Tolarova und Harris 1995*)
- ein Multivitamin (u. a. Vitamine A, B, C, D, E) mit 0,8mg Folsäure hat keinen Effekt auf die Ausbildung orofazialer Spalten (*Czeizel und Dudás 1992, Czeizel 1995, Czeizel et al. 1996*)
- durch Multivitaminpräparate mit Folsäure wird das Vorkommen isolierter Spalten der Lippe oder des Gaumens um 50% gesenkt (*Shaw et al. 1995a*)
- bei Frauen, die in der Schwangerschaft ein folsäurereiches Multivitaminpräparat einnahmen, war das Risiko für die Entwicklung orofazialer Spalten um 25 bis 50% reduziert (*Czeizel 1998*)
- durch Gabe eines Vitamin B-Komplexes (prophylaktisch, simultan und/oder therapeutisch) wurde die Entstehung von Dexamethason-induzierten Gaumenspalten an Mäusen bis zu 70% reduziert (*Schubert et al. 1990*)
- laut Medical Research Council (MRC) (1991) bewirken 4mg Folsäure/Tag perikonzeptionell (ein Monat vor und drei Monate nach Konzeption) eine Prävention des Wiederauftretens von Neuralrohrdefekten in 72% (*Bower 1995, Czeizel et al. 1996, Hall und Solehdin 1998, Yoder 1999*)
- durch 0,8mg Folsäure/Tag (als Komponente eines Vitamin B₁₂-haltigen

Multivitamins) komplette Reduktion des ersten Auftretens von Neuralrohrdefekten und der totalen Rate von strukturellen Fehlbildungen (*Bower 1995, Czeizel 1995, Czeizel et al. 1996*)

- die optimale tägliche Einnahme von Folat in perikonzeptioneller Periode liegt bei 0,66mg/d (gewöhnliche Folateinnahme: 0,18mg/d) (*Czeizel 1998*)
- durch 0,4mg Folsäure/Tag wird die Entstehung von Neuralrohrdefekten um 45% reduziert (tägliches Minimum: 0,05mg Folsäure) (*Swain und Clair 1997*)
- Folsäuremengen zwischen 0,36 und 0,8mg/d wirken präventiv in Bezug auf Neuralrohrdefekte (*Bower 1995*)
- oft verwendete Folsäurekonzentration für Prävention von Neuralrohrdefekten: 0,4 bis 0,8mg/d (für Prävention des Wiederauftretens eines Neuralrohrdefektes eventuell höhere Dosen ? 4 mg/d, obwohl in vielen Studien gezeigt wurde, dass 0,4mg Folsäure/Tag als Komponente eines Multivitaminpräparates ausreichend sind) (*Czeizel 1995, Butterworth und Bendich 1996*)

LKGS sind mindestens zu zwei Dritteln multifaktoriellen Ursprungs. Selbst bei Vorhandensein endogener erblicher Faktoren erfolgt eine Spaltinduktion nur bei zusätzlich einwirkenden exogenen Einflüssen in der sensitiven Phase des kraniofazialen Systems während der Organogenese. Präventive Maßnahmen können durch pharmakokinetische bzw. dynamische Interaktionen von präventiven Medikamenten mit endogenen und/oder exogenen Teratogenen sowie durch Induktion oder Steigerung von Reparationsmechanismen nach Einwirkung teratogener Impulse wirken. Die Mechanismen können entweder in der Mutter oder im Embryo auftreten, je nach Möglichkeit des Plazentadurchtritts (*Schubert et al. 1990*).

Die Natulan®-Gabe an die Gruppen FP, TP, FTP, MP und P erfolgte jeweils am 14. Trächtigkeitstag. Die Feten dieser Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der **SSL** und des **Gewichtes** signifikant von den Feten der Gruppen ohne Procarbazineinfluss (Gruppen F, T und K). Die Tiere, denen Natulan® verabreicht wurde, hatten eine geringere Wachstumsrate, mit niedrigerem Gewicht und einer kleineren SSL.

Durch zahlreiche tierexperimentelle Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Applikation von Procarbazin an trächtige Ratten am 14. Trächtigkeitstag in einer Dosis von 200mg/kg LM an den Feten zur Ausprägung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten führt (*Kreybig et al. 1968, 1970a, b, Schmitz et al. 1972, 1973, Rolffs et al. 1973, Johnson et al. 1984, Bienengräber et al. 1994, 1999a, b, Malek et al. 2003, 2004*). Schon *Abou-Tara (1975)* wies auf die einheitliche Entstehung charakteristischer Missbildungssyndrome bei sämtlichen überlebenden Feten nach Applikation von 200mg Natulan®/kg LM am 14. Tag der Gestation hin. Diese Dosis führte zu einer beträchtlichen Hemmung des Wachstums. So betrug die durchschnittliche Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der fehlgebildeten Feten nur 70% der gleichaltrigen Kontrollfeten. Es traten folgende Fehlbildungen des Skelettes auf:

- vordere Extremitäten (Adaktylien)
- hintere Extremitäten (hypoplastische Femora, fehlendes Becken, Fehlen oder nur knorpelige Rudimente von Tibiae, Fibulae, Tarsalia und Phalangen)
- Wirbelsäule (hypoplastische [1-2 mm lange] und geknickte Caudae)
- Rippen (nur als unvollständige Ansätze unmittelbar über den Wirbelkörpern angelegt)
- Sternalaplasie
- Schädel (Unterkiefer stark hypogen, hypoplastisches Dentale der Maxilla, Muskel- und Gelenkfortsätze nur rudimentär ausgebildet, hypoplastische Gaumenfortsätze, Ankyloglossie)

(*Kreybig et al. 1970b, Abou Tara 1975, Bienengräber und Müller 1993, Bienengräber et al. 1994, 1997, 1999a*).

Malek et al. (1996) fanden hingegen nach einer Natulan®-Applikation von 5mg/100g LM während der Hell-Phase keine signifikanten Änderungen der Gewichte und SSL im Vergleich zur Kontrollgruppe, was auf die niedrige Dosierung des Zytostatikums zurückgeführt werden könnte. Im Gegensatz dazu bewirkte dieselbe Dosis Procarbazin, in der Dunkel-Phase verabreicht, signifikante Gewichtsreduktionen und Wachstumsstörungen. Die durch Natulan® verursachten Gewichtsreduktionen und geringeren SSL der Feten konnten durch die zusätzliche Applikation von Thiozyanat (SCN^-) bzw. Folsäure (Gruppen FP, TP und FTP) nicht kompensiert werden. Beim Vergleich der Fehlbildungen in den Gruppen P und TP wies letztere am Os metacarpale III, den Ossa digitalia III und V der vorderen Extremität und der Fibula eine geringere Knochenreife auf. Diese Ergebnisse waren unerwartet. Daraus kann geschlossen werden, dass Thiozyanat in der Lage ist, die teratogenen Effekte des Procarbazins zu steigern. Da Thiozyanat die Zelltätigkeit anregt, muss eine unkontrollierte Mehraufnahme des Zellgiftes Natulan® diskutiert werden. Dieser Mechanismus deutet darauf hin, dass das Cyclophosphamidmodell (*Kramer et al.* 1983) nicht so einfach auf Procarbazin übertragbar ist. Beide Zytostatika haben alkylierende Eigenschaften und entfalten ihre teratogene oder vielmehr antiteratogene Wirkung nach ihrer Aktivierung in Carbokationen und verursachen Bindungen sowie Spaltungen der DNA-Ketten (*Rutishauser und Bollag* 1963, *Dorr und Fritz* 1980, *Dold et al.* 1993, *Robbiano et al.* 1994). Offensichtlich haben die biotransformierten Metabolite der Agenzien eine unterschiedliche Affinität zu SCN^- -Anionen. Folglich hat Thiozyanat, in Kontrast zu den Ergebnissen von *Wattenberg* (1979), bezüglich der Ossifikation keinen antiteratogenen Effekt. Vermutlich ist der antiteratogene Effekt abhängig von den Bindungseigenschaften der Substanzen mit protektiven Eigenschaften. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Knochen des Skelettes ihre sensiblen Phasen gegen teratogene Agenzien in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung durchlaufen. Während im Kopf-Hals-Bereich lediglich die Ossifikation des Os nasale und des Os occipitale durch Procarbazin verzögert wurden, traten an den Endgliedern der Extremitäten sehr ausgeprägte Veränderungen auf.

Hinsichtlich der SSL und der Gewichte der Feten bewirkte die zusätzliche Gabe von Folsäure an die Tiere der Gruppen mit Natulan®-Applikation (Gruppe FP) keine signifikanten Veränderungen im Vergleich mit Gruppe P. Gruppe F wies keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe K auf. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben einer signifikanten positiven Einflussnahme von Folsäure auf die durch Procarbazin hervorgerufenen Skelettveränderungen könnte die zu geringe Dosierung des Vitamins sein. Möglicherweise war der Applikationszeitpunkt von Folsäure während der teratogenen Phase zu spät gewählt und damit die Verfügbarkeit als antiteratogenes Agens nicht in ausreichendem Umfang gegeben. In anderen Arbeiten wird auf die große Bedeutung einer perikonzeptionellen Folsäureapplikation hingewiesen (*Bower 1995, Butterworth und Bendich 1996, Czeizel et al. 1996, Hall und Solehdin 1998, Hol et al. 1998, Hörsten und Pelz 1996, Yoder 1999*).

Malek et al. (2003) applizierten an LEW.1A-Ratten vom 14. bis 17. Gestationstag je 0,4mg Folsäure/100g LM nach einer Procarbazingabe von 20mg/100g LM am 14. Tag. Sie wiesen mit ihren Untersuchungen eine unterstützende Wirkung der Folsäure bei intrauterinen Präventions- bzw. Reparationsprozessen von kompletten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten nach. Eine Folsäureapplikation in oben beschriebener Konzentration - im Vergleich mit den vorliegenden Versuchen 2,5-mal höher - ist demnach als partieller Schutz gegen die Procarbazin-Teratogenität anzusehen (*Bienengräber et al. 2001*). Dabei ist, weiterführenden Experimenten von *Malek et al. (2004)* zufolge, das Ausmaß der protektiven Wirkung von Folsäure auf Procarbazin-induzierte Wachstumsretardationen, Gaumenspalten und Mikrogenien geschlechtsspezifisch und dosisabhängig. *Czeizel et al. (1999)* beobachteten einen dosisabhängigen Effekt der Folsäure auf die Prävention von orofazialen Spaltbildungen auch am Menschen.

Bezüglich der SSL und Gewichte führte die kombinierte Anwendung von Folsäure und Thiozyanat in der Gruppe FTP ebenfalls nicht zur Kompensation des Procarbazineffektes. Somit kann für die genannten Parameter nicht von einer skelettspezifischen Prävention von Folsäure und Thiozyanat gegen Procarbazin ausgegangen werden.

An **Kopf** und **Rumpf** traten lediglich geringe signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. So wurden Hemmungsfehlbildungen am Os nasale, dem 1. Zervikalwirbel und der 13. Rippe beobachtet. Die Ossa nasalia der Feten, die am 14. Trächtigkeitstag einer Procarbazinapplikation ausgesetzt wurden (Gruppen FP, TP, FTP und P), waren signifikant geringer ossifiziert als die der Feten ohne Natulan®-Einfluss (Gruppen F, T und K). Das spricht dafür, dass sich das Nasenbein um den 14. Trächtigkeitstag, und damit zum Zeitpunkt der Natulan®-Applikation, in seiner sensiblen Phase bezüglich der Ossifikation befindet. Die alleinige Thiozyanatgabe in der Gruppe T bewirkte eine signifikant schwächere Verknöcherung im Vergleich mit der Kontrollgruppe K. Möglicherweise führten durch Thiozyanat veränderte zelluläre Membraneigenschaften zu einer negativen Beeinflussung der Ossifikation im Bereich des Os nasale. Die bislang in der Literatur diskutierten durch Thiozyanat hervorgerufenen Änderungen der Membraneigenschaften beziehen sich hauptsächlich auf schnell proliferierende Gewebe (*Durbin* 1984, *Weuffen* et al. 1984c, 1990b).

Die 13. Rippe fehlte in der Gruppe FTP signifikant häufiger als in allen anderen Gruppen. Die Ursache hierfür ist unklar. Es muss eine Verstärkung des negativen Procarbazineffektes durch die zusätzliche hohe Anzahl an Applikationen diskutiert werden, welche für die Tiere eine Stresssituation und dahingehend einen Störfaktor hinsichtlich der Skelettentwicklung darstellen. Andererseits lösen Einwirkungen wie Blutentnahmen und Injektionen nur einen schwachen Stress aus, was nach *Kramer* et al. (1979) zu einer Erhöhung des Thiozyanat-Serumspiegels führt. Der gesteigerte SCN⁻-Wert könnte wiederum eine veränderte Membrankonfiguration bewirkt haben, wodurch eine Wirkungsverstärkung des Procarbazins denkbar wäre.

Während der intrauterinen Entwicklung der Rattenfeten werden die **Extremitäten** am 14. Trächtigkeitstag (Embryogenese) ausgebildet, um sich in der frühen fetalen Entwicklungsphase (15. und 16. Tag) zu differenzieren. Zu diesem Zeitpunkt wird das Skelett knorpelig vorgebildet. Am 17. Tag der Gestation beginnt die Ossifikation in der Mandibula und setzt sich am 18. Tag an Schädelbasis, Rippen, Wirbelsäule und Extremitäten fort. Am 19. Tag erfolgt die Ossifikation der Sacralwirbel (*Brock und Kreybig* 1964). Dies weist, wie auch die Resultate der vorliegenden Arbeit, auf ein Fortschreiten der Ossifikation von kranial nach kaudal hin. Ferner konnte eine Abnahme der Knochenreife von proximal nach distal festgestellt werden. Im Gegensatz dazu beobachteten *Gille et al.* (1998) an Wistarratten post partum, dass innerhalb einer Extremität das Wachstum der weiter distal gelegenen Glieder früher abgeschlossen ist. Dieser disto-proximale Wachstumsgradient wurde von *Lippert* (1963a,b) auch am Menschen nachgewiesen. *Gille et al.* (1998) beschrieben darüber hinaus ein leicht beschleunigtes Wachstum der vorderen Extremität verglichen mit den korrespondierenden Knochen der hinteren Extremität. Dies wiederum stimmt mit den ermittelten Ergebnissen und vorangegangenen Untersuchungen von *Weingärtner et al.* (2004a) überein. Die vorderen Gliedmaßen entwickelten sich etwas früher als die hinteren Gliedmaßen und waren hinsichtlich der Knochenreifung weiter fortgeschritten. Die Unterschiede im Extremitätenwachstum zeigten sich auch bei anderen Säugetierarten wie Kaninchen (*Haardick* 1956) und Hunden (*Salomon et al.* 1994). Die stärker ausgeprägten Schädigungen der hinteren Gliedmaßen, verglichen mit den vorderen Gliedmaßen, bieten einen deutlichen Hinweis darauf, dass sich die vorderen Extremitäten etwas eher entwickeln. Trotz dieser leichten Differenzen gilt es als gesichert, dass beide Gliedmaßenknospen (vordere und hintere) am bzw. um den 14. Tag vorhanden sind. Die mit Natulan® behandelten Embryonen/Feten wiesen charakteristische Veränderungen der Skelettreifung (Adaktylien der vorderen und hinteren Extremitäten, Syndaktylien der hinteren Extremitäten, Hypogenien der Mandibula, rudimentäre Costae) auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von *Abou Tara* (1975), *Bienengräber* und *Müller* (1993)

sowie *Bienengräber* et al. (1994, 1997). Die auffälligsten Unterschiede zwischen den Gruppen traten an den am weitesten distal lokalisierten Gliedern der Extremitäten auf.

Während die Ossa digitalia III und V der vorderen Extremität in der Gruppe FP weiter ossifiziert waren als in der Gruppe TP, hatte an der hinteren Extremität das Thiozyanat, alleinig oder in Kombination verabreicht (Gruppen TP und FTP), einen stärkeren präventiven Einfluss auf die durch Natulan® induzierten Fehlbildungen. Die stärksten präventiven Effekte in der Gruppe TP traten am Os metatarsale II und in der Gruppe FTP an den Ossa metatarsalia I und II sowie den Ossa digitalia I und V gegenüber den verbleibenden Präventionsgruppen auf. Demzufolge hat Thiozyanat allein oder in Kombination mit Folsäure neben einer Fehlbildungsinduktion durch Procarbazin (Gruppen TP und FTP) an der hinteren Extremität einen stärkeren präventiven Effekt als an der vorderen Gliedmaße. Hingegen wirkte an den vorderen Phalangen die Verabreichung von Folsäure neben der teratogenen Einflussnahme von Procarbazin (Gruppe FP) hinsichtlich der Knochenreifung stärker protektiv als an den Gliedern der hinteren Extremität.

Die durch Procarbazin induzierten Fehlbildungen konnten durch die Applikation von Folsäure und/oder Thiozyanat nicht verhindert werden, jedoch zeigten sich für die einzelnen Skelettteile unterschiedliche präventive Effekte.

Die Knochenanlagen, die von der Procarbazinapplikation nicht beeinträchtigt wurden, hatten ihre sensible Phase entweder vor oder nach dem 14. Trächtigkeitstag.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Dosierung des Wirkstoffes Procarbazin ausreichend war, um teratogene Effekte auf die Knorpel-Knochen-Entwicklung der Feten auszuüben. In einer Konzentration von 20mg/100g LM ist Natulan® andererseits nicht so toxisch, dass es den Säugetierorganismus letal schädigen würde.

Dies war jedoch in den Gruppen, denen der embryotoxische Wirkstoff **Methotrexat** verabreicht wurde (Gruppen MP und M), der Fall. Nach der Applikation von 0,0026mg MTX/100g LM (entspricht 2mg/75kg LM) am 1.,

7. und 14. Trächtigkeitstag konnten bei der Schnittentbindung am 21. Tag der Gestation ausnahmslos resorbierte Früchte gewonnen werden. Die Darstellung der Implantationen erfolgte hierbei mittels Ammoniumsulfid. Es steht zur Diskussion, ob die einzelne Dosis des MTX zu hoch gewählt war, oder die Anzahl der Applikationen die embryotoxische Wirkung verursachte. Beim Menschen liegt die therapeutische Dosis bei 5 bis 25mg MTX je Woche. Diesbezüglich galt die in der vorliegenden Arbeit applizierte Dosis als nicht toxisch, was jedoch durch die Untersuchungsergebnisse widerlegt wurde. *De Sesso und Jordan (1977)* beobachteten bereits sechs Stunden nach einer Applikation von 1,92mg MTX/100g LM an Kaninchen am 12. Trächtigkeitstag bei 95% der Feten Strukturveränderungen an den Extremitäten, wie fehlende und überzählige Finger, Syndaktylien und verkümmerte Extremitäten bei relativ normaler proximaler Anatomie. Die dabei gewählte MTX-Konzentration erscheint im Vergleich zu der im vorliegenden Versuch applizierten Wirkstoffmenge relativ hoch. Die Ursache für die stark differierenden Ergebnisse ist vermutlich in der sich unterscheidenden Stoffwechselrate der beiden Spezies zu suchen.

Die intrauterine Entwicklung der Ratte gliedert sich nach *Schumacher und Fanghänel (1973)* in die Blastogenese (0. bis 8. Tag), die Embryogenese (8. bis 14. Tag) und die Fetogenese (15. bis 21. Tag). Die Blasto- und Embryogenese sind durch ein sehr schnelles Wachstum und eine Vielzahl von Formveränderungen gekennzeichnet. Die Einwirkung teratogener Noxen in diesen beiden Perioden führt zur höchsten Fehlbildungsrate. Eine weitere mögliche Erklärung für die Resorptionen aller Feten nach MTX-Gabe wäre demnach die zu zeitige Applikation am 1. Gestationstag. Da MTX hochgradig embryotoxisch wirkt (*Milunsky et al. 1968, Powell und Ekert 1971, De Sesso und Jordan 1977, De Sesso und Goeringer 1992, Luijsterburg et al. 1997*), wäre es denkbar, dass die Mehrzahl der Blastozysten bereits zu diesem Zeitpunkt abstarben und resorbiert wurden. Während der Blastogenese findet eine rapide Vermehrung relativ primitiver Zellen statt. Werden in diesem Stadium nur wenige Zellen geschädigt, kann der Verlust unter Umständen vollständig, d. h. ohne das Auftreten von Fehlbildungen, ausgeglichen werden. Ansonsten gehen nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip alle Zellen zugrunde (*Moore 1977*).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Wirkstoff MTX während der intrauterinen Entwicklung einen relativen Folatmangel induzieren. Bisher fehlen in der Wissenschaft Versuche, in denen der alleinige Folsäuremangel als Ursache für die Ausbildung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Skelettveränderungen untersucht wird. Aufgrund der bereits genannten in Frage kommenden Gründe war eine Auswertung der Fetenskelette der Gruppen MP und M nicht möglich. Für nachfolgende Untersuchungen empfiehlt es sich, den Wirkstoff MTX niedriger zu dosieren bzw. den Zeitpunkt der Applikation anders zu wählen.

Abweichungen und **Ungenauigkeiten** der metrischen Untersuchungsergebnisse können u. a. durch die Dauer der Begattungszeit zustande gekommen sein. Diese war mit vier Stunden im Vergleich zu anderen Arbeiten bereits stark reduziert, jedoch wirken sich auch Unterschiede von wenigen Stunden als breite Streuung im Erscheinungsbild der Fehlentwicklungen und Wachstumsverzögerungen der Feten aus. Eine vollständige Ausschaltung dieses Faktors kann nur durch artifizielle Insemination zum gleichen Zeitpunkt des Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere erreicht werden. Für die Genauigkeit der Versuchsergebnisse ist der Zeitpunkt der Applikation der verschiedenen Wirkstoffe von großer Bedeutung (*Güttner* 1982). Der Säugetierorganismus unterliegt, somit auch seine Reaktionen auf die applizierten Pharmaka, einem Biorhythmus. Aus diesem Grunde wurden alle Applikationen zur gleichen Stunde (7.00 Uhr) des jeweiligen Tages vorgenommen.

Wie der Zeitpunkt, kann auch die Art der Applikation auf die Untersuchungsergebnisse Einfluss nehmen. Folsäure und Thiozyanat wurden subkutan, Natulan® und MTX intraperitoneal verabreicht. Die Gefahr der Fehlapplikation in innere Hohlorgane bzw. der Verletzung von Leber und Milz ist bei intraperitonealen Injektionen besonders hoch (*Güttner* 1982). Trotz eines Vorgehens mit größtmöglicher Sorgfalt sind etwaige injektionsbedingte mechanische Schädigungen der Säugetierorganismen nicht vollkommen auszuschließen. Zum Ausschluss eventueller negativer Effekte, die durch die Applikationsarten aufgetreten sein könnten, erhielten die Tiere der Kontrollgruppe alle Injektionen mit physiologischer

Kochsalzlösung. Das injizierte Volumen entsprach dabei der in den Versuchsgruppen verabreichten Menge. Ein möglicherweise bestehendes Infektionsrisiko konnte ausgeschlossen werden, indem für jedes Tier neue sterile Lösungen und Kanülen verwendet wurden.

Dem Decken wurden ausschließlich Weibchen mit einer Körpermasse von ca. 220g zugeführt. Damit war das von *Hagemann* (1960) und *Jung* (1962) publizierte Mindestgewicht der für die Paarung geeigneten Rattenweibchen von 120 bis 150g deutlich überschritten, und das optimale Alter hinsichtlich der Fruchtbarkeit von 100 bis 300 Tagen erreicht.

Durch die zur Anwendung gekommene modifizierte Knorpel-Knochen-Färbung nach *Brylla* und *Wendler* (1979) ließen sich sehr detaillierte Aussagen über den Stand der Ossifikation am 21. Gestationstag treffen. Dieses Verfahren der simultanen Färbung mit Alizarinrot und Alicianblau bringt diffizile knöcherne und knorpelige Skelettanteile gleichermaßen gut zur Darstellung (*Whitaker* und *Dix* 1979, *Schmidt* 1981).

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der bioaktiven Wirkstoffe Folsäure und Thiozyanat, separat sowie in Kombination, auf die Skelettentwicklung von LEW.1A-Ratten zu untersuchen. Inbegriffen war die Überprüfung eines protektiven Effektes beider Substanzen bei Fehlbildungsinduktion durch Procarbazin und Methotrexat. Des weiteren galt es, die Knochenreife von Rattenfeteten am 21. Tag post conceptionem näher zu charakterisieren.

Die normale Embryonalentwicklung der Ratte zeigte am Skelett unterschiedliche Stadien der Knochenreife am 21. Trächtigkeitstag. Die Reifung des Skelettsystems erfolgte von kranial nach kaudal und von proximal nach distal. Die vorderen Extremitäten waren weiter entwickelt als die hinteren Gliedmaßen.

Methotrexat führte in der gewählten Dosis zur intrauterinen Resorption aller Feteten und war daher für die Beurteilung der Skelettreife ungeeignet.

Durch die Procarbazinapplikation am 14. Tag der Gestation wurden nicht alle Skelettbestandteile in ihrer Entwicklung beeinflusst. Lediglich Knochen, die sich um den Zeitpunkt der Natulan®-Gabe in ihrer sensiblen Entwicklungsphase befanden, wurden in ihrer Reifung und Entwicklung beeinträchtigt. Aufgrund der abnehmenden Knochenreife von kranial nach kaudal bzw. proximal nach distal ergaben sich an den Knochen der Gliedmaßen mehr sensible Phasen, besonders für die der hinteren Extremität. Zwar waren vollständige Präventionen von Fehlbildungen nach teratogener Beeinflussung nicht zu verzeichnen, jedoch zeigten sich für einzelne Skeletteile unterschiedliche präventive Effekte.

In der Gruppe FP (Folsäure und Procarbazin) wiesen das Os occipitale sowie die Ossa digitalia III und V der vorderen Extremität eine weitere Knochenreife auf als in der Gruppe TP, während an der hinteren Extremität das Thiozyanat, alleinig oder in Kombination verabreicht (Gruppen TP und FTP), einen stärkeren präventiven Einfluss auf die Natulan®-induzierten Fehlbildungen besaß. Die stärksten präventiven Effekte in der Gruppe TP traten beim Os metatarsale II und in der Gruppe FTP an den Ossa

metatarsalia I und II sowie den Ossa digitalia I und V gegenüber den verbleibenden Präventionsgruppen mit Procarbazinapplikation auf. Demzufolge hat Thiozyanat allein oder in Kombination mit Folsäure neben einer Fehlbildungsinduktion durch Procarbazin (Gruppen TP und FTP) an der hinteren Extremität einen stärkeren präventiven Effekt als an der vorderen Gliedmaße. Hingegen wirkte an den vorderen Phalangen die Verabreichung von Folsäure neben der teratogenen Einflussnahme von Procarbazin (Gruppe FP) hinsichtlich der Knochenreifung stärker protektiv als an den Gliedern der hinteren Extremität.

Die sensible Phase ist nicht identisch mit dem Reifegrad oder dem Entwicklungsstadium. Sie ist spezifisch für jeden Knochen an jedem Tag der Embryonalentwicklung. Durch eine alleinige Folsäuregabe (Gruppe F) konnte kein signifikanter Anstieg der Skelettreife im Vergleich mit der Kontrollgruppe K beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigten keinen protektiven oder antiteratogenen Effekt bei alleiniger Thiozyanatgabe (Gruppe T) gegenüber der Kontrollgruppe K. Darüber hinaus beschleunigte die Applikation von SCN^- neben einer Procarbazingabe (Gruppe TP) die teratogenen Effekte des Procarbazins am Os metacarpale III, den Ossa digitalia III und V der vorderen Extremität sowie der Fibula.

Diese Effekte waren unerwartet und es empfiehlt sich deren Berücksichtigung bei der onkologischen Therapie in der Humanmedizin. Procarbazin ist ein erfolgreiches Medikament bei der Behandlung von Morbus Hodgkin. Es ist zu empfehlen, dass Patienten, welche sich einer Krebstherapie mit Procarbazin unterziehen, nicht unkontrolliert thiozyanatreiche Lebensmittel, z. B. Wirsing Kohl, Brokkoli oder Chinakohl, erhalten.

7. Schrifttum

- 1 Abou-Tara N:
Experimentell erzeugte Mißbildungen des Kauschädels bei der Ratte durch Behandlung mit verschiedenen Hydrazinderivaten an einzelnen Tagen der vorgeburtlichen Entwicklung.
Med. Diss., Hamburg 1975.
- 2 Achon M, Reyes L, Alonso-Aperte E, Ubeda N, Varela-Moreiras G:
High dietary folate supplementation affects gestational development and dietary protein utilization in rats.
J Nutr. 1999; 129: 1204-8.
- 3 Adam C, Weuffen W, Kramer A, Below H, Köhler KH:
Einfluß von Thiocyanat auf die Entwicklung von Usambaraveilchen und Tradescantia am Modell der Hydrokultur.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987; 36: 107-8.
- 4 Aita N, Ishii K, Akamatsu Y, Ogasawara Y, Tanabe S:
Cloning and expression of human liver rhodanese cDNA.
Biochem Biophys Res Commun. 1997; 23: 56-60.
- 5 Alexander WD, Wolff J:
Thyroidal iodide transport. VIII. Relation between transport, goitrogenic and antigoitrogenic properties of certain anions.
Endocrinol. 1966; 78: 581-90.
- 6 Alonso-Aperte E, Ubeda N, Achon M, Perez-Miguelsanz J, Varela-Moreiras G:
Impaired methionine synthesis and hypomethylation rats exposed to valproate during gestation.
Neurology. 1999; 52: 750-6.

- 7 Anderson LL, Collins GJ, Ojima Y, Sullivan RD:
A study of the distribution of methotrexate in human tissues
and tumors.
Cancer Res. 1970; 30: 1344-8.
- 8 Azzone GF, Massari S:
Active transport and binding in mitochondria.
Biochem biophys Acta. 1973; 301: 195-226.
- 9 Bancroft JB, Rutzler F:
Ber Ges Physiol 1932; 64: 389
zit.: Merck's Jahresbericht XLVII 1933: 259.
- 10 Barber RC, Lammer EJ, Shaw GM, Greer KA, Finnel RH:
The role of folate transport and metabolism in neural tube defects.
Mol Genet Metab. 1999; 66: 1-9.
- 11 Below H, Weuffen W:
Analytik von Thiocyanat in biologischen Materialien.
In: Weuffen W und Decker H: Thiocyanat - ein bioaktives Ion.
I.S.M.H., Törpin 2004: 79.
- 12 Bély M, Tanka D:
Histochemische Untersuchungen der Aktivität der Thiosulfat-Zyanid-
Sulfurtransferase und Cytochromoxidase im Knorpel- und
Knochengewebe.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 20.
- 13 Bender RA:
Membrane transport of Methotrexate (NSC-740) in human
neoplastic cells.
Cancer Chemother Rep. 1975; 6: 73-82.

- 14 Bienengräber V, Fanghänel J, Malek FA, Kundt G:
Application of thiamine in preventing malformations, specifically cleft alveolus and palate, during the intrauterine development of rats.
Cleft Palate Craniofac J. 1997; 34: 318-24.
- 15 Bienengräber V, Malek FA, Fanghänel J, Abou-Tara N:
Hydrazine-induced disturbances in the craniogenesis of experimental animals.
In: Vogel R, Fanghänel J, Giebel J: Aspects of teratology. Vol. 1. Tectum, Marburg 1996: 209-13.
- 16 Bienengräber V, Malek FA, Fanghänel J, Kundt G:
Disturbances of palatogenesis and their prophylaxis in animal experiments.
Anat Anz. 1999a; 1: 111-5.
- 17 Bienengräber V, Malek FA, Möritz KU, Fanghänel J, Gundlach KK, Weingärtner J:
Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study.
Cleft palate Craniofac J. 2001; 38: 393-8.
- 18 Bienengräber V, Malek FA, Möritz KU, Fanghänel J, Weingärtner J, Gundlach KKH:
Prävention Procarbazin-induzierter Gaumenspalten mit Folsäure - eine experimentelle Studie.
10. Symposium der AG Teratologie, Greifswald 25.09.1999b.
- 19 Bienengräber V, Müller P:
Tierexperimentelle Studie zur Thiaminprophylaxe von Fehlbildungen unter besonderer Berücksichtigung von Kiefer- und Gaumenspalten.
Rostock Medizin Beiträge. 1993; 1: 79-89.

- 20 Bienengräber V, Müller P, Fanghänel J, Abou-Tara N:
Begleitschäden am Viszerokranium bei Rattenfeteten mit
experimentell induzierten Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten.
Dtsch Zahnärztl Z. 1994; 49: 258-60.
- 21 Bischoff KB, Dedrick RL, Zaharko DS, Longstreth JA:
Methotrexate pharmacokinetics.
J Pharm Sci. 1971; 60: 1128-33.
- 22 Bleyer WA:
The clinical pharmacology of methotrexate.
Cancer. 1978; 41: 36-51.
- 23 Böhland H:
Bindungsverhältnisse und Ligandeigenschaften der Thiocyanat-
gruppierung.
In: Weuffen W: Medizinische und biologische Bedeutung der
Thiocyanate (Rhodanide).
Volk und Gesundheit, Berlin 1982: pp 28.
- 24 Böhland H:
Thiocyanate compounds.
In: Golub AM, Köhler H, Skopenko VV: Chemistry of
Pseudohalogenides.
Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo 1986: pp 239.
- 25 Borsa J, Whitmore GF:
Studies relating to the mode of action of methotrexate. 3. Inhibition
of thymidylate synthetase in tissue culture cells and in cell-free
systems.
Mol Pharmacol. 1969; 5: 318-32.

- 26 Boulos BM, Hanna F, Davis LE, Almond CH:
Placental transfer of antipyrine and thiocyanate and their use in determining maternal and fetal body fluids in a maintained pregnancy.
Arch int Pharmacodyn Therm. 1973; 201: 42-51.
- 27 Bower C:
Folate and neural tube defects.
Nutr Rev.1995; 53: S33-S38.
- 28 Bower C, Stanley FJ:
Dietary folate as a risk factor for neural tube defects. Evidence from a case control study in Western Australia.
Med J Aust. 1989; 150: 613-8.
- 29 Bower C, Wald NJ:
Vitamin B₁₂ deficiency and the fortification of food with folic acid.
Eur J Clin Nutr. 1995; 49: 787-93.
- 30 Brederick G, Jülich WD, Weuffen W, Schindler W:
Anwendung von anorganischen Rhodaniden bei der Ferkelaufzucht.
Arch exper Vet-med. 1977; 31: 665-70.
- 31 Brock N, von Kreybig T:
Teratogenese als pharmakologisch-toxikologisches Problem
I. Allgemeine Grundlagen: Normale Embryonalentwicklung von Ratte und Meerschweinchen.
Arzneimittelforsch. 1964; 14: 655.
- 32 Brylla E, Wendler D:
Kombinierte Knochen-Knorpel-Färbung: Methodik und Vorteile.
2. Symposium der AG Teratologie, Jena 1. bis 3.11.1979.

- 33 Buddecke E:
Grundriss der Biochemie. 8. Aufl.
W. de Gruyter, Berlin, New York 1989; 400-3.
- 34 Buhning U, Skin YS, Folsch E:
The influence of folate antagonists on the metabolism of folic acid
and its reduced derivatives in rat liver and kidney.
Cancer Res. 1977; 37: 299-304.
- 35 Burth U, Weuffen W, Jahn M, Kramer A, Müller R, Tesche M:
Mittel zur Förderung der Wundabschlußreaktion bei Pflanzen.
Patent DD 264569 A3, 1986.
- 36 Butterworth CE, Bendich A:
Folic acid and the prevention of birth defects.
Ann Rev Nutr. 1996; 16: 73-97.
- 37 Carrasco N:
Iodide transport in the thyroid gland.
Biochem Biophys Acta. 1993; 1154: 65-82.
- 38 Chabner BA, Young RC:
Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA-
synthesis in normal and tumorous target tissues.
J Clin Invest. 1973; 52: 1804-11.
- 39 Copp AJ:
Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes.
Curr Opin Neurol. 1998; 11: 97-102.
- 40 Czeizel AE:
Folic acid in the prevention of neural tube defects.
J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1995; 20: 4-16.

- 41 Czeizel AE:
Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1998; 78: 151-61.
- 42 Czeizel AE, Dudás I:
Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation.
N Engl J Med. 1992; 327: 1832-5.
- 43 Czeizel AE, Dudás I, Metneki J:
Pregnancy outcomes in a randomized controlled trial of periconceptional multivitamin supplementation. Final report.
Arch Gynecol Obstet. 1994; 255: 131-9.
- 44 Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A:
Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts.
Pediatrics. 1999; 104: 66.
- 45 Czeizel AE, Tóth M, Rockenbauer:
Population-based case control study of folic acid supplementation during pregnancy.
Teratology. 1996; 53: 345-51.
- 46 Dawson EB, Evans DR, van Hook JW:
Amniotic fluid B₁₂ and folate levels associated with neural tube defects.
Am J Perinatol. 1998; 15: 511-4.
- 47 De Angelis LM, Tong WD, Lin S, Fleisher M, Bertino JR:
Carboxypeptidase G2 rescue after high-dose methotrexate.
J Clin Oncol. 1996; 14: 2145-9.

- 48 Decker H:
Die Bedeutung von Thiocyanat bei der Peroxidase-Aktivität.
In: Weuffen W und Decker H: Thiocyanat - ein bioaktives Ion.
I.S.M.H., Törpin 2004: 203-12.
- 49 Delange F, Vigneri R, Trimarudi F, Filetti S, Pezzino V:
Etiological factors of endemic goiter in north-eastern Sicily.
J Endocr Invest. 1978; 2: 137-42.
- 50 Depersdorff J, Augsten M:
Untersuchungen über den Wert der Thiocyanatbestimmung zur
Objektivierung des Zigarettenrauchens.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 31-3.
- 51 De Sesso JM, Goeringer GC:
Amelioration by leucovorin of methotrexate developmental toxicity in
rabbits.
Teratology. 1991; 43: 201-15.
- 52 De Sesso JM, Goeringer GC:
Methotrexate-induced developmental toxicity in rabbits is
ameliorated by 1-(p-tosyl)-3,4,4-trimethylimidazolidine, a functional
analog for tetrahydrofolate-mediated one-carbon transfer.
Teratology. 1992; 45: 271-83.
- 53 De Sesso JM, Jordan RL:
Drug-induced limb dysplasia in fetal rabbits.
Teratology. 1977; 15: 199-212.
- 54 Dold U, Hermanek K, Höffken K, Sack H:
Praktische Tumorthherapie.
G. Thieme, Stuttgart, New York 1993.

- 55 Dorr RT, Fritz WL:
Cancer Chemotherapy Handbook.
Elsevier, New York 1980.
- 56 Dunn DL, Lubet RA, Prough RA:
Oxidative metabolism of N-isopropyl-alpha-(2-methyl-hydrazino)-p-toluamide hydrochloride (procarbazine) by rat liver microsomes.
Cancer Res. 1979; 39: 4555-63.
- 57 Durbin RP:
Backdiffusion of H⁺ in isolated frog gastric mucosa.
Am J Physiol. 1984; 246: 114-9.
- 58 Economides DL, Ferguson J, Mackenzie IZ, Darley J, Ware II, Holmes-Siedle M:
Folate and vitamin B₁₂ concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects.
Br J Obstet Gynaecol. 1992; 99: 23-5.
- 59 Ekholm R:
Biosynthesis of thyroid hormones.
Int Rev Cytol. 1990; 120: 243-88.
- 60 Engström KG, Sehlin J:
Thiocyanate induces vasoconstriction in rat-tail artery primed with norepinephrine.
J Lab Clin Med. 1996; 127: 391-400.
- 61 Eskes TKAB :
Folates and the fetus.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1997; 71: 105-11.

- 62 Eskes TKAB :
Open or Closed.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1998; 78: 169-77.
- 63 Essien FB, Wannberg SL:
Methionine but not folinic acid or vitamin B₁₂ alters the frequency of neural tube defects in axd mutant mice.
J Nutr. 1993; 123: 27-34.
- 64 Fanghänel J, Schumacher GH:
Problems and possibilities in teratological research.
Folia Morphol. 1984; 43: 91-7.
- 65 Fridovich I:
Inhibition of acetoacetic decarboxylase by anions. The Hofmeister lyotropic series.
J Biol Chem. 1963; 238: 592-8.
- 66 Fujinaga M, Baden JM:
Methionine prevents nitrous oxide-induced teratogenicity in rat embryos grown in culture.
Anesthesiology. 1994; 81: 184-9.
- 67 Gille U, Ludwig B, Salomon FV, Gericke A, Placzeck D, Rieck O:
Growth in rats (*Rattus norvegicus* BERKENHOUT).
3. Development of the musculoskeletal system.
J Exp Anim Sci. 1998; 39: 136-50.
- 68 Gläser A:
Onkologie.
G. Thieme, Berlin 1980.

- 69 Goldman D:
Analysis of the cytotoxic determinants for Methotrexate (NSC-740):
A role for "free" intracellular drug.
Cancer Chemother Rep. 1975a; 6: 51-61.
- 70 Goldman D:
Membrane transport of Methotrexate (NSC-740) and other folate
Compounds: Relevance to rescue protocols.
Cancer Chemother Rep. 1975b; 6: 63-72.
- 71 Greer MA, Stott AK, Milne KA:
Effect of thiocyanate, perchlorate and other anions on thyroidal
iodine metabolism.
Endocrinol. 1966; 79: 237-47.
- 72 Grisk A:
Pharmakologie und Toxikologie.
In: Weuffen W und Decker H: Thiocyanat - ein bioaktives Ion.
I.S.M.H., Törpin 2004: 103-20.
- 73 Grisk A, Kramer A, Weuffen W:
Pharmakologie und Toxikologie anorganischer Thiocyanate.
In: Weuffen W: Medizinische und biologische Bedeutung der
Thiocyanate (Rhodanide).
Volk und Gesundheit, Berlin 1982: 46-73.
- 74 Gundlach KKH, Abou-Tara N, von Kreybig T:
Tierexperimentelle Ergebnisse zur Entstehung und Prävention
von Gesichtsspalten und anderen kraniofazialen Anomalien.
Fortschr Kieferorthop. 1986; 47: 356-61.

- 75 Güttner I:
Versuchstierkrankheiten und toxikologisches Tierexperiment -
iatrogene Krankheiten.
In: Klöcking HP, Wiezorek: Aktuelle Probleme der Toxikologie.
Der Tierversuch Freiheit Halle. 1982: 81-92.
- 76 Haardick H:
Die Gestaltung der Körperproportionen durch begrenztes Wachstum
der Skelettelemente.
Acta Anat. 1956; 26: 1-99.
- 77 Hackenberger I, von Kreybig T:
Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und bei
der Ratte.
Arzneimittelforsch. 1965; 15: 1456-60.
- 78 Hagemann E:
Ratte und Maus. Versuchstiere in der Forschung.
W. de Gruyter, Berlin 1960.
- 79 Hall JG, Solehdin F:
Folate and its various ramifications.
Adv Pediatr. 1998; 45: 1-35.
- 80 Hamida BF, Soussia L, Guermazi F, Zeghal N:
Thiocyanate and central nervous system maturation of young mice.
Ann Endocrinol (Paris). 2003; 64: 268-76.
- 81 Hathcock JN:
Vitamins and minerals: efficacy and safety.
Am J Clin Nutr. 1997; 66: 427-37.

- 82 Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA:
Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts.
Am J Epidemiol. 1996; 143: 1229-34.
- 83 Heid MK, Bills ND, Hinrichs SH, Clifford AJ:
Folate deficiency alone does not produce neural tube defects in mice.
J Nutr. 1992; 122: 888-94.
- 84 Henderson ES, Adamson RH, Oliverio VT:
The metabolic fate of tritiated Methotrexate.
II. Absorption and excretion in man.
Cancer Res. 1965; 25: 1018-24.
- 85 Hibbard BM, Hibbard ED, Jeffcoate TNA:
Folic acid and reproduction.
Acta Obstet Gynecol Scand. 1965; 44: 375-400.
- 86 Hinz C:
Pharmakokinetik des Methotrexat in der Therapie kindlicher Tumoren.
Med. Diss., Greifswald 1997.
- 87 Hishida R, Nau H:
VPA-induced neural tube defects in mice. 1. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione.
Teratog Carcinog Mutagen. 1998; 18: 49-61.
- 88 Höbel M, Asmar F, Krüger FW, Maroske D:
Über die Ausscheidung von ¹³¹J in das Broncho-Trachealsekret von Laboratoriumstieren und deren Beeinflussung durch Pharmaka (II).
Arch Int Pharmakodyn Therap. 1967; 168: 116-40.

- 89 Hol FA, von der Put NMJ, Geurds MPA, Heil SG, Trijbels FJM, Hamel BCJ, Mariman ECM, Blom HJ:
Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate-synthetase) in patients with neural tube defects.
Clin Genet. 1998; 52: 119-25.
- 90 Horne DW:
Transport of folates and antifolates in liver.
Proc Soc Exp Biol Med. 1993; 202: 385-91.
- 91 Hörsten A von, Pelz L:
Periconceptional prevention of cleft lip/cleft palate. A metaanalysis.
In: Vogel R, Fanghänel J, Giebel J: Aspects of teratology. Vol. 1. Tectum, Marburg 1996: 38-40.
- 92 House JD, Brosnan ME, Brosnan JT:
Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia.
Kidney Int. 1998; 54: 1601-7.
- 93 Howell SB, Ensminger WD, Krishan A, Frei E:
Thymidine rescue of high-dose methotrexate in humans.
Cancer Res. 1978; 38: 325-30.
- 94 Ivankovic S:
Fehlende teratogene Wirkung von Nitroprussidnatrium (NNP) an Wistarratten und Kaninchen.
Arzneimittelforsch. 1979; 29: 1092-4.

- 95 Jahn M, Müller R:
Einfluß von Thiocyanat auf die Wundabschlußreaktion pflanzlicher Gewebe.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1990; 39: 45-6.
- 96 Jess G, Weuffen W:
Zur Thiocyanatverteilung im Humanblut.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 28-30.
- 97 Jirousek L:
The metabolism of the thiocyanate ion.
Physiol Bohemosloven. 1956; 5: 316-29.
- 98 Johns DG, Hollingsworth JW, Cashmore AR, Plenderleith IH, Bertino JR:
Methotrexate displacement in man.
J Clin Invest. 1964; 43: 621-9.
- 99 Johnson JM, Thompson DJ, Burck JD:
The neuroteratogenicity of procarbazine in the rat: behavioral, morphological and neurochemical.
Teratology. 1984; 30: 1-10.
- 100 Jorke D, Beickert A:
Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Thiocyanats (Rhodanid) auf die Blutbildung des Hundes.
Folia haematol. 1955; 73: 38-48.
- 101 Josting A, Diehl V, Engert A:
Methotrexat.
Onkologe. 1998; 4: 974-85.

- 102 Juchau MR:
Chemical teratogenesis.
Prog Drug Res. 1993; 41: 22-5.
- 103 Juchau MR:
Chemical teratogenesis in humans: Biochemical and molecular mechanisms.
Prog Drug Res. 1997; 49: 44-8.
- 104 Jülich WD, Hübner G, Meng W, Kramer A, Koch S, Weuffen W:
Neuere Vorstellungen zu Wechselwirkungen von Thiocyanat und Schilddrüse.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987; 36: 83-5.
- 105 Jülich WD, Kramer A, Spiegelberger E, Weuffen W:
Einfluß von NaSCN auf die Serumaktivität der Alanin-Amino-Transferase bei experimenteller Leberschädigung des Meerschweinchens und in vitro-Befunde zur Beeinflussung dieses Enzyms.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 59-60.
- 106 Jülich WD, Ploen U, Weuffen W:
Untersuchungen zum Einfluß von Thiocyanat auf die Auslösbarkeit der Asthmareaktion beim Meerschweinchen.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1990; 39: 25-7.
- 107 Jülich WD, Weuffen W:
Relevanz und Segreganz der Thiocyanat-Serumspiegelbestimmung bei Tumorpatienten in Abhängigkeit von der Prävalenz.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 37-9.

- 108 Jung S:
Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere.
G. Fischer, Stuttgart 1962.
- 109 Kirstila V, Lenander-Lumikari M, Soderling E, Tenovuo J:
Effects of oral hygiene products containing lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin on the composition of whole saliva and on subjective oral symptoms in patients with xerostomia.
Acta Odontol Scand. 1996; 54: 391-7.
- 110 Kirstila V, Lenander-Lumikari M, Tenovuo J:
Effects of a lactoperoxidase-system-containing toothpaste on dental plaque and whole saliva in vivo.
Acta Odontol Scand. 1994; 52: 346-53.
- 111 Koch S:
Tierexperimentelle Untersuchungen zum Einfluß von Thiocyanaten auf ausgewählte Regenerationsprozesse im Säugetierorganismus.
Habil-Schrift Med Fak Univ Greifswald, 1989.
- 112 Koch S, Kramer A, Kupfer M, Wehner W, Weuffen W:
Einfluß von Thiocyanat auf die Knochenfrakturheilung nach experimenteller Femurosteotomie beim Meerschweinchen.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1990; 39: 22-4.
- 113 Koch S, Kramer A, Stein J, Adrian V, Weuffen W:
Mutagenitätsprüfung im Spermakopf-Test/Maus und mutagene Potenz von 2 Desinfektionsmitteln auf Basis von Peressigsäure bzw. Phenolen.
Zbl. 1989; 188: 391-403.

- 114 Koletzko B, von Kries R:
Prävention von Neuralrohrdefekten durch Folsäurezufuhr in der
Frühschwangerschaft.
Mon Schr Kinderhkd. 1995; 143: 1003-5.
- 115 Kramer A, Berensci G, Paldy A, Weuffen W:
The antimutagenic effect of sodium thiocyanate on the mutagenicity
of cyclophosphamide toward mouse bonemarrow cells and germ
cells.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1983; 32: 69-71.
- 116 Kramer A, Böhlend H:
Biologische, medizinische und chemische Aspekte der Thio-
cyanatforschung.
Hyg Med. 1996; 21: 335-45.
- 117 Kramer A, Kühn M, Burmeister C, Weuffen W:
Einfluß von NaSCN auf das periphere Blutbild gesunder bzw. in
zytostatischer Dosierung mit Cyclophosphamid behandelte Mäuse.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987a; 36: 63-5.
- 118 Kramer A, Meng W, Reinwein D, Weuffen W, Below H, Ermisch U,
Jülich WD, Koch ST, Kellner R, Meng S, Schibille O, Strassenburg
A, Bauch K, Straube W, Ulrich FE, Ventz M:
Experimentelle und epidemiologische Untersuchungen zu
Wechselbeziehungen von Thiocyanat und Schilddrüsenfunktion.
Z Gesamte Hyg. 1990; 36: 383-7.
- 119 Kramer A, Nowotny T, Adrian V, Below H, Thürkow B:
Einfluß von UV-Bestrahlung auf den Thiocyanat Spiegel in Serum,
Haut und Leber beim Meerschweinchen.
Z Dermatol. 1996a; 182: 181-6.

- 120 Kramer A, Pitten FA, Zöllner H:
Einfluß von Thiocyanat auf die Schilddrüse im Hinblick auf
Empfehlungen für eine thiocyanatreiche Ernährung.
Dtsch Lebensmitt Rundsch. 1998; 94: 83-8.
- 121 Kramer A, Weuffen W:
Protective Wirkung von Thiocyanat am Modell der septisch
infizierten Maus.
Zentralbl Hyg Umweltmed. 1990; 190: 293-6.
- 122 Kramer A, Weuffen W, Adrian V, Adam CH, Heinrich U:
Untersuchungen zur protektiven Wirksamkeit von Natriumthiocyanat
gegenüber toxischen Einflüssen (antitoxischer SCN⁻-Effekt) an FI-
Zellen bzw. an Kressesamen.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987b; 36: 75-7.
- 123 Kramer A, Weuffen R, Below H, Jülich WD, Weuffen W:
Thiocyanat-Serumspiegel beim Meerschweinchen in Abhängigkeit
von Thiocyanatapplikation und Immunisierung.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987c; 36: 66-8.
- 124 Kramer A, Weuffen W, Hiepe T, Völzke M, Völzke, Thürkow B,
Jülich WD, Weber A:
Förderung der Wollbildung und Körpermasseentwicklung beim
Schaf durch alimentäre Thiocyanatsupplementierung.
Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 1996b; 109: 419-27.
- 125 Kramer A, Weuffen W, Schröder H, Prott V, Prott P:
Verhalten des Blutrhadanidspiegels im Streß beim
Meerschweinchen, ausgelöst durch eine Verbrennung 3. Grades.
Dt Gesundheitswes. 1979; 34: 1261-4.

- 126 Kramer A, Zarbock R, Zöllner H, Weuffen W:
Biologische Bedeutung des Thiocyanats.
Z Dermatol. 1994; 180: 182-7.
- 127 Kreybig T von:
Extremitätenmißbildung im Tierexperiment.
Arzneimittelforsch. 1965; 15: 1213-7.
- 128 Kreybig T von:
Teratologie.
Urban & Schwarzberg, München 1975.
- 129 Kreybig T von, Preussmann R, von Kreybig I:
Chemische Konstitution und teratogene Wirkung bei der Ratte. II.:
N-Alkylharnstoffe, N-Methylthioacetamid, N-Alkylsulfonamide, N,N-
Dialkylacetamide und Chloracetamid.
Arzneimittelforsch. 1970a; 19: 1073.
- 130 Kreybig T von, Preussmann R, von Kreybig I:
Chemische Konstitution und teratogene Wirkung bei der Ratte. III.:
N-Alkylcarbonhydrazide, weitere Hydrazinderivate.
Arzneimittelforsch. 1970b; 20: 363-7.
- 131 Kreybig T von, Preussmann R, Schmidt W:
Chemische Konstitution und teratogene Wirkung bei der Ratte. I.:
Carbonsäureamide, Carbonhydrazide und Hydroxamsäuren.
Arzneimittelforsch. 1968; 18: 645.
- 132 Kühn M:
Einfluß von Thiocyanat und Cerutil® auf das weiße Blutbild unter
Cyclophosphamidapplikation in cytostatischer Dosierung bei den
Species Maus und Meerschweinchen.
Med. Diss., Greifswald 1998.

- 133 Lederle Arzneimittel GmbH & Co:
Schriftenreihe Antimetaboliten, März 1985.
- 134 Leitzmann C, Watzl B:
Rohkost – integrativer Bestandteil der Vollwert-Ernährung.
Gourmet. 1986; 12: 67-70.
- 135 Lenander-Lumikari M, Tenovu J, Mikola H:
Effects of a lactoperoxidase system-containing toothpaste on levels
of hypothiocyanate and bacteria in saliva.
Caries Res. 1993; 27: 285-91.
- 136 Lippert H:
Pränatale Wachstumsvorgänge an Fuß und Tibia des Menschen.
Verh Anat Ges. 1963a; 57: 343-7.
- 137 Lippert H:
Grundregeln des relativen Wachstums beim Menschen.
Naturwiss. 1963b; 50: 366-84.
- 138 Lucock MD, Wild J, Schorah J, Levene MI, Hartley R:
The methylfolate axis in neural tube defects. In vitro
characterization and clinical investigation.
Biochem Med Metab Biol. 1994; 52: 101-14.
- 139 Luijsterburg AJ, van der Zee DC, Gaillard JL, Los FJ, Brandenburg
H, van Haeringen A, Vermeij-Keers C:
Chorionic villus sampling and end-artery disruption of the fetus.
Prenat Diagn. 1997; 17: 71-6.
- 140 Magnus P, Magnus EM, Berg K:
Increased levels of apotranscobalamins 1 and 2 in amniotic fluid
from pregnant women with previous neural tube defect offspring.
Clin Genet. 1986; 30: 167-74.

- 141 Malek FA, Bienengräber V, Leopold K, Paul I:
Dosage-dependent effect of Natulan® on embryonic development and behaviour of Wistar rats.
In: Vogel R, Fanghänel J, Giebel J: Aspects of teratology. Vol. 1. Tectum, Marburg 1996: 204-8.
- 142 Malek FA, Moritz KU, Fanghänel J, Bienengräber V:
Sex-related differences in procarbazine-induced cleft palate and microgenia and the anti-teratogenic effect of prenatal folic acid supplementation in rats.
Ann Anat. 2003; 185: 465-70.
- 143 Malek FA, Moritz KU, Fanghänel J, Bienengräber V:
Reduction of procarbazine-induced cleft palates by prenatal folic acid supplementation in rats.
Pathol Res Pract. 2004; 200: 33-40.
- 144 Marcondes S, Bau EC, Antunes E, Dietrich CP, Nader HB, De Nucci G:
Inhibition of heparin synthesis by methotrexate in rats in vivo.
Biochem Pharmacol. 2002; 64: 169-75.
- 145 Martens A:
Zum Einfluss von Folsäure und Thiocyanat auf die Entwicklung der Kiefer-Gesichtsregion der LEW.1A-Ratte unter besonderer Berücksichtigung der Prävention von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.
Med. Diss., Greifswald 2003.
- 146 Michajlovskij N:
Zur Rolle des Thiocyanats bei der Entstehung des endemischen Struma.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 21-2.

- 147 Midda M, Cooksey MW:
Clinical uses of an enzyme-containing dentifrice.
J Clin Periodontol. 1986; 13: 950-6.
- 148 Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR,
Lassman MR, Walden ME, Depp OR, Hoffman HJ:
The absence of a relation between the periconceptional use of
vitamins and neural tube defects. National Institute of Child Health
and Human Development Neural Tube Defects Study Group.
N Engl J Med. 1989; 321: 430-5.
- 149 Milunsky A, Graef JW, Gaynor MF:
Methotrexate-induced congenital malformations.
J Pediatr. 1968; 72: 790-5.
- 150 Molloy AM, Mills JL, Kirke PN, Ramsbottom D, Partlin JM, Burke H,
Conley M, Whitehead AS, Weir DG, Scott JM:
Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by
thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. Low folate
status alone may be the critical factor.
Am J Med Genet. 1998; 78: 155-9.
- 151 Moore KL:
The developing human.
WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto 1977.
- 152 Moser K, Stacher A:
Chemotherapie maligner Erkrankungen. 3. Aufl.
Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1986.
- 153 MRC Vitamin Study Research Group :
Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research
Council Vitamin Study.
Lancet. 1991; 338: 131-7.

- 154 Murphy PA:
Periconceptional supplementation with folic acid. Does it prevent neural tube defects?
J Nurse Midwifery. 1992; 37: 25-32.
- 155 Nagasawa H, Yanai R, Nakajima Y, Namiki H, Kikujama S, Shiota K:
Inhibitory effects of potassium thiocyanate on normal and neoplastic mammary development in female mice.
Eur J Cancer. 1980; 16: 473-80.
- 156 Neumann HJ, Frömmel H:
Beschreibung einer neuen, interessanten Wirkung von Cerutil.
Z Klin Med. 1986; 41: 55-8.
- 157 Nichols JB:
The pharmacologic and therapeutic properties of the sulfocyanates.
Amer J med Sci. 1925; 170: 735-8.
- 158 Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, Rozen R, Oakley GP, Adams MJ:
5,10-methylenetetrahydrofolatereductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defcets.
Am J Med Genet. 1996; 63: 610-4.
- 159 Paetzelt H, Kramer A, Lüdde KH:
Die biologische Bedeutung der Laktoperoxidase-H₂O₂-Thiocyanatsysteme.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 12-3.
- 160 Paetzelt H, Lüdde KH:
Zur Bedeutung von Myeloperoxidase und eosinophiler Peroxidase für die unspezifische Infektabwehr.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987; 36: 31-3.

- 161 Pietrzik K, Prinz-Langenohl R, Thorand B:
Mikronährstoffe in der Schwangerschaft.
Z Geburtshilfe Neonatol. 1997; 201: 21-4.
- 162 Powell HR, Ekert H:
Methotrexate-induced congenital malformations.
Med J Aust. 1971; 2: 1076-7.
- 163 Prott V, Kramer A, Schroeder H, Prott P, Weuffen W:
Untersuchungen zum Thiocyanat Spiegel in der Schwangerschaft
und im Wochenbett sowie zum Thiocyanatgehalt in der
Muttermilch.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984; 33: 34-6.
- 164 Prott V, Prott P:
Untersuchungen zum Thiocyanathaushalt bei Schwangeren und
Wöchnerinnen und ergänzende Tierversuche.
Med. Diss., Greifswald 1983.
- 165 Prott V, Raband T, Raband A, Thürkow B, Kramer A, Weuffen W:
Thiocyanatgehalt in menschlichen Embryonen und fetalen Organen
sowie bei Mutter und Kind unter der Geburt und im Wochenbett.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1990; 39: 49-51.
- 166 Relling MV, Stapleton FB, Ochs J:
Removal of methotrexate, leucovorin and their metabolites by
combined hemodialysis and hemoperfusion.
Cancer. 1988; 82: 884-8.
- 167 Robbiano L, Allavena A, Bagarolo C:
Comparison in human and rat hepatocytes of the DNA-damaging
activity of five chemicals probably carcinogenic to humans.
Toxicol In Vitro. 1994; 8: 131-7.

- 168 Rolffs J, von Kreybig T, Pfeifer G:
Über Lippen-Kiefer-Gaumenspaltformen bei Ratten durch
teratogene Substanzen.
In: Schuchardt K: Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie.
G. Thieme, Stuttgart, New York 1973; 16/17: 37.
- 169 Rosenbauer KA:
Exogene Mißbildungsfaktoren bei Mensch und Tier.
Naturwiss Rundsch. 1973; 26: 229-37.
- 170 Rosin M, Kocher T, Kramer A:
Effects of SCN⁻/H₂O₂ combinations in dentifrices on plaque and
gingivitis.
J Clin Peridontol. 2001; 28: 270-6.
- 171 Rosin M, Kramer A, Bradtke D, Richter G, Kocher T:
The effect of a SCN⁻/H₂O₂ toothpaste compared to a commercially
available triclosan-containing toothpaste on oral hygiene and
gingival health - a 6-month home-use study.
J Clin Periodontol. 2002; 29: 1086-91.
- 172 Rowsell S, Pauptit RA, Tucker AD, Melton RG, Blow DM, Brick P:
Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with
applications in cancer therapy.
Structure. 1997; 5: 337-47.
- 173 Rutishauser A, Bollag W:
Cytological investigations with a new class of cytotoxic agents:
methylhydrazine derivatives.
Experientia. 1963; 19: 131-2.

- 174 Saarivirta M, Kreula M:
Strumigene Substanzen in Nahrungs- und Futterpflanzen und ihr Übergehen in die Milch.
In: Weuffen W: Medizinische und biologische Bedeutung der Thiocyanate (Rhodanide).
Volk und Gesundheit, Berlin 1982: 221-40.
- 175 Salomon FV, Böhme U, Koch U, Gille U:
Das Skelett- und Muskelfaserwachstum von Beagle-Hunden.
Proc 20th Congr Europ Assoc Vet Anat Zürich 1994; 74.
- 176 Scatchard G, Scheinberg IH, Armstrong SH:
Physical chemistry of protein solutions: V. The combination of human serum albumin with thiocyanate ion.
J Amer Chem Soc. 1950; 72: 540-6.
- 177 Scatchard G, Yap WT:
Physical chemistry of protein solutions: XII. The effects of temperature and hydroxide ion on the binding of small anions to human serum albumin.
J Amer Chem Soc. 1964; 86: 3434-8.
- 178 Schmidt R:
Zur Leistungsfähigkeit der kombinierten Knorpel-Knochen-Färbung bei teratologischen Untersuchungen an der Labormaus.
Z Versuchstierk. 1981; 23: 224-5.
- 179 Schmitz R, Busch W, von Kreybig T:
Chemisch erzeugte Mißbildungen des Kauschädels bei Versuchstieren. I. Die Wirkung von Cyclophosphamid und 6-Mercaptopurin auf die Embryonal- und Fetalentwicklung der Ratte.
Dtsch Zahn-Mund-Kieferheilk. 1972; 59: 385.

- 180 Schmitz R, Busch W, von Kreybig T:
Chemisch erzeugte Mißbildungen des Kauschädels bei Versuchstieren. II. Teratologische Untersuchungen mit N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff bei Ratten und Mäusen.
Dtsch Zahn-Mund-Kieferheilk. 1973; 60: 220.
- 181 Schornagel JH, Leyva A, Pinedo HM:
Methotrexate with thymidine protection of rescue in advanced head and neck cancer.
Cancer Treat Rep. 1984; 68: 543-5.
- 182 Schubert J, Schmidt R, Raupach HW:
New findings explaining the mode of action in prevention of facial clefting and first clinical experience.
J Craniomaxillofac Surg. 1990; 18: 343-7.
- 183 Schulz A:
Untersuchungen zur alimentären Gabe von Thiocyanat (SCN⁻) durch verschiedene Kostformen und deren ernährungsphysiologische Bedeutung für die Immunantwort am Modell der Hepatitis B-Schutzimpfung.
Med. Diss., Greifswald 1997.
- 184 Schumacher GH, Fanghänel J:
Normo- und Teratogenese unter Schalleinwirkung.
In: Bach H: Mensch und Umwelt aus der Sicht der Anthropologie.
Veröffentlichungen der Friedrich-Schiller-Universität, Jena 1973.
- 185 Schwalbe E:
Die Morphologie der Mißbildungen des Menschen und der Tiere I-III.
G. Fischer, Jena 1913.

- 186 Schwartz DE, Bollag W, Obrecht P:
Distribution and excretion studies of procarbazine in animals and man.
Arzneimittelforsch. 1967; 17: 1389-93.
- 187 Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM:
Risk of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid preconceptionally.
Lancet. 1995a; 345: 393-6.
- 188 Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ:
Maternal preconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring.
Am J Med Genet. 1995b; 59: 536-45.
- 189 Shaw GW, Wasserman CR, O'Malley CD:
Periconceptional vitamin use and reduced risk of conotruncal and limb defects in California.
Teratology. 1994; 49: 372.
- 190 Sikka PK, McMartin KE:
Determination of folate transport pathways in cultured rat proximal tubule cells.
Chem Biol Interact. 1998; 114: 15-31.
- 191 Skeaff M, Mann J:
Should folate be added to flour to prevent neural tube defects?
N Z Med J. 1998; 111: 417-8.
- 192 Snodgrass SR:
Vitamin neurotoxicity.
Mol Neurobiol. 1992; 6: 41-73.

- 193 Stadtkus K, Miek A:
Der Einfluß des Zytostatikums Natulan® auf die Keimesentwicklung der Wistar ratte unter besonderer Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik.
Med. Diss., Greifswald 1999.
- 194 Steegers-Theunissen RPM, Smithells RW, Eskes TKAB:
Update of new risk factors and prevention of neural tube defects.
Obstet Gynecol Surv. 1993; 48: 287-93.
- 195 Stone ML:
Effects on the fetus of folic acid deficiency in pregnancy.
Clin Obstet Gynecol. 1968; 11: 1143-53.
- 196 Sutton C, Mclvor RS, Vagt M, Doggett B, Kapur RP:
Methotrexate-resistant form of dihydrofolate reductase protects transgenic murine embryos from teratogenic effects of methotrexate.
Pediatr Dev Pathol. 1998; 1: 503-12.
- 197 Swain RA, Clair L:
The role of folic acid in deficiency states and prevention of disease.
J Fam Pract. 1997; 44: 138-44.
- 198 Tamura T, Hong KH, Mizuno Y, Johnston KE, Keen CL:
Folate and homocysteine metabolism in copper-deficient rats.
Biochem Biophys Acta. 1999; 1427: 351-6.
- 199 Thorand B, Pietrzik K, Prinz-Langenohl R, Hages M, Holzgreve W:
Maternal and fetal serum and red blood cell folate and vitamin B₁₂ concentrations in pregnancies affected by neural tube defects.
Z Geburtshilfe Neonatol. 1996; 200: 176-80.

- 200 Thürkow B, Weuffen W:
Gaschromatographische Bestimmung des Thiocyanats in pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln sowie Humanserum nach papierchromatographischer Abtrennung.
Pharmazie. 1981; 36: 96-9.
- 201 Thürkow B, Weuffen W:
Möglichkeiten für eine thiocyanatreiche Ernährung.
In: Weuffen W und Decker H: Thiocyanat - ein bioaktives Ion.
I.S.M.H., Törpin 2004: 251-70.
- 202 Thürkow B, Weuffen W, Kramer A, Below H, Johnson D:
Zur Bedeutung von Thiocyanat für die gesunde Ernährung des Menschen.
Dtsch Lebensmitt Rundsch. 1992; 88: 307-13.
- 203 Tolarova M:
Periconceptional supplementation with vitamins and folic acid to prevent recurrence of cleft lip.
Lancet. 1982; 2: 217.
- 204 Tolarova M, Harris J:
Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins.
Teratology. 1995; 51: 71-8.
- 205 Tuchmann-Duplessis H, Mercier-Parot L:
Production of ocular and skeletal malformations in the rat by administration of methyl-hydrazine.
C R Seances Soc Biol Fil. 1967; 161: 2127-31.

- 206 Vaney MC, Broutin I, Retailleau P, Douangamath A, Lafont S, Hamiaux C, Prange T, Ducruix A, Rie`s-Kautt M:
Structural effects of monovalent anions on polymorphic lysozyme crystals.
Acta Crystallogr D. 2001; 57: 929-40.
- 207 Vobis V:
Untersuchungen zum Verhalten der Komponenten des Laktoperoxidase-Wasserstoffperoxid-Systems (LPS) in der Milch aus dem gesunden und kranken Euter des Rindes.
Diss A Vet-med Fakultät der Univ Leipzig, 1992.
- 208 Wattenberg LW:
Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis.
In: Miller EC: Naturally occurring carcinogens - mutagens and modulators of carcinogenesis.
Univ. Park Press Baltimore 1979; pp 315.
- 209 Weber E:
Grundriß der biologischen Statistik. 7. Aufl.
G. Fischer, Jena 1972.
- 210 Weingärtner J, Liefländer S, Below H, Fanghänel J, Bienengräber V:
The influence of procarbazine and thiocyanate on embryonic bone maturation.
Eur J Anat. 2004a; 8: 25-8.
- 211 Weingärtner J, Martens A, Bienengräber V, Fanghänel J, Kundt G:
Do folic acid and thiocyanate have a preventive effect on exogenously induced disturbances of embryonic cranial development?
Clin Oral Investig. 2004b; 8: 161-4.

- 212 Weitzel G, Schneider F, Fretzdorff AM, Seynsche K, Finger H:
Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der
Methylhydrazine.
Z Physiol Chem. 1964; 336: 271-82.
- 213 Weitzel G, Schneider F, Hirschmann WD, Durst J, Thauer R, Ochs
HD, Kummer D:
Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der
Methylhydrazine, III.
Z Physiol Chem. 1967; 348: 443-54.
- 214 Werkheiser WC:
The biochemical, cellular and pharmacological action and effects of
the folic acid antagonists.
Cancer Res. 1963; 23: 1277-85.
- 215 Weuffen W:
Ausblick.
In: Weuffen W und Decker H: Thiocyanat - ein bioaktives Ion.
I.S.M.H., Törpin 2004: 359-66.
- 216 Weuffen W, Burth U, Müller P, Tirschmann W, Kramer A, Below H:
Einfluß von Thiocyanat auf Wachstum und Resistenzeigenschaften
der Pflanze.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984a; 33: 61-2.
- 217 Weuffen W, Jahr H, Kiowski S, Baehr R, Jülich WD, Grün E, Kramer
A, Adrian V:
Wechselwirkungen von Thiocyanat (SCN^-) und Wasserstoffperoxid
(H_2O_2) bei der unspezifischen Abwehr (Resistenz) unter besonderer
Berücksichtigung der Phagozytose.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987; 36: 39-43.

- 218 Weuffen W, Jülich WD, Rotermund L:
Die protektive Wirkung von Rhodaniden beim Versuchs- und Nutztier.
Arch exp Vet med. 1975; 29: 955-62.
- 219 Weuffen W, Kramer A:
Zur Einordnung des Thiocyanateffekts innerhalb von Lebensprozessen und sich ergebende Anwendungsmöglichkeiten.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1987; 36: 5-17.
- 220 Weuffen W, Kramer A, Ambrosius H, Adrian V, Below H, Jülich WD, Koch S, Thürkow B, Verbeek F:
Zur Bedeutung des endogenen Wirkstoffes und Umweltfaktors Thiocyanat für die unspezifische und spezifische Resistenz aus hygienischer Sicht.
Zentralbl Hyg Umweltmed. 1990a; 189: 473-510.
- 221 Weuffen W, Kramer A, Below H, Böhland H, Jülich WD, Thürkow B, Burth U:
Das Thiocyanation als physiologisch bedeutsamer Wirkstoff in der belebten Natur .
Pharmazie. 1990b; 45: 16-29.
- 222 Weuffen W, Kramer A, Paetzelt H, Lüdde KH:
Biologische Bedeutung von Thiocyanat und Schlußfolgerungen für die lokale Infektabwehr.
In: Weuffen W, Berencsi G, Gröschel D, Kemter B, Kramer A, Krasilnikow AP: Handbuch der Antiseptik. Band I/4.
Volk und Gesundheit, Berlin 1984b: 218.
- 223 Weuffen W, Kramer A, Thürkow B:
Aktuelle Schwerpunkte der medizinischen und biologischen Thiocyanatforschung.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1984c; 33: 4-11.

- 224 Weuffen W, Reißmann G, Kramer A, Schroeder H, Prott V, Prott H:
Verhalten des Properdin-, Komplement- und Thiocyanat-
serumspiegels bei Gabe von Natriumthiocyanat.
Z ges Hyg Grenzgebiete. 1980; 26: 724-5.
- 225 Weuffen R, Thürkow B, Kramer A, Weuffen W, Wilhelm F,
Franke G:
Thiocyanatgehalt in verschiedenen Kompartimenten des Auges.
Wiss Z Ernst-Moritz-Arndt-Univ Med R. 1990c; 39: 52-3.
- 226 Weuffen W, Weingärtner J:
Zellprotektion.
In: Weuffen W und Decker H: Thiocyanat - ein bioaktives Ion.
I.S.M.H., Törpin 2004: 336-40.
- 227 Whitaker J, Dix KM:
Double staining technique for rat foetus skeletons in teratological
studies.
Lab Animals. 1979; 13: 309-10.
- 228 Whithouse MW, Rainsford KD:
Prevention of gastrotoxicity of Aspirin and related drugs in rats by
lithium salts and sodium thiocyanate.
Toxicol Appl Pharmacol. 1983; 68: 323-7.
- 229 Widemann BC, Balis FM, Murphy RF, Sorensen JM, Montello MJ,
O'Brien M, Adamson PC:
Carboxypeptidase-G2, thymidine and leucovorin rescue in cancer
patients with methotrexate-induced renal dysfunction.
J Clin Oncol. 1997; 15: 2125-34.

- 230 Wilmanns W, Sauer H, Schalhorn A:
Biochemical control of high-dose methotrexate/Leucovorin rescue therapy.
Recent Results Cancer Res. 1980; 74: 42-9.
- 231 Wolff G:
Transport of iodine and other anions in the thyroid gland.
Physiol Rev. 1964; 44: 45-90.
- 232 Wood JL, Kingsland N:
Labeled sulfur uptake by thyroids of rats with low plasma thiocyanate levels.
J Biol Chem. 1950; 185: 833-44.
- 233 Wyngaarden JB, Stanburg JB, Rapp B:
The effects of iodine, perchlorate, thiocyanate and nitrate administration upon the iodine concentrating mechanism of the rat thyroid.
Endocrinol. 1953; 52: 568-74.
- 234 Wyngaarden JB, Wright BM, Ways P:
The effect of certain anions upon the accumulation and retention of iodine by the thyroid gland.
Endocrinol. 1952; 50: 537-49.
- 235 Yoder DK:
Preventing neural tube defects with folic acid.
Tenn Med. 1999; 92: 177-8.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

17.03.2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susan Liefländer
 Wohnort: 03046 Cottbus, A.-Kolping-Str.8
 geboren: 21.09.1976 in Bergen/Rügen
 Familienstand: ledig

Schulbildung

09/1983 - 09/1991 Polytechnische Oberschule Hermann-Matern in
 Gingst
 09/1991 - 07/1995 Gymnasium Ernst-Moritz-Arndt in Bergen
 07/1995 Abitur

Studium

10/1996 - 10/2001 Studium der Zahnmedizin an der Ernst-Moritz-
 Arndt-Universität in Greifswald
 10/2001 Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

03/2002 - 09/2004 Anstellung als Assistenz Zahnärztin in der ZA-
 Praxis Dr. A. Stabenau in Lübben
 seit 09/2004 Anstellung als Assistenz Zahnärztin in der ZA-
 Praxis B. Schmidt in Baruth

Cottbus, 17.03.2006

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. J. Fanghänel, derzeit Leiter der Abteilung Orale Anatomie der Poliklinik für Kieferorthopädie, Präventive Zahnmedizin und Kinderzahnheilkunde, für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas. Mein besonderer Dank gilt gleichzeitig Herrn Dr. J. Weingärtner, Institut für Anatomie und Zellbiologie, für seine nachhaltige fachliche Unterstützung, viele nützliche Hinweise sowie die stets geduldige und angenehme Zusammenarbeit.

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten danke ich Herrn PD Dr. G. Kundt, Mitarbeiter am Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Universität Rostock.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau M. Bansemer, Mitarbeiterin am Institut für Anatomie und Zellbiologie, für deren tatkräftige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und bei Frau M. Rosenfeld, Mitarbeiterin am Institut für Pathologie, für die Hilfe bei der Erstellung der Fotografien bedanken.

Die Arbeit in der vorliegenden Form fertigzustellen, war jedoch erst durch die Unterstützung meines Lebensgefährten Heiko Kanisch möglich. Nicht nur dafür gebührt ihm mein herzlichster Dank.

Anhang

- Abkürzungsverzeichnis
- Mittelwerte und Standardabweichungen mit signifikanten Unterschieden in allen Gruppen (Tabellen 6 bis 13)
- Auflistung der Urdaten auf CD-ROM

Abkürzungsverzeichnis

BRUST	Brustwirbel
CAPFROLI	Caput – Os frontale links
CAPFRORE	Caput – Os frontale rechts
CAPHYOID	Caput – Os hyoideum
CAPINC	Caput – Os incisivum
CAPINTER	Caput – Os interparietale
CAPNASLI	Caput – Os nasale links
CAPNASRE	Caput – Os nasale rechts
CAPOCC	Caput – Os occipitale
CAPPAL	Caput – Os palatinum
CAPPARLI	Caput – Os parietale links
CAPPARRE	Caput – Os parietale rechts
CAPPRAES	Caput – Os praesphenoidale
CAPSPHEN	Caput – Os sphenoidale
CAPTEMLI	Caput – Os temporale links
CAPTEMRE	Caput – Os temporale rechts
CARPLI	Ossa carpi links
CARPRE	Ossa carpi rechts
CLAVILI	Clavicula links
CLAVIRE	Clavicula rechts
COSTLI	Costa links
COSTRE	Costa rechts
DIGHILI	Ossa digitorum – hintere Extremität links
DIGHIRE	Ossa digitorum – hintere Extremität rechts
DIGVOLI	Ossa digitorum – vordere Extremität links
DIGVORE	Ossa digitorum – vordere Extremität rechts
F	Folsäure-Gruppe
FEMURLI	Femur links
FEMURRE	Femur rechts
FIBULLI	Fibula links
FIBULRE	Fibula rechts

FP	Folsäure/Procarbazin-Gruppe
FTP	Folsäure/Thiozyanat/Procarbazin-Gruppe
GEW	Gewicht
HALS	Halswirbel
HUMLI	Humerus links
HUMRE	Humerus rechts
ILILI	Os ilium links
ILIIRE	Os ilium rechts
ISCHLI	Os ischii links
ISCHRE	Os ischii rechts
K	Kontrollgruppe
LM	Lebendmasse
LUMB	Lumbalwirbel
M	Methotrexat-Gruppe
MANDIBLI	Mandibula links
MANDIBRE	Mandibula rechts
MAXLI	Maxilla links
MAXRE	Maxilla rechts
METACALI	Ossa metacarpalia links
METACARE	Ossa metacarpalia rechts
METATLI	Ossa metatarsalia links
METATRE	Ossa metatarsalia rechts
MP	Methotrexat/Procarbazin-Gruppe
OZ	Ossifikationszentrum
P	Procarbazin-Gruppe
PATELLI	Patella links
PATELRE	Patella rechts
PUBILI	Os pubis links
PUBIRE	Os pubis rechts
RADLI	Radius links
RADRE	Radius rechts
SACR	Sacralwirbel
SCAPULI	Scapula links
SCAPURE	Scapula rechts

SSL	Scheitel-Steiß-Länge
T	Thiozyanat-Gruppe
TARSLI	Ossa tarsi links
TARSRE	Ossa tarsi rechts
TIBIALI	Tibia links
TIBIARE	Tibia rechts
TP	Thiozyanat/Procarbazin-Gruppe
ULNALI	Ulna links
ULNARE	Ulna rechts
ZYGLI	Os zygomaticum links
ZYGRE	Os zygomaticum rechts

Tabelle 6. Gewicht, SSL, Kopf – Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S) mit signifikanten Unterschieden

Gruppe	FP (n=22)		TP (n=30)		FTP (n=23)		F (n=30)		T (n=35)		P (n=28)		K (n=37)	
	a		b		c		d		e		f		g	
Parameter	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
GEW	1,78 ^{d,e,g}	0,19	1,83 ^{d,e,g}	0,22	1,74 ^{d,e,g}	0,31	3,33 ^f	0,42	3,17 ^f	0,37	1,83 ^g	0,26	3,35	0,35
SSL	27,23 ^{d,e,g}	1,48	26,53 ^{d,e,g}	2,13	27,09 ^{d,e,g}	1,93	36,06 ^f	2,33	35,89 ^f	1,92	26,79 ^g	1,64	36,32	1,81
CAPFROLI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPFRORE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPTEMLI	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
CAPTEMRE	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
CAPPARLI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPPARRE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPNASLI	2,23 ^{d,e,g}	0,53	2,13 ^{d,e,g}	0,35	1,96 ^{d,e,g}	0,47	2,83 ^f	0,38	2,74 ^{f,g}	0,44	2,00 ^g	0,54	2,95	0,23
CAPNASRE	2,23 ^{d,e,g}	0,53	2,13 ^{d,e,g}	0,35	2,00 ^{d,e,g}	0,43	2,83 ^f	0,38	2,74 ^{f,g}	0,44	2,00 ^g	0,54	2,95	0,23
ZYGLI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
ZYGRE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
MAXLI	3,00	0,00	2,97	0,18	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
MAXRE	3,00	0,00	2,97	0,18	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
MANDIBRE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
MANDIBLI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPINC	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPPAL	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPINTER	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPSPHEN	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPPRAES	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CAPOCC	2,14 ^{b,d,e,f,g}	0,35	2,00 ^{d,e,g}	0,00	2,00 ^{d,e,g}	0,00	2,53 ^f	0,51	2,71 ^f	0,46	2,00 ^g	0,00	2,57	0,5
CAPHYOID	1,95	0,21	1,90	0,31	1,96	0,21	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00

Tabelle 9. Rumpf 3 – Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S) mit signifikanten Unterschieden

Gruppe	FP (n=22)		TP (n=30)		FTP (n=23)		F (n=30)		T (n=35)		P (n=28)		K (n=37)	
	a		b		c		d		e		f		g	
Parameter	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
COSTLI 7	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTLI 8	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTLI 9	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTLI 10	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTLI 11	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTLI 12	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTLI 13	2,91 ^c	0,43	2,90 ^c	0,55	2,26 ^{d,e,f,g}	1,21	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 1	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 2	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 3	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 4	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 5	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 6	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 7	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 8	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 9	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 10	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 11	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 12	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
COSTRE 13	2,91 ^c	0,43	2,90 ^c	0,55	2,26 ^{d,e,f,g}	1,21	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00

Tabelle 10. Vordere Extremität 1 – Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S) mit signifikanten Unterschieden

Gruppe	FP (n=22)		TP (n=30)		FTP (n=23)		F (n=30)		T (n=35)		P (n=28)		K (n=37)	
	a		b		c		d		e		f		g	
Parameter	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
SCAPULI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
SCAPURE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
HUMLI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
HUMRE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
ULNALI	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
ULNARE	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
RADLI	2,91	0,43	2,97	0,18	2,83	0,58	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
RADRE	2,91	0,43	2,97	0,18	2,83	0,58	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00
CARPLI	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
CARPRE	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
METACALI 1	0,18 ^{d,e,g}	0,39	0,03 ^{c,d,e,g}	0,18	0,30 ^{d,e,f,g}	0,47	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,07 ^g	0,26	1,00	0,00
METACALI 2	0,45 ^{c,d,e,g}	0,60	0,63 ^{c,d,e,g}	0,49	0,96 ^{d,e,f,g}	0,56	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	0,57 ^g	0,50	2,00	0,00
METACALI 3	1,41 ^{d,e,f,g}	0,59	1,20 ^{d,e,f,g}	0,71	1,17 ^{d,e,f,g}	0,78	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,71 ^g	0,46	2,00	0,00
METACALI 4	1,00 ^{d,e,g}	1,02	1,37 ^{c,d,e,g}	0,85	0,78 ^{d,e,f,g}	1,00	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,39 ^g	0,88	2,00	0,00
METACALI 5	0,55 ^{d,e,g}	0,60	0,53 ^{d,e,g}	0,51	0,39 ^{d,e,g}	0,50	1,00 ^f	0,00	1,09 ^f	0,28	0,64 ^g	0,49	1,00	0,00

Tabelle 11. Vordere Extremität 2 – Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S) mit signifikanten Unterschieden

Gruppe	FP (n=22)		TP (n=30)		FTP (n=23)		F (n=30)		T (n=35)		P (n=28)		K (n=37)	
	a		b		c		d		e		f		g	
Parameter	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
METACARE 1	0,18 ^{d,e,g}	0,39	0,03 ^{c,d,e,g}	0,18	0,30 ^{d,e,f,g}	0,47	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,07 ^g	0,26	1,00	0,00
METACARE 2	0,45 ^{c,d,e,g}	0,60	0,63 ^{c,d,e,g}	0,49	0,96 ^{d,e,f,g}	0,56	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	0,57 ^g	0,50	2,00	0,00
METACARE 3	1,36 ^{d,e,f,g}	0,58	1,23 ^{d,e,f,g}	0,73	1,17 ^{d,e,f,g}	0,78	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,71 ^g	0,46	2,00	0,00
METACARE 4	1,00 ^{d,e,g}	1,02	1,33 ^{c,d,e,g}	0,84	0,74 ^{d,e,f,g}	0,96	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,39 ^g	0,88	2,00	0,00
METACARE 5	0,55 ^{d,e,g}	0,60	0,53 ^{d,e,g}	0,51	0,35 ^{d,e,f,g}	0,49	1,00 ^f	0,00	1,09 ^f	0,28	0,64 ^g	0,49	1,00	0,00
DIGVOLI 1	0,05 ^{d,e,g}	0,21	0,03 ^{d,e,g}	0,18	0,17 ^{d,e,g}	0,39	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGVOLI 2	0,18 ^{d,e,g}	0,39	0,03 ^{c,d,e,g}	0,18	0,26 ^{d,e,f,g}	0,45	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGVOLI 3	0,50 ^{b,d,e,g}	0,51	0,07 ^{c,d,e,f,g}	0,25	0,39 ^{d,e,g}	0,50	1,03 ^f	0,18	1,00 ^f	0,00	0,46 ^g	0,51	1,00	0,00
DIGVOLI 4	0,45 ^{d,e,g}	0,51	0,60 ^{d,e,g}	0,50	0,39 ^{d,e,f,g}	0,50	1,03 ^f	0,18	1,00 ^f	0,00	0,68 ^g	0,48	1,00	0,00
DIGVOLI 5	0,50 ^{b,d,e,g}	0,51	0,17 ^{d,e,f,g}	0,38	0,35 ^{d,e,g}	0,49	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,46 ^g	0,51	1,00	0,00
DIGVORE 1	0,05 ^{d,e,g}	0,21	0,03 ^{d,e,g}	0,18	0,17 ^{d,e,g}	0,39	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGVORE 2	0,18 ^{d,e,g}	0,39	0,03 ^{c,d,e,g}	0,18	0,26 ^{d,e,f,g}	0,45	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGVORE 3	0,50 ^{b,d,e,g}	0,51	0,07 ^{c,d,e,f,g}	0,25	0,39 ^{d,e,g}	0,50	1,03 ^f	0,18	1,00 ^f	0,00	0,46 ^g	0,51	1,00	0,00
DIGVORE 4	0,45 ^{d,e,g}	0,51	0,60 ^{d,e,g}	0,50	0,36 ^{d,e,f,g}	0,49	1,03 ^f	0,18	1,00 ^f	0,00	0,68 ^g	0,48	1,00	0,00
DIGVORE 5	0,50 ^{b,d,e,g}	0,51	0,17 ^{d,e,f,g}	0,38	0,35 ^{d,e,g}	0,49	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,46 ^g	0,51	1,00	0,00

Tabelle 13. Hintere Extremität 2 – Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (S) mit signifikanten Unterschieden

Gruppe	FP (n=22)		TP (n=30)		FTP (n=23)		F (n=30)		T (n=35)		P (n=28)		K (n=37)	
	a		b		c		d		e		f		g	
Parameter	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S	MW	S
METATLI 1	0,00 ^{d,e,g}	0,00	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,13 ^{d,e,f,g}	0,34	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,00 ^g	0,00	1,00	0,00
METATLI 2	0,00 ^{b,c,d,e,g}	0,00	0,27 ^{d,e,f,g}	0,45	0,48 ^{d,e,f,g}	0,73	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	0,07 ^g	0,26	2,00	0,00
METATLI 3	1,00 ^{d,e,g}	0,00	1,03 ^{d,e,g}	0,32	1,13 ^{d,e,g}	0,34	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,04 ^g	0,19	2,00	0,00
METATLI 4	1,14 ^{d,e,g}	0,56	1,30 ^{d,e,g}	0,65	1,30 ^{d,e,g}	0,56	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,43 ^g	0,63	2,00	0,00
METATLI 5	0,09 ^{d,e,g}	0,29	0,03 ^{d,e,g}	0,18	0,26 ^{d,e,f,g}	0,62	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	0,00 ^g	0,00	2,00	0,00
METATRE 1	0,00 ^{d,e,g}	0,00	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,13 ^{d,e,f,g}	0,34	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,00 ^g	0,00	1,00	0,00
METATRE 2	0,00 ^{b,c,d,e,g}	0,00	0,27 ^{d,e,f,g}	0,45	0,48 ^{d,e,f,g}	0,73	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	0,07 ^g	0,26	2,00	0,00
METATRE 3	1,00 ^{d,e,g}	0,00	1,00 ^{d,e,g}	0,26	1,13 ^{d,e,g}	0,34	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,04 ^g	0,19	2,00	0,00
METATRE 4	1,14 ^{d,e,g}	0,56	1,27 ^{d,e,g}	0,69	1,30 ^{d,e,g}	0,56	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	1,43 ^g	0,63	2,00	0,00
METATRE 5	0,05 ^{d,e,g}	0,21	0,03 ^{d,e,g}	0,18	0,26 ^{d,e,f,g}	0,62	2,00 ^f	0,00	2,00 ^f	0,00	0,00 ^g	0,00	2,00	0,00
DIGHILI 1	0,00 ^{d,e,g}	0,00	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,13 ^{d,e,g}	0,34	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGHILI 2	0,09 ^{d,e,g}	0,29	0,27 ^{d,e,g}	0,45	0,30 ^{d,e,g}	0,47	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,11 ^g	0,31	1,00	0,00
DIGHILI 3	0,91	0,29	0,97	0,18	0,87 ^{d,e,f,g}	0,34	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
DIGHILI 4	0,91	0,29	0,90 ^{e,g}	0,31	0,91	0,29	1,00	0,00	1,00	0,00	0,93	0,26	1,00	0,00
DIGHILI 5	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,07 ^{d,e,g}	0,25	0,17 ^{d,e,g}	0,39	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGHIRE 1	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,17 ^{d,e,g}	0,39	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00
DIGHIRE 2	0,09 ^{d,e,g}	0,29	0,27 ^{d,e,g}	0,45	0,30 ^{d,e,g}	0,47	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,11 ^g	0,31	1,00	0,00
DIGHIRE 3	0,91	0,29	0,97	0,18	0,87 ^{d,e,f,g}	0,34	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
DIGHIRE 4	0,91	0,29	0,87 ^{d,e,g}	0,35	0,91	0,29	1,00	0,00	1,00	0,00	0,93	0,26	1,00	0,00
DIGHIRE 5	0,00 ^{c,d,e,g}	0,00	0,07 ^{d,e,g}	0,25	0,22 ^{d,e,g}	0,42	1,00 ^f	0,00	1,00 ^f	0,00	0,04 ^g	0,19	1,00	0,00