Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
eingereicht von Prof. Dr. med. W. Wuttke

Kann die pränatale Gabe von Dexamethason Einfluss auf die skelettale Entwicklung haben?

Modell der intakten männlichen Callithrix jacchus

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Henrike Wolf
aus
Kassel

Göttingen 2014

Die Dissertation entstand im Department für Endokrinologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen im Zeitraum von 2008 bis 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
1. Berichterstatter/ in:	Prof. Dr. med. W. Wuttke
2. Berichterstatter/ in:	PD Dr. Mohammad Tezval
3. Berichterstatter/ in:	Prof. Dr. Rainer Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Wirkungsweise der Glukokortikoide (GC) 1

1.2 Die Unreife der fetalen Lunge im Zusammenhang mit der Frühgeburt . .2

1.3 Das metabolische Syndrom 4

1.4 Callithrix jacchus (CJ) als Primatenmodell 5

1.5 Histologie der langen Röhrenknochen: Oberschenkel (Femur) und Schienbein (Tibia) 7

1.6 Weitere Wirkungen von GC beim Fötus 10

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit 10

2. Material und Methoden 13

2.1 Versuchsablauf 13

2.2 Herstellung der Knochenpräparate 15

2.2.1 Acrylat-Einbettung 15

2.2.2 Beschichtung der Objektträger und Schneiden der Blöcke . . .15

2.2.3 Knochenspezifische Färbung (nach Goldner) 15

2.3 Histologische Auswertung 16

2.3.1 Mikroskop und Software 16

2.3.2 Histomorphometrische Auswertung 17

2.3.2.1 Bestimmung der Kortikalisdicke in der Diaphyse im proximalen sowie distalen Abschnitt des Oberschenkelknochens und im proximalen Abschnitt des Schienbeinknochens 19

2.3.2.2 Bestimmung der relativen Flächenanteile von

I.) Trabekel

II.) rotem Knochenmark

III.) gelbem Knochenmark (Fettmark)

in der Metaphyse der proximalen sowie distalen Anteile des Oberschenkelknochens und den proximalen Anteilen des Schienbeinknochens 21

2.3.3 Statistik 24

3. Resultate 25
3.1 Körpergewicht 25
3.2 Körpermaße der Tiere 26
3.2.1 Körpermaße der Tiere bei der Geburt 26
3.2.2 Körpermaße nach 18 und 24 Monaten 27
a.)Schädel-Fersen-Länge (SFL= Gesamtkörperlänge) 27
b.)Schädel-Steiß- Länge (SSL) 28
3.3 Histomorphometrische Auswertung der Oberschenkelpräparate 30
3.3.1 Messung der Kortikalisdicke 30
3.3.1.1 Proximal 30
a.) Diaphyse 30
b.) Metaphyse 31
3.3.1.2 Distal 32
a.) Diaphyse 32
b.) Metaphyse 33
3.3.2 Messung des Flächenanteils von
I.) Trabekel
II.) rotem Knochenmark (rM)
III.) Fettanteilen im intraossalen Bereich (gelbes Mark = gM)
im Oberschenkelknochen. 35
3.3.2.1 Proximal. 35
I.) Trabekel. 35
II.) rotem Knochenmark (rM). 36
III.) Fettanteilen im intraossalen Bereich (gelbes Mark = gM). .37
3.3.2.2 Distal. 38
I.) Trabekel. 38
II.) rotem Knochenmark 39
III.) Fettanteilen im intraossalen Bereich (gelbes Mark=gM) . .40
3.4 Histomorphometrische Auswertung der Schienbeinpräparate 41
3.4.1 Messung der Kortikalisdicke 41
3.4.1.1 Proximal 41
a.) Diaphyse 41
b.) Metaphyse 42

3.4.2 Messung des Flächenanteils von
I.) Trabekel
II.) rotem Knochenmark (rM)
III.) Fettanteilen im intraossären Bereich (gelbes Mark = gM) im Schienbeinknochen. 43
3.4.2.1 Proximal 43
I) Trabekel 43
II.) rotem Knochenmark (rM) 44
III.) Fettanteilen im intraossären Bereich (gelbes Mark = gM) .45
3.4.3 Knochendichte im Schienbeinknochen. 46
4 Diskussion 47
4.1 Körpergewicht und Körpergröße 47
a.)Körpergewicht 47
b.)Körpergröße 48
4.2 Knochenarchitektur, Knocheneigenschaften, Knochenstoffwechsel . . .50
4.2.1 Kortikalisdicke 50
a.)Oberschenkel 50
b.)Schienbein 50
4.2.2 Flächenverhältnisse von Trabekel, rotem Knochenmark und Fettmark
a.)Oberschenkel 51
b.)Schienbein 52
4.2.3 Knochendichte 53
4.3 Kritische Beurteilung der Versuchsreihe 55
5. Zusammenfassung 56
Anlagenverzeichnis 58
I Liste der EUPEAH-Versuchstiere 58
II Übersicht Rohnährstoffe Diätfutter 59
III Acrylat-Einbettung 60
IV Knochenspezifische Färbung (nach Goldner) 61
Literaturverzeichnis 62

Abkürzungsverzeichnis

CJ	Callithrix jacchus
Dex 5 mg Früh	Frühe Applikation von 5 mg Dexamethason (zwischen 42. und 48. Schwangerschaftstag)
Dex 5 mg Spät	Späte Applikation von 5 mg Dexamethason (zwischen 90. und 96. Schwangerschaftstag)
DPZ	Deutsches Primatenzentrum
EUPEAH	Glucocorticoid hormone programming in early life and its impact on adult health
GC	Glukokortikoide
gM	Gelbes Knochenmark
rM	Rotes Knochenmark
SFL	Schädel-Fersen-Länge
SSL	Schädel-Steiß-Länge

1. Einleitung

1.1 Wirkungsweise der Glukokortikoide (GC)

Dexamethason ist eines der bekanntesten Kortisonpräparate mit einem großen Einsatzspektrum und gehört zur Wirkstoffklasse der GC. Es wird synthetisch hergestellt und wirkt rund 30-mal stärker als das körpereigene Kortisol (Wikipedia: Dexamethason 2013, Toxcenter 2009). Mit einer Halbwertszeit von 36 - 54 Stunden gehört es zur Gruppe der langwirksamen GC.

GC wirken stark auf den Körperstoffwechsel und die unterschiedlichen Gewebe. Dies erlaubt ein breites Einsatzspektrum. Allerdings sollte die große Zahl an Nebenwirkungen nicht außer Acht gelassen werden. Sie betreffen den gesamten Körper mit nicht unbeachtlichen Folgen (Toxcenter 2009).

Auswirkungen auf den Kalzium- und Knochenstoffwechsel sind seit langem bekannt (Henzen 2003, Pfeifer et al. 2001). Bei Kindern kann durch pharmakologische Dosen eine Hemmung des Längenwachstums und der Knochenreife festgestellt werden (Henzen 2003). Unter anderem ist auch die Knochenarchitektur betroffen. Bei Langzeitanwendungen von GC kommt es zum Erscheinungsbild der Osteoporose (Nehls 2010, Pfeifer et al. 2001). Wissenschaftler des Leibniz-Institutes für Alters-forschung - Fritz-Lipmann-Institut Jena haben im Jahr 2010 entdeckt, dass nicht die Osteoklasten der Angriffpunkt für die GC sind, sondern die Osteoblasten. Die glukokortikoidinduzierte Osteoporose entsteht durch einen gestörten Knochen-aufbau (Tan et al. 2012, Rauch et al. 2010). Hier ist insbesondere der trabekuläre Knochen der Wirbelkörper wegen seines höheren Knochenumbaus betroffen (Nehls 2010). Das Frakturrisiko steigt um das Dreifache (Henzen 2003). Eine weitere Komplikation der Therapie ist die Osteonekrose des Femurkopfes, aber auch Humeruskopf und distaler Femur können betroffen sein (Tan et al. 2012, Henzen 2003). Die veränderte Knochenstruktur der postmenopausalen Osteoporose hingegen kommt durch den Rückgang der Östrogenproduktion und der daraus resultierenden vermehrten Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen zustande (Helmberg 2009/ 2010, Junqueira et al 2002).

1.2 Die Unreife der fetalen Lunge im Zusammenhang mit der Frühgeburt

Etwa 10 % aller Kinder kommen vor Vollendung der 37. Schwangerschafts-woche (SSW), 2% bis 3 % vor Vollendung der 34. SSW und 1% bis 2 % vor Vollendung der 32. SSW zur Welt, Tendez steigend (Sauerwald und Rath 2000)

Am meisten gefürchtet bei der Frühgeburt ist das Atemnotsyndrom oder *Respiratory-distress-Syndrom (RDS)* mit seinen Folgen. Das RDS ist eine akute Erkrankung der Lunge während der ersten Lebensstunden und Tage (Wulf und Schmidt-Matthiesen 1997). Bei ca. 20 % der Frühchen führt es zum Tode (Schneider et al. 2011). Das Atemnotsyndrom ist Folge eines primären Surfactantmangels bei gleichzeitiger struktureller Unreife der Lunge (Wulf und Schmidt-Matthiesen 1997). Die Reifung der Lunge ist vor allem von der Surfactantbildung abhängig. Dieses wird in Pneumozyten Typ II gebildet. Die Wirkung des Surfactant besteht darin, dass es die Oberflächenspannung der Alveolen herabsetzt. Erfolgt dessen Synthese nicht, können sich die Alveolen nicht entfalten und sie bleiben kollabiert (Bender et al. 2003).

Durch Gabe von GC kann die Mortalität des RDS deutlich reduziert werden. Dies wurde durch mehrere wissenschaftliche Studien schon in den 60er-Jahren belegt (Crowley 1995, Crowley et al. 1990, Liggins 1972, Liggins1969).

Inzwischen ist es therapeutischer Standard, bei drohender Frühgeburt zwischen der 24. und 34. SSW eine GC-Therapie einzuleiten Die Dosis entspricht 4 x 6 mg i.m. im 12-h-Intervall oder 2 x 12 mg im 24-h-Intervall (Commitee Opinion 2011, Kutzler et al. 2004, Smrcek et al. 2001). Vor der 24. SSW sollten keine GC verabreicht werden (Schneider et al. 2011). Wegen seiner guten Plazentagängigkeit erreichen GC beim Fötus schnell eine hohe Plasmakonzentration (Hatz 1998). Die nachweisbare Wirkung tritt 24 Stunden nach Injektion ein und das Wirkungsoptimum 48 Stunden bis 7 Tage nach Therapiebeginn (Der Arzneimittelbrief 1998). Dadurch ist die Überlebensrate verbessert. Zwischen der 24. und 28. SSW kann durch die GC-Gabe das RDS nicht verhindert, aber die Mortalitätsrate und die Anzahl an ventrikulären Hirnblutungen deutlich reduziert werden. Nach der 29. SSW bis zur 34. SSW wird eine Senkung des RDS-Risikos durch die Therapie erreicht (Schneider et al. 2011).

Die Gabe von GC ist in den letzten Jahren rückläufig geworden. Trotz der bekannten positiven Wirkung auf die Beschleunigung der Lungenreifung sind auch die Nebenwirkungen nicht außer acht zu lassen. In vielen Studien setzte man sich damit aus-

einander, wie die GC auf die restlichen Organe wirken und was dies für die weitere Entwicklung des Kindes bedeutet im Hinblick auf Spätfolgen (Bender et al. 2003). Nachteilige Effekte der längeren pränatalen Verabreichung können die Ausdehnung der Schwangerschaftslänge (Novy und Walsh 1983), Wachstumsretardation des Fötus (Korgun et al. 1999) und reduziertes Geburtsgewicht beim Menschen sein (de Vries et al. 2007). Bei den Neugeborenen wird häufig festgestellt, dass nach pränataler Dexamethason-gabe eine Zunahme des Blutdrucks in den ersten 24 Stunden nach der Geburt auftritt (Fatusić 2004). De Vries et al. (2007) wiesen auch erhöhte Blutdruckwerte bei pubertären Chlorocebus aethiops nach. Durch den Einfluss der GC auf das hormonelle System können Erkrankungen wie die Hypertonie im Erwachsenenalter verstärkt ausgebildet werden (Korgun et al. 1999). Darüber hinaus sind Hyperglykämien, Hyperinsulinismus und hypothalamische-hypo-physäre Veränderungen bekannt (de Vries et al. 2007).

Tierstudien haben ebenfalls gezeigt, dass die Gabe von GC in therapeutischen Dosen während der Schwangerschaft das Wachstum des Föten verzögert sowie zur Auslösung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Stoffwechselkrankheiten im Erwachsenenalter führen kann.

Bei Müttern ist eine vorübergehende Wirkung auf den Knochenformationsprozess bekannt, die aber ohne Spätfolgen bleibt (Ogueh et al.1998).

1.3 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom umfasst die Risikofaktoren erhöhter Taillenumfang, überhöhte Triglyzeridwerte, erniedrigte HDL-Cholesterinwerte, erhöhter Blutdruck und erhöhte Blutzuckerwerte (Wirth et al. 2006). Werden mehr als drei dieser Risikofaktoren zusammen festgestellt, kann von der Diagnose metabolisches Syndrom gesprochen werden (Lee et al. 2011, Wirth et al. 2006).

Die Effekte der Fettleibigkeit auf den Knochenmetabolismus werden kontrovers diskutiert. Zum einen spricht man dem Übergewicht positive Effekte auf den Knochenumbau zu, zum anderen negative mit Verlust an Knochendichte. Adipozyten und Osteoblasten differenzieren sich aus denselben multipotenten mesenchymalen Stammzellen, was bei Übergewicht zu einer vermehrten Differenzierung von Adipozyten mit Fetteinlagerung führen kann und gleichzeitig die Osteoblastendifferenzierung und das Knochenremodelling negativ beeinflusst. Der Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und chronischer Entzündung ist bekannt. Die dabei freigesetzten proinflammatorischen Zytokine fördern die Osteoklastenaktivität und die Knochenresorption durch Beeinflussung bestimmter Rezeptoren. Vermehrte Aufnahme fetthaltiger Nahrungsmittel kann zu einer gestörten Calciumaufnahme im Darm führen und damit die Verfügbarkeit von Calcium für Knochenformationsprozesse verringen. Es ist bekannt, dass chronische Entzündungen und hohe Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit Parodontitis, Pankreatitis, entzündlichen Magen-Darm-Erkrankungen und rheumatoiden Arthriden zu Knochenabbau führen können (Cao 2011).

Bei männlichen Mäusen, die 14 Tage mit einer sehr fetthaltigen Diät ernährt wurden, stellte man ein reduziertes trabekuläres Knochenvolumen und eine erniedrigte Trabekelanzahl im Schienbein fest. Im kortikalen Knochen dagegen gab es keine erkennbaren Veränderungen (Cao et al. 2009). Postmenopausale Frauen mit metabolischem Syndrom zeigen höhere Werte an C-reaktivem-Protein und eine geringere Knochendichte im Lendenwirbel und Oberschenkelhals. Prämenopausale Frauen mit metabolischem Syndrom dagegen haben nur eine reduzierte Knochendichte im Lendenwirbel (Jeon et al. 2011). Das Fettgewebe ist außerdem ein endokrines Organ, welches Adipokine ausschüttet, die wiederum Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel haben und am Krankheitsbild der Osteoporose beteiligt sind (Lee et al. 2011).

1.4 Callithrix jacchus (CJ) als Primatenmodell

Abb. 1: Callithrix jacchus (http://farm3.static.flickr.com/2243/2446896482_536cc 74582.jpg) 24.7.2011

Der CJ *(Weißbüscheläffchen*) gehört zur Familie der Krallenaffen. Ursprünglich stammt er von der Nordostküste Brasiliens, inzwischen ist er aber auch im südöstlichen Brasilien angesiedelt (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011). Besondere Kennzeichen dieser Tiere sind die weißen büschelartigen Haare, die die Ohren umgeben, der weiße Fleck auf der Stirn, dem sonst haarlosen Gesicht und der lange grau-weiß gestreifte Schwanz (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011). Die Tiere erreichen eine Kopf-Rumpflänge von ca. 18 cm bis 25 cm bei einem Körpergewicht von rund 300 - 500 Gramm (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011, Hauser et al. 2008, Bagi et al. 2007, Li et al. 2005). Die geringe Körpergröße der CJ erleichtert den Umgang mit ihnen als Versuchstiere (Chandolia et al. 2006). Im Gegensatz zu Schweinen, Hunden und Schafen sind ihre Handhabung und die Unterbringung deutlich einfacher (Bagi et al. 2007, Angeliewa et al. 2004). Mehrlingsgeburten sind in menschlicher Obhut häufig.
Die Schwangerschaft von CJ dauert zwischen 140 - 145 Tagen (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011, Li et al. 2005). Im Schnitt bringt das Weibchen zwischen ein und zwei Junge pro Geburt zur Welt (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011, Hofmann et al. 2007). Zwillingsgeburten sind typisch für die CJ (Hofmann et al. 2007). Nach drei Monaten werden die Jungen entwöhnt (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011, Hauser et al. 2008). Die Geschlechtsreife tritt im zweiten Lebensjahr ein (Wikipedia: Callithrix jacchus 2011, Hauser et al. 2008, Li et al. 2005). In freier Wildbahn ist mit einer Lebens-

erwartung von ca. 12 Jahren zu rechnen (entspricht einem Alter von über 80 Jahren beim Menschen). In menschlicher Obhut erreichen die Tiere häufig ein höheres Alter. Der CJ zeigt beim Hormonprofil und Zyklus große Ähnlichkeit mit der Frau. Die Zykluslänge liegt bei ca. 28 Tagen (Li et al. 2005). Allerdings zeigt er keine typischen äußeren Änderungen für das Zyklusstadium wie Menstruation oder Veränderung des Scheidenepithels (Hearn 1983). Ein weiterer Unterschied vom weiblichen CJ zur Frau ist die erhöhte Ovulationsrate von mehreren Eizellen pro Zyklus und der damit verbundenen Häufung zu Zwillings- und Drillingsschwangerschaften (Li et al. 2005). Der Tag der Ovulation wird bei den CJ als erster Tag des Zyklus gerechnet, wohingegen bei der Frau der Zyklus mit dem ersten Tag der Menstruation beginnt (Hearn 1983). Die relativ lange dauernde Gravidität in Abhängigkeit zu seiner Körpergröße im Vergleich zur Frau wird von Merker et al. 1988 in einer verzögerten Embryonalentwicklung beschrieben.

Relative kurze Zuchtintervalle von 4,5 - 5 Monaten (Li et al. 2005, Angeliewa et al. 2004, Hearn et al. 1978, Hearn 1983) und das frühe Eintreten der Geschlechtsreife (Pubertätsbeginn zwischen dem 6. und 12. Lebensmonat) (Li et al. 2005) macht sie diesbezüglich zu einem idealen Objekt im Rahmen von reproduktionsbiologischen Untersuchungen. Das Körperwachstum und die skelettale Entwicklung sind bei männlichen und weiblichen Tieren identisch (Li et al. 2005).

1.5 Histologie der langen Röhrenknochen: Oberschenkel (Femur) und Schienbein (Tibia)

Das Knochengewebe ist ein spezielles Bindegewebe, welches überwiegend aus einer kalziumreichen extrazellulären Substanz (Knochenmatrix) besteht. Den anorganischen Anteil bilden als Hauptanteil Kalzium und Phosphat in Form von Hydroxyapatitkristallen. Der organische Anteil besteht zu 95 % aus Kollagen Typ I und Proteoglykanen, welche von den Osteoblasten sezerniert werden. Während der Knochenmineralisierung werden diese im Knochen eingeschlossen und dann als Ostozyten bezeichnet. Ihre Aktivität kann durch mechanische Beanspruchung des Knochens gefördert werden. Die Osteoklasten bilden die dritte Komponente an Zellen des Knochens. Sie gehören dem MPS (Mononukleären Phagozytosesystem) an und sind in der Lage, die Knochenmatrix abzubauen.

Der Oberschenkelknochen und der Schienbeinknochen gehören zu den lamellär aufgebauten Röhrenknochen. Der Röhrenknochen teilt sich in zwei Zonen auf: die Epiphyse, den verbreiterten Teil des Knochens, der größtenteils aus spongiösem Knochen besteht und die Diaphyse, die den Knochenschaft bildet und überwiegend aus Kortikalis aufgebaut ist. Den Übergang bildet die Metaphyse, in der auch die Epiphysenfuge liegt. In ihr findet das Knochenwachstum statt. Zerschneidet man den Röhrenknochen quer, erkennt man eine äußere kompakte Schicht, Substantia compacta bzw. Kortikalis und im Bereich der Metaphyse noch eine innere Schicht, die Substantia spongiosa, ein schwammartiges Gebilde.

Die lamelläre Schicht der Kortikalis entsteht dadurch, dass Kollagenfasern und Matrix dicke Lamellen bilden, die sich konzentrisch um einen zentralen Kanal anordnen, den Havers-Kanal. Zusammen mit den Lamellen bildet er das Havers-System oder Osteon. In diesen Kanälen verlaufen nutritive Gefäße, Nerven und Bindegewebe, welche vom Periost aus einsprießen. Über schräg verlaufende Volkmann-Kanäle kommuniziert das Havers-System mit dem Knochenmark und dem Periost. Die knochensubstanzfreien Räume enthalten das rote Knochenmark (rM), in dem die Blutzellen gebildet werden und das gelbe Knochenmark (gM), das zum Hauptanteil aus Fett besteht (Jastrow 2011, Junqueira et al. 2002, Mörike et al. 2001). Bei Kindern und Jugendlichen ist vornehmlich rotes Knochenmark zu finden. Mit Abschluss des Wachstums und im Alter entwickelt sich ein Teil zu gelbem Knochenmark (Junqueira et al. 2002, Mörike et al. 2001).

Die Hauptbelastungszonen des Skeletts der menschlichen Spezies befinden sich in den Handgelenken, der Hüfte und den Füßen. Dies ist bedingt durch den aufrechten Gang. Bei den Primaten hingegen liegt wegen des Vierfüßlerganges die Hauptbelastungszone besonders in den Knien.

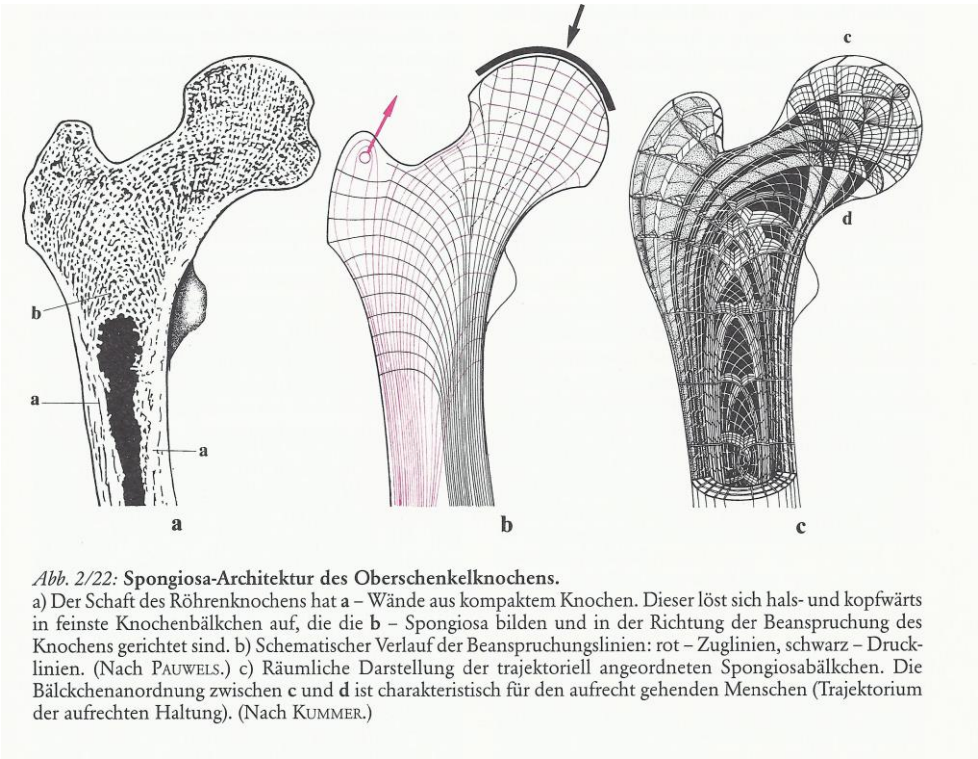


Abb. 2: Spongiosa-Architektur des Oberschenkelknochens nach Kummer aus Mörike KD/ Betz E/ Mergenthaler W: Biologie des Menschen, 2001, S. 125

Röhrenknochen entstehen durch enchondrale und desmale Ossifikation. Aus einer Mesenchymverdichtung entwickelt sich ein hyalines Knorpelmodell des zu bildenden Knochens, welches von einer durch desmale Ossifikation entstandenen Knochenmanschette umgeben ist (*Periost*). Die knorpelbildenden Chondrozyten sterben im Laufe der Zeit ab und die Matrix verkalkt. Durch Einsprossung von Blutgefäßen und sich zu Osteoblasten differenzierenden Stammzellen wird die verkalkte Knochenmatrix besiedelt und es beginnt die Synthese von Knochenmatrix.

In der Diaphyse wächst die periostale Knochenmatrix Richtung Epiphyse, während gleichzeitig in ihrem Inneren mit Hilfe von Osteoklasten durch Knochenanbau die Markhöhle geschaffen wird. In der Epiphysenfuge bleibt während des gesamten Längenwachstums des Knochens noch Knorpel vorhanden. Nach Abschluss des Wachstums wird diese durch Bildung von Knochenmatrix verschlossen. Das Dickenwachstum findet aber weiterhin zeitlebens durch Zug auf das Periost statt.

Das Knochenwachstum und der Knochenumbau (*Turnover*) werden durch verschiedene Faktoren wie mechanische Einwirkung, Hormone, Wachstumsfaktoren oder Medikamente beeinflusst. Bei Kindern ist der Turnover ca. 200mal schneller im Vergleich zum Erwachsenen (Jastrow 2011, Junqueira et al. 2002, Mörike et al. 2001).

Das Skelett der erwachsenen CJ hat ähnliche anatomische Charakteristika wie das erwachsene Humanskelett (Bagi et al. 2007). Die Struktur des Havers-Systems und das Remodelling von spongiösen und kortikalen Knochen ist bei ihnen ebenfalls vorhanden (Bagi et al. 2007, Jerome und Peterson 2001). Dies macht sie zu adäquaten Modellen für medikamenteninduzierte Veränderungen im Knochenmetabolismus und der Knochenarchitektur.

Strukturanalysen von spongiösem Knochen alternder CJ zeigen den gleichen Verlust an Trabekelmasse und Architektur im Vergleich zum alternden Menschen. Allerdings sind die publizierten Daten über die Knochenanatomie, -struktur und den Metabolismus von CJ sehr rar (Bagi et al. 2007).

1.6 Weitere Wirkungen von GC beim Fötus

1972 wurde Dexamethason im Rahmen der Frühgeburttherapie erstmals eingesetzt. Liggins und Howie sind die Begründer der RDS-Therapie mit Dexamethason (Wulf und Schmidt-Matthiesen 1997). Diese Therapie schien der Durchbruch zur Verhinderung der Säuglingssterblichkeit zu sein. Die Medikation half, das Überleben der Frühchen zu verbessern. Ende der 90er-Jahre propagierte man Dexamethason noch als das Heilmittel, mit dem man das Frühgeburtrisiko deutlich reduzieren konnte. Es wurden Empfehlungen für die Verabreichung gegeben, obwohl noch nicht hinreichend Forschungsergebnisse existierten. Im Laufe der Jahre erlangte man durch viele Studien Erkenntnisse zu den Auswirkungen von GC auf den gesamten Körper und die Entwicklung des Organismus. Es gibt wenige Bereiche im Körper, in denen keine Wirkung nachweisbar ist, allerdings besteht weiterhin großer Forschungsbedarf, da lange noch nicht alle Gebiete ausreichend untersucht worden sind. In machen Organen sind nur kurzzeitige Veränderungen bekannt, aber auch Langzeitveränderungen auf den Organismus und das Sozialverhalten wurden in Studien bestätigt. Durch die nach und nach erscheinenden neuen Ergebnisse, die besonders auf die Nebenwirkungen aufmerksam machen, änderte sich aus diesem Grund in den letzten Jahren die Meinung über den richtigen Applikationszeitraum.

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Heute verabreicht man GC sogar eher zurückhaltender als noch 2005, nachdem die vorliegende Versuchsreihe gestartet wurde. In dieser Arbeit wird versucht zu belegen, dass das Umdenken und eine zurückhaltende Gabe positiv für die Entwicklung des Kindes sein können.
Da menschliche Probanden aus ethischen Gründen für diese Versuchsreihe nicht in Frage kommen, ist für eine solche Untersuchung ein geeignetes Modelltier unerlässlich. Affen sind das wertvollste Modell für die humane Forschung. Sie werden bevorzugt eingesetzt im Vergleich zu Mäusen oder Ratten, da sie dem Menschen entwicklungsgeschichtlich am nächsten stehen. Dies gilt besonders für die reproduktionsbiologische Forschung, da Primaten dem Menschen in Physiologie und Anatomie in diesem Bereich ähnlicher sind als Nager. Die Affen haben im Gegensatz

zum Menschen, bei dem die Hauptbelastungszone im Bereich der Hüfte liegt, bedingt durch ihren Vierfüßlergang, ihre Hauptbelastungszonen im Knie, zusammengesetzt aus dem distalen Femur und der proximalen Tibia. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Untersuchung die Veränderungen im Bereich Hüfte und Knie der Tiere untersucht.

In der Versuchsreihe arbeitete man mit einer großen Anzahl an Primaten. Histologische Präparate lieferten der Oberschenkelknochen und der Schienbeinknochen. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit exakter und innovativer Methodik.

Mit Hilfe der histomorphometrischen Analyse wurden die histologischen Knochenschnitte untersucht. Diese lieferten ein Bild über den Knochenlängsschnitt und Aussagen über die Infrastruktur des Knochens. Außerdem wurden Daten aus einer qCT-Messung der Tibia zur Verfügung gestellt.

Bei der Vermessung der histologischen Knochenschnitte bestand das Ziel darin, herauszufinden, ob die frühe oder späte pränatale Verabreichung von Dexamethason Einflüsse auf die Knochenstruktur von Oberschenkel- und Schienbeinknochen hat. Untersucht wurde zum einen die Kortikalisschichtstärke im diaphysalen und metaphysalen Bereich. Es galt zu analysieren, ob in den verschiedenen Kortikaliszonen Veränderungen in der Schichtstärke durch die zeitlich unterschiedlichen Applikationszeiträume entstehen und ob Oberschenkel und Schienbein gleich oder abweichend reagieren. Zum anderen wurden die Flächenverhältnisse von Trabekel, rotem und gelbem Knochenmark vermessen. Die Fläche der Trabekel soll Auskunft über die Stabilität des Knochens geben. Das rote Knochenmark hängt maßgeblich mit dem Immunsystem zusammen und Veränderungen in diesem Bereich könnten Hinweise auf reduziertes Abwehrverhalten des Körpers geben. Die Ausdehnung des gelben Knochenmarks geht einher mit einem hohen Anteil an viszeralem Fett und kann damit Hinweise liefern, ob die pränatale Applikation von Dexamethason Einfluss auf das Körpergewicht (erhöhte Adipositasgefahr) hat bzw. ein metabolisches Syndrom begünstigen kann. Dadurch könnte die Osteoporosegefahr im Alter deutlich ansteigen.

Das qCT dagegen zeigt ein Bild des Knochens im Querschnitt und berechnet die physikalische Dichte (kg / m^3) jedes Volumenelementes. Es gibt uns damit Aussagen über den Mineralgehalt von Spongiosa und Kortikalis und die mechanischen Parameter (Knochen- und Biegefestigkeit) des Knochens.

Das DEXA-Verfahren (Dual-Energy X-ray Absorptiometry) dagegen misst nur die flächenprojizierende Masse (kg / m²) und kann somit keine Aussagen über die Dichte im physikalischen Sinn machen (Wikipedia: DEXA bzw. qCT). Ebenfalls kann ein MRT-Bild keine detaillierten Bilder der Knochenstruktur liefern, da der Wasserstoffgehalt des Knochens dafür zu gering ist (Krebsinformationsdienst). Somit kamen dieses Analyseverfahren für die vorliegende Versuchsreihe nicht in betracht.

Es besteht auch die Frage, wenn Veränderungen in beiden untersuchten Knochen auftreten würden, ob dann auch Veränderungen in anderen Knochen zu vermuten sind und welche Folgen daraus hervorgehen. Wie ist z.B. die Haltbarkeit und Stabilität von Zahnimplantaten zu bewerten, wenn die Dexamethasonapplikation sich negativ auf die Knochenentwicklung in Maxilla und Mandibula auswirkt? Oder wird durch die Dexamethasonapplikation die Adipositasgefahr gesteigert und kann es durch das vermehrte Fettgewebe und die dadurch bedingte erhöhte Ausschüttung an proinflammatorischen Zytokinen zu einer Begünstigung von Osteoporose im Alter kommen?

2. Material und Methoden

Die Versuchsreihe aus dem EUPEAH- Programm (Glucocorticoid hormone programming in early life and its impact on adult health) startete vor meiner Übernahme der Dissertation. Die histologischen Präparate des Oberschenkel- und Schienbeinknochens waren bereits von Prof. Dr. med. vet. Christina Schlumbohm, Deutsches Primatenzentrum Göttingen und PD Dr. med. MU Dr. Dana Seidlová-Wuttke geschnitten und gefärbt worden und wurden zur Untersuchung an mich übergeben. Ich erhielt in schriftlicher Form die Vorgehensweise zur Herstellung dieser Präparate. Meine Aufgabe bestand darin, mit Hilfe eines an einen Computer angeschlossenen Mikroskops und entsprechender Software, im Oberschenkel- und Schienbeinknochen die Kortikalisdicke und die Flächenverhältnisse von Trabekel, rotem Knochenmark und Fettmark zu vermessen. Die nach Messung erhaltenen Werte wurden mit Hilfe eines Statistikprogramms in Graphen umgewandelt. Diese Graphen dienten zur Auswertung.
Prof. Dr. med. vet. Christina Schlumbohm und PD Dr. med. MU Dr. Dana Seidlová-Wuttke stellten mir darüber hinaus Ergebnisse der Körpergewichtsentwicklung, den Körpermaßen sowie der Knochendichtemessungen bis zum 24. Lebensmonat zur Verfügung. Diese Auswertungen erfolgten ebenfalls vor meiner Übernahme.

2.1 Versuchsablauf

Die Muttertiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt keine Medikation. Bei der zweiten und dritten Gruppe wurde zwischen einer frühen und einer späten pränatalen Dexamethasongabe unterschieden. Die frühe Applikation fand während dem **42. und 48.** Schwangerschaftstag statt (Dex 5 mg Früh), die späte zwischen dem **90. und 96.** (Dex 5 mg Spät) (Entspricht Ende zweites Trimenon, Anfang drittes Trimenon beim Menschen). Dabei wurde den Tieren 7 Tage in Folge 5 mg Dexamethason (Jenapharm, Deutschland) in Tablettenform mit 200 µl Wasser aufgeschwemmt und vermischt mit Nutrical, einer Vitaminpaste von Albrecht-Pharma in Aulendorf, oral verabreicht.
Es fand eine regelmäßige veterinär-medizinische Kontrolle statt.
Im Zeitraum zwischen dem 20.04.2003 und dem 08.12.2003 wurden die Jungtiere im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) Göttingen geboren. Für dieses Experiment

verwendete man 30 männliche CJ aus der Nachkommenschaft dieser Mütter (siehe Tabelle in Anlage I).

Abb. 3: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft und die Applikationszeiträume von Dexamethason

Haltungsbedingungen

Die männlichen Jungtiere wurden in einem fensterlosen, vollklimatisierten Stall jeweils in einem Maschendrahtkäfig von 50 x 76 x 125 cm innerem Maß mit ihren Familien zusammen gehalten. Von 6.00 Uhr morgens bis 18.00 Uhr abends erhellte man den Stall mit künstlichem Licht. Anschließend wurden die Tiere 12 Stunden in der Dunkelheit belassen, um den Tagesrhythmus nachzuahmen.

Die Tiere bekamen eine spezielle Nahrung der Firma ssniff ® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, in Form von Pellets (V383x Mar, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany).

Diese Pellets setzen sich aus Getreide und Getreidenebenerzeugnissen, Ölsaatprodukten, Zucker, Milchprodukten, pflanzlichen Fetten, Mineralstoffen, Trockenobst, Vitaminen und Spurenelementen zusammen. Diese Pellets und normales Leitungswasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Die genaue Nährstoffzusammensetzung kann aus der Tabelle in Anlage II entnommen werden.

Im Alter von 2 Jahren wurden die männlichen Tiere mit einer auf ihr Gewicht abgestimmten Ketaminüberdosis euthanisiert.

2.2 Herstellung der Knochenpräparate

2.2.1 Acrylat-Einbettung

Durch die Acrylateinbettung werden die Knochenpräparate für das Schneiden vorbereitet. Die Acrylateinbettung erfolgte nach den üblichen Vorgehensweisen. Details siehe Anlage III.

2.2.2 Beschichtung der Objektträger und Schneiden der Blöcke

Die Objektträger (Knittel Gläser geschnitten, mattrand) wurden zunächst mit 100%igem Ethanol gesäubert und entfettet, danach mit einer auf etwa 50°C vorgewärmten Gelatine-Chromalaunlösung dünn bestrichen (Zusammensetzung: 0,9 g Gelatine gelöst in 200 ml destilliertem Wasser zusammen mit 7,7 ml 4%iger Chromalaunlösung (Riedel 31246)). Als Mikrotom diente ein Leica Jung Polycut S mit einer eingestellten Schnittdicke von 3 µm. Die Schnittfläche des Acrylat-Blockes wurde vor dem Schneiden mit 40%igem Ethanol bepinselt, ferner diente eine Schale mit 40%igem Ethanol zum Auffangen und Begutachten der frisch abgetrennten Knochenschnitte. Geschnitten wurde in longitudinaler Richtung des Knochens. Gelungene Schnitte wurden gleich auf die beschichteten Objektträger aufgebracht und mit 96%igem Ethanol gestreckt. Zuletzt bedeckte man jeden Objektträger mit einer Schutzfolie (Kisol-Folie, Firma Kettenbach, Eschenburg-Wissenbach) und trocknete diesen in einer Presse im Thermoschrank (Heraeus Instruments Typ B6060) bei 37°C für mindestens 24 Stunden.

2.2.3 Knochenspezifische Färbung (nach Goldner)

Die Präparate wurden mit der knochenspezifischen Färbungsart nach Goldner eingefärbt. Genaue Zusammensetzung siehe Anlage IV.

2.3 Histologische Auswertung

2.3.1 Mikroskop und Software

Zur Auswertung der Knochenpräparate wurde ein Zeiss Axiophot Mikroskop mit eingebauter CCD-Kamera und der dazugehörigen Bildanalysesoftware analySIS® 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Hamburg) verwendet. Die Vergrößerung bei Auswertung der Kortikalisdicke und der Trabekeldichte betrug 2,5 x 1,25 = 3,125 µm.

2.3.2 Histomorphometrische Auswertung

Zur Auswertung wurde jeweils ein 1,5 - 1,7 cm langes Stück des proximalen und distalen Oberschenkelknochens und des proximalen Schienbeinknochens herangezogen.

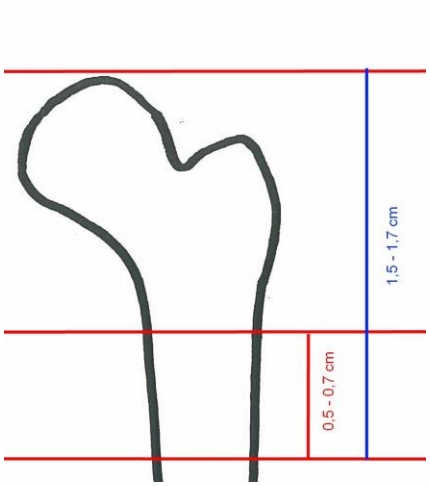


Abb. 4: Oberschenkel proximal

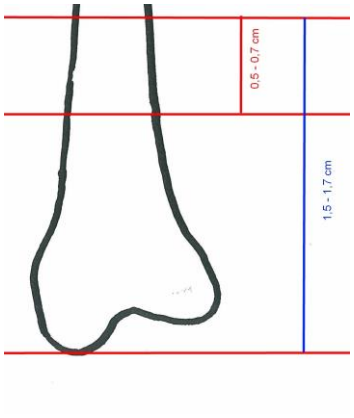


Abb. 5: Oberschenkel distal

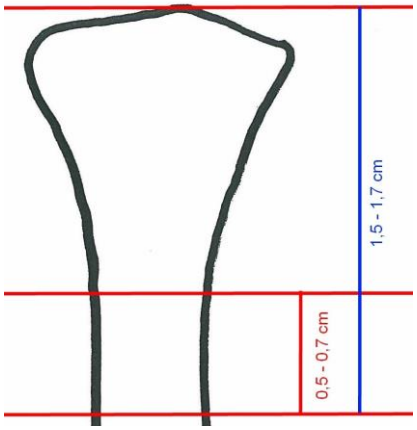


Abb.6: Schienbein proximal

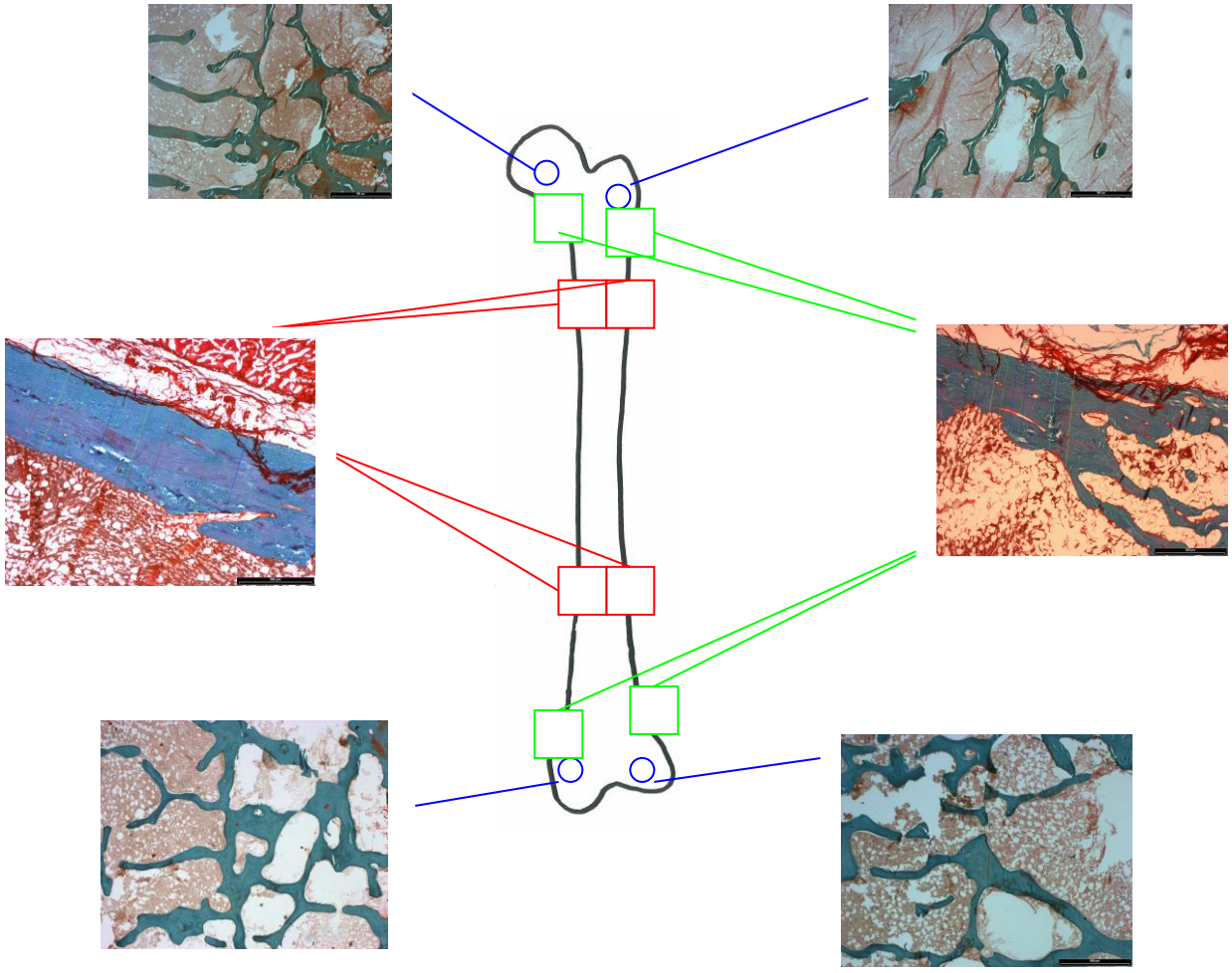


Abb. 7: Übersicht der Bildausschnitte des Oberschenkelknochens:
blau:Übersicht Flächenanteile Trabekel, rM und gM;
grün: Kortikalisdicke methaphysal;
rot: Kortikalisdicke diaphysal

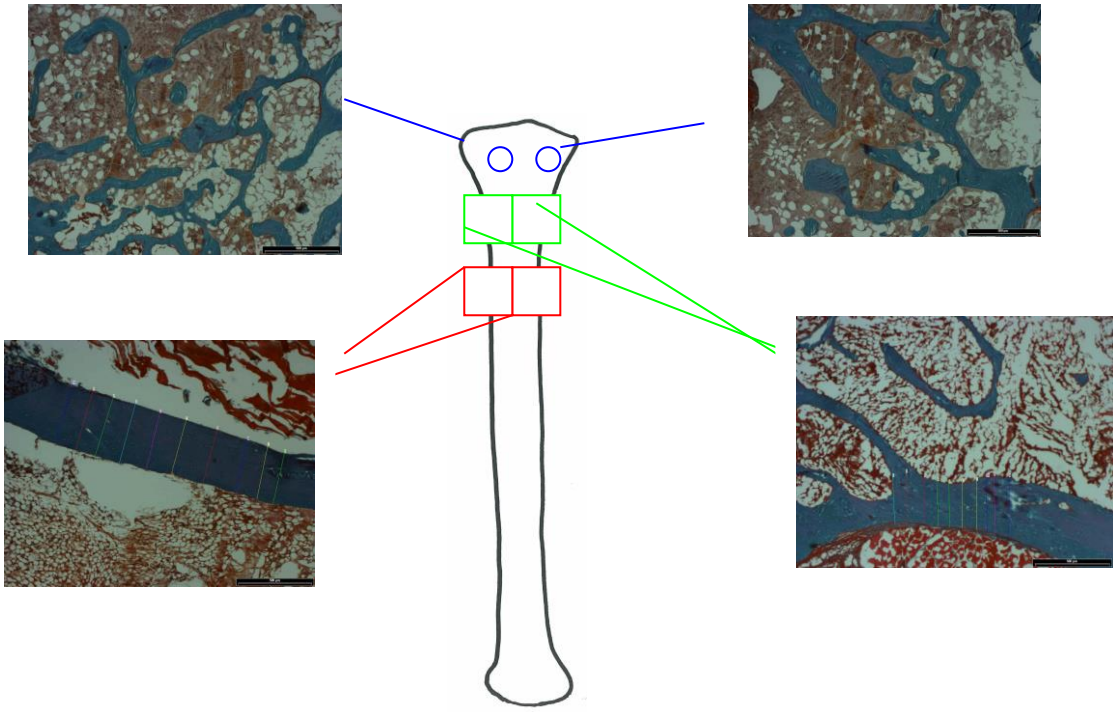


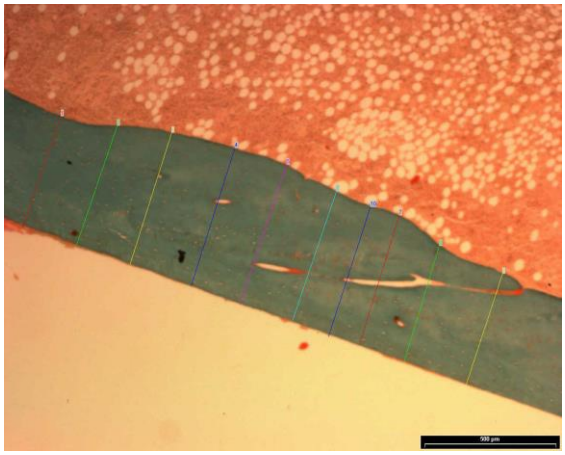
Abb. 8: Übersicht der Bildausschnitte des Schienbeinknochens:
blau: Übersicht Flächenanteile Trabekel, rM und gM;
grün: Kortikalisdicke methaphysal;
rot: Kortikalisdicke diaphysal

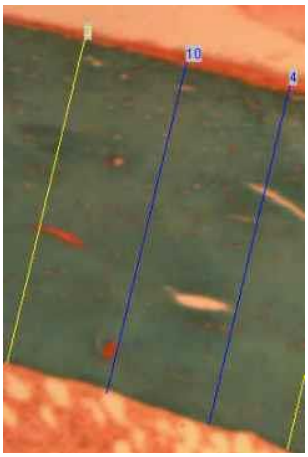
2.3.2.1 Bestimmung der Kortikalisdicke in der Diaphyse im proximalen sowie distalen Abschnitt des Oberschenkelknochens und im proximalen Abschnitt des Schienbeinknochens

Für die Bewertung der Kortikalisdicke stand ein 0,5 cm langes Stück Diaphyse zur Verfügung. Es wurden jeweils zwei sich gegenüberliegende Abschnitte der Kortikalis zur Auswertung herangezogen. Nach Bildaufnahme erfolgten 10 parallel zueinander liegende Messungen in beliebigem Abstand. Die gemessenen Werte konnten im Anschluss in einer Excel-Tabelle abgelesen werden. Es erfolgten nur Auswertungen von Bildausschnitten, bei denen keine Präparationsdefekte vorlagen.

Vorgehen bei der Auswertung am PC

Bilder	
1. Einzelbildaufnahme	Nach Suche einer zur Auswertung geeigneten Stelle der Kortikalis ohne Präparationsdefekte mit Hilfe des Mikroskops wird vom gewünschten Bildausschnitt eine Einzelbildaufnahme gemacht
2. Vergrößerung gesetzt	Das Programm fragt nach der Vergrößerung. Es wird eine Vergrößerung von 3,125 angegeben
3. Messbalken zeichnen	Es wird ein Messbalken im Bild abgebildet
Messen	
4. Beliebiger Abstand	Die Kortikalis kann nun vermessen werden. Es werden 10 möglichst parallele Messungen vorgenommen





	Breite
Messlinie 1	452,84 µm
Messlinie 2	503,44 µm
Messlinie 3	516,66 µm
Messlinie 4	520,28 µm
Messlinie 5	518,00 µm
Messlinie 6	498,18 µm
Messlinie 7	481,98 µm
Messlinie 8	479,57 µm
Messlinie 9	417,57 µm
Messlinie 10	454,25 µm

Abb. 9: Beispielbildausschnitt aus der Kortikalis der Diaphyse des Oberschenkels distal mit Messlinien (links), vergrößerter Darstellung (rechts) und Ausschnitt aus der Exceltabelle mit den dazugehörigen Messwerten.

2.3.2.2 Bestimmung der relativen Flächenanteile von

I.) Trabekel

II.) rotem Knochenmark

III.) gelbem Knochenmark (Fettmark)

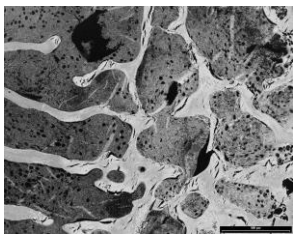
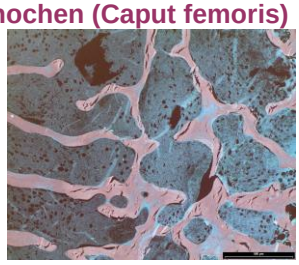
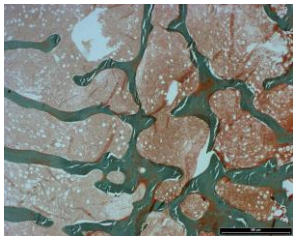
in der Metaphyse der proximalen sowie distalen Anteile des Oberschenkelknochens und den proximalen Anteilen des Schienbeinknochens

Im proximalen Teil des Oberschenkelknochens wurde zum einen ein zentraler Bildausschnitt des Caput femoris ausgewertet, zum anderen der proximale Teil der Metaphyse. Distal zog man Teile des Epicondylus lateralis und des Epicondylus medialis zur Auswertung heran. Im Falle des Schienbeinknochens wurden Bildausschnitte vom Epikondylus lateralis und Epikondylus medialis vermessen.
Bei Vorliegen von Präparationsdefekten fand nur eine Auswertung von Bildausschnitten statt, die keine gestörte Knochenarchitektur aufwiesen.

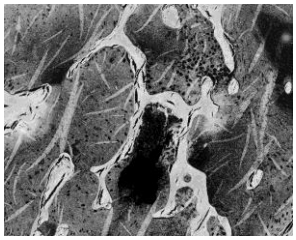
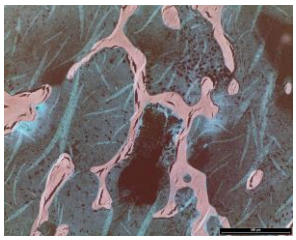
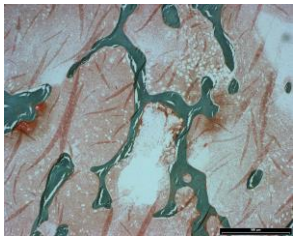
Vorgehen bei der Auswertung am PC

Bilder	
1. Einzelbildaufnehme	Nach Suche einer zur Auswertung geeigneten Stelle ohne Präparationsdefekte mit Hilfe des Mikroskops wird vom gewünschten Bildausschnitt eine Einzelbildaufnahme gemacht. Nach Bildaufnahme erfolgt zunächst eine Schattenkorrektur mit der entsprechenden Programmfunktion, mit deren Hilfe mögliche störende Schwankungen der Hintergrundausleuchtung beseitigt werden können.
2. Vergrößerung setzen	Das Programm fragt nach der Vergrößerung. Es wird eine Vergrößerung von 3,125 angegeben.
3. Messbalken zeichnen	Es wird ein Messbalken im Bild abgebildet
Oper	
4. Bittiefe ändern	Die Bittiefe wird in 8 Bit geändert
5. Grau-Lut setzen	Umwandlung des Farbbildes in ein graues Bild. Als Ergebnis erhält man ein 8-Bit-Grauwertbild mit Grauwerten zwischen 0 und 255. Den drei histologischen Strukturen Trabekeln, rotem und gelbem Mark lassen sich nun jeweils zusammenhängende Grauwertbereiche (Phasen) zuordnen.
Bilder	
6. Schwellenwert	Hier wird die farbige Kodierung entsprechend der Knochenstruktur dargestellt: Grün: Trabekel Rot : rotes Knochenmark Gelb: gelbes Knochenmark Die Schwellenwerte, welche den obersten und untersten Grauwert einer Phase definieren, werden manuell für jede Messung neu festgesetzt. Dazu dient das ursprüngliche Echtfarbbild auf einem zweiten Monitor als Vorlage, nach der die Schwellenwerte möglichst analog gesetzt werden.
Messen	
7. Phasenanalyse	Die Phasenanalyse errechnet die quantitativen Flächenanteile der jeweiligen Grauwertbereiche

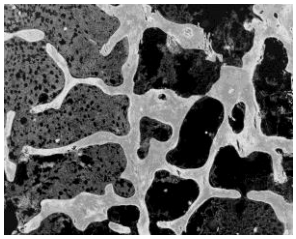
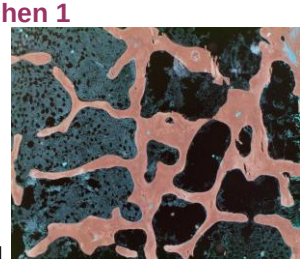
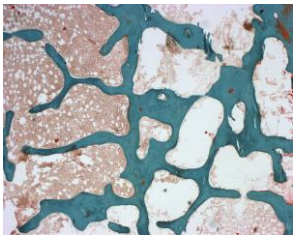
Proximaler Oberschenkelknochen (Caput femoris)


grau

invertiert

messen

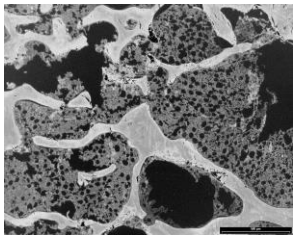
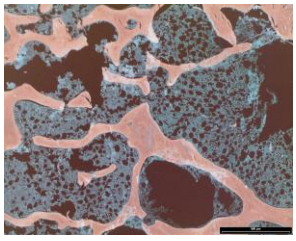
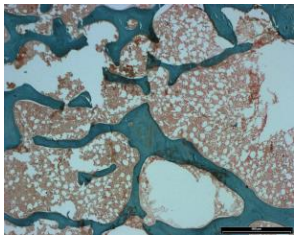
Proximaler Oberschenkelknochen


grau

invertiert

messen

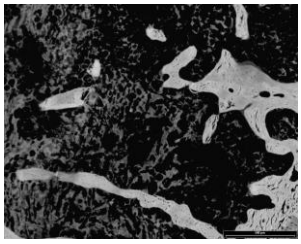
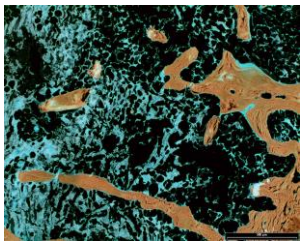
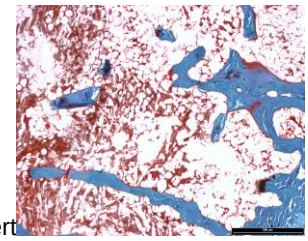
Distaler Oberschenkelknochen 1


grau

invertiert

messen

Distaler Oberschenkelknochen 2


grau

invertiert

messen

Proximaler Schienbeinknochen 1


grau

invertiert

messen

Proximaler Schienbeinknochen 2

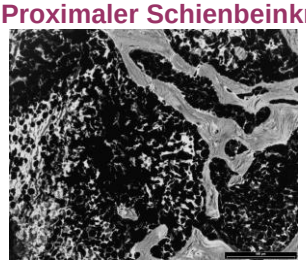
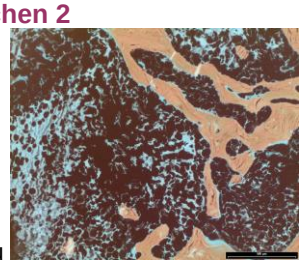
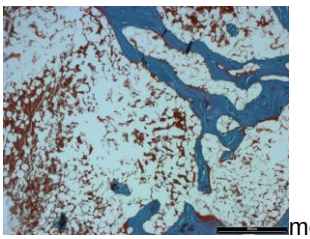

grau

invertiert

messen

Abb. 10: Zeigt beispielhaft die Darstellung der histologischen Bildausschnitte der unterschiedlichen Knochenareale in grau, farblich invertiert und im Messzustand

2.3.3 Statistik

Die aus den Vermessungen erhaltenen Werte wurden automatisch in eine Exceltabelle übertragen. Mittels des Softwareprogramms PRISM® (GraphPadPrism 4.0, San Diego, USA) wurden diese Werte in Graphen umgewandelt und die statistischen Werte berechnet. Unter Zuhilfenahme des t-test wurden die Kontrollgruppe mit den beiden Versuchsgruppen und die Versuchsgruppen untereinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Resultate

3.1 Körpergewicht

Die Daten über die Körpergewichtsentwicklung der CJ wurden mir in Form eines Graphen zur Verfügung gestellt, da die Vermessung bereits vor Übernahme der vorliegenden Arbeit stattfand.

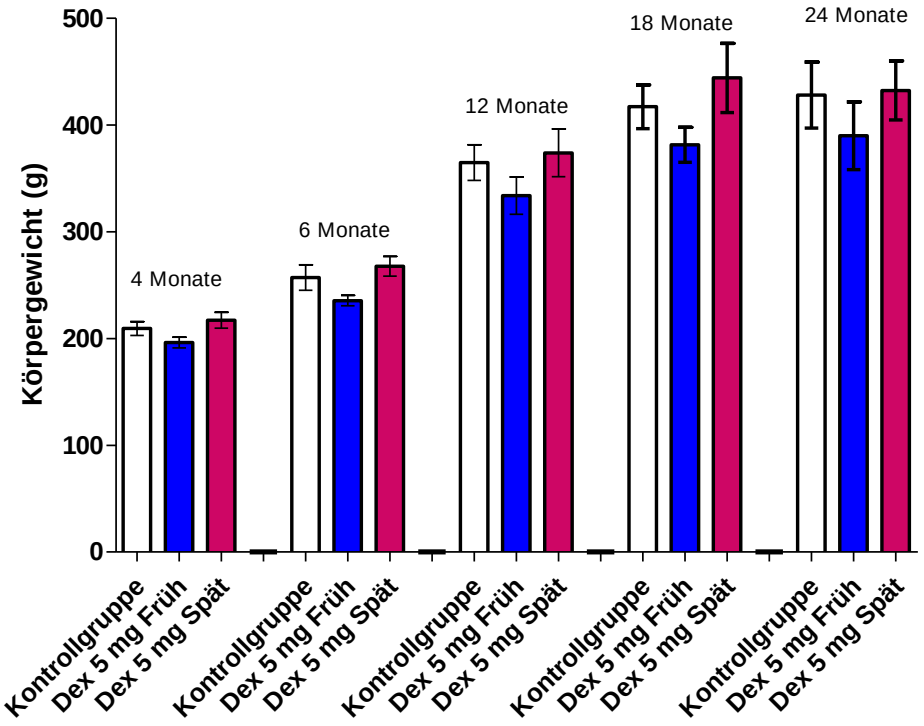


Abb. 11: Körpergewichtsentwicklung der männlichen CJ innerhalb von zwei Jahren nach zeitlich unterschiedlicher Dexamethasondosis von 5 mg.

Im Rahmen der Untersuchung des Körpergewichts konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe gegenüber den Testgruppen innerhalb der Altersgruppe festgestellt werden. Ebenfalls sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen in ihrer Altersstufe nachweisbar.

3.2 Körpermaße der Tiere

In den ersten zwei Lebensjahren wurden die Tiere dreimal vermessen. Die Daten über die Körpergrößenentwicklung wurden mir in Form von Graphen zur Verfügung gestellt, da die Vermessung bereits vor Übernahme der vorliegenden Arbeit stattfand.

3.2.1 Körpermaße der Tiere bei der Geburt

Mir wurde bestätigt, dass beim Vermessen der Tiere nach der Geburt keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen festgestellt wurden.

3.2.2 Körpermaße nach 18 und 24 Monaten

Die Körpergröße der Tiere wurde in Schädel-Fersen-Länge (SFL= Gesamtkörperlänge) und Schädel-Steiß-Länge (SSL) im Alter von 18 und 24 Monaten bestimmt.

a.) Schädel-Fersen-Länge (SFL= Gesamtkörperlänge)

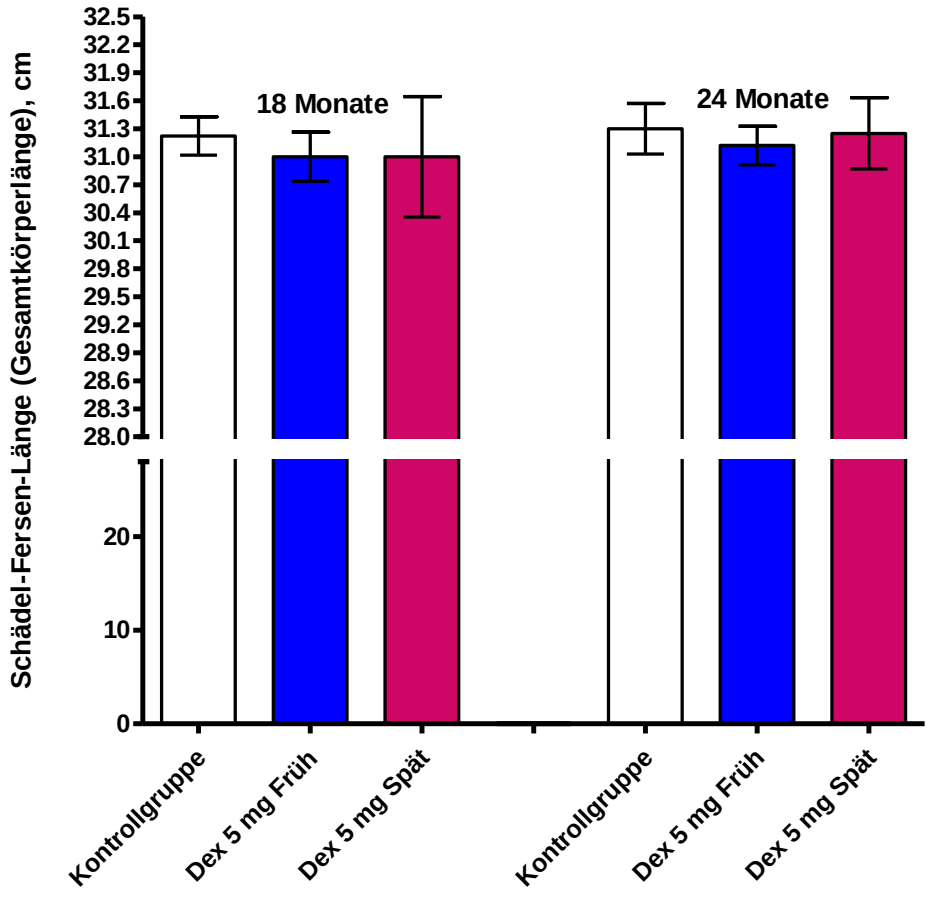


Abb. 12: SFL der männlichen CJ nach zeitlich unterschiedlicher Dexamethasondosis von 5 mg.

Im Rahmen der Untersuchung des SFL konnten keine signifikanten ($p < 0,05$ vs. Kontrolle) Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe versus den Testgruppen innerhalb der Altersgruppe festgestellt werden. Ebenfalls sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen innerhalb ihrer Altersstufe nachweisbar.

b.) Schädel-Steiß-Länge (SSL)

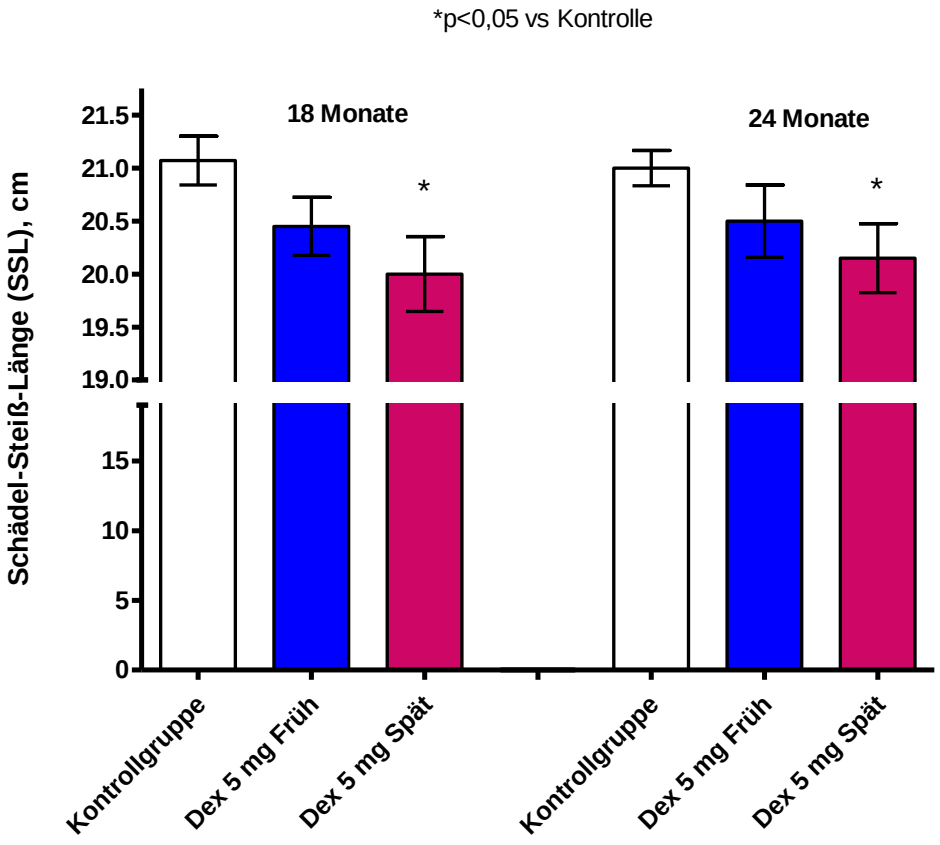


Abb. 13: SSL der männlichen CJ nach zeitlich unterschiedlicher Dexamethasondosis gemessen im Alter von 18 und 24 Monaten.

Im Rahmen der Untersuchung der SSL sind signifikante Unterschiede (*p<0,05 vs. Kontrolle) nach 18 und 24 Monaten bei Dex 5 mg Spät im Vergleich zur Kontrollgruppe der jeweiligen Altersstufe aufgetreten. Die Tiere der Ver-suchsgruppe haben immer die kürzeste Schädel-Steiß-Länge, die Kontroll-gruppe die längste. Ansonsten konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Gruppen festgestellt werden.

Zusammenfassung

1.) SFL

Der Vergleich der SFL innerhalb der jeweiligen Altersgruppen zeigt keine signifikanten Unterschiede.

2.) SSL

Der Vergleich der SSL in den jeweiligen Altersgruppen zeigt dagegen signifikante Unterschiede. Die Tiere der Kontrollgruppe haben den längsten Rumpf und die kürzesten Beine. Bei Dex 5 mg Spät ist das gegensätzliche Phänomen erkennbar, d.h. diese Tiere haben den kürzesten Rumpf und die längsten Beine. Sie erscheinen optisch gedrungener. Bei Dex 5 mg Früh sind die Verhältnisse dagegen ausgeglichen.

3.3 Histomorphometrische Auswertung der Oberschenkelpräparate

Bei der histomorphometrischen Auswertung wurde zum einen die Stärke der Kortikalis im Bereich der Diaphyse und der Metaphyse vermessen und zum anderen die Flächenanteile von Trabekeln, rotem Knochenmark und gelbem Knochenmark im Bereich der Metaphyse.

3.3.1 Messung der Kortikalisdicke

3.3.1.1 Proximal

a.) Diaphyse

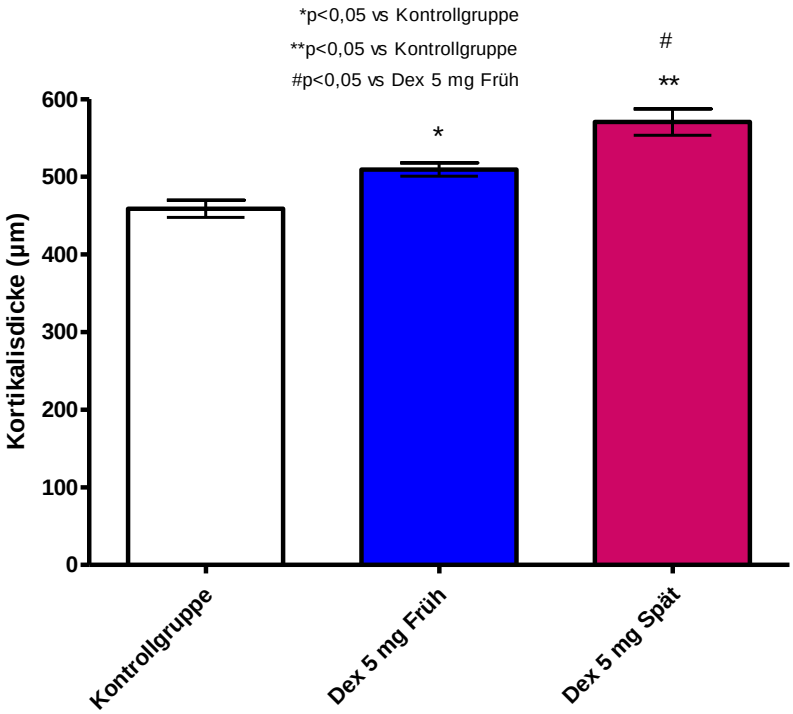


Abb. 14: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Kortikalisdicke in der Diaphyse des Oberschenkelknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung der Kortikalisdicke waren signifikante Unterschiede nachweisbar. Sowohl der Vergleich zwischen Dex 5 mg Früh und Dex 5 mg Spät mit der Kontrollgruppe zeigte signifikante Dickenunterschiede der Kortikalis wie auch der Vergleich der beiden Versuchsgruppen miteinander. Je später die Gabe von Dexamethason, desto dicker die Kortikalis.

b.) Metaphyse

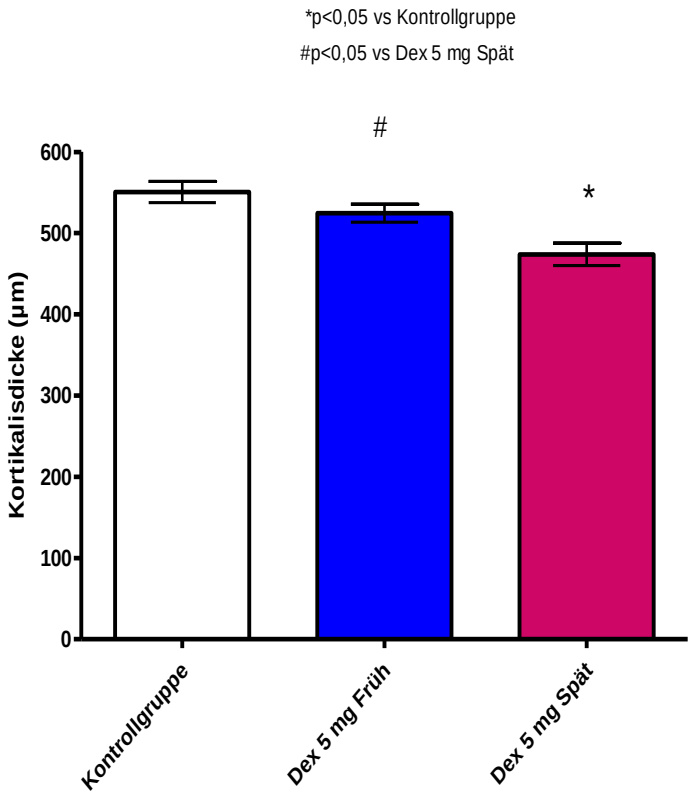


Abb. 15: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Kortikalisdicke in der Metaphyse des Oberschenkelknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung der Kortikalisdicke sind Signifikanzen aufgetreten. Sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch im Vergleich zur frühen Dexamethasongabe nimmt die Dicke der metaphysalen Kortikalis mit später Gabe deutlich ab. Die frühe Gabe beeinflusst die Dicke der Kortikalis nicht.

3.3.1.2 Distal

a.) Diaphyse

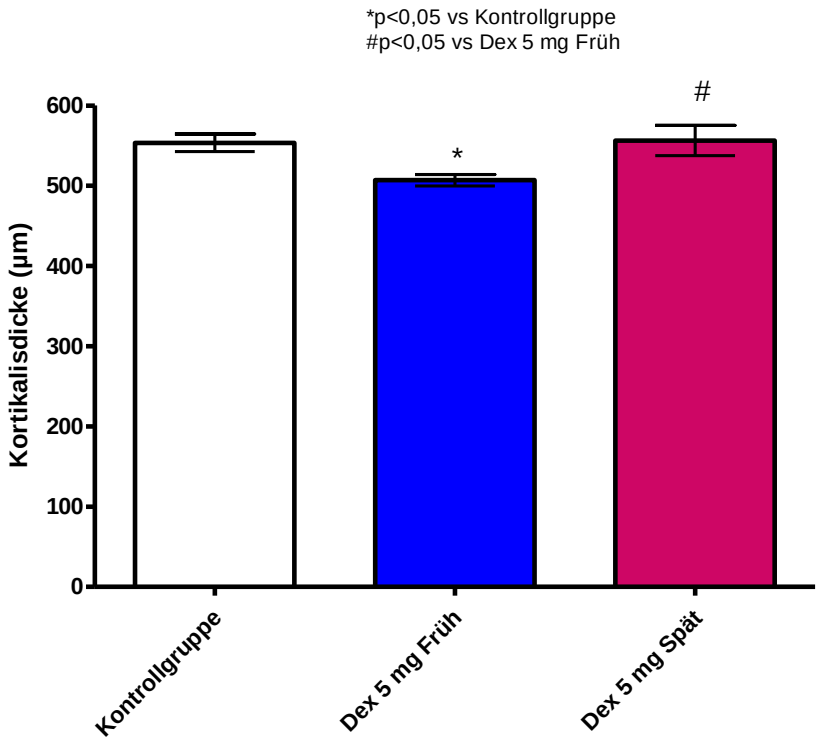


Abb. 16: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Kortikalisdicke in der Diaphyse des Oberschenkelknochens distal.

Im Rahmen der Untersuchung der Kortikalisdicke konnten signifikante Unterschiede zwischen Dex 5 mg Früh und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Kortikalisdicke bei Dex 5 mg Früh ist deutlich geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenfalls bestehen Signifikanzen zwischen Dex 5 mg Spät und Dex 5 mg Früh. Auch hier ist die Dicke der Kortikalis bei Dex 5 mg Früh sichtbar geringer. Zwischen der späten Gabe und der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Die frühe Dexamethasongabe beeinflusst das Wachstum der Kortikalis im distalen Oberschenkelknochen negativ, d.h., sie wird zu schwach ausgebildet. Dagegen scheint die späte Gabe keinen Einfluss auf die Kortikalisentwicklung zu nehmen.

b.) Metaphyse

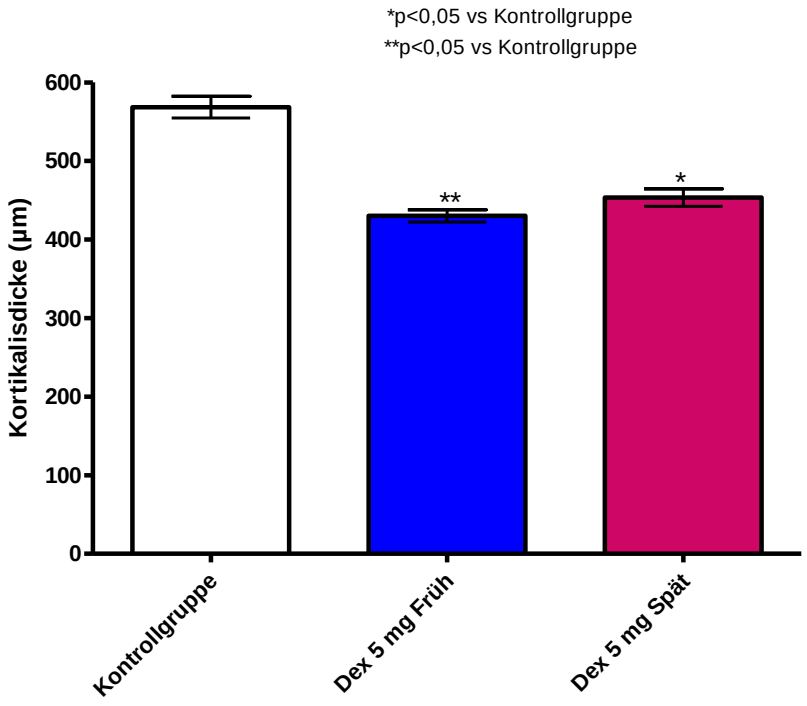


Abb. 17: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethasone-Exposition (bei CJ) auf die Kortikalisdicke in der Metaphyse des Oberschenkelknochens distal.

Im Rahmen der Untersuchung der Kortikalisdicke konnten signifikante Unterschiede zwischen Dex 5 mg Früh und der Kontrollgruppe festgestellt werden wie auch zwischen Dex 5 mg Spät und der Kontrollgruppe. Zwischen beiden Versuchsgruppen konnten dagegen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.
Sowohl die frühe als auch die späte Gabe wirken sich einheitlich negativ auf die metaphysale Kortikalisentwicklung aus.

Zusammenfassung

- Bei Dex 5 mg Früh ist die Kortikalis metaphysal distal dünner als proximal. Diaphysal dagegen ist sie gleich stark.
- Bei Dex 5 mg Spät ist die Kortikalis metaphysal wie diaphysal im Vergleich proximal distal immer gleich stark. Allerdings ist sie diaphysal immer deutlich dicker als metaphysal.
- Die Kontrollgruppe hat metaphysal proximal eine dickere Kortikalis als diaphysal. Distal nimmt die diaphysale Kortikalisdicke zu.

Vergleich untereinander

- Die Metaphyse proximal bei Dex 5 mg Spät ist dünner als bei der Kontrollgruppe und Dex 5 mg Früh. Dex 5 mg Früh zeigt keine Veränderungen.
- Die Metaphyse distal ist in beiden Versuchsgruppen dünner als bei der Kontrollgruppe.
- Diaphysal proximal nimmt die Stärke der Kortikalis zu, je später Dexamethason verabreicht wird.
- Diaphysal distal ist bei Dex 5 mg Früh die Kortikalis dünner als bei der Kontrollgruppe und Dex 5 mg Spät. Dex 5 mg Spät zeigt keine Veränderungen.

.

3.3.2 Messung des Flächenanteils von

I.) Trabekel

II.) rotem Knochenmark (rM)

III.) Fett im intraossalen Bereich (gelbes Mark =gM)

im Oberschenkelknochen

3.3.2.1 Proximal

I.)

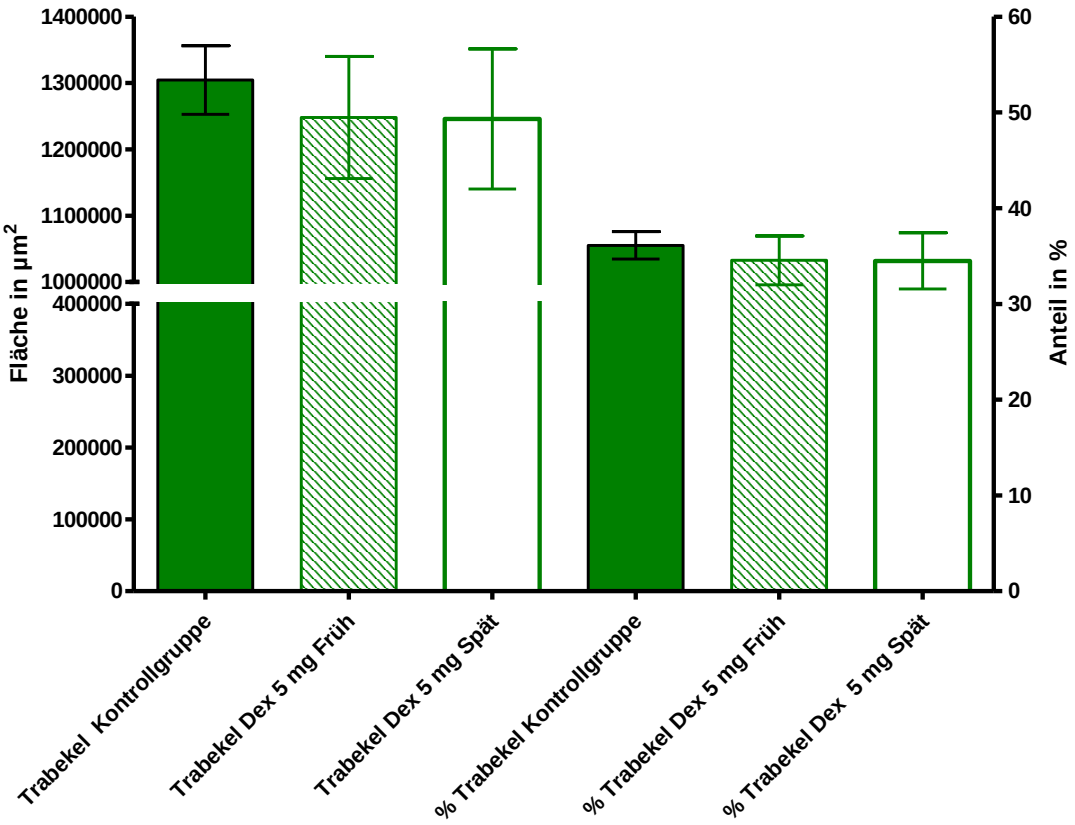


Abb. 18: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Trabekel-eigenschaften des Oberschenkelknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung des intraossären Trabekelanteiles konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

II.)

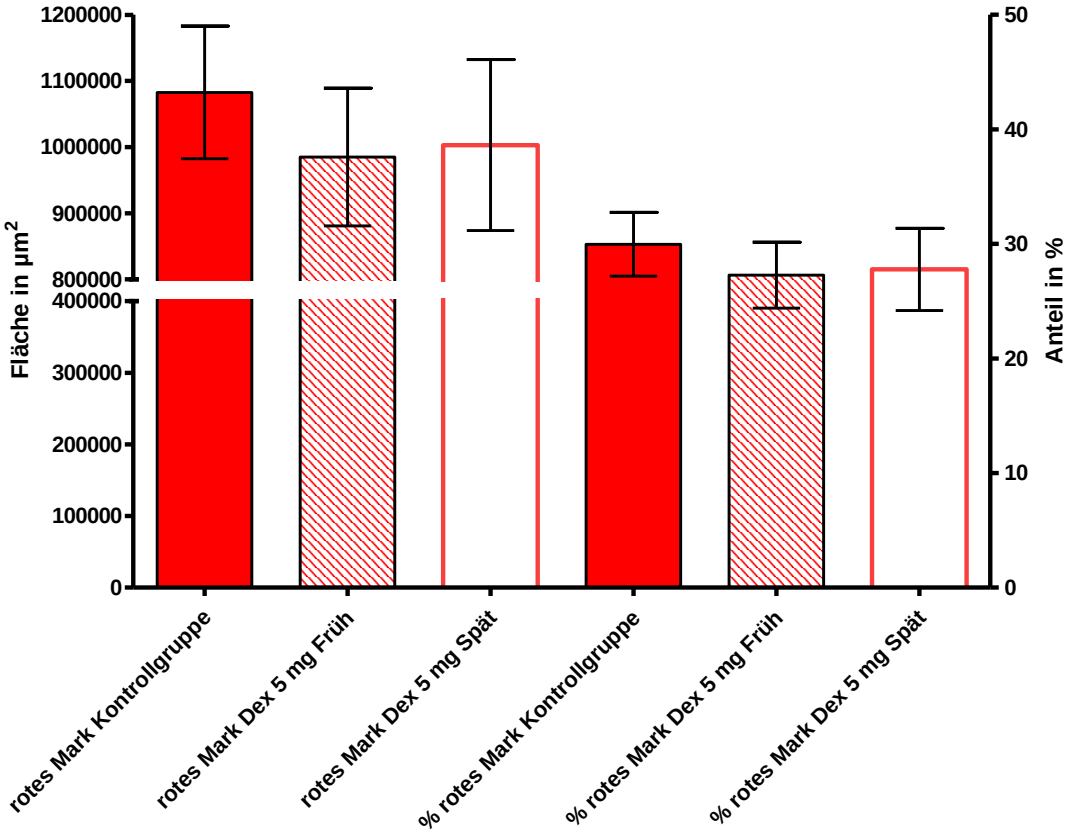


Abb. 19: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf den Anteil des roten Knochenmarks in der Metaphyse des Oberschenkelknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung des intraossären Anteiles an rotem Knochen-mark konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

III.)

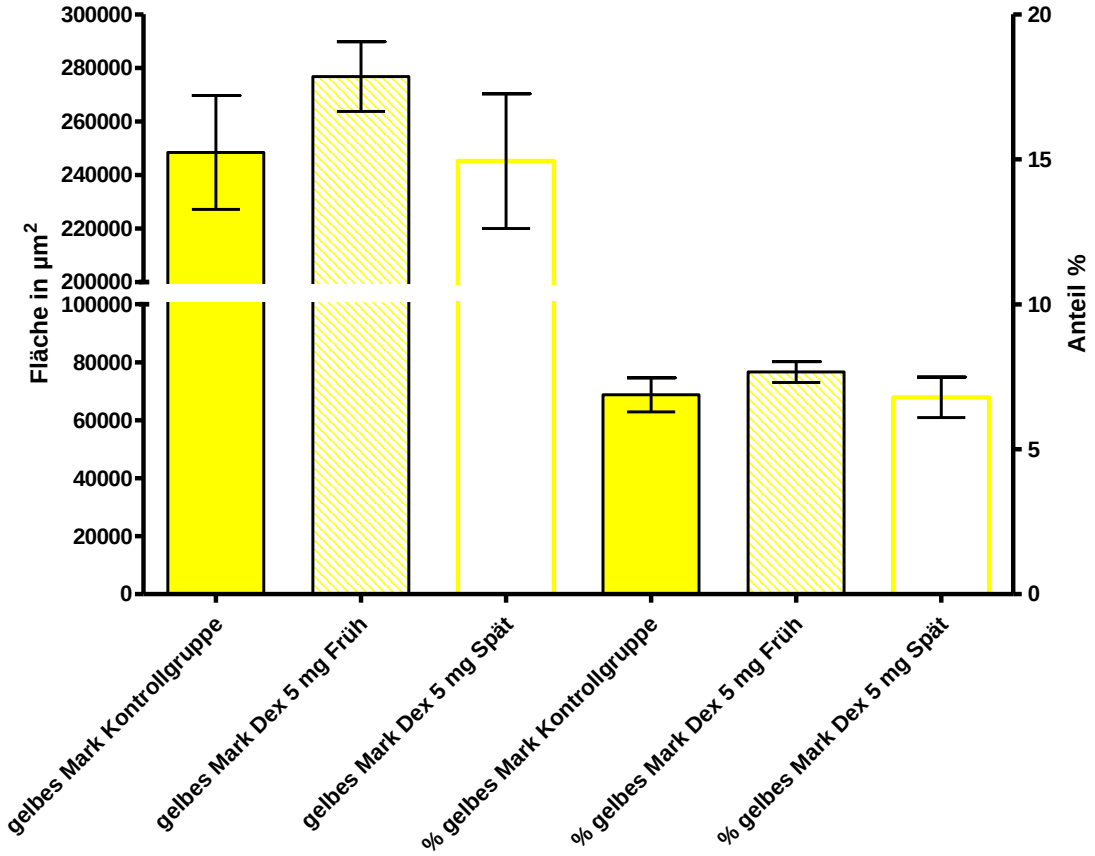


Abb. 20: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf den Fettanteil im intraossären Bereich in der Metaphyse des Oberschenkelknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung des Fettanteiles im intraossären Bereich konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

3.3.2.2 Distal

I.)

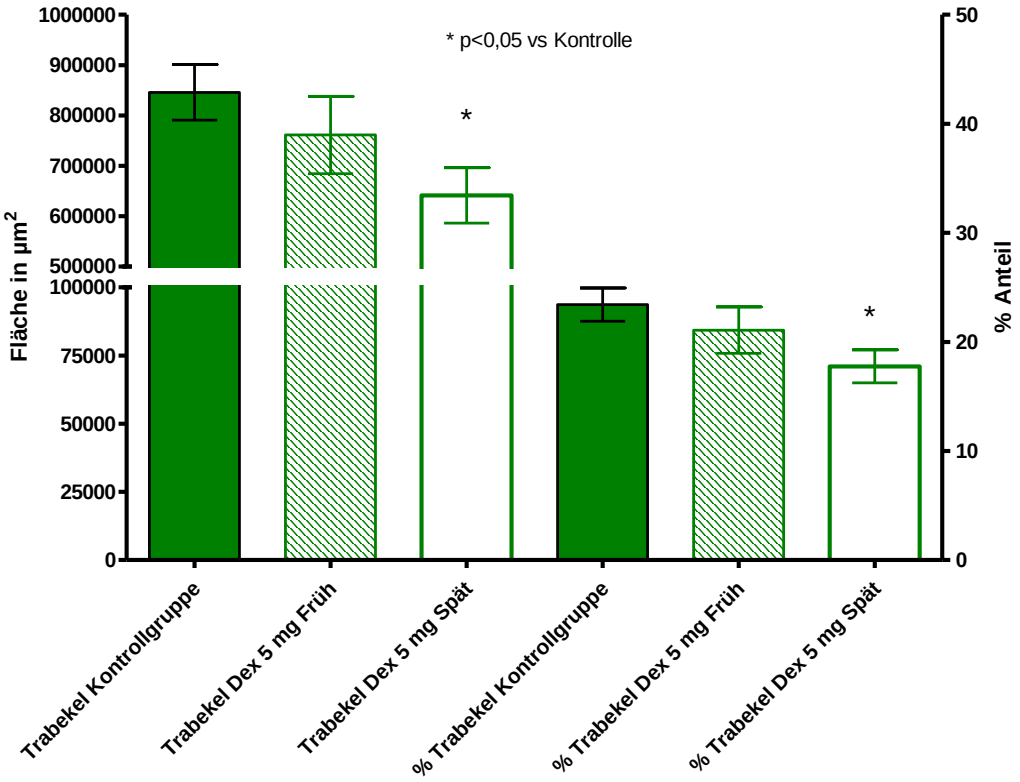


Abb. 21: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Trabekel-eigenschaften des Oberschenkelknochens distal.

Im Rahmen der Untersuchung des intraossären Trabekelanteils sind signifikante Unterschiede zwischen Dex 5 mg Spät und der Kontrollgruppe aufgetreten. Dex 5 mg Spät hat eine verringerte Trabekeldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

II.)

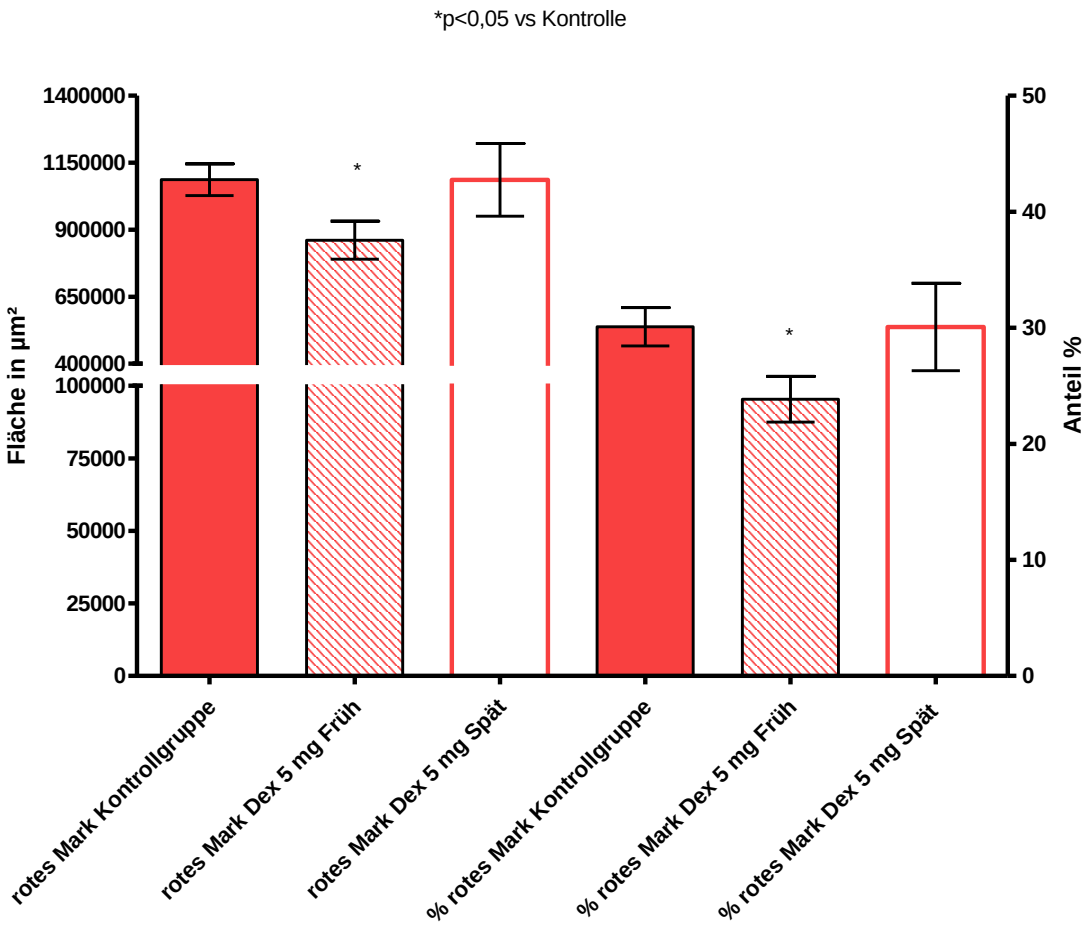


Abb. 22: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf den Anteil des roten Knochenmarks in der Metaphyse des Oberschenkelknochens distal.

Im Rahmen der Untersuchung des Anteils an rotem Knochenmark im intraossären Bereich sind signifikante Unterschiede zwischen Dex 5 mg Früh und der Kontrollgruppe aufgetreten. Sie zeigen einen deutlich reduzierten Anteil an rotem Knochenmark bei Dex 5 mg Früh.

III.)

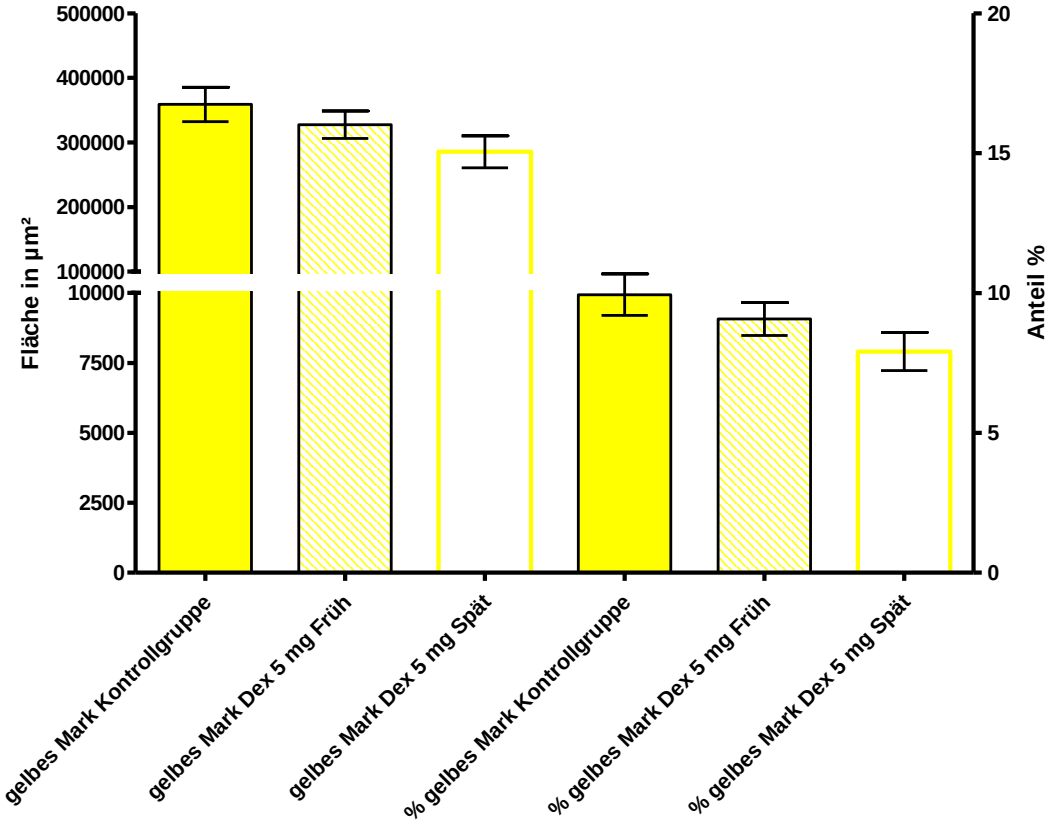


Abb. 23: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf den Fettanteil im intraossären Bereich der Metaphyse des Oberschenkelknochens distal.

Im Rahmen der Untersuchung des intraossären Fettanteiles konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Zusammenfassung

- Proximal sind keine Veränderungen bei Trabekel-, rotem Knochenmarks- und Fettmarksanteil aufgetreten.
- Distal hat Dex 5 mg Spät eine reduzierte Trabekeldichte im Vergleich zur Kontrollgruppe.
- Distal hat Dex 5 mg Früh einen reduzierten Anteil an rotem Knochenmark.

3.4 Histomorphometrische Auswertung der Schienbeinpräparate

Im Rahmen der histomorphometrischen Auswertung wurde zum einen die Stärke der Kortikalis im Bereich der Diaphyse und der Metaphyse vermessen und zum anderen die Flächenanteile von Trabekeln, rotem Knochenmark und gelbem Knochenmark im Bereich der Metaphyse.

3.4.1 Messung der Kortikalisdicke

3.4.1.1 Proximal

a.) Diaphyse

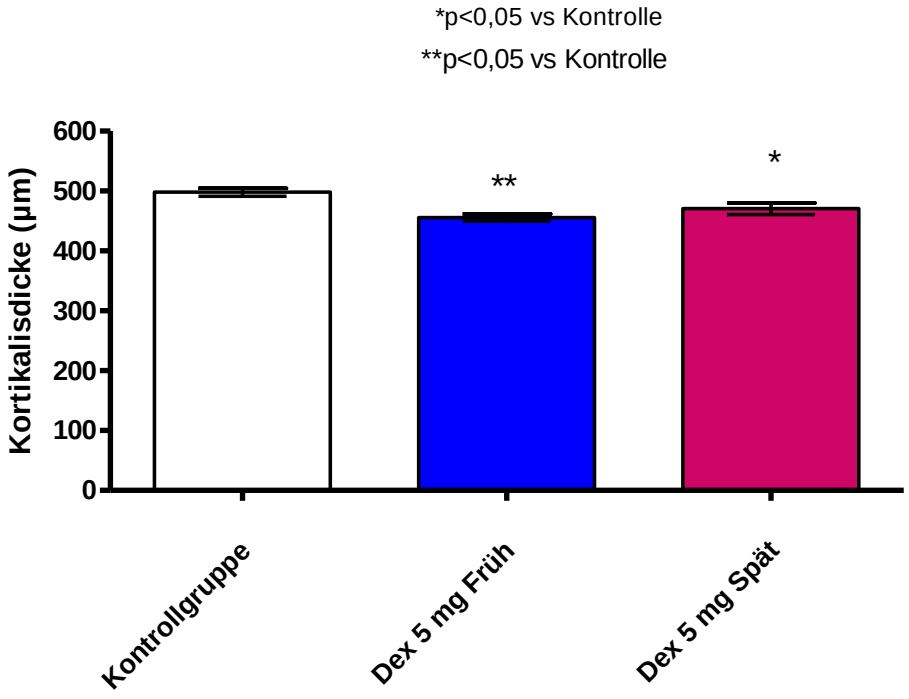


Abb. 24: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Kortikalisdicke in der Diaphyse des Schienbeinknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung konnten signifikante Unterschiede in der Kortikalisdicke zwischen Dex 5 mg Früh und der Kontrollgruppe sowie zwischen Dex 5 mg Spät und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Gegensatz zur Kontroll-

gruppe ist die Kortikalisdicke in beiden Versuchsgruppen reduziert. Die Gabe von Dexamethason wirkt sich somit unabhängig vom Zeitpunkt auf die Kortikalis-entwicklung aus.

b.) Metaphyse

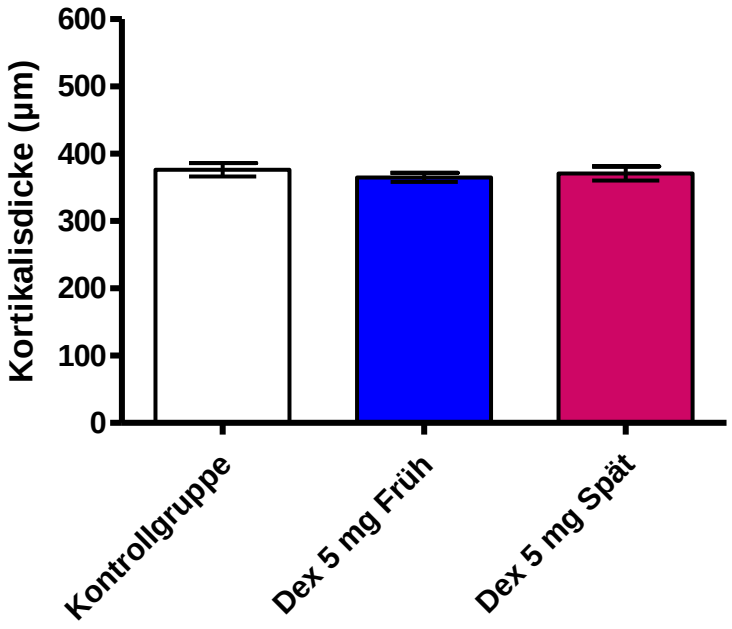


Abb. 25: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Kortikalisdicke in der Metaphyse des Schienbeinknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung der Kortikalisdicke konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden.

Zusammenfassung

- Diaphysal ist die Kortikalisdicke in beiden Versuchsgruppen reduziert
- Metaphysal sind keine Unterschiede aufgetreten

3.4.2 Messung des Flächenanteils von

I.) Trabekel

II.) rotem Knochenmark (rM)

III.) Fett im intraossären Bereich (gelbes Mark = gM)

im Schienbeinknochen

3.4.2.1 Proximal

I.)

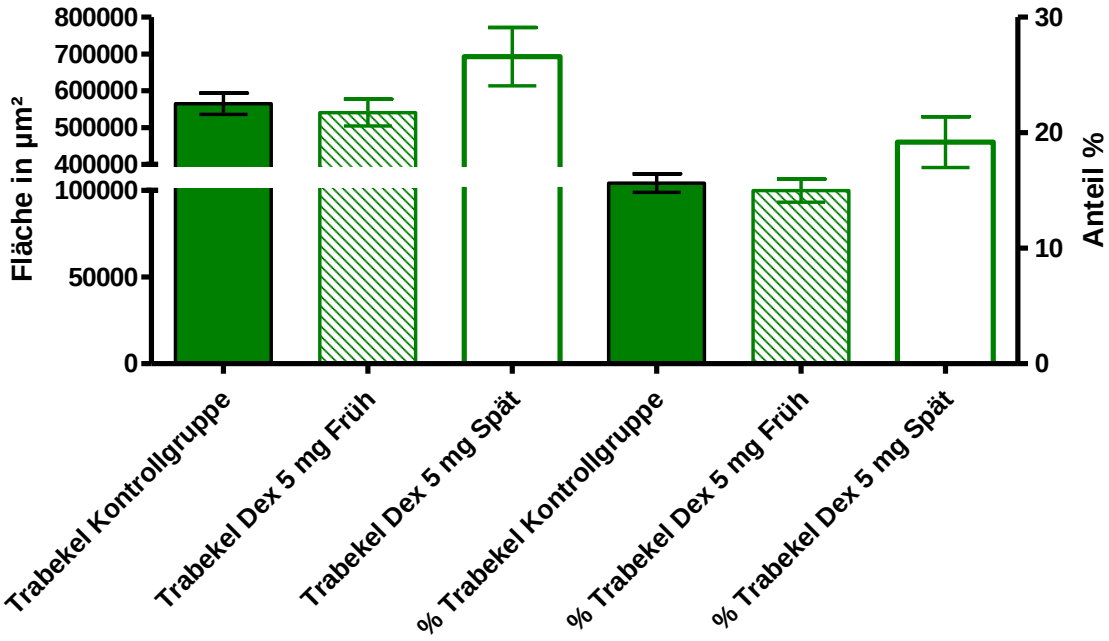


Abb. 26: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf die Trabekel-eigenschaften des Schienbeinknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung des intraossären Trabekelanteiles konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen fest-gestellt werden.

II.)

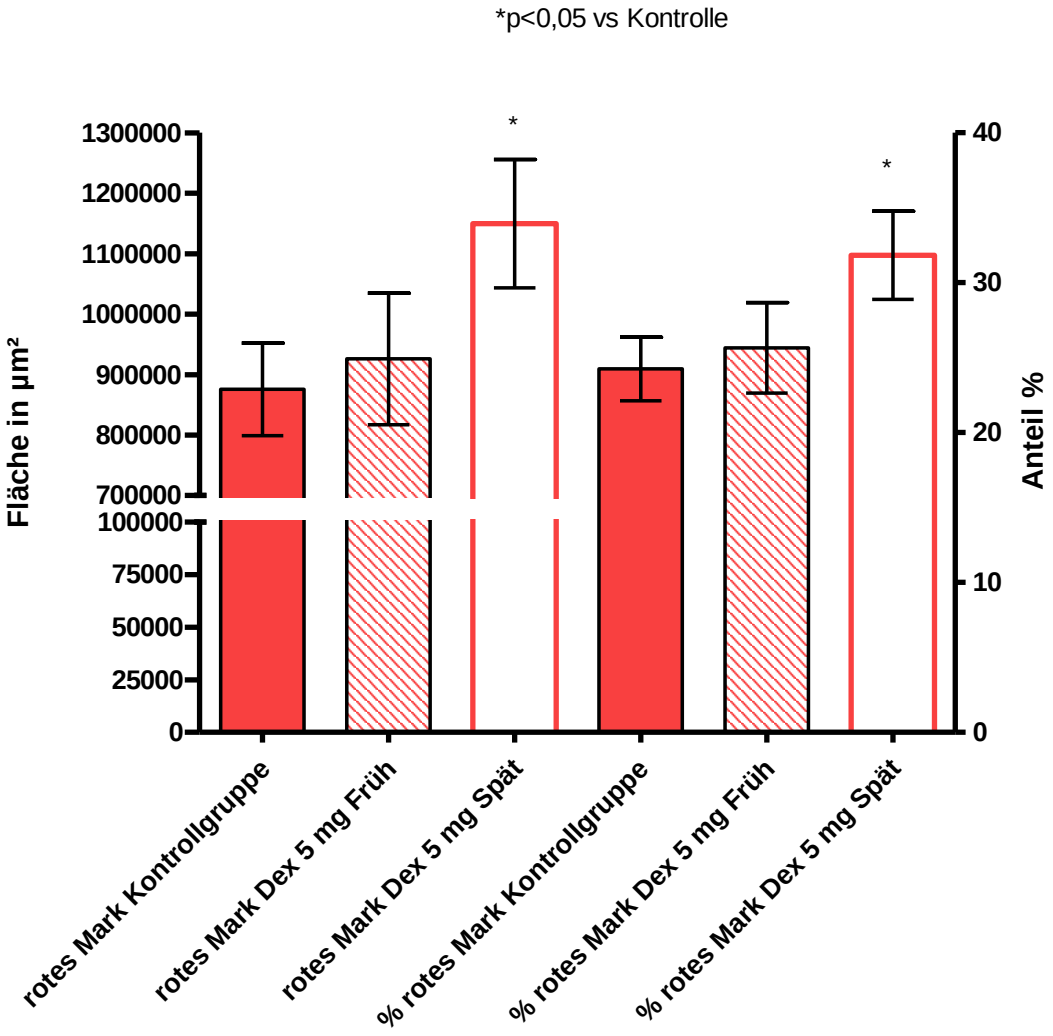


Abb. 27: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf den Anteil des roten Knochenmarks des Schienbeinknochens proximal.

Im Rahmen der Untersuchung des intraossären Anteiles an rotem Knochenmark gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Dex 5 mg Spät. Die Tiere aus Dex 5 mg Spät haben einen deutlich höheren Anteil an rotem Knochenmark im Vergleich zur Kontrollgruppe.

III.)

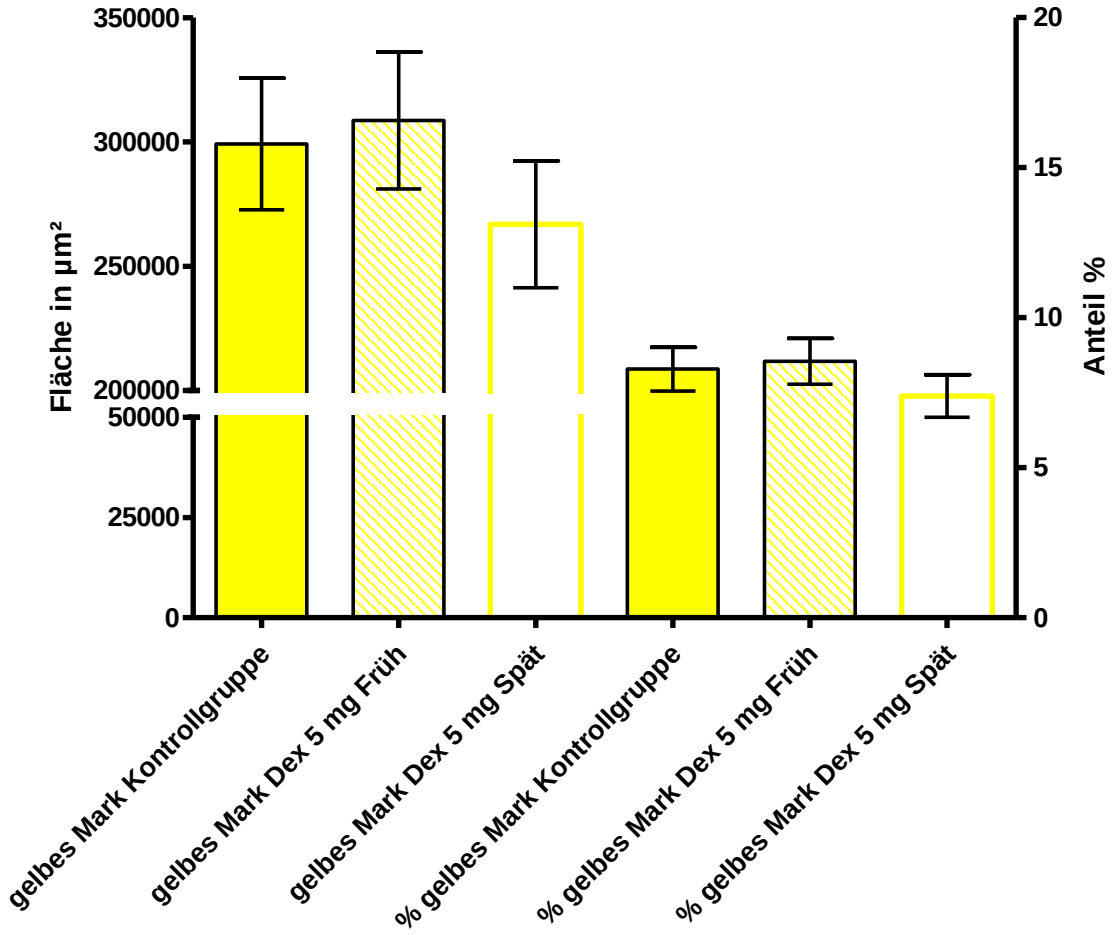


Abb. 28: Effekt der Schwangerschafts-Dexamethason-Exposition (bei CJ) auf den Fettanteil im intraossären Bereich des Schienbeinknochens proximal.

Bei der Untersuchung des intraossären Fettmarkanteiles gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

3.4.2.2 Zusammenfassung

- Der Trabekelanteil zeigt keine Unterschiede
- Der Anteil an rotem Knochenmark ist bei Dex 5 mg Spät deutlich erhöht
- Der Anteil an Fettmark zeigt keine Unterschiede

3.4.3 Knochendichte im Schienbeinknochen

Die Ergebnisse über die Knochendichteentwicklung zwischen dem 4. und 24 Lebensmonat wurden mir in Form einer graphischen Darstellung zur Verfügung gestellt, da die Untersuchung bereits vor Übernahme der vorliegenden Arbeit erfolgte.

*p<0,05 vs Kontrolle der einzelnen Altersstufen

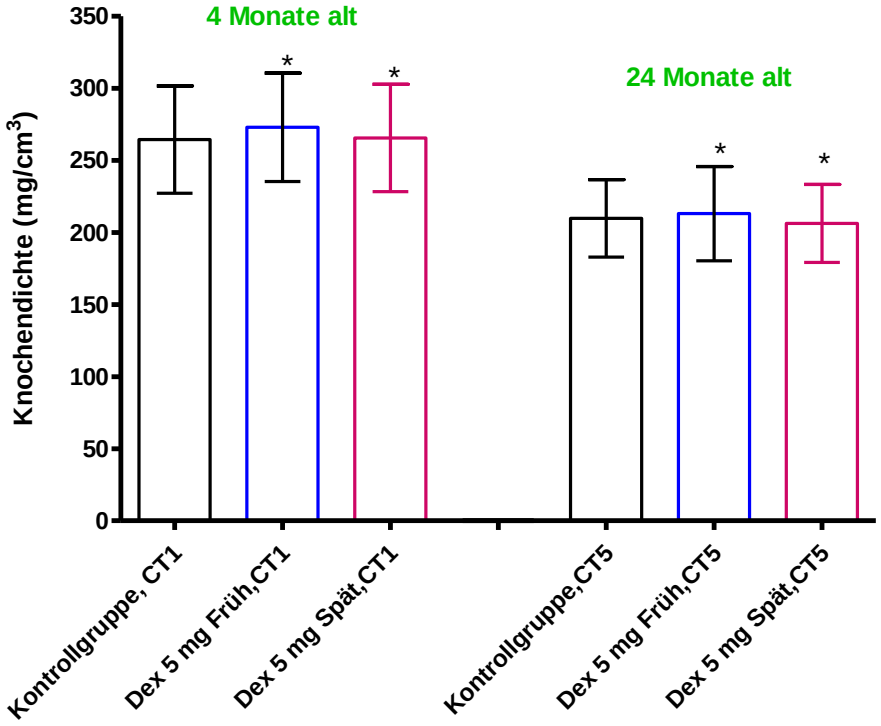


Abb. 29: Knochendichte in der Metaphyse des proximalen Schienbeinknochens nach früher und später intrauteriner Dexamethason-Applikation im 4. und 24. Lebensmonat.

Sowohl im 4. als auch im 24. Lebensmonat sind keine Signifikanzen innerhalb der Versuchsgruppen aufgetreten. Die Knochendichte nimmt aber signifikant vom 4. Lebensmonat bis zum 24. Lebensmonat hin in allen Gruppen ab.

4. Diskussion

Diese Arbeit soll aufzeigen, ob und inwiefern sich die zeitpunktabhängige pränatale Gabe von Dexamethason speziell auf die Skelettentwicklung auswirkt. Dabei stehen insbesondere die Veränderungen beim Oberschenkel- und Schienbeinknochen im Vordergrund. Das Modell des männlichen Callithrix jacchus eignet sich hierzu besonders gut, da viele biologische Gemeinsamkeiten zum Menschen zu finden sind (Merker et al. 1988).

4.1 Körpergewicht und Körpergröße

a.) Körpergewicht

Die Gabe von Dexamethason zeigt in der vorliegenden Studie keine Veränderungen beim Körpergewicht der Tiere im Zeitraum zwischen Geburt und 24. Lebensmonat.

Bei Menschen (Crowther et al. 2007), anderen Primaten (de Vries et al. 2007, Hauser et al. 2007 und 2008, Bramlage et al. 2009) und Ratten (Swolin-Eide et al. 2002) nimmt die pränatale Dexamethasongabe keinen Einfluss auf das Geburtsgewicht.

Im Alter von 24 Monaten konnte sowohl beim Primaten (Bramlage et al. 2009) (entspricht etwa einem Alter von 14 Jahren beim Menschen) als auch beim Menschen (Crowther et al. 2007) keine Abweichungen des Körpergewichts nach Dexamethasongabe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

De Vries et al. (2007) stellten in ihrer Studie an Primaten (*Chlorocebus aethiops*) unmittelbar postnatal keine Veränderungen des Geburtsgewichts fest, aber nach dem 6. Lebensmonat zeigte sich bei Dexamethasongaben von 120 µg / kg und ab dem 8. Lebensmonat bei 200 µg / kg eine signifikante Gewichtsreduktion.

Das Körpergewicht beim Menschen steht in engem Zusammenhang mit dem Blutdruck. Jedes Kilogramm entspricht ca. 2 Torr des Blutdrucks (Bramlage 2005). Treten Veränderungen im Gewicht auf, wirkt sich dies nachhaltig auf den Wert des Blutdrucks aus (Bramlage et al. 2009). Geringes Geburtsgewicht gilt als Risikofaktor für kardio-vaskuläre Erkrankungen, Bluthochdruck und Diabetes. Besonders das Verhältnis von Fettmasse zu fettfreier Körpermasse scheint Einfluss darauf zu haben (Wang et al. 2007). Bei frühgeborenen Menschenkindern ist im Allgemeinen mit

einem höheren Blutdruck zu rechnen. Daraus ergibt sich für die Betroffenen im Alter ein deutlich höheres Risiko, an Hypertonie zu erkranken (Crowther et al. 2007). In Tierversuchen wurde angedeutet, dass die pränatale Verabreichung von GC im Alter negative Effekte auf das kardio-vaskuläre System und die metabolischen Funktionen nach sich ziehen können. Besonders der Blutdruck verschlechtere sich mit zunehmenden Lebensjahren (de Vries et al. 2007, Crowther et al. 2007). Auch beim Menschen werden, selbst bei einmaliger Verabreichung, Veränderungen im hormonellen System vermutet, die allerdings erst im Erwachsenenalter zu Erkrankungen wie Hypertonie führen können (Korgun et al. 1999).
Präpubertär konnten allerdings deutliche Unterschiede im Körpergewicht bei Kindern mit pränataler Dexamethasongabe nachgewiesen werden. Im Alter zwischen 5 und 10 Jahren (entspricht einem Alter von ca. 1-2 Jahren beim CJ) sind die Kinder deutlich leichter als ihre Altersgenossen (Wang et al. 2007). Durch die Gabe besteht aber ein höheres Risiko, mit fortschreitendem Alter an Übergewicht zu erkranken, da mit einem Anstieg des subkutanen Fettgehaltes gerechnet werden muss (de Vries et al. 2007). Tierstudien belegen seit einigen Jahren, dass die Verabreichung von Dexamethason den Körper für Krankheiten im Erwachsenenalter programmiert (z.B. Hyperinsulinismus) (de Vries et al. 2007, Newnham und Moss 2001).

b.) Körpergröße

Nach der pränatalen Gabe von Dexamethason konnten in der vorliegenden Studie bezüglich der Gesamtkörpergröße keine Veränderungen festgestellt werden.
Dies wird durch mehrere Studien bei Menschen (Crowther et al. 2006, Crowther et al. 2007), Primaten (*Chlorocebus aethiops*) und Ratten (Franko et al. 2010) bestätigt.
Allerdings haben die Tiere der Dex 5 mg Spät-Gruppe bei gleicher SFL und gleichem Körpergewicht eine kürzere SSL, d.h. die Tiere wirken gedrungener.
Am Beispiel des *Chlorocebus aethiops* stellten de Vries et al. (2007) ab dem 6. Lebensmonat bei einer Dexamethasongabe von 200 µg / kg eine signifikant reduzierte Schädel-Fersen-Länge im Vergleich zu den anderen Versuchs-gruppen fest. Zu ebenfalls abweichenden Ergebnissen gelangten Wang et al. (2007). Sie stellten Unterschiede in der Körpergröße bei Kindern im Alter von 5 - 10 Jahren fest (entspricht ca. 1-2 Jahre beim CJ), verglichen mit Altersgenossen ohne pränatale GC-Behandlung.

Swolin-Eide et al (2002) stellten bei männlichen Ratten nach wiederholter Dexamethasongabe im Alter von 5 Wochen bei der Dex-Gruppe eine signifikant erhöhte Körpergröße fest.

Die fetalen Parameter beim Chlorocebus aethiops wurden durch die Dexamethasongabe nicht beeinflusst. Veränderungen im Körper waren erst nach der Geburt im Laufe der Zeit festzustellen. Die Tiere nahmen nicht so schnell zu und wuchsen langsamer (de Vries et al. 2007).

In Studien mit menschlichen Probanden konnten negative Effekte auf den physikalischen Status von Neugeborenen nicht nachgewiesen werden (Crowther et al. 2006, Crowther et al. 2007). Beeinträchtigungen der motorischen Reflexe von Ratten sind als Folge bekannt (Hauser et al. 2008). Hauser et al. (2008) wiesen reduzierte motorische Fähigkeiten von jugendlichen CJ nach. Besonders die späte Applikation zeigte hier größere Auswirkungen als die frühe. Des Weiteren sind beim CJ Entwicklungsstörungen im sozialen und kognitiven Bereich (z.B. Hyperaktivität (Hauser et al. 2007, 2008) aufgetreten.

Darüber hinaus stellte man eine höhere körperliche Aktivität bei CJ nach früher Dexamethasongabe und ein ausgeprägteres Essverhalten fest (Hauser et al. 2007). Crowther et al. beschrieben 2007, dass die Dexamethasongabe bis zum Alter von 2 Jahren keinerlei Auswirkungen auf das soziale und emotionale Leben von Kindern hat.

4.2. Knochenarchitektur, Knocheneigenschaften, Knochenstoffwechsel

4.2.1 Kortikalisdicke

a.) Oberschenkelknochen

Die späte Gabe von Dexamethason fördert in der vorliegenden Studie das Dickenwachstum der Kortikalis im diaphysalen Bereich. Metaphysal dagegen ist proximal wie distal eine Schwächung der Kortikalis sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass bei Stürzen die Bruchgefahr in diesen Bereichen zunehmen kann.
Bei früher pränataler Gabe von Dexamethason ist die Stärke im distalen Bereich des Knochens der Kortikalis sowohl diaphysal als auch metaphysal, also Richtung Knie, reduziert gegenüber der Kontrollgruppe. Dadurch muss von einer Schwächung der langen Röhrenknochen und der damit verbundenen erhöhten Bruchgefahr ausgegangen werden.

b.) Schienbeinknochen

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass eine pränatale Dexamethasongabe das diaphysale Kortikaliswachstum des Schienbeinknochens verringert und eine geschwächte Knochenstruktur in beiden Versuchsgruppen beobachtet werden kann. Metaphysal dagegen scheint die Gabe keinen Einfluss auf das Dickenwachstum der Kortikalis zu haben. Die daraus resultierende Schwächung der langen Röhrenknochen erhöht die Bruchgefahr in diesem Bereich.

Die unterschiedlich entwickelten Kortikalisstärken der beiden Knochen sind als sehr interessante Ergebnisse zu betrachten, für die es derzeit noch keine Erklärung gibt. Es ist zu vermuten, dass die Kortikalisentwicklung des Oberschenkelknochens anders reguliert wird, als die Kortikalisentwicklung des Schienbeinknochens
Die Stärke der Kortikalis ist für die Tiere besonders wichtig aufgrund ihres Vierfüßlerganges, da das Knie die Hauptbelastungszone der unteren Extremitäten ist. Die vorliegende Studie zeigt, dass dort die stärksten Veränderungen stattfinden.

Beim Menschen hingegen liegen durch den aufrechten Gang die Hauptbelastungszentren auf dem Oberschenkelhals.

Die Humerusquerschnittsfläche war bei Schweinen mit Dexamethasongabe deutlich geringer als bei der Kontrollgruppe. Die durchschnittliche Wandstärke des Humerus war bei der Dexgruppe am stärksten und bestätigt damit zum Teil unsere Ergebnisse. Bei der mechanischen Analyse der Knochen wurde eine herabgesetzte Bruchfestigkeit und Elastizität bei der Dexgruppe festgestellt (Śliwa et al. 2006).
Bei Schweinen konnte bei einer 12-maligen Applikation (jeden zweiten Tag) in den letzten 24 Tagen vor der Geburt bei einer Gabe von 3 mg pro Tag und einer fortgesetzten Gabe von 0,5 mg / kg pro Tag die ersten 30 Lebenstage lang, eine Abnahme der Knochenqualität von Humerus, Femur und Rippen, eine negative strukturelle Entwicklung sowie reduzierte mechanische Eigenschaften der Knochen festgestellt werden. Das Risiko von Frakturen im Bereich der Rippen und Extremitäten steigt. Durch den Verlust an Knochengewebe und gestörter fetaler Knochenmineralisation besteht ein Risiko auf neonatale Osteoporose. Die fetale Wachstumshemmung wird kompensiert durch ein übermäßiges Wachstum im Vergleich zum Alter. Beim Menschen treten die negativen Effekte bei der Gabe während des dritten Trimenons auf, da zu diesem Zeitpunkt das maximale fetale Wachstum stattfindet (Śilwa et al. 2010).

4.2.2 Flächenverhältnisse von Trabekel, rotem Knochenmark und Fettmark

a.) Oberschenkelknochen

In der vorliegenden Studie spiegelt sich die späte Verabreichung von Dexamethason in einer reduzierten Trabekeldichte im distalen Oberschenkelknochen wider und die frühe Applikation in einem verringerten Anteil an rotem Knochenmark im distalen Oberschenkelknochen.

Die reduzierte Trabekeldichte weist auf eine Instabilität des Knochens hin, welche durch die reduzierte Kortikalisdicke noch verstärkt wird.
Allein die hoch dosierte (> 7,5 mg / tgl.) orale Gabe von GC zeigt besonders beim trabekulären Knochen ihre Wirkung. Durch das beschleunigte Remodelling ist der

Strukturverlust in diesem Gewebe sehr ausgeprägt und gut röntgenologisch sichtbar (hier als Beispiel die erhöhte Frakturneigung der Wirbelkörper) (Pfeifer et al. 2001).

Die geringe Ausbildung des roten Knochenmarks bei Dex 5 mg Früh kann auf eine eventuelle reduzierte Immunabwehr hinweisen. Fuenfer et al. (1987) berichteten von mehreren Studien, die eine hemmende Wirkung von GC auf das Immunsystem nachgewiesen hatten. Bei Neugeborenen konnte ein Anstieg von Morbidität und Mortalität bei bakteriellen Infektionen festgestellt werden. Die T-Zellproliferation ist nach antenataler GC-Gabe bei Neugeborenen deutlich abgeschwächt (Kavelaars et al. 1999). Verringerungen in den Phagozytose-eigenschaften von Leukozyten bei Frühgeborenen wurden 1984 schon von Lazzarin et al. beschrieben.

Veränderungen im Fettanteil des Knochens konnten nicht nachgewiesen werden. De Vries et al. (2007) berichten über eine Zunahme des Unterhautfettgewebes nach Dexamethasongabe. Die Verabreichung stellt im Körper etwas um, aber die Auswirkungen sind erst nach der Geburt sichtbar. Die Effekte sind ferner dosisabhängig (de Vries et al. 2007).

b.) Schienbeinknochen

In der vorliegenden Studie konnte bei den Tieren aus Dex 5 mg Spät eine signifikante Zunahme des roten Knochenmarks im proximalen Schienbein verzeichnet werden.

Es ist bekannt, dass nach mütterlicher GC-Verabreichung bei neugeborenen Menschenkindern zumindest zeitweise ein Anstieg von neutrophilen und unreifen neutrophilen Granulozyten entstehen kann. Auch die nach der Geburt auftretende Leukozytose der Kinder ist auf die mütterliche GC-Applikation zurückzuführen (Barak et al. 1992). Zachman et al. (1988) bestätigten die Möglichkeit erhöhter Leukozytenwerte und besonders eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten bei Kindern, die 3 bis 7 Tage nach mütterlicher Dexamethasonapplikation geboren wurden. Die Anzahl an roten Blutkörperchen, der Hämatokrit- und Hämoglobinwert sowie die Zahl an Reticulozyten sind nach Dexamethasonapplikation während der letzten Schwangerschaftswochen bei Rattennachwuchs signifikant erhöht. Ebenfalls ist die Plasmakonzentration von Erythropoitin, dem Hauptregulator der Erythropoese,

sowohl beim Rattennachwuchs als auch bei den Müttern signifikant höher (Tang et al. 2011).

Die Ergebnisse der Auswertung der Flächenverhältnisse von Trabekel, rotem Knochenmark und Fettmark bestätigen die angenommene Vermutung über die unterschiedlichen Regulierungsvorgänge beim Oberschenkel- und Schienbein-knochen. Im Bereich des Schienbeinknochens zeigt sich die Wirkung von GC in erhöhen Werten von rotem Knochenmark, während beim distalen Oberschenkelknochen reduzierte Trabekelzahlen und weniger rotes Mark zu verzeichnen sind.

4.2.3 Knochendichte

In der vorliegenden Studie zeigen die mir übergebenen Ergebnisse des qCT des proximalen Schienbeinknochens keine signifikanten Veränderungen der Knochen-dichte bei den Versuchsgruppen.
In der präpubertären Phase, bei Kindern zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr, können nach pränataler Dexamethasongabe allerdings verringerte Knochenmassen nachgewiesen werden. Dies ist bedingt durch eine früher erreichte Pubertät der Kinder nach pränataler Dexamethasongabe (z.B. bei bronchopulmonarer Dysplasie (BPD)). Es ist bekannt, dass die BPD keinen Einfluss auf die Größe und das Gewicht der Kinder hat. Deswegen schließt man daraus, dass die Veränderungen dexamethasonbedingt sein müssen (Wang et al. 2007). Darüber hinaus neigen Frühgeborene mit geringem Geburtsgewicht dazu, schlechter mineralisierte Knochen zu haben, da die Hauptmineralisation der Knochen erst im 3. Trimenon zunimmt (Ward et al 1998).
Bei Frühgeborenen ohne GC-Gabe sind perinatale Knochenmineralisationsdefizite bekannt. Darüber hinaus sind die Kinder kleiner und leichter im Vergleich zu normal Geborenen und haben eine geringere BMD (*bone mineral density*) im Bereich der Hüften. Allerdings regulieren sich diese Werte im Laufe der Zeit in den Normbereich (Bowden et al. 1999).
Dalle Carbonare et al. (2005) behaupten, dass nicht nur die Knochenmasse wichtig für die mechanischen Eigenschaften ist, sondern die Kombination aus

Knochenvolumen und Mikroarchitektur, d.h. Breite, Anzahl, Aufteilung und Organisation der Trabekel. Unabhängig von der Knochendichte ist allein die Mikroarchitektur wichtig für die Zerbrechlichkeit.
Auf Auswirkungen von pränataler Dexamethasonapplikation weisen auch Śliwa et al. (2006) hin. Postnatal konnten Effekte bei den Knochenformationsprozessen durch Abnahme der Kollagen- und Knochenmatrixsynthese fest-gestellt werden. BMD (*bone mineral density*), BMC (*bone mineral content*) und geometrische Parameter sind im Humerus verringert (Śliwa et al. 2006, 2010).

In der vorliegenden Studie wurden anhand der histologischen Schnittbilder deutlich sichtbare Veränderungen bestätigt. Besonders im Bereich der Knie, welche bei den Primaten die Hauptbelastungszonen des Körpers sind, bedingt durch den Vierfüßlergang, konnten wir Veränderungen aufzeigen. Der Oberschenkelknochen reagiert in dieser Studie am sensitivsten auf die Dexamethasonapplikation. Des Weiteren sind Einflüsse am proximalen Schienbeinknochen erkennbar, wohingegen der poximale Oberschenkelknochen die wenigsten Veränderungen zeigt. In Bezug zum Thema "Osteoporose im Alter" ist es wichtig für uns gewesen, zu Ergebnissen zu gelangen, die uns Hinweise liefern, ob die pränatale Gabe von Dexamethason Langzeitwirkungen auf die Knochenentwicklung bzw. das Knochenremodelling hat und ob dadurch eine Osteoporoseerkrankung begünstigt wird. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Oberschenkel am sensitivsten auf die Dexamethason-Therapie anspricht.

4.3 Kritische Beurteilung der Versuchsreihe

Die Anzahl an Primaten in dieser Versuchsreihe ist im Unterschied zu anderen Studien außerordentlich hoch. Es war von Anfang an gewollt, 10 Tiere pro Versuchsgruppe zu erhalten. In anderen Publikationen wird mit bedeutend weniger Tieren gearbeitet, aber die Wissenschaftler sind sich sicher, dass ihre Ergebnisse auch mit geringer Versuchstieranzahl ausreichend sind. Vorteilhaft zu werten ist, dass die Primaten selbst gezüchtet wurden. Somit konnten optimale Aufzucht-bedingungen sichergestellt werden. Allerdings wurden die Tiere nur bis zum Alter von 2 Jahren untersucht (entspricht ca. 14 - 16 Jahre beim Menschen), so dass man die Auswirkungen des Dexamethasons, die erst im späten Erwachsenenalter zum Tragen kommen, in diesen Auswertungen nicht erfassen konnte.

Beim Auswerten der histologischen Schnittbilder traten Probleme in Form von nicht auswertbaren Bildern auf Grund von Fehlschnitten auf, so dass nicht immer 10 Proben pro Versuchsgruppe zur Verfügung standen. Während der Messungen wurden erhebliche Streuwerte innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen festgestellt. Ein qCT des Oberschenkelknochens konnte aus technischen Gründen nicht gemacht werden, da das Gerät nur an Kleintiere adaptiert ist.

Kritisch zu sehen ist ebenfalls, dass in dem Gebiet der Knochenarchitektur bisher nur wenig geforscht wurde. Primaten sind als Forschungsobjekte noch seltener anzutreffen. Häufiger wurde mit Schafen, Schweinen und Nagern gearbeitet, die allerdings eine andere Embryonalentwicklung haben im Vergleich zum Menschen. Die Literatursuche gestaltete sich äußert schwierig, da wenige Studien zu diesem Thema zu finden sind und die Ergebnisse sich häufig widersprechen (Angeliewa et al. 2004). Es gibt wenige Studien zu den Effekten von GC bei Primaten und wenn, dann befassen sich die meisten mit fetalen und nicht mit den postnatalen Auswirkungen (Hauser et al. 2008).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit die pränatale Knochenentwicklung von der Dexamethasongabe beeinflusst wird. Die Glukokortikoidtherapie ist weit verbreitet und ihre Nebenwirkungen sind hinreichend bekannt. Auch die Wirkung auf den Knochenstoffwechsel wurde intensiv erforscht, allerdings nicht in Bezug auf die pränatale Therapie. Die Verabreichung von Dexamethason zur Vorbeugung des Atemnotsyndroms betrieb man zeitweise sehr intensiv. Mit Zunahme der Forschung auf diesem Gebiet, stellten sich allerdings erhebliche Auswirkungen auf die prä- und postnatale Entwicklung der Kinder heraus. Deswegen ist der Einsatz zur RDS-Prophylaxe heute relativ zurückhaltend.

Zu diesem Zweck wurden 30 männliche Nachkommen der Spezies Callithrix jacchus, deren Mütter während der Schwangerschaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Dexamethasonapplikation erhielten, untersucht. Es erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen: frühe Applikation, späte Applikation und in die Kontrollgruppe. Während der ersten beiden Lebensjahre wurden Körpergröße und Körpergewicht in regelmäßigen Abständen dokumentiert. Im Alter von 2 Jahren wurden die Tiere euthanasiert. Als Untersuchungsobjekte dienten Oberschenkel- und Schienbeinknochen. Es wurden die Kortikalisdicke, die Flächenverhältnisse von Trabekeln, rotem Knochenmark und gelben Fettmark analysiert sowie die Knochendichte ermittelt.

Die Ergebnisse zeigen eine deutlich reduzierte diaphysale Kortikalisdicke beider Knochen in der Gruppe mit früher Dexamethasonapplikation. In der späten Applikationsgruppe dagegen fand man eine stärker ausgeprägte Kortikalis diaphysal, aber eine reduzierte im metaphysalen Bereich. Diese Schwächung kann besonders im Alter Frakturen im Oberschenkelhals begünstigen, vor allem wenn eine hormonell bedingte Osteoporose als Begleiterkrankung hinzukommt.

In beiden Versuchsgruppen kann eine deutliche Schwächung der Knochensubstanz im Bereich der Knie, in diesem Fall die Hauptbelastungszone der Tiere, bedingt durch den Vierfüßlergang, nachgewiesen werden. Der Oberschenkel reagiert auf die Dexamethasonapplikation am sensitivsten.

Des Weiteren sind Veränderungen der Flächenverhältnissen aufgetreten. Bei der frühen Applikation von Dexamethason ist eine deutlich reduzierte Anzahl an rotem Knochenmark zu finden, während bei der späten Applikation eine vermehrte Anzahl

nachweisbar ist. Dies zeigt, dass Dexamethason auch Auswirkungen auf die Blutbildung und das Immunsystem mit sich bringt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dazu anregen, weiter auf diesem Gebiet zu forschen, da die Anzahl an Publikationen noch limitiert ist. Bezüglich der RDS-Prophylaxe ist über eine strengere Indikationsstellung nachzudenken.

Liste der EUPEAH-Versuchstiere

Geburtsdatum Kind	Kind laufende Nr.	Kind DPZ-Nr.	Kind Name	Raum	DEX-Dosis
20.04.2003	1MI	12026	Hadar	A	control
07.06.2003	7MIV	12093	Anorak	B	control
30.12.2003	27MXIV	12376	Pooki	B	5mg/late
08.01.2004	29MXV	12379	Laser	G	5mg/early
12.01.2004	31MXVI	12398	Harro	B	5mg/late
16.01.2004	35MXVIII	12409	Eldar	H	5mg/early
19.01.2004	37MXIX	12412	Enwer	G	5mg/late
23.01.2004	39MXX	12422	Aron	A	5mg/early
28.01.2004	45MXXIII	12427	Kord	B	5mg/late
28.01.2004	47MXXIV	12428	Hassan	B	5mg/late
28.01.2004	49MXXV	12430	Lorien	A	5mg/late
30.05.2004	56MXXVIII	12583	Hero	A	5mg/early
03.05.2004	57MXXIX	12581	Zonko	A	5mg/early
04.05.2004	61MXXXI	12589	Ergo	A	5mg/late
08.05.2004	65MXXXIII	12595	Pfefferkuchen	H	Control
10.05.2004	69MXXXV	12606	Olgy	B	5mg/late
18.07.2004	73MXXXVII	12759	Max	G	Control
25.07.2004	75MXXXVIII	12761	Aurelius	H	Control
31.07.2004	77MXXXIX	12762	Joseph	H	5mg/late
31.07.2004	79MXL	12766	Aragon	H	5mg/late
04.08.2004	83MXLII	12771	Loreo	B	5mg/early
08.08.2004	85MXLIII	12775	Krishna	H	5mg/early
11.08.2004	87MXLIV	12789	Errant	G	Control
23.08.2004	89MXLV	12793	Knecht	B	Control
07.10.2004	91MXLVI	12878	Goofy	A	Control
11.10.2004	95MXLVIII	12884	Zazu	A	Control
12.10.2004	97MXLIX	12888	Allegro	H	Control
13.10.2004	99ML	12889	Orin	B	5mg/early
13.10.2004	100ML	12890	Ovid	B	5mg/early
08.12.2004	103MLII	12969	Wolfgang	H	5mg/early

Übersicht Rohnährstoffe Diätfutter

Rohnährstoffe	**(%)**	**Mineralstoffe**	**(%)**
Trockensubstanz	93,5	Calcium	1,00
Rohproteine (N x 6,25)	26,1	Phosphor	0,70
Rohfett	7,0	Natrium	0,20
Rohfaser	2,5	Magnesium	0,18
Rohasche	6,8	Kalium	0,92
N-freie Extraktstoffe	51,1	**Aminosäuren**	**(%)**
Stärke	23,4	Lysin	1,70
Zucker	20,4	Methionin	0,49
Fettsäuren	**(%)**	Met+Cys	0,88
C 8:0	0,15	Threonin	1,16
C 10:0	0,12	Tryptophan	0,41
C 12:0	0,90	Arginin	1,63
C 14:0	0,36	Histidin	0,66
C 16:0	0,74	Valin	1,38
C 16:1	0,02	Isoleucin	1,27
C 18:0	0,19	Leucin	2,24
C 18:1	1,39	Phenylalanin	1,32
C 18:2	2,22	Phe+Tyr	2,37
C 18:3	0,17	Glycin	0,97
C 20:0	0,01	Glutaminsäure	4,78
Vitamine	**per kg**	Asparginsäure	2,78
Vitamin A	18.000 IE	Prolin	1,71
Vitamin D3	3.000 IE	Alanin	1,18
Vitamin E	120 mg	Serin	1,30
Vitamin C	3.500 mg	**Spurenelemente**	**per kg**
Vitamin K	5 mg	Eisen	154 mg
Thiamin (B1)	14 mg	Mangan	44mg
Riboflavin (B1)	22 mg	Zink	70 mg
Pyridoxin (B6)	17 mg	Kupfer	11 mg
Cobalamin (B12)	100 mükrogramm	Jod	2,1 mg
Nicotinsäure	70 mg	Selen	0,2 mg
Pantothensäure	34 mg	Cobalt	2,0 mg
Folsäure	7 mg		
Biotin	440 mükrogramm		
Cholin-Cl	2.400 mg		
Inositol	100 mg		

Energie	**MJ/kg**
Bruttoenergie (GE)	18,5
Umsetzbare Energie (ME)*	15,6
Verteilung der ME*: 55% aus Kohlenhydraten, 28% aus Proteinen, 17% aus Fett	

Herstellung der Knochenpräparate

Acrylat-Einbettung

Die aufgetauten Femora wurden mit Hilfe einer Kneifzange im Bereich der Diaphyse in ausreichendem Abstand zur Epiphysenfuge durchtrennt und zur weiteren Behandlung in kleinen Glasbehältern aufbewahrt.

1. Fixierung	• 70%iges Ethanol	3 Tage
2. Dehydratation	• 80%iges Ethanol	24 h
	• 90%iges Ethanol	24 h
	• 100%iges Ethanol	24 h
3. Entfettung	• 100%iges Ethanol +Aceton (1:1)	24 h
4. Durchtränkung	• Methylmetacrylat-Gemisch **(MMA-Gemisch)***	3 Tage bei 4°C im Kühl-schrank zur Verhin-derung der vorzeitigen Polymeri-sation
5. Polymerisierung		Temperaturerhöhung auf 32°C im Wasserbad

Der ausgehärtete Acrylat-Block konnte durch ein vorsichtiges Zertrümmern des Glasgefäßes freigelegt werden.

***MMA-Gemisch nach folgender Zusammensetzung:**

- 1000 ml Methylmetacrylat (*Merck-Nr. 800590*),
- 200 ml Di-Butylphtalat (*Merck-Nr. 12487*),
- 29 g Benzoylperoxid (*Merck-Nr. 801641*).

Herstellung der Knochenpräparate

Knochenspezifische Färbung (nach Goldner)

Zur Verwendung kam eine Trichrom-Färbung nach Goldner.

1.Entfernung überschüssiger Acrylate	• Objektträger werden in 2-Methoxyethylacetat gelagert	1 h
2. Präparate gespült	• 100%iger Alkohol	10 Min
3. Färben	• Weigerts Hämatoxilyn	10 Min
	• Bläuen in Leitungswasser	10 Min
	• 2 g Ponceau de Xylidine + 1g Säurefuchsin + 0,4 ml 1%ige Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser	45 Min
	• Spülen in 1%iger Essigsäure	1 Min
	• kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser	
	• 2 g Wolframatophosporsäure + 1 g Orange G + 200 ml destilliertes Wasser	7 Min
	• Spülen mit 1%iger Essigsäure	1 Min
	• 0,4 g Lichtgrün + 0,4 ml Essigsäure + 200 ml destilliertes Wasser	15 Min
	• Auswaschen mit 1%iger Essigsäure	
	• Entwässern in 96%igem und 100%igem Ethanol, dann in Xylol	Jeweils 10 Min

Mit Hilfe eines Tropfens Eukitt ließ sich zum Abschluss ein Deckglas über das Präparat und den Objektträger aufkleben.

Literaturübersicht

- **Angeliewa A, Budde M, Schlachter M, Hoyle NR, Bauss F (2004):** Biochemical bone turnover markers are useful tools to assess changes in bone metabolism in marmosets. J Bone Miner Metab 22, 192-197
- **Bagi CD, Volberg M, Moalli M, Shen V, Olson E, Hanson N, Berryman E, Andresen CJ (2007):** Age-related Changes in Marmoset trabecular and cortical bone and response to Alendronat therapy resemble human bone physiology and architektu. Anat rec 290,1005-1016
- **Barak M, Cohen A, Herschkowitz S (1992):** Total leukocyte and neutrophil count changes associated with antenatal betamethasone administration in premature infants. Acta Paediatr. 81, 760-763
- **Bender HG, Diedrich K, Künzel W:** Klinik der Frauen und Geburtsheilkunde Band 7; 4.Auflage, Urban & Fischer, München 2003
- **Bowden LS, Jones CJ, Ryan SW (1999):** Bone mineralisation in ex-preterm infants aged 8 years ago. Eur J Pediatr 158, 658-661
- **Bramlage C (2005):** Was hat Bluthochdruck mit dem Gewicht zu tun?, http://www.med.uni-goettingen.de/media/global/tag_der_medizin /tdm2005_was_hat_bluthochd_m_gewicht.pdf, 16.10.2011
- **Bramlage CP, Schlumbohm Ch, Pryce ChR, Mirza S, Schnell Ch, Amann K, Amstrong VW, Eitner F, Zapf A, Feldon J (2009):** Prenatal dexamethason exposure does not alter blood pressure and nephron number in the young adult marmoset monkeys. Hypertension 54,1115-1122
- **Cao J (2011):** Effects of obesity on bone metabolism, J Orthop Surg Res., 6:30
- **Cao JJ, Gregoire BR, Gao H (2009):** High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice, Bone 44, 1097-1104
- **Chandolia RK, Luetjens CM, Wistuba J, Yeung ChH, Nieschlag E, Simoni M (2006)**: Changes in endocrine profile and reproductive organs during puberty in the male marmoset monkey (Callithrix jacchus). Reproduction 132, 355-363

- **Committee opinion (2011):** Antenatal corticosteroid therapy for the fetal maturation. Obstet Gynaecol 117:422-424
- **Crowley PA (1995):** Antenatal corticosteroid therapy: a meta analysis of the randomized trials1972- 1994, Am J Obstet Gynecol; 83: 483 494
- **Crowley PA, Chalmers I, Keirse MJNC (1990):** The effect of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. Br J Obstet Gynaecol, Vol. 97: 11,25
- **Crowther C, Doyle L, Haslam RR, Hiller JE, Harding JE, Robinson JS (2007):** Outcomes at 2 years of age after repeat doses of antenatal corticosteroids. N Engl J Med 357, 1179-1189
- **Crowther CA, Haslam RR, Hiller JE, Doyle LW, Robinson JS (2006):** Neonatal respiratory distress syndrome after repeat exposure to antenatal corticosteroids: a randomised controlled trial. Lancet. 367,1913-1919
- **Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005):** Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. Micron 36, 609-616
- **De Vries A, Holmes MC, Heijnis A, Seier JV, Heerden J, Louw J, Wolfe-Coote S, Meaney MJ, Levitt NS, Seckl JR (2007):** Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. J Clin Invest. 117, 1058–1067
- **Der Arzneimittelbrief: Leserbrief:** Betamethason oder Dexamethason zur Beschleunigung der fetalen Lungenreifung, unter http://www.der-arzneimittelbrief.net/Jahrgang1998/Ausgabe09Seite72b.htm, 16.09.2008
- **Fatusić Z (2004):** The role of corticosteroids in the lungs maturation in exspected premature birth. Med Arh 58, 249-252
- **Franko KL, Forhead AJ, Fowden AL (2010):** Differential effects of prenatal stress and glucocorticoid administration on postnatal growth and glucose metabolism in rats. J Endocrinol 204, 319-329
- **Fuenfer MM, Herson VC, Raye JR, Woronick CL, Eisenfeld L, Ingardia CJ, Block CF, Krause PJ (1987):** The effect of betamethasone on neonatal neutrophil chemotaxis. Pediatr Res 22, 150-153
- **Hatz HJ:** Glucocorticoide. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1998

- **Hauser J, Dettling-Artho A, Pilloud S, Maier C, Knapman A, Feldon J, Pryce ChR (2007):** Effects of prenetal dexamethason on postnatal physical, endocrine, and social development in the common marmoset monkey. Endrocrinology 148,1813-1822
- **Hauser J, Knapman A, Zürcher NR, Pilloud S, Maier C, Diaz-Heijtz R, Forssberg H, Dettling A, Feldon J, Pryce Ch (2008):** Effects of prenatal dexamethasone treatment on physical growth, Pituitary-adrenal hormones, and performance of Motor, motivational, and cognitive tasks in juvenile and adolescent Common marmoset monkeys Endocrinologie 149, 6343-6355
- **Hearn JP:** The common marmoset (Callithrix jacchus). In: Hearn JP (ed.): Reproduction in New World primates, new models in medical science. MTP Press Ltd., Lancaster 1983:181-215.
- **Hearn JP, Abbott DH, Chambers PC, Hodges JK, Lunn SF (1978):** Use of the common marmoset, Callithrix jacchus, in reproductive research. Primates Med 10, 40-49.
- **Helmberg A:** Knochenstoffwechsel 2009/2010, unter http://www.helmberg.at/knochen-stoffwechsel.pdf, 30.7.2011
- **Henzen Ch (2003):**Therapie mit Glukokortikoiden: Risiken und Nebenwirkungen Schweiz Med Forum 19, 442-446, unter http://www.medicalforum.ch/pdf/pdf_d/2003/2003-19/2003-19-419.PDF 30.7.2011
- **Hofmann MI, Schradin C, Geissmann Th (2007):** Radiographic Evaluation of neonatel skeletal development in Callimico goeldii reveals closer similarity to Callithrix jacchus than to Sagunius Oedipus. Am J Primatol 69, 420-433
- **Jastrow H:** Elektronenmikroskopischer Atlas von Zellen, Geweben und Organen im Internet, unter http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie /workshop/EM/EMKnochen.html, 25.7.11
- **Jeon YJ, Lee JG, Kim SS, Kim BH, Kim SJ, Kim YK, Kim IJ (2011):** Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- und postmenopausal women, Endocr J. 58, 87-93
- **Jerome CP, Peterson PE (2001):** Nonhuman primate models in skeletal research. Bone 29, 1-6
- **Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO:** Histologie, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin 2002

- **Kavelaars A, van der Pompe G, Bakker JM, van Hasselt PM, Cats B, Visser GH, Heijnen CJ (1999):** Altered immune function in human newborns after prenatal administration of betamethasone: enhanced natural killer cell activity and decreased T cell proliferation in cord blood. Pediatr Res 45, 306-312
- **Korgun ET, Barth S, Demir R, Desoye G, Dohr G, Hahn D, Hahn T (1999):** Das synthetische Glukokortikoid Triamcinolon-Acteonid inhibiert die Expression von Glukosetransportern in Trophoblastenzellen der Plazenta. J Fertil Reprod 9 (Ausgabe für Österreich), 7-16, www.kup.at/kup/pdf/501.pdf/journals/summary/501html 24.09.2011
- **Krebsinformationsdienst:** Untersuchung bei Krebs: MRT, http://www.krebsinformationsdienst.de/untersuchung/kernspintomographie-technik.php, 11.11.2012
- **Kutzler MA, Ruane EK, Coksaygan T, Vincent SE, Nathanielsz PW (2004):** Effect of three courses of maternally administered Dexamethason at 0.7, 0.75 and 0.8 of gestation on prenatal and postnatal growth in sheep. Pediatrics 113, 313-319
- **Lazzarin A, Luerti M, Uberti-Foppa C, Zavattini G, Rossi A, Tornaghi R (1984):** Polymorphnuclear leucocytes function from premature infants after prevention of respiratory distress syndrome with betamethasone and ambroxol. Biol Res Pregnancy Perinatol, 5, 130-134
- **Lee Y, Kim M, Choi K, Kim J, Bae W, Kim S, Sohn Ch (2011):** Relationship between inflammation biomarkers, antioxidant vitamins and bone mineral desity in Patients with metabolic syndrome, Nutr Res Pract. April, 150-156
- **Li LH, Donald JM, Golub MS (2005):** Review on testicular development, structure, function, and regulation in common marmoset Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 74, 450-469
- **Liggins GC (1969):** Premature delivery of fetal lambs infused with glucocorticoids. J. Endocrinol 45, 515-523
- **Liggins GC, Howie RN (1972):** A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment fpr prevention of Respiratory Distress Syndrome in premature infants, Pediatrics 50, 515-525
- **Merker HJ, Sames K, Csato W, Heger W, Neubert D:** The embryology of Callithrix jacchus. In: Merker H-J, Neubert D, Hendrickx AG, (Hrsg.). Non-

Human Primates - Developmental Biology and Toxicology Wissenschaft 217-239 Verlag Ueberreuter, Wien Berlin 1988

- **Mörike KD, Betz E, Mergenthaler W:** Biologie des Menschen, 15. Auflage, Quelle&Meyer Verlag, Wiebelsheim 2001
- **Nehls, V (2010):** Glucocortcoid-induzierte Osteoporose, http://immunendokrinologie.de/html/cortison-osteoporose.html, 11.11.12
- **Newnham JP, Moss TJ (2001):** Antenatal glucocorticoids and growth: single versus multiple doses in animal and human studies. Semin Neonatol 6, 285-292
- **Novy MJ, Walsh SW (1983):** Dexamethasone and estradiol treatment in pregnant rhesus macaques: effects on gestional lenght, maternal plasma hormones, and fetal growth. Am J Obstet Gynecol 145, 920-931
- **Ogueh O, Khastgir G, Studd JW, Jones J, Alaghband-Zadeh J, Johnson MR (1998):** Antenatal corticosteroid therapy and risk of osteoporosis. Br J Obstet Gynaecol 105, 551-555
- **Pfeifer M, Minne HW, Pollähne W (2001):** Glukokortikoid-induzierte Osteoporose: Pathophysiologie und Therapie. J Miner Stoffwechs 8, 44-46, www.kup.at/mineralstoffwechsel 24.08.2011
- **Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R (2010):** Glucocorticoids suppress bone Fromation by attenuating osteoblast differentiationvia the monomeric glucocorticoid receptor. Cell Metabolism 11, 517-531, http://idw-online.de/de/news373274, 19.08.2011
- **Sauerwald A, Rath W (2000):** Lungenreifetherapie mit Glukokortikoiden bei drohender Frühgeburt. Z Geburtsh Neonatal 204, 203-209
- **Schneider H, Husslein P, Schneider KTM:** Die Geburtshilfe, 4. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2011, 539 ff
- **Śliwa E, Tatara MR, Nowakowski H, Pierzynowski SG, Studzinski T (2006):** Effect of maternal dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration on skeletal development during the last three weks of prenatal life in pigs. J Matern Fetal Neonatal Med 19, 489-493
- **Śliwa E, Dobrowolski P, Piersiak T (2010)**: Bone development of suckling piglets after prenatal neonatal und perinatal treatment with Dexamethason. J Anim Physiol Anim Nutr 94, 293-306

- **Smrcek J.; Möller J.; Schultz C., Gembruch U (2001):** Lungenreifeinduktion bei drohender Frühgeburt. Gynäkologe 34,1100-1102
- **Swolin-Eide D.; Dahlgren J.; Nilsson C.; Albertson Wikland K.; Holmäng A.; Ohlsson C (2002):** Affected skeletal growth but normal bone mineralization in rat offspring after prenatal dexamethasone exposure. Journal of Endocrinologie 174, 411-418
- **Tan G, Kang P, Pei F (2012):** Glucocorticoids affect the metabolism of bone marrow stromal cells and lead to osteonecrosis of the femoral head: a review. Chin Med J, 125,134-139
- **Tang JI, Seckl JR, Nyirenda MJ (2011):** Prenatal glucocorticoid overexposure causes permanent increases in renal erythropoietin expression and red blood cell mass in rat offsprings, Endocrinology 152, 2716-2721
- **Toxcenter:** Dexamethason, unter http://www.toxcenter.de/stoff-infos/d/dexamethason.pdf, 24.4.2009 (aus Daunderer-Klinische Toxikologie 152.Erg.-Lfg 8/01)
- **Wang D, Vandermeulen J, Atkinson SA (2007):** Early life factors predict abnormal growth and bone accretion at prepuberty in former premature infants with/without neonatal dexamethasone exposure. Pediatr Res 61, 111-116
- **Ward WE, Donovan SM, Atkinson SA (1998):** Dexamethason-induced abnormalities in growth and bone metabolism in piglets are partially attenuated by growth hormon with no synergistic effect of insulin-like growth factor. Pediatric Research 44, 215-221
- **Wikipedia:** Callithrix jacchus, unter http://de.wikipedia.org/wiki/Callithrix_jacchus, 1.3.2009
- **Wikipedia:** DEXA bzw. qCT, unter http://de.wikipedia.org/wiki/DEXA 11.11.2012
- **Wikipedia:** Dexamethason, unter http://de.wikipedia.org/wiki/Dexamethason, 9.06.2013
- **Wirth A, Pfeiffer A, Steinmetz A, Albus A, Bjarnason-Wehrens B, Cordes C, Franz IW, Hoberg E, Karoff M, Klein G, Willemsen D, Witt T, Völler H (2006):** Das metabolische Syndrom, herzmedizin 23 Nr. 3, Jürgen Hartmann Verlag GMBH, Heßdorf-Klebheim
  http://www.dgpr.de/fileadmin/user_upload/DGPR/Leitlinien/DGPR_MetaBol_Teil_1.pdf

- **Wulf KH, Schmidt-Matthiesen H:** Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Band 7, 3. Auflage; Urban und Schwarzenberg, München 1997, 318 ff
- **Zachman RD, Bauer CR, Boehm J, Korones SB, Rigatto H, Rao AV (1988):** Effect of antenatal dexamethasone on neonatal leukocyte count. J Perinatol. 8, 111-113

Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke und Frau Priv.- Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke für die Überlassung des Themas und die umfassende wissenschaftliche als auch persönliche Betreuung über den gesamten Zeitraum, meinem Lebenspartner Tobias für die mentale Unterstützung und meinen Eltern, die mir diesen beruflichen Werdegang ermöglicht haben.