

**Aus dem Klinisch-Chemischen Zentrallabor  
der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar  
Juniorprofessorin Dr. Rima Obeid**

---

Zusammenhang zwischen B-Vitaminen,  
Homocystein und Methylierungsstatus in Blut und  
Fruchtwasser bei Schwangeren mit normalem  
Schwangerschaftsausgang

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin

Medizinische Fakultät

Universität des Saarlandes

2009

vorgelegt von:

Eva Raabe

geboren am 22. 05. 1984  
in Saarbrücken

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1.1 DIE WICHTIGKEIT VON FOLAT UND VITAMIN B12 WÄHREND DER SCHWANGERSCHAFT UND IM FETALEN STOFFWECHSEL.....	9
1.2 HOMOCYSTEIN UND DESSEN ZUSAMMENHANG MIT B-VITAMINEN UND METHYLIERUNGSMARKERN .....	11
<i>Chemische Struktur von Homocystein und verwandten Verbindungen</i> .....	11
<i>Biochemie des Homocysteins</i> .....	12
<i>Referenzwerte für HCY-Konzentrationen im Blut</i> .....	15
<i>Hyperhomocysteinämie (HHCY) als unabhängiger Risikofaktor</i> .....	16
<i>Beeinflussung des HCY-Metabolismus durch Medikamente und Lifestyle-Faktoren</i> .....	17
1.3 HOMOCYSTEIN IN DER GRAVIDITÄT .....	19
<i>Homocystein in der normalen Schwangerschaft</i> .....	19
<i>HCY und Schwangerschaftskomplikationen</i> .....	19
1.4 S-ADENOSYLMETHIONIN UND S-ADENOSYLHOMOCYSTEIN.....	23
<i>S-Adenosylmethionin (SAM)</i> .....	23
<i>S-Adenosylhomocystein (SAH)</i> .....	24
1.5 FOLAT .....	24
<i>Struktur des Folats</i> .....	24
<i>Folatquellen in der Nahrung</i> .....	25
<i>Stabilität des Folats</i> .....	25
<i>Intestinale Absorption und Bioverfügbarkeit des Folats</i> .....	26
<i>Plasmareferenzbereich, tägliche Aufnahme und Speicherung</i> .....	26
<i>Biochemie des Folats</i> .....	27
<i>Folat und Neuralrohrdefekte</i> .....	28
1.6 VITAMIN B12 .....	28
<i>Struktur des Vitamin B12</i> .....	28
<i>Vitamin B12-Quellen in der Nahrung</i> .....	29
<i>Intestinale Absorption und Bioverfügbarkeit des Vitamin B12</i> .....	29
<i>Plasmareferenzbereich, tägliche Aufnahme und Speicherung</i> .....	31
<i>Biochemie des Vitamin B12</i> .....	31
1.7 VITAMIN B6 .....	32
<i>Struktur des Vitamin B6</i> .....	32
<i>Vitamin B6-Quellen in der Nahrung</i> .....	33
<i>Absorption und Bioverfügbarkeit des Vitamin B6</i> .....	33
<i>Plasmareferenzbereich, tägliche Aufnahme und Speicherung</i> .....	33
<i>Biochemie des Vitamin B6</i> .....	33
1.8 GEBURTSDEFEKTE .....	34
<i>Neuralrohrdefekte</i> .....	34
<i>Down-Syndrom (Trisomie 21)</i> .....	37
<i>Ewards-Syndrom (Trisomie 18)</i> .....	37
<i>Ulrich-Turner-Syndrom (Monosomie X)</i> .....	38
<i>Multipler Sulfatasemangel</i> .....	38
1.9 FRUCHTWASSER .....	38
<b>2. PROBANDEN UND METHODEN</b> .....	<b>41</b>
2.1 PROBANDEN, BLUTENTNAHME UND GEWINNUNG VON FRUCHTWASSER .....	41
2.2 BLUT UND FRUCHTWASSER ANALYTIK.....	42
<i>HCY-, Cys-, und MMA-Bestimmung mit Hilfe von Gaschromatographie-Massen-spektrometrie (GCMS)</i> ..	42
<i>Bestimmung von S-Adenosylhomocystein und S-Adenosylmethionin mit Hilfe von LCMS-MS</i> .....	45
<i>Folatbestimmung</i> .....	47
<i>Vitamin B12 Bestimmung</i> .....	48
<i>Holo-TC-Bestimmung</i> .....	48

<i>Vitamin B6-Bestimmung</i> .....	49
<i>Bestimmung von Albumin und Gesamtprotein</i> .....	49
2.3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEEN, MATERIALIEN UND GERÄTE .....	51
2.4 STATISTIK.....	53
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>54</b>
ÜBERSICHT ÜBER DIE PROBANDINNEN UND FETALE MAßE BEI ANAMNESE .....	54
BLUT- UND FRUCHTWASSERPARAMETER DER NORMALEN SCHWANGERSCHAFTEN .....	55
SERUM- UND PLASMAPARAMETER DER AUFFÄLLIGEN SCHWANGERSCHAFTEN.....	57
FRUCHTWASSERPARAMETER DER AUFFÄLLIGEN SCHWANGERSCHAFTEN,.....	59
SERUM- UND PLASMAPARAMETER IN ABHÄNGIGKEIT VOM GESTATIONSALTER .....	61
FRUCHTWASSERPARAMETER IN ABHÄNGIGKEIT VOM GESTATIONSALTER .....	62
VERGLEICH DER BLUT- MIT DEN FRUCHTWASSERPARAMETERN DER NORMALEN SCHWANGERSCHAFTEN .....	63
VITAMIN B12 UND HOLO-TC IN FRUCHTWASSER UND SERUM .....	64
HOLO-HC UND MMA IN FRUCHTWASSER UND SERUM .....	66
FOLAT UND HCY IN FRUCHTWASSER UND SERUM.....	67
SAH UND SAM IN FRUCHTWASSER UND PLASMA .....	68
KORRELATION DER VITAMIN B12-MARKER IM FRUCHTWASSER.....	69
ZUSAMMENHANG ZWISCHEN FOLAT, HOLO-TC UND HCY IM FRUCHTWASSER.....	70
ABHÄNGIGKEIT DES HOLO-TC IN FRUCHTWASSER UND SERUM VOM SERUM VITAMIN B12 .....	71
ABHÄNGIGKEIT DES FRUCHTWASSER-HCY VOM SERUM-HCY .....	72
ABHÄNGIGKEIT DES FRUCHTWASSER-HCY VOM FRUCHTWASSER-HOLO-TC .....	73
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
HCY UND CYSTATHIONIN IM VERGLEICH BLUT/FRUCHTWASSER.....	74
FOLAT, VITAMIN B12, HOLO-TC UND MMA IM VERGLEICH BLUT/FRUCHTWASSER.....	75
METHYLIERUNGSMARKER IM VERGLEICH BLUT/FRUCHTWASSER.....	77
ROLLE DER PROTEINE IM FRUCHTWASSER.....	78
KORRELATIONEN ZWISCHEN BLUTMARKERN UND FRUCHTWASSERMARKERN .....	79
ABHÄNGIGKEIT DER GETESTEN PARAMETER VOM GESTATIONSALTER .....	79
VITAMIN B-STOFFWECHSEL UND GEBURTSDEFEKTE.....	80
VITAMIN B-STOFFWECHSEL UND NTD .....	80
VITAMIN B-STOFFWECHSEL UND DOWN-SYNDROM.....	81
VITAMIN B-STOFFWECHSEL UND TURNER-SYNDROM UND TRISOMIE 18.....	82
VITAMIN B12-STOFFWECHSEL UND MULTIPLER SULFATASEMANGEL.....	82
VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT FRÜHEREN STUDIEN.....	83
KERNAUSSAUGEN .....	84
EMPFEHLUNG .....	84
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>6. ANLAGEN .....</b>	<b>100</b>
6.1 AUFKLÄRUNG UND EINWILLIGUNG .....	100
6.2 FRAGEBOGEN.....	102
<b>7. POSTER.....</b>	<b>103</b>
<b>8. DANK.....</b>	<b>104</b>
<b>9. LEBENS LAUF .....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abd.	abdominaler
AFP	Alphafetoprotein
ATP	Adenosyltriphosphat
Cys	Cystathionin
CBS	Cystathionin- $\beta$ -Synthase
DHF	Dihydrofolat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
eV	Elektronenvolt
FW	Fruchtwasser
g	Gramm
GCMS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
HCY	Homocystein
HHCY	Hyperhomocysteinämie
HPLC	High performance liquid chromatography
Holo-HC	Holo-Haptocorrin
holo-TC	Holo-Transcobalamin
IF	intrinsic factor
IUGR	Intrauterine Growth Restriction (intrauterine Wachstumsverzögerung)
KI	Konfidenzintervall
MMA	Methylmalonsäure
MS	Methioninsynthase
MSR	Methioninsynthasereduktase
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolat
MTHFD	Methylentetrahydrofolatdehydrogenase
MTHFR	Methylentetrahydrofolatreduktase
NADPH	Nicotinamidadeninnukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NTD	Neural tube defect; Neuralrohrdefekt
OR	Odds Ratio
Pa	Pascale
PLP	Pyridoxal-5'phosphat
PMP	Pyridoxaminphosphat
PNP	Pyridoxinphosphat
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
SAH	S-Adenosylhomocystein

SAM	S-Adenosylmethionin
SPE	Solid phase extraction
SSW	Schwangerschaftswoche
THF	Tetrahydrofolat
W	Watt

## Zusammenfassung

Der Bedarf an B-Vitaminen (Folat, Vitamin B12 und B6) ist während der Schwangerschaft auf Grund einer erhöhten mütterlichen Metabolisierungsrate und fetalen Bedürfnissen außergewöhnlich hoch. Folat, Vitamin B12 und B6 fungieren als Kofaktoren im Einkohlenstoffmetabolismus, der DNA-Synthese und in zahlreichen Methylierungsreaktionen. Diese Stoffwechselwege sind vor allem im sich entwickelnden Embryo aktiv. B-Vitamine sind Teil des Homocystein (HCY)-Metabolismus und sind beteiligt an der Produktion von S-Adenosylmethionin (SAM), dem universalen Methylgruppendonorator in allen Zellen. SAM entsteht aus der Aminosäure Methionin und wird nach Abgabe seiner Methylgruppe an andere zelluläre Komponenten zu S-Adenosylhomocystein (SAH) abgebaut. SAH wird zu HCY hydrolysiert. Diese Reaktion ist reversibel. HCY kann mit der SAH-Hydrolase zu SAH umgewandelt werden.

Hyperhomocysteinämie ist ein Risikofaktor für Schwangerschaftskomplikationen, wie zum Beispiel Präeklampsie und Geburtsdefekte. In diesem Zusammenhang konnten sowohl Veränderungen im mütterlichen Blut als auch im Fruchtwasser nachgewiesen werden. Die Veränderung des Fruchtwasservolumens ist streng abhängig vom Gestationsalter. In der Frühschwangerschaft entsteht das Fruchtwasser hauptsächlich durch aktiven Transport von Flüssigkeit über das Amnion in die Fruchthöhle. Später dient der fetale Urin als Hauptquelle zur Fruchtwasserproduktion. Weitere Fruchtwasserquellen sind Flüssigkeitsverschiebungen zwischen Fruchtwasser und fetalem Blut, Fruchtwassertransport über die nichtkeratinisierte Haut, sowie Sekretion von Lungenflüssigkeit.

Einzelne Studien untersuchten B-Vitamine und HCY im Fruchtwasser. Niedrige Konzentrationen an Vitamin B12 und Folat waren assoziiert mit einem erhöhten Risiko für Geburtsdefekte. Bisher gibt es noch keine Daten über die Konzentration von SAH und SAM im Fruchtwasser. Weiterhin ist noch nicht untersucht, inwiefern der Serum-Spiegel das metabolische Milieu im Fruchtwasser widerspiegeln kann.

Wir untersuchten SAH, SAM, B-Vitamine und HCY im Fruchtwasser und im Blut von Schwangeren mit unauffälliger Schwangerschaft. Wir haben 97 Schwangere mit intakter Schwangerschaft (Median: 37 Jahre, 16,7 SSW), sowie 7 Frauen mit einer Pathologie des ungeborenen Kindes untersucht. Die Patientenrekrutierung dauerte von August 2006 bis September 2007. Die Frauen unterzogen sich an der Universitätsfrauenklinik Homburg/Saar einer routinemäßigen Fruchtwasseruntersuchung/Amnioncentese (AC). Die Probandinnen wurden über den Inhalt der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission nach entsprechendem Antrag genehmigt. Es wurde EDTA-Plasma, Serum und Fruchtwasser im maximalen Abstand von einer Stunde entnommen. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Konzentrationen von HCY, Cystathionin (Cys), Methylmalonsäure (MMA), SAH, SAM, Folat,

Vitamin B12, Vitamin B6, holo-Transcobalamin (holo-TC), Albumin und Gesamtprotein wurden in Blut und Fruchtwasser bestimmt.

Die SAH- und SAM-Konzentrationen in Plasma und Fruchtwasser wurden unter Verwendung von LCMS/MS gemessen. Die Konzentrationen von HCY, Cys und MMA wurden bestimmt unter Verwendung von GCMS. Mithilfe eines Chemilumineszenz-Immunoassays bestimmten wir die Konzentrationen von Vitamin B12 und Folat sowohl im Blut als auch im Fruchtwasser. Die holo-TC-Konzentrationen wurden mithilfe eines Zwei-Schritt-Sandwichassays (AxSYM) ermittelt. Die Konzentrationen von Albumin und Gesamtprotein wurden mit einem Farbttest mit Endpunktmethode gemessen.

Bei Frauen mit höherem Gestationsalter ließen sich im Blut signifikant niedrigere Konzentrationen von Folat zeigen als bei Frauen mit niedrigerem Gestationsalter. Im Fruchtwasser zeigten sich mehrere signifikante Unterschiede abhängig vom Gestationsalter: Bei Frauen mit höherem Gestationsalter zeigten sich für SAM höhere Konzentrationen, für Vitamin B12, Folat und holo-TC jedoch niedrigere Konzentrationen als in der Gruppe der Schwangeren mit niedrigerem Gestationsalter. HCY, Folat, Vitamin B6, Albumin, Gesamtprotein sowie die SAM/SAH-Ratio zeigten im Fruchtwasser signifikant niedrigere Konzentrationen als im Blut. Für Cys, MMA, SAH, SAM, Vitamin B12 und holo-TC ermittelten wir im Fruchtwasser signifikant höhere Konzentrationen als im Blut. Wir fanden eine positive hoch signifikante Korrelation zwischen Blut und Fruchtwasser für HCY ( $r=0,61$ ), Folat ( $r=0,50$ ) und Vitamin B12 ( $r=0,50$ ). Signifikante Korrelationen zeigten sich weiterhin für holo-TC ( $r=0,46$ ), MMA ( $r=0,39$ ), Vitamin B6 ( $r=0,33$ ) und Cys ( $r=0,27$ ). Für SAH und SAM ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen Blut und Fruchtwasser. Die Vitamin B12-Marker Gesamt-Vitamin B12, holoTC und MMA zeigen untereinander Abhängigkeiten: holo-TC im Fruchtwasser ist ein starker positiver Prädiktor für Vitamin B12 im Fruchtwasser ( $r=0,73$ ). Holo-TC im Fruchtwasser und MMA im Fruchtwasser verbindet eine schwache negative aber signifikante Korrelation ( $r= -0,27$ ).

Folgende Kernaussagen der Studie lassen sich zusammenfassend darstellen: Der mütterliche HCY- und B-Vitamin-Status sind die wichtigsten Bestimmungsgrößen der Fruchtwasserparameter. Die Fruchtwasser-Methylierungsmarker (SAH und SAM) hängen nicht mit dem mütterlichen Methylierungsstatus zusammen. Da Folat und Vitamin B12 im Serum signifikante Bestimmungsgrößen des Fruchtwasser-HCY sind, kann erniedrigtes Folat und Vitamin B12 den HCY-Spiegel im Fruchtwasser und demnach auch das Risiko für Geburtsdefekte erhöhen. In den wenigen untersuchten pathologischen Schwangerschaften zeigten sich, verglichen mit der Normalgruppe, starke Abweichungen der Fruchtwasserparameter. Zukünftige Studien sind erforderlich um diese Daten zu bestätigen.

## Summary

### Relation between B-vitamins, homocysteine and methylation status in blood and amniotic fluid of pregnant women with normal pregnancy

The requirement for B-vitamins (folate, vitamin B12 and B6) is exceptionally high during pregnancy due to increased maternal metabolic rate and fetal demands. Folate, vitamin B12 and B6 function as cofactors in one-carbon metabolism, DNA-synthesis and in numerous methylation reactions. These metabolic pathways are particularly active in the developing embryo. B-vitamins participate in homocysteine (Hcy) catabolism and production of S-adenosyl methionine (AdoMet), the universal methyl donor in all living cells. AdoMet is generated from methionine and further converted into S-adenosyl homocysteine (AdoHcy) after donating its methyl group to other cellular components. AdoHcy is hydrolysed into Hcy that can be converted via AdoHcy-hydrolase into AdoHcy.

Hyperhomocysteinaemia is a risk factor for pregnancy complications e.g. preeclampsia and birth defects. In this context changes in blood and amniotic fluid could be showed. The rate of change in amniotic fluid (AF) volume is a strong function of gestational age. In early gestation the active transport of solute by the amnion into the amniotic space is the most likely mechanism for the formation of AF. In the later pregnancy fetal urine is a major source of AF. Other sources of AF during gestation are: the movement of water and solute between AF and fetal blood, water transport across the permeable non-keratinized fetal skin, and secretion of fluids by fetal lungs.

Few studies evaluated concentrations of B-vitamins and total Hcy (tHcy) in AF. Low concentrations of folate and vitamin B12 in AF were related to an increased risk for birth defects. There are no data about concentrations of AdoMet and AdoHcy in AF. Furthermore there aren't any data in how far the blood-concentrations reflect the metabolic milieu in amniotic fluid. We studied the concentrations of B-vitamins, tHcy, AdoMet, and AdoHcy in AF from pregnant women with normal birth outcome.

The study included 97 pregnant women with healthy fetus (median age 37 years; median gestational age 16.7 weeks) and seven pregnant women, whose fetus had a pathology. These women were referred for routine AF testing (amniocentesis) at the department of Gynecology, University Hospital of the Saarland between August of 2006 and September of 2007. Patients were included after written informed consent. The ethic commission allowed the accomplishment of the study. EDTA-plasma, serum and AF samples were collected within one hour from each other. The aliquots were stored at -80°C until analysis. Concentrations of tHcy, cystathionine (cys), methyl malonic acid (MMA), AdoMet, AdoHcy, folate, vitamin B12, vitamin B6, holotranscobalamin (holo-TC), albumin and total protein were measured in both blood and AF.

Concentrations of AdoMet and AdoHcy in plasma and AF were measured by using LC-MS/MS. Concentrations of tHcy, Cys and MMA were measured in serum and AF samples utilizing GCMS. The concentrations of total vitamin B12 and folate were determined in serum and AF utilizing a chemiluminescence immunoassay. Concentrations of holotranscobalamin (holoTC) in serum and AF were measured by a two-step sandwich assay (AxSYM). Concentrations of albumin and total protein were measured by using a colour test with end point.

Women with higher gestational age showed significantly lower concentrations of folate in blood than women with lower gestational age. In AF there were several significant differences depending on gestational age: For women with higher gestational age AdoMet showed higher concentrations, whereas vitamin B12, folate and holo-TC showed lower concentrations than women with lower gestational age. tHcy, folate, vitamin B6, albumin, total protein and the SAM/SAH ratio showed in AF significantly lower concentrations than in blood. For Cys, MMA, SAH, SAM, vitamin B12 and holo-TC we measured significantly higher concentrations in AF than in blood. We found a strong highly significant correlation between blood and AF for tHcy ( $r=0,61$ ), folate ( $r=0,5$ ) and vitamin B12 ( $r=0,5$ ). Holo-TC ( $r=0,46$ ), MMA ( $r=0,39$ ), vitamin B6 ( $r=0,33$ ) and Cys ( $r=0,27$ ) showed significant correlations. For AdoMet and AdoHcy there were no significant correlations between blood and AF. The vitamin B12 marker total vitamin B12, holo-TC and MMA showed connections: holo-TC in AF is a strong significant positive predictor for vitamin B12 in AF ( $r=0,73$ ). Holo-TC in AF and MMA in AF showed a weak but significant negative connection ( $r= -0,27$ ).

Conclusions: Maternal blood tHcy and vitamin status are the most important determinants of AF markers. AF methylation markers (AdoMet and AdoHcy) are not related to mother's methylation status. Because folate and vitamin B12 in serum were significant determinants of AF-tHcy, low folate and vitamin B12 status could increase tHcy thus increasing the risk of birth defects. Strong changes of AF markers were found in few cases with birth defects. In future studies more cases are required to confirm these results.

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Wichtigkeit von Folat und Vitamin B12 während der Schwangerschaft und im fetalen Stoffwechsel

Die Nährstoffversorgung bei schwangeren Frauen spielt bei der Entwicklung des Kindes eine entscheidende Rolle. Folat, Vitamin B12 und Vitamin B6 sind auf Grund ihrer Rolle bei der Zellproliferation und Zellteilung von größter Bedeutung. Insbesondere während der Neurulation, welche während der ersten Wochen nach der Konzeption stattfindet, ist Folat unerlässlich.

Es ist bekannt, dass Folatmangel während der Frühschwangerschaft das Risiko, ein Kind mit Neuralrohrdefekt (NTD) zu bekommen, erhöht. Es gilt als bewiesen, dass die regelmäßige Einnahme von Folat mit einer Dosis von etwa 400 µg pro Tag vor der Konzeption und während der Frühschwangerschaft zur Reduktion der Inzidenz von NTD beiträgt. Diese Erkenntnis führte zur Empfehlung, dass Frauen, welche eine Schwangerschaft planen, täglich  $\geq 400$  µg Folat als Substitution zu sich nehmen sollen (*Finnel et al. 2002; Shaw et al. 1995 und 2002; Williams et al. 2002; Mills et al. 1995; Eskes 1998*).

Im Gegensatz zur Folateinnahme wurde der Vitamin B12-Substitution während der Schwangerschaft weniger Beachtung geschenkt. Dennoch ist es von Bedeutung, denn Vitamin B12 wird benötigt, um 5-Methyl-Tetrahydrofolat in die aktive Form Tetrahydrofolat umzuwandeln. Folatsubstitution bei Frauen mit Vitamin B12-Mangel führt zu Rückstau von inaktivem Folat im Serum und folglich sekundär zu Folatdefizienz trotz normalen Serumfolatspiegeln.

Folat und Vitamin B12 sind zwei Hauptdeterminanten des Methylierungspotenzials der Zelle und bestimmen somit indirekt die Synthese- und den Methylierungsstatus der DNA-Bausteine. Mangel an diesen Vitaminen könnte chromosomale Instabilität und Veränderung in der Genexpression hervorrufen (*James et al. 2002; Zaina et al. 2005; Ingrosso 2003*). Dies ist insbesondere bedeutend in Phasen erhöhter Proliferation – einem Zustand, wie er in der Schwangerschaft besteht. Aufgrund der möglichen schwerwiegenden Konsequenzen einer erniedrigten Konzentration an Vitamin B12 und Folat beim Feten, empfiehlt sich eine möglichst frühzeitige Diagnostik zur Detektion eines eventuellen Vitamin B-Mangels in der Schwangerschaft.

Folat und Vitamin B12 spielen eine wichtige Rolle im Homocystein (HCY) Metabolismus. Vitamin B12 ist Kofaktor der Methioninsynthase (MS) und der Methylmalonyl-CoA Mutase, welche Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA isomerisiert. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass bei Vitamin B12 Mangel Methylmalonyl-CoA zu Methylmalonylsäure (MMA) hydrolysiert wird. Der MMA-Spiegel steigt an, was als sensitiver Marker für Vitamin B12 Mangel gilt (*Hvas et al. 2002, Cox et al. 1962*). Die Bewertung von mütterlichen HCY-Serumkonzentrationen

und MMA-Spiegeln zeigt den Status des B-Vitamin-Stoffwechsels während der Schwangerschaft an. Zahlreiche Studien belegen, dass Hyperhomocysteinämie (HHCY), sowie Folat- und Vitamin B12-Mangel Risikofaktoren für Schwangerschaftskomplikationen und ungünstigen Schwangerschaftsausgang sind. Bei gesunden jungen Frauen steht HHCY meist in Zusammenhang mit zu niedrigem B-Vitamin-Status (*Vollset et al. 2000*).

Eine aktuelle Studie zeigte, dass niedrige mütterliche Vitamin B12-Spiegel mit metabolischen Anomalien assoziiert sind, wahrscheinlich auf Grund des unausgeglichene Methylierungsstatus, also einer verminderten Ratio von S-Adenosylmethionin (SAM), dem wichtigsten Methylgruppendonor, zu S-Adenosylhomocystein (SAH), der demethylierten Form des SAM (*Guerra-Shinohara et al. 2004*). Was jedoch wesentlich bedeutender ist, ist die Tatsache, dass man verminderte SAM- und erhöhte SAH-Spiegel auch bei den Neugeborenen von Frauen mit niedrigem Vitamin B12 Status beobachten konnte (*Guerra-Shinohara et al. 2004*). Die klinischen Folgen solcher Befunde für die weitere Entwicklung des Kindes ist noch nicht untersucht.

Ein signifikanter Zusammenhang wurde berichtet zwischen Folat- und Vitamin B12- Mangel und NTD (*Afman et al. 2001; Ray et al. 2003; Steen et al. 1998; Dawson et al. 1998*). Ferner wurde HHCY gerade bei Müttern von Kindern mit Down Syndrom beobachtet (*Bosco et al. 2003*). Ebenso haben Frauen, die homozygot für die Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR) C677T Mutation sind, welche mit erhöhten HCY-Werten einhergeht, ein etwa dreifach erhöhtes Risiko für Feten mit NTD verglichen mit Müttern ohne die T Substitution (*Ingrosso et al. 2003*). HHCY und B-Vitamin-Mangel sind weiterhin Risikofaktoren für kongenitale Herzerkrankungen, Frühgeburtlichkeit und Totgeburten (*Vollset et al. 2000*). NTD sind die häufigsten Missbildungen, die in Zusammenhang mit mütterlichem Folat-Mangel gebracht werden können (*Finnell et al. 2002; Shaw et al. 1995 und 2002; Williams et al. 2002; Czeizel et al. 1992; Steegers-Theunissen et al. 1994*). Es wurde gezeigt, dass die HCY-Konzentration bei Müttern mit NTD-Kindern höher war als bei Müttern mit gesunden Kindern. Die Folat-Konzentration war bei Kindern mit Spina bifida signifikant niedriger als bei gesunden Kindern. Das Odds Ratio (OR) für einen NTD bei den Kindern lag bei 2,56 (95% KI 1,28-5,13) und bei den Müttern bei 3,05 (95% KI 1,54-6,03), wenn deren Folatstatus im niedrigsten Quartil der Kontrollen lag (*Christensen et al. 1999*).

Neue Strategien zur Primärprävention von NTD schließen die präkonzeptionelle Folat- Substituierung mit ein. Im Jahre 1998 bestimmte die U.S. Food and Drug Administration, dass alle Getreideprodukte mit Folat angereichert werden müssen (140 µg/100 g Getreide), was zu einer Erhöhung der täglichen Folataufnahme von circa 100 µg führte (*Honein et al. 2001*). Daraufhin haben sich der Folatstatus und die HCY-Konzentrationen verbessert und ein deutlicher Rückgang an Fehlbildungen konnte verzeichnet werden (*Williams et al. 2002*).

Frühere Studien zeigten, dass die Vitamin B12-Konzentrationen im Fruchtwasser höher sind als im mütterlichen Blut (*Steen et al. 1998; Dawson et al. 1998*). Niedrige Konzentrationen von Vitamin B12 im Blut oder im Fruchtwasser sind stark assoziiert mit dem Risiko für NTD (*Dawson et al. 1998*). In den Fruchtwasserproben der Neuralrohrdefektschwangerschaften waren auch die Folatkonzentrationen erniedrigt (*Dawson et al. 1998*).

Der Zusammenhang zwischen Folat und Vitamin B12-Markern (wie MMA und Holo-Transcobalamin (holo-TC)) im Fruchtwasser sowie zwischen Blut und Fruchtwasser ist bisher nicht bekannt. Die Methylierungsmarker (SAM und SAH) wurden noch nie im Fruchtwasser getestet. Weiterhin wurde auch der Zusammenhang zwischen diesen Markern und dem Schwangerschaftsausgang noch nicht untersucht. Faktoren, die möglicherweise diese Methylierungsmarker beeinflussen sind ebenso noch nicht untersucht.

## **1.2 Homocystein und dessen Zusammenhang mit B-Vitaminen und Methylierungsmarkern**

### **Chemische Struktur von Homocystein und verwandten Verbindungen**

Homocystein (HCY) ist eine endogene, schwefelhaltige, nichtproteinogene Aminosäure (Abb.1.2.1). HCY wird nicht über die Nahrung aufgenommen. Es kommt ausschließlich als Zwischenprodukt im Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin vor (*Miner et al. 1997*). Methionin muss dem Körper mit tierischem Eiweiß zugeführt werden und spielt beim Menschen als Methylgruppendonator eine unentbehrliche Rolle. HCY ist ein kleines Molekül (Molekulargewicht MG=135 Dalton), dessen Wasserlöslichkeit sehr gering ist. Cystathionin (Cys) ist ein Nebenprodukt im Metabolismus von HCY. Es entsteht in einer Vitamin B6-abhängigen Reaktion durch Kondensation von Serin an HCY.

Abb.1.2.1: Die chemische Struktur von Homocystein, Methionin und Cystathionin

Homocystein	$\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{) COOH}$
Methionin	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{) COOH}$
Cystathionin	$\text{HOOC-CH(NH}_2\text{)CH-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{) COOH}$

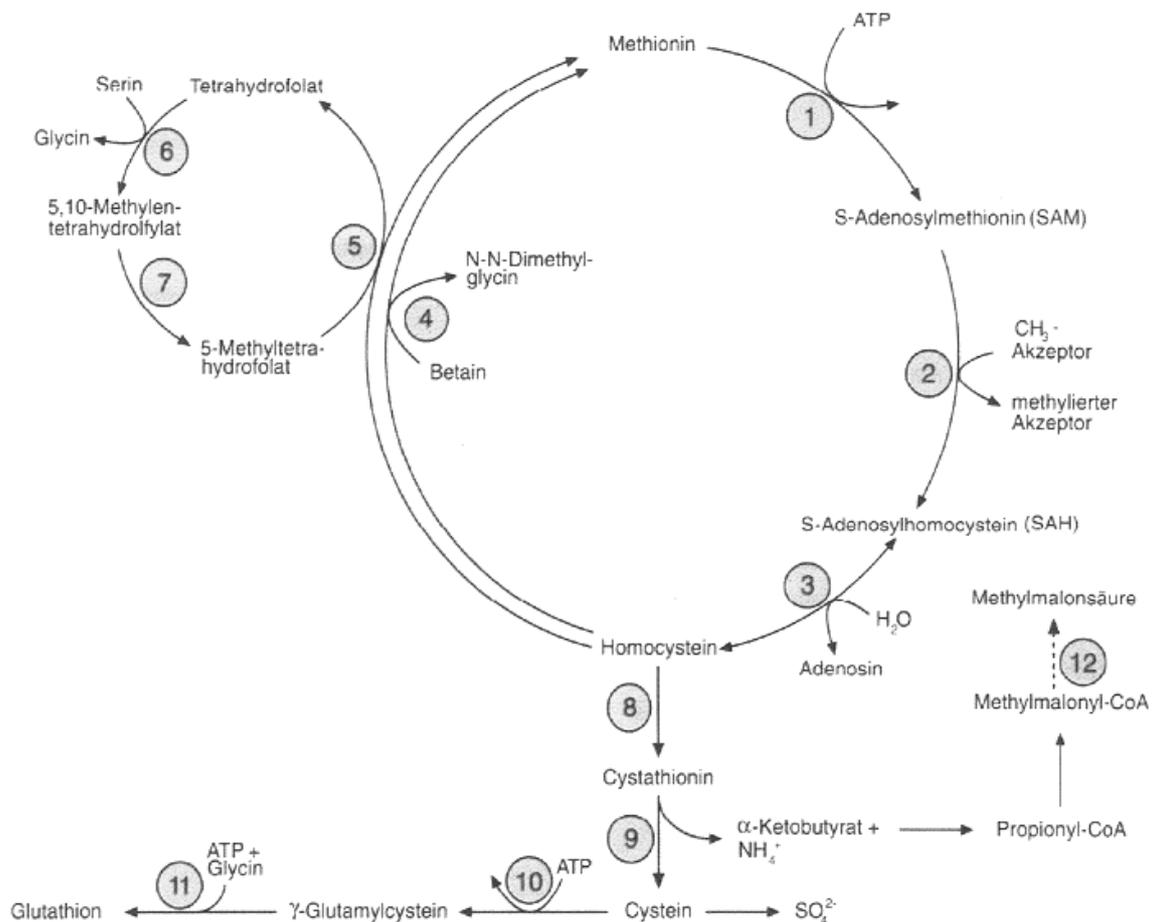
### **Biochemie des Homocysteins**

Die physiologische Bedeutung von HCY erklärt sich durch seine zentrale Position in drei miteinander verbundenen Stoffwechselwegen. Methionin ist die einzig bekannte HCY-Quelle beim Menschen. Methionin, das hauptsächlich durch Nahrungsproteine bereitgestellt wird, wird in Anwesenheit von Adenosyltriphosphat (ATP) zu S-Adenosylmethionin (SAM) aktiviert. SAM ist ein Methylgruppendonator bei vielen Reaktionen der Zelle. Dabei wird SAM zu S-Adosylhomocystein (SAH) umgewandelt, welches wiederum zu HCY hydrolysiert wird (s. Abb. 1.2.2 Nr. 1,2,3). Dies ist der einzige Stoffwechselweg zur Produktion von HCY im Körper. HCY wird über Cystathionin verstoffwechselt zu Cystein (Nr. 8,9), remethyliert zu Methionin (Nr. 4,5) oder über die SAH-Hydrolase zu SAH umgewandelt (Nr.3). Besonders wenn die HCY-Konzentration erhöht ist, wird HCY verstärkt über die SAH-Hydrolase metabolisiert.

Der Abbau von HCY über den Remethylierungsweg wird von dem Enzym Methioninsynthase (MS) (Nr.5) katalysiert. Für diese Reaktion wird Methylcobalamin (Vitamin B12) als Kofaktor benötigt. Eine durch 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) bereitgestellte Methylgruppe wird auf die MS übertragen, welche diese dann unter Bildung von Methionin auf HCY überträgt.

Der HCY-Abbau über den Transsulfurationsweg wird katalysiert über das Enzym Cystathionin- $\beta$ -Synthase (CBS, Nr.8), welches Vitamin B6 (Pyridoxalphosphat) als Kofaktor benötigt. Das entstandene Cystathionin wird umgewandelt in Cystein und  $\alpha$ -Ketobutyrat mit Hilfe der Cystathioninase (Nr. 9), einem weiteren Vitamin B6-abhängigem Enzym. Cystein kann weiterhin zu Glutathion der Hauptdeterminanten im antioxidativen Stoffwechsel des Menschen umgewandelt werden. Weiterhin spielt HCY zusammen mit 5-MTHF eine Schlüsselrolle im Ein-Kohlenstoff-Stoffwechsel. Sowohl HCY als auch 5-MTHF sind Substrate für die Produktion von Tetrahydrofolat (THF) und Methionin. THF ist die aktive Form des Folats, welche für die Synthese von Purinen wichtig ist, die als DNA-Bausteine benötigt werden (*Stanger 2004; Carmel et al. 2001*).

Abb.1.2.2: Homocysteinemetabolismus und dazugehörige Enzyme (Resch et al. 1996)



1 : S-Adenosyl-L- Methionin Synthetase = Methionin-Adenosyltransferase	7 : $N^5,N^{10}$ -Methylen-Tetrahydrofolat Reduktase
2 : Transmethylierungsreaktionen	8 : Cystathionin $\beta$ -Synthetase, $B_6$ abhängig
3 : S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase	9 : $\gamma$ -Cystationinase = Cystathionin $\gamma$ -Lyase, $B_6$ abhängig
4 : Betain-Homocystein Methyltransferase	10 : Glutamyl Cystein Synthetase
5 : $N^5$ -Methyltetrahydrofolat-Homocystein Methyltransferase = Methionin Synthetase, $B_{12}$ abhängig	11 : Glutathion Synthetase
6 : Serin Oxidase, $B_6$ abhängig	12 : L-Methylmalonyl-CoA Mutase

Der HCY-Abbau über den Transsulfurationsweg wird vermehrt bei Methioninüberschuss aktiviert, zum Beispiel nach dem Essen. Auf der anderen Seite wird in Situationen mit relativem Mangel an Methionin in Zellen, wie sie beim Fasten vorherrschen, HCY eher zu Methionin remethyliert. Ein suffizienter HCY-Metabolismus hängt ab von der Verfügbarkeit von Vitamin  $B_6$ ,  $B_{12}$  und Folat (Carmel et al. 2001; Jacobsen 1998; Temple et al. 2000), sowie von einigen Schlüsselenzymen (Miner et al. 1997).

Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der HCY-Metabolismus streng reguliert: SAM verstärkt als allosterischer Aktivator wohl den Abbau über den Transsulfurationsweg und hemmt die Transmethylierung (*Selhub et al. 1992*). Im Falle von Folatmangel ist 5-MTHF nicht ausreichend verfügbar, was in einer Erhöhung des HCY-Spiegels resultiert. Im Gegensatz dazu kann bei Überschuss an 5-MTHF die Produktion von SAM gesteigert sein und das entstandene SAM kann die Produktion von 5-MTHF aus 5,10-Methyltetrahydrofolat über die Blockade des Enzyms Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) inhibieren, um die Produktion von 5-MTHF herunter zu regulieren (*Carmel et al. 2001*).

SAM ist der Hauptmethylgruppendonator in vielen biochemischen Reaktionen des Menschen: in der Synthese von Phospholipiden, Nukleinsäuren, Aminosäuren, Neurotransmittern etc. Die Konzentrationen von SAM und SAH sind streng reguliert. Steigt die SAH/SAM Ratio an, wird die DNA-Methylierung inhibiert, was die Genexpression beeinträchtigt (*Medina et al. 2001*). Die Methioninsynthasereduktase (MSR) ist ein weiteres wichtiges Enzym, welches für die Reduktionsreaktivierung von Methylcobalamin verantwortlich ist und dafür sorgt, dass die aktive Form des Koenzyms Vitamin B12 vorliegt (*Gaughan et al. 2001*).

Nur kleine Mengen Homocystein zirkulieren im Plasma als freie Thiol-Form. Der Hauptanteil liegt als Disulfidkomplexe vor, bei welchen HCY an SH-Gruppen bindet. Diese werden von schwefelhaltigen Aminosäuren, die Teil von Plasmaproteinen sind (v.a. Albumin) bereitgestellt (*Ueland et al. 1996*). Es bilden sich sowohl gemischte Disulfide wie z.B. mit Cystein, als auch symmetrische Disulfide mit Homocystein (Homocystin) (*Ueland et al. 1996*). Freies HCY ist instabil und bei neutralem pH sehr schlecht löslich (*Guttormsen et al. 1993*). Daher liegen in vivo die Konzentrationen des freien HCY extrem niedrig (nur 1-2% der Konzentration des Gesamt-HCY,  $\approx$  circa 0,1-0,2  $\mu\text{mol/l}$  bei Normalwerten von  $< 12 \mu\text{mol/l}$ ) (*Refsum et al. 1998*). Für die quantitative Messung behandelt man HCY mit bestimmten Reduktionsmitteln. Dies bewirkt, dass HCY aus den Disulfiden gelöst und die Quantifizierung möglich wird. Die nachfolgende Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der Hauptformen des HCY in vivo.

**Bestandteile des Plasmahomocysteins**

1. Reduziert:		
Homocystein (frei, nicht proteingebunden)	1-2%	$\text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ $\text{NH}_3^+$
2. Oxidiert:		
Homo-Disulfide (Homocystin)	5-10%	$\text{NH}_3^+$ $\text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ $\text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ $\text{NH}_3^+$
Gemischte Disulfide		
Proteingebundenes Homocystein	80-90%	$\text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-Albumin}$ $\text{NH}_3^+$
Cystein-Homocystein	5-10%	$\text{NH}_3^+$ $\text{OOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ $\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ $\text{NH}_3^+$

**Referenzwerte für HCY-Konzentrationen im Blut**

Vor circa 15 Jahren wurde ein HCY-Wert von 16  $\mu\text{mol/l}$  als physiologische Obergrenze angegeben (Malinow 1994). Dieser Grenzwert wurde jedoch stetig nach unten korrigiert, sodass heute die Obergrenze bei 10-12  $\mu\text{mol/l}$  liegt. Werte zwischen 16-30  $\mu\text{mol/l}$  werden als milde, zwischen 31-100  $\mu\text{mol/l}$  als moderate und Werte über 100  $\mu\text{mol/l}$  als schwere Hyperhomocysteinämie (HHCY) bezeichnet (Jacobsen 1998). Die HCY-Werte sind alters- und geschlechtsspezifisch verteilt. Im Alter nimmt die Nierenleistung physiologischerweise ab, was in erhöhten HCY-Konzentrationen resultiert (Herrmann et al. 1999 und 2000; Norlund et al. 1998). Bei Neugeborenen liegt der HCY-Wert in der Nabelschnur zwischen 3,49-4,49  $\mu\text{mol/l}$  (Malinow et al. 1998). Bei Kindern bis 12 Jahren wurden bei einem Durchschnittsalter von 8,6 Jahren Werte von 3,5-9,8  $\mu\text{mol/l}$  gemessen (Vilaseca et al. 1997). Nach der Pubertät steigen die Werte stark an, wobei Männer stets höhere Werte haben als Frauen (bei 40-45jährigen etwa 2  $\mu\text{mol/l}$  Differenz bei Gesunden) (Fukagawa et al. 2000). Während einer unkomplizierten Schwangerschaft nimmt HCY im Plasma um bis zu 20-60% ab (Walker et al. 1999; Kang et al. 1986; Andersson et al. 1992; Murphy et al. 2002). Nach der Geburt steigt

HCY wieder an und erreicht schnell wieder Ausgangswerte (*Infante-Rivard et al. 2002*). In der Postmenopause steigen die HCY-Werte an (*Hak et al. 2000*).

### **Hyperhomocysteinämie (HHCY) als unabhängiger Risikofaktor**

Die HHCY gilt seit einigen Jahren als unabhängiger Risikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen und venöse Thrombosen (*Herrmann et al. 1999; Welch et al. 1998; de Bree et al. 2005*). Zunehmend wendet sich die Forschung in diesem Bereich auch geburtshilflichen Krankheitsbildern wie angeborenen Fehlbildungen, habituellen Aborten, Präeklampsie, HELLP-Syndrom und Plazentainsuffizienz zu.

### **Genetisch bedingte HHCY**

Man unterscheidet zwischen den autosomal-rezessiv vererbten schweren Formen der HHCY und der milden HHCY, die durch heterozygote Formen sowie leichtere Defekte an Cystathion- $\beta$ -Synthase (CBS), N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-MTHF-Reduktase (MTHFR) oder Methioninsynthase (MS) hervorgerufen werden kann (*Mudd et al. 1995*). Die schwere Form der HHCY ist bedingt durch einen autosomal-rezessiv vererbten Mangel an CBS oder MTHFR. Für die homozygote Form des Mangels an CBS wird eine Inzidenz von 1:200.000-1:344.000 angegeben (*Stanger 2004*). Klinisch stehen hier mentale Retardierung, Skelettdeformitäten, eine sehr früh auftretende Atherosklerose sowie damit unmittelbar zusammenhängend arterielle und venöse Thrombosen bereits im 2. und 3. Lebensjahrzehnt im Vordergrund (*Carson et al. 1962; Rees et al. 1993*).

Heterozygote weisen einen zwei- bis vierfach höheren Plasma-HCY-Spiegel auf als Gesunde. Während der Mangel an CBS bei einem Vorliegen einer Restfunktion des Enzyms mit hochdosiertem Vitamin B<sub>6</sub> in Kombination mit Folat behandelbar ist, existiert für N<sub>5</sub>,N<sub>10</sub>-MTHFR-Mangel keine Therapie, so dass hier die Prognose deutlich schlechter ist (*Mudd et al. 1972*). Die MTHFR kann verschiedene Punktmutationen aufweisen, die mit einer Restaktivität des Enzyms einhergehen.

Als wichtigster Faktor für eine milde HHCY ist die thermolabile Variante der MTHFR zu nennen. Sie resultiert aus einer Punktmutation (C677T) in der kodierenden Region für die Bindungsstelle für MTHF im MTHFR-Molekül. Als Aminosäure wird Valin anstelle von Alanin eingebaut. Als Folge der Mutation hat das TT-Enzym bei 37°C eine verminderte spezifische Aktivität mit geringerer katalytischer Wirkung als beim CC-Genotyp. Die Prävalenz für das Auftreten der homozygoten Form der thermolabilen MTHFR liegt zwischen 5-18%, abhängig von Population und Ethnizität (*Brattström et al. 1998; Molloy et al 1997*). Eine milde HHCY manifestiert sich hier jedoch nur bei Folatmangel oder niedrig normalen Folatwerten. Bei hochnormalen bzw. bei erhöhten Folatkonzentrationen manifestiert sich die HHCY nicht, weil erhöhte Folatwerte das TT-Enzym stabilisieren (*Harmon et al. 1996*).

### HHCY auf Grund von Vitaminmangel

Mangel an den im HCY-Stoffwechsel als Koenzyme beteiligten Vitaminen wie Folat, Vitamin B6 oder Vitamin B12 führt zu HHCY. Eine Substitution kann zur Normalisierung der Spiegel führen (*Brattström et al. 1988; Kang et al. 1987; Stabler et al. 1993*)

### Erkrankungen, die einen erhöhten HCY-Spiegel bedingen

Erkrankungen wie Niereninsuffizienz, Hypothyreose, perniziöse Anämie und einige maligne Tumoren sind mit einem erhöhten HCY-Spiegel assoziiert (*Robinson et al. 1996; Lien et al. 2000; Guttormsen et al. 1998*).

### **Beeinflussung des HCY-Metabolismus durch Medikamente und Lifestyle-Faktoren**

Es gibt eine ganze Reihe von Wirkstoffen, die den HCY-Stoffwechsel beeinflussen. Entweder als direkte oder indirekte Antagonisten von Kofaktoren und Enzymaktivitäten oder durch Disulfidaustauschreaktionen, Resorptionsstörungen oder Enzyminduktion. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Beeinflussung des HCY-Spiegels durch gängige Medikamente und Lebensgewohnheiten.

**Beeinflussung durch Medikamente**

<b>Medikament</b>	<b>↑↓</b>	<b>Mechanismus</b>	<b>Referenz</b>
Theophyllin, Koffeinkonsum	↑	Vitamin B6 Antagonismus	Ubbink et al. 1996 Grubben et al. 2000
Lachgas	↑	Inaktivierung der MS	Danishpajooch et al. 2001
Methotrexat	↑	Kompetitive Inhibition von Folat	Guttormsen et al. 1998
Fibrate	↑	PPAR-Aktivierung, abnehmende Nierenleistung	Jonkers et al. 1999
Niacin	↑	Vitamin B6-Antagonist	Garg et al. 1999
L-Dopa	↑	Substrat für SAM-abhängige Methylierung	Zoccolella et al. 2007
Antiepileptika	↑	Erniedrigung von Folat und Vitamin B6	Attilakos et al. 2006
N-Acetylcystein	↓	Spaltung von Disulfidbrücken	Scholze et al. 2004
Protonenpumpenhemmer	↑	Erhöhung des Magen-pH führt zu Mangel an Vitamin B12	Schenk et al. 1996
Östrogen und Progesteron	↓	Hormonwirkung	Mijatovic et al. 1998
Orale Kontrazeptiva	↑	Folatabnahme	Durand et al. 2001
Tamoxifen	↓	Partieller Agonist am Östrogenrezeptor	Cattaneo 2001
Metformin	↑	Hemmung der Sekretion von Intrinsic Factor	Carlsen 1997

**Beeinflussung durch Lifestyle-Faktoren**

Rauchen	↑	Interferenz mit Cobalamin, Pyridoxin und Folat; Radikalbildung	Piyathilake et al. 1994
Alkoholkonsum	↑	Generelle Malnutrition, Blockade der Methylierungsreaktionen	Schneede et al. 2000; Trimble et al. 1993
Vegetarische Diät	↑	Vitamin B12 Mangel	Herrmann et al. 2001

## 1.3 Homocystein in der Gravidität

### Homocystein in der normalen Schwangerschaft

Während einer unkomplizierten Schwangerschaft nimmt HCY im Plasma um bis zu 20-60% ab, besonders im 1. Trimenon. Diese Veränderung ist bereits ab der 7. Schwangerschaftswoche messbar. Das Minimum wird im 2. Trimenon erreicht, während die Werte im dritten Trimenon wieder auf Werte wie die des ersten Drittels leicht ansteigen. Der mittlere HCY-Spiegel (in  $\mu\text{mol/l}$ ) war 5.6 (95% KI 3.9-7.3) zwischen 8.-16. SSW, 4.3 (95% KI 3.5-5.3) zwischen 20.-28. SSW, 5.5 (95% KI 3.3-7.5) zwischen 36.-42. SSW, sowie 7.9 (95% KI 6.2-9.6) in der nichtschwangeren Kontrollgruppe (*Walker et al. 1999*). HCY war in allen 3 Trimestern signifikant niedriger als bei den nichtschwangeren Kontrollen ( $p < 0,001$ ). Die HCY-Spiegel korrelierten mit den Albumin-Spiegeln, welche während der Schwangerschaft ebenfalls fallen. Die Substitution von Folat führte ebenfalls zu erniedrigten HCY-Spiegeln (*Walker et al. 1999*). Diese Veränderungen des mütterlichen Plasma-HCY wurden mit der mütterlichen Proteinaufnahme, dem Albuminmangel, der fetalen Utilisation und besonders mit der Hämö-dilution durch Flüssigkeitsverschiebungen erklärt. Das mütterliche Plasmavolumen beginnt jedoch während einer normalen Schwangerschaft erst ab der 10. SSW zuzunehmen, die beobachtete Abnahme schon in der 7. SSW kann daher nicht mit dem Hämö-dilutionseffekt erklärt werden (*Murphy et al. 2002*).

Tab.1.3.1: Veränderung des HCY-Spiegels während einer normalen Schwangerschaft (*Walker et al. 1999*)

	Schwangere Frauen (SSW)			Nichtschwangere Frauen
	8-16	20-28	36-42	
<b>HCY- Mittelwert</b> [ $\mu\text{mol/l}$ ]	5,6	4,3	5,5	7,9
<b>95%-KI</b>	3,9-7,3	3,5-5,3	3,3-7,5	6,2-9,6

### HCY und Schwangerschaftskomplikationen

Eine Reihe von Schwangerschaftspathologien wurden mit HHCY in Zusammenhang gebracht. HHCY gilt seit einigen Jahren als Risikofaktor für die unterschiedlichsten Schwangerschaftskomplikationen (*Ray et al. 1999*) wie Präeklampsie (*Herrmann et al. 2005; Mignini et al. 2005*), Plazentainsuffizienz (*El-Khairi et al. 2003*), HELLP-Syndrom (*Herrmann et al. 2004*) und Abruption placenta (*Del Bianco et al. 2004*). Es konnte auch ein Zusammenhang zum Auftreten von habituellen Aborten (*Nelen et al. 2000*) und dem Auftreten von Fehl-

bildungen, wie vor allem NTD (*Steegers-Theunissen et al. 1994*), hergestellt werden. Sowohl HHCY als auch eine Homozygotie für die thermolabile Variante der MTHFR und ein Folatmangel wurden als Risikofaktoren für plazentaassoziierte Erkrankungen wie Präeklampsie, Abruptio placentae oder Aborte bestätigt (*Ray et al. 1999*).

In der Hordaland-Homocystein-Studie (*Vollset et al. 2000*) wurden Plasma-HCY-Werte von 5883 Frauen zwischen 40-42 Jahren mit dem Verlauf und den Komplikationen der insgesamt 14492 Schwangerschaften dieser Frauen verglichen. Vergleich man die HCY-Spiegel der Frauen im oberen mit dem unteren Drittel, zeigten Frauen mit erhöhten Werten ein deutlich erhöhtes Risiko für Präeklampsie (um 32%), Frühgeburtlichkeit (um 38%) und niedriges Geburtsgewicht (um 101%). Auch das Auftreten von Totgeburten wies eine Korrelation mit dem HCY-Spiegel auf. Sowohl das Auftreten von NTD als auch von Klumpfüßen war signifikant mit erhöhtem HCY assoziiert. Ein Mangel an Folat und Vitamin B12 ist ebenso mit dem vermehrten Auftreten von NTD assoziiert (*Ray et al. 2003; Afman et al. 2001; Eskes 1998*). Bei einer Studie an brasilianischen Schwangeren und ihren Neugeborenen konnte gezeigt werden, dass die HCY-Konzentrationen der Neugeborenen höher waren, deren Mütter einen niedrigen Cobalaminstatus im Blut aufwiesen (*Guerra-Shinohara et al. 2004*). Erniedrigte Vitamin B12-Konzentrationen führten zu einer Erhöhung von SAH und einer Erniedrigung von SAM bei den Müttern. Die SAM/SAH Ratio war sowohl bei den Vitamin-defizienten Müttern als auch bei deren Neugeborenen signifikant erniedrigt (*Guerra-Shinohara et al. 2004*).

#### Wiederholte bzw. habituelle Aborte

Als Abort bezeichnet man den spontanen Verlust der Schwangerschaft vor Eintreten der Lebensfähigkeit des Kindes. Es erfolgt eine Unterscheidung in sporadische Aborte und ein habituelles Abortgeschehen mit mindestens 3 aufeinander folgenden Aborten. Außerdem werden sie zeitlich in Früh- (<14. SSW) und Spätaborte (>14.SSW) unterteilt. Die Rate an Aborten unter allen klinisch festgestellten Schwangerschaften liegt zwischen 11% und 15% (*Marzusch et al. 1996*).

Eine bis zur Schwangerschaft unentdeckte Thrombophilie konnte bei betroffenen Frauen zunehmend erkannt und als mögliche Ursache für habituelle Aborte identifiziert werden. Wouters berichtete als erster über den Zusammenhang zwischen HHCY und habituellen Aborten. 14% der Patientinnen mit habitueller Abortneigung, welche noch kein Kind geboren haben, litten an HHCY, verglichen mit 33% der Patientinnen, welche bereits Kinder geboren haben (*Wouters et al. 1993*).

Es wurde die Hypothese erhoben, dass ein frühzeitiger Schaden der Dezidualgefäße die Implantation des Embryos stört. Diese Embryotoxizität des HCY konnte bei Ratten (*Vanaerts et al. 1994*) und Hühnern (*Rosenquist et al. 1996*) bestätigt werden. In der letztgenannten

Arbeit von Rosenquist wurde gezeigt, dass bei einem HCY-Wert von  $15\mu\text{mol/l}$  75% der Hühnerembryonen starben, während die Überlebenden Anomalien, wie Ventrikelseptumdefekte und Neuralrohrdefekte aufwiesen.

Zu Beginn der Schwangerschaft konnte in der Amnionflüssigkeit eine Umwandlung von HCY in Methionin mit Hilfe der MTHFR erreicht werden. Bei Patientinnen mit MTHFR-Mutation funktioniert diese Umwandlung weniger gut, was zu einem Anstieg von HCY im Fruchtwasser und damit zu Aborten führen kann (*Steegers-Theunissen et al. 1997*).

### Präeklampsie

Präeklampsie ist eine Schwangerschaftserkrankung mit Hypertonie und Proteinurie als Leitsymptome. Die Präeklampsie ist eine systemische Erkrankung der Schwangerschaft, die zu einer Beeinträchtigung der Organfunktionen der Mutter führen kann. Lässt sich die Hypertonie nicht mehr medikamentös beherrschen oder weist ein Anstieg der Retentionswerte auf ein drohendes Nierenversagen hin, muss die Indikation zur Terminierung der Gravidität gestellt werden (*Stauber 2007*).

Eine HHCY gilt als unabhängiger Risikofaktor für eine Atherosklerose. Die Dysfunktion des Endothels durch direkte zytotoxische Effekte und oxidativen Stress wird durch HHCY unterstützt. Palan und Kharb konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass es bei Präeklampsie Hinweise auf solche oder ähnliche Einflüsse gibt (*Palan et al. 2001; Kharb 2000*). Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit des Endothels gegenüber vasokonstriktorisches Einflüssen (*AbdAlla et al. 2001*). In der Niere führt die endotheliale Dysfunktion zur Störung der glomerulären Filtration. Es kommt zur Retention der harnpflichtigen Stoffe Harnsäure, Harnstoff und Kreatinin.

Das HELLP-Syndrom stellt eine schwere Verlaufsform der Präeklampsie dar. HELLP steht für den typischen Laborbefund: Hämolyse (H), erhöhte Leberenzyme (EL) und Thrombozytopenie (LP= low platelets). Klinisch imponieren hier der Oberbauchschmerz sowie schweres allgemeines Krankheitsgefühl mit Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Die grundlegende Ätiologie der Präeklampsie ist weiterhin unbekannt. Man geht von einer gestörten Trophoblastinvasion der uterinen Spiralarterien aus (*Brosens et al. 1972*).

Dekker beschrieb erstmalig HHCY als Risikofaktor für Präeklampsie. In einem Kollektiv von 79 Patientinnen mit Zustand nach schwerer Präeklampsie zeigte sich bei 14 von ihnen (17,7%) eine HHCY (*Dekker et al. 1995*). Weiterhin konnte eine auffallende Korrelation zwischen dem HCY-Spiegel und der Konzentration des zellulären Fibronektins im Plasma als Zeichen der endothelialen Dysfunktion bei Patientinnen mit Präeklampsie festgestellt werden (*Powers et al. 1998*).

In einer anderen Studie wurde eine große Patientinnengruppe (n=345) mit stattgehabter schwerer Präeklampsie mit einer Gruppe normal verlaufender Schwangerschaften verglichen

und auf Thrombophilien untersucht. Eine HHCY fand sich bei 12,1% der Frauen mit Präeklampsie im Vergleich zu 4,5% in der Kontrollgruppe (*van Pampus et al. 1999*). Postpartal abgenommene Proben bei präeklampsischen und eklampsischen afrikanischen Frauen wiesen ebenfalls im Vergleich zu normalen Entbindungen erhöhte HCY-Spiegel auf. Für Nulliparae zeigte sich hier ein gesteigertes Risiko, mit erhöhtem HCY-Spiegel an Präeklampsie zu erkranken (*Rajkovic et al. 1999*).

Eine bei Präeklampsie auftretende HHCY ist assoziiert mit der homozygoten Form der C677T Mutation des MTHFR-Gens sowie niedrigen Vitaminspiegeln (*van der Molen et al. 2000; Lachmeijer et al. 2001*). Mit diesen Erkenntnissen lassen sich allerdings nicht alle Fälle von HHCY bei Präeklampsie erklären.

### Retroplazentäres Hämatom

Goddijn-Wessel konnte in einer Studie einen signifikanten Unterschied im HCY-Spiegel bei Patientinnen mit retroplazentärem Hämatom im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufzeigen. 31% der Patientinnen mit retroplazentärem Hämatom wiesen nach Methionin-Belastungstest eine HHCY auf, wobei es in der Kontrollgruppe nur 9% waren (*Goddijn-Wessel et al. 1996*). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass drei Monate nach der Schwangerschaft bei 26% der Patientinnen mit retroplazentärem Hämatom eine HHCY nachweisbar war (*de Vries et al. 1997*).

### Intrauterine Wachstumsverzögerung (IUGR= intrauterine growth restriction)

Bei Plazentainsuffizienz besteht aufgrund einer inadäquaten Trophoblastinvasion eine verminderte plazentare Perfusion, die zu einer fetalen Unterversorgung und in der Folge unter Umständen zu einer fetalen intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) führt. Eine IUGR liegt vor, wenn der Fetus sein genetisch angelegtes Wachstumspotenzial nicht ausschöpfen kann. Von der hier angesprochenen IUGR aufgrund uteroplazentarer Dysfunktion, die sich meist nach der 24. SSW manifestiert, muss man IUGR aufgrund anderer Ursachen (Chromosomenanomalien, Stoffwechseldefekte, mütterliche Faktoren) abgrenzen. Die meisten Feten mit IUGR werden als so genannte small for gestational age (SGA) Kinder geboren, deren Geburtsgewicht unter der 10%-Perzentile liegt (*Sitzmann 2006*). In der Hordalandstudie wurde bei Frauen im obersten HCY-Quantil (10,7-78  $\mu\text{mol/l}$ ) ein 1,21fach erhöhtes Risiko für eine kindliche Wachstumsretardierung beobachtet ( $p=0,01$ ) verglichen mit dem niedrigsten Quantil (3,6-7,5  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Vollset et al. 2000*). Hogg et al. untersuchten HCY bei 22 Müttern mit IUGR-Feten und bei 402 Müttern mit gesunden Feten zu zwei Zeitpunkten (26. und 37. SSW). Es konnte kein signifikanter Unterschied der HCY-Konzentrationen gefunden werden (*Hogg et al. 2000*). In einer großen Studie von 2003 (*Infante-Rivard et al. 2003*) wurde HCY im Nabelschnurblut und im mütterlichen Blut zum Zeitpunkt der Geburt bestimmt. Die

Analyse wurde bei 483 Fall- (=Kind mit IUGR) und 468 Kontrollmüttern sowie bei 409 IUGR-Babys und 438 Kontrollbabys durchgeführt. Es zeigte sich entgegen der Erwartungen ein inverser Zusammenhang zwischen Plasma-HCY und IUGR. Für einen Anstieg des HCY im mütterlichen Plasma um 5  $\mu\text{mol/l}$  zeigte sich ein Odds Ratio für IUGR von 0,37 (95% KI, 0,24-0,58). Es konnte mit steigendem HCY ein steigendes Geburtsgewicht gezeigt werden (*Infante-Rivard et al. 2003*).

## **1.4 S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein**

### **S-Adenosylmethionin (SAM)**

SAM wurde als das aktivierte Methionin beschrieben (*Cantoni 1951*). Durch Transmethylierung wird es zu S-Adenosylhomocystein umgebaut (*De la Haba et al. 1959*). SAM ist ein sehr wichtiges Nukleosid und der universellste Methylgruppendonator im menschlichen Metabolismus (*Chiang et al. 1996*). SAM ist am Umsatz verschiedenster Hormone (z.B.: Noradrenalin  $\rightarrow$  Adrenalin), Neurotransmitter und Nukleinsäuren beteiligt. Beim Menschen sind insgesamt ca. 1000 Methylierungsreaktionen mit Beteiligung von SAM bekannt (*Chiang et al. 1996*).

Vor allem Zellwachstum und Zelldifferenzierung sind eng mit Methylierungen von Proteinen verbunden. Diese zentrale Stellung zeigt, dass eine mangelnde Verfügbarkeit von SAM Auswirkungen auf viele Zellfunktionen hat. Hypomethylierungen der DNA sind Merkmal von maligne entarteten Zellen (*Feinberg et al. 1995 und 2002*). SAM spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Synthese von Zellmembranen. Aus Phosphatidyläthanolamin und drei  $\text{CH}_3$ -Gruppen (von SAM bereitgestellt) wird Phosphatidylcholin produziert. Diese Phosphoglyzeride haben besonders im Nervengewebe einen hohen Umsatz. Beim Gesunden werden täglich ca. 6-8 g SAM produziert, woraus etwa 800 mg freie Methylgruppen gebildet werden (*Matsubara et al. 1992*).

Im HCY-Metabolismus übernimmt SAM wichtige Regulierungsfunktionen: es agiert als allosterischer Hemmer für die Remethylierung von HCY, indem es die MTHFR und somit die Synthese von 5-MTHF hemmt (*Jencks et al. 1987*). Außerdem wirkt es als positiv allosterischer Aktivator der Cystathionin- $\beta$ -Synthase und aktiviert so die Transsulfurierung (*Finkelstein et al. 1975*).

Therapeutisch wurde SAM wegen seiner antipsychotischen Wirkung eingesetzt sowie zur Behandlung von Depressionen (*Kagan et al. 1990*) und Migräne (*Friedel et al. 1989*). Bei Pavianen konnte ein alkoholtoxischer Leberschaden vermindert und der Mangel an Glutathion behoben werden (*Lieber et al. 1990*). Sowohl oral als auch parenteral hat SAM jedoch eine schlechte Bioverfügbarkeit und kann wahrscheinlich nicht intakt in Zellen aufgenommen werden, was den therapeutischen Einsatz limitiert (*Ueland 1982*).

### **S-Adenosylhomocystein (SAH)**

Chemisch entspricht SAH dem demethylierten SAM. Um den Methioninmetabolismus aufrecht zu erhalten, muss SAH aus dem Stoffwechsel entfernt werden. Alle Zellen enthalten das Enzym SAH-Hydrolase, welches SAH zu HCY und Adenosin hydrolysiert. Diese Reaktion ist reversibel, vitaminunabhängig und das Gleichgewicht befindet sich auf Seiten des SAH (*De la Haba et al. 1959*). Das entstandene Adenosin wird über verschiedene Schritte in ATP umgewandelt und steht so erneut für die Methioninaktivierung zu SAM zur Verfügung. Als Vorläufer einer HHCY ist SAH erhöht. SAH ist wahrscheinlich ein noch sensitiverer Indikator für kardiovaskuläre Erkrankungen als HCY (*Kerins et al. 2001*). SAH ist ein starker Inhibitor für die Aktivität der Methyltransferasen (*Kerr 1972*). HHCY führt zu einer erhöhten SAH-Konzentration und folglich zu einer gehemmten Methyltransferaseaktivität. SAH kann deren Aktivität um bis zu 50-70% reduzieren (*Wang et al. 1997*). Damit die SAM-abhängige Transmethylierung nicht vollständig blockiert wird, wird SAH zu Adenosin und HCY umgewandelt. Pharmakologische Blockierung der SAH-Hydrolase führt zur intrazellulären SAH-Erhöhung. Spezifische SAH-Hydrolaseinhibitoren hemmen die Methylierung von Proteinen, Phospholipiden, RNA und DNA (*Chiang et al. 1996*). Da vor allem Lymphozyten auf die Aktivierung durch Methylierung angewiesen sind (*German et al. 1983*) unterdrücken die SAH-Hydrolaseinhibitoren auch die Immunantwort durch selektive Hemmung der T-Zellproliferation und IL-2-Produktion (*Wolos et al. 1993 a+b*).

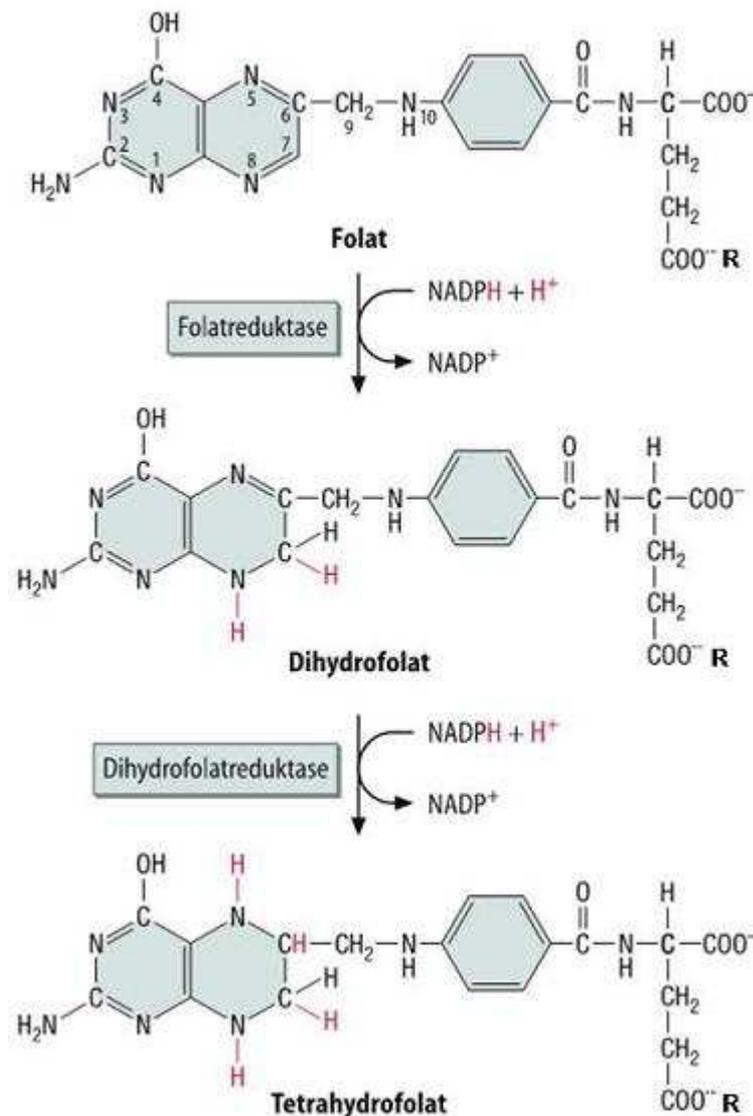
### **1.5 Folat**

Folat gehört zur Gruppe der B-Vitamine. Es fungiert als Koenzym und spielt eine wichtige Rolle bei den Ein-Kohlenstoffübertragungen. Somit ist es für die DNA-Biosynthese unerlässlich. Weiterhin wird Folat zur Remethylierung von HCY zu Methionin benötigt.

#### **Struktur des Folats**

Unter dem Begriff Folat fasst man mehrere Derivate zusammen, die alle das gleiche Grundskelett aufweisen. Folat ist ein kleines wasserlösliches Molekül, welches aus einem Pteridinkern (2-Amino-4-hydroxypteridin), p-Aminobenzoesäure und L-Glutamat (mit 1 bis 9 Glutaminresten) aufgebaut ist. Der Pteridinring kann von Säugetieren zwar synthetisiert werden, es ist jedoch nicht möglich, diesen mit den anderen Resten zu verknüpfen. Als Folate bezeichnet man die Derivate, die sich vom Grundskelett des Folats ableiten. 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (THF) ist die biologisch aktive Form des Folats. Es entsteht durch stufenweise Reduktion unter Verbrauch von zwei Molekülen NADPH. Als Zwischenprodukt entsteht 7,8-Dihydrofolat (*Donnelly 2001; Löffler 2007*).

Abb.1.5.1: Bildung von Tetrahydrofolat aus Folat



R = Rest

### Folatquellen in der Nahrung

Folat kommt sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Produkten vor. Vor allem Leber, Pilze und grünes Gemüse sind reich an Folat. In der Nahrung kommt Folat vor allem als Polyglutamat-Derivat von Tetrahydrofolat vor (*Lucock 2000*).

### Stabilität des Folats

Die meisten Nahrungsfolate sind instabil in dem Sinne, als dass sie leicht oxidiert werden können, etwa durch Hitze, Licht oder Metallionen. Daher ist wohl der Anteil der biologisch

aktiven Form reduziert, wenn folatreiche Nahrung gekocht wird. Andererseits ist Folsäure aber ein hitzestabiles Molekül (*Lucock 1995*). Auf Grund dessen erwartet man von mit Folsäure angereicherten Lebensmitteln bzw. bei Vitaminpräparaten eine höhere Bioverfügbarkeit als bei natürlich vorkommenden Folaten.

### **Intestinale Absorption und Bioverfügbarkeit des Folats**

Die Polyglutamatform, in der die Folate in der Nahrung hauptsächlich vorliegen, kann nicht resorbiert werden. In der Bürstensaummembran des Duodenum und Jejunum werden daher die Glutamyreste mit Hilfe von  $\gamma$ -Glutamylcarboxypeptidasen, lysosomalen Exopeptidasen, abgespalten (*Chandler et al. 1986*). Das Folat liegt so als Monoglutamat vor und kann leicht mit Hilfe von Transportern resorbiert werden. Werden größere Mengen (bis zu mehrere mg) an Folat aufgenommen, wie es in der Frühschwangerschaft empfohlen wird, werden diese beinahe quantitativ resorbiert. Nach oraler Gabe ist die maximale Plasmakonzentration nach 1-2 Stunden erreicht. Intrazellulär werden die Monoglutamate mit Hilfe von der  $\gamma$ -Glutamatsynthetase wieder zu Polyglutamaten konjugiert und können in dieser Form gespeichert und im intrazellulären Stoffwechsel umgesetzt werden (*Steinberg et al. 1983; Lowe et al. 1993*). So wird ein Gradient aufrechterhalten, welcher die Aufnahme von Monoglutamat in die Zelle begünstigt (*Sierra et al. 1999*).

Der intrazelluläre Folatpool besteht zu ca. 95% aus der Polyglutamatform. Dabei ist die Zellteilungsrate proportional dem intrazellulären Folatspeicher (*Steinberg et al. 1983*). Im Serum wird hauptsächlich 5-Methyl-THF transportiert (ca. 80%), welches unspezifisch an Albumin,  $\alpha$ -Makroglobulin und Transferrin gebunden ist. Ein kleiner Teil wird sehr spezifisch mit einem folatbindenden Protein transportiert (*Antony et al. 1985*). Weiterhin liegt ein Drittel in ungebundener Form vor.

Die Folatausscheidung im Urin ist bei normaler, bedarfsadäquater Folatzufuhr gering. Aufgrund tubulärer Rückresorption in der Niere beträgt die Ausscheidung biologisch aktiver Folatformen ca. 10 bis 20 % der resorbierten Folatmonoglutamatmenge (*Loew et al. 1987*). Auch biologisch inaktive Abbauprodukte werden über den Urin ausgeschieden. Liegt die Folataufnahme unterhalb des Bedarfs, wird die Folatexkretion minimiert, während bei erheblicher Überschreitung der Bedarfsmenge die Rückresorptionskapazität der Niere überfordert wird und die Folatkonzentration im Urin in Abhängigkeit von der zugeführten Menge ansteigt (*Williams et al. 1982*). Die fäkale Folatausscheidung umfasst neben nicht resorbierten Nahrungsfolaten auch enteral synthetisierte Folatverbindungen, die nach allgemeiner Auffassung nicht wesentlich zur Folatbedarfsdeckung beitragen.

### **Plasmareferenzbereich, tägliche Aufnahme und Speicherung**

Der Plasmareferenzbereich für Folat liegt zwischen 5-25 ng/ml (11,5-57,4 nmol/l). Für gesunde Personen wird eine tägliche Aufnahme von 400  $\mu$ g empfohlen. Da in der

Schwangerschaft ein erhöhter Bedarf an Ein-Kohlenstoffeinheiten, welche von THF bereitgestellt werden, für die de-novo-Synthese von Purinen und Pyrimidinen besteht und eine klare Assoziation von Folatmangel und dem Auftreten von Neuralrohrdefekten nachgewiesen werden konnte, wird Frauen, die eine Schwangerschaft planen und Schwangeren in der Frühschwangerschaft die Einnahme von Folatpräparaten mit Konzentrationen von 400 bis 800 µg täglich empfohlen. Die Leber ist wichtigstes Speicherorgan der Folate.

### **Biochemie des Folats**

In der Zelle fungiert 5-Methyl-THF als Methylgruppendonator für die Remethylierung von HCY zu Methionin und wird selbst zu THF. Methionin ist der Antrieb für die Synthese von SAM, dem wichtigsten Methylgruppendonator für DNA, RNA, Proteine und Phospholipide. Bei Folatmangel wird weniger Methionin produziert, was zu verminderten Konzentrationen von SAM führt. Mangel an SAM führt zu Hypomethylierung. THF, welches nach Demethylierung von 5-Methyl-THF entsteht, wird in mehreren Reaktionen als Substrat benutzt. THF kann in 10-Formyl-THF umgewandelt werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Methyltetrahydrofolatdehydrogenase (MTHFD) katalysiert. Die MTHFD katalysiert weiterhin die reversible Reaktion von 10-Formyl-THF zu 5,10-Methenyl-THF und dieses wiederum weiter zu 5,10-Methylen-THF (*Hum et al. 1988*).

Der Folatmetabolismus stellt Ein-Kohlenstoffeinheiten zur Synthese von den Purinen Adenin und Guanin zur Verfügung, welche Bausteine der DNA sind. Ein weiterer DNA-Baustein ist das Pyrimidin Thymin, dessen Synthese durch die Thymidilatsynthase katalysiert wird. In dieser Reaktion überträgt 5,10-Methylen-THF seine Methylengruppe auf dUMP. Es entsteht dTMP und Dihydrofolat (DHF). Durch die als Hilfsenzym wirkende Dihydrofolatreduktase wird DHF mit Hilfe von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  wieder in THF umgewandelt. THF kann unter Katalyse der Serin-Hydroxymethyl-Transferase einen  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ -Rest des Serins aufnehmen und liegt nach Wasserabspaltung wieder als 5,10-Methylen-THF vor. Beide Enzyme benötigen Vitamin B6 als Koenzym. Hier wird deutlich, dass die Geschwindigkeit des Thymin-Stoffwechsels eng mit dem Folatstoffwechsel verknüpft ist (*Löffler 2007*).

Bei jeder Verminderung des Folatangebotes bzw. der zur Verfügung stehenden Folate muss es zu einer Störung der Thyminnukleotid-Biosynthese und damit der DNA-Replikation kommen. Mangel an Thymin führt nämlich zum fälschlichen Einbau von Uracil in die DNA während der Replikation (*Blount et al. 1997*). Uracil-Fehleinbau führt zu vermehrten Doppelstrangbrüchen und kann bei der notwendigen Basenexcisionsreparatur zur Induktion von Punktmutationen führen (*Duthie et al. 1998; Melnyk et al. 1999; Kunz 1988*). 5,10-Methylen-THF wird letztlich durch die MTHFR reduziert zu 5-Methyl-THF.

## **Folat und Neuralrohrdefekte**

Die MTHFR spielt eine zentrale Rolle für die Verfügbarkeit von Folat für die Remethylierung von HCY. Wie bereits beschrieben führt die C677T Mutation der MTHFR zu einer verminderten Aktivität und somit zu einem erniedrigten Angebot an 5-Methyl-THF und verminderter Remethylierung von HCY (*Van der Put et al. 1995 und 1997*). Die MS wird nicht nur für die Remethylierung von HCY zu Methionin benötigt, sondern spielt auch eine Rolle bei der Produktion des Membranlipids Myelin, das die Myelinscheide aufbaut. Vor allem die homozygote Form der Mutation ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für NTD. Verminderte Remethylierung von HCY führt zu verminderter Methioninsynthese, was zur Verminderung der Methylierung von DNA, RNA und Proteinen führt. Der MTHFR 677 TT Genotyp konnte mit genereller DNA-Hypomethylierung in Zusammenhang gebracht werden. Interessanterweise konnte bei Personen dieses Genotyps, welche einen hohen Folatspiegel aufwiesen, nachgewiesen werden, dass der HCY-Anstieg nicht so stark ausgeprägt war. Dies deutet auf präventive Effekte für Folatsubstitution bei diesen Personen hin. Frauen dieses Genotyps, die zusätzlich einen erniedrigten Folatstatus aufweisen, haben ein zusätzlich erhöhtes Risiko ein Kind mit NTD zu bekommen (*Van der Put et al. 2001*).

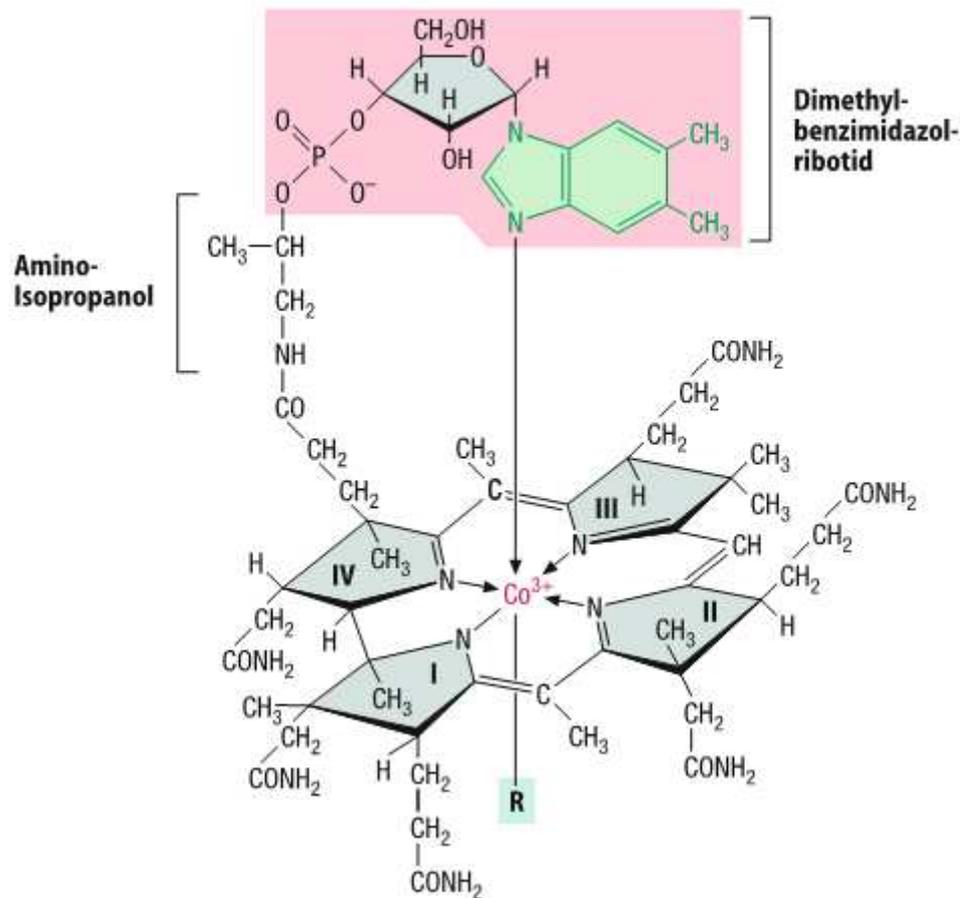
## **1.6 Vitamin B12**

### **Struktur des Vitamin B12**

Das Vitamin B12-Molekül hat eine einzigartige chemische Struktur. Es ist aus einem Corrinringssystem aufgebaut, welches dem Porphyrinkern des Häm-Moleküls gleicht, wobei die Corrinstruktur des Vitamin B12 nicht wie im Häm Eisen, sondern Cobalt als zentralen Stoff enthält. Daher wird Vitamin B12 auch als Cobalamin bezeichnet und ist das einzige biologisch wichtige Molekül, das Cobalt enthält. Cobalamin weist nur drei alpha-Methanbrücken auf, wobei es im Häm vier sind.

Cyanocobalamin ist ein synthetisches Derivat des Cobalamins. In dieser Form wird das Vitamin B12 in pharmazeutischen Präparaten verwendet. Cyanocobalamin ist ein hitze- und lichtstabiles Molekül, ist aber erst biologisch aktiv, wenn es in-vivo in Hydroxycobalamin hydrolysiert werden kann (*Löffler et al. 2007*).

Abb.1.6.1: Struktur von Vitamin B12



### Vitamin B12-Quellen in der Nahrung

Die einzige bekannte Quelle für Vitamin B12 im menschlichen Körper ist die bakterielle Synthese. Pflanzen, Tiere und Menschen können kein Vitamin B12 produzieren. Für Tiere ist die Menge des Vitamin B12, die sie von den B12-produzierenden Bakterien in ihrem Kolon erhalten, ausreichend. Menschen müssen Vitamin B12 über tierische Nahrungsmittel aufnehmen. Fleisch, Fisch, Leber, Niere, Eier und Milchprodukte sind geeignete Cobalamin-Lieferanten, in pflanzlichen Nahrungsmitteln hingegen ist kein Vitamin B12 enthalten (*Herbert 1988*). Veganer sind daher auf die unzureichende Produktion von Vitamin B12 durch Bakterien im distalen Dünndarm angewiesen (*Herbert 1994*). Im Gegensatz zum Folat ist Vitamin B12 ein verhältnismäßig stabiles Molekül, welches durch die Nahrungsmittelzubereitung kaum zerstört wird.

### Intestinale Absorption und Bioverfügbarkeit des Vitamin B12

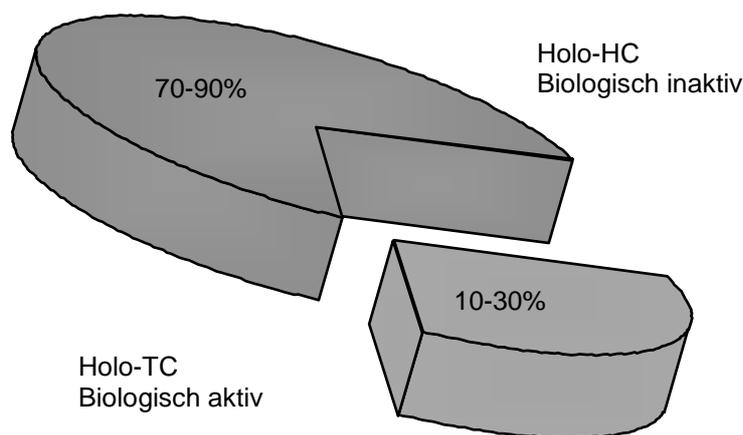
In der Nahrung liegt Vitamin B12 an Nahrungsproteine gebunden vor. Im Magen wird Vitamin B12 durch Peptidasen von den Proteinen gelöst, an Haptocorrin gebunden und ins

Duodenum gebracht. Im Duodenum herrscht ein neutraler pH. Hier löst sich Haptocorrin mit Hilfe von Pankreasenzymen leichter vom Vitamin B12, sodass sich an intrinsic factor (IF) binden kann. Intrinsic factor ist ein Glykoprotein, welches von den Parietalzellen des Magens produziert wird. Der IF-Vitamin B12-Komplex kann im proximalen Ileum mit Hilfe eines rezeptorvermittelten Endozytoseprozesses in die Mukosazelle aufgenommen werden.

In den Enterozyten wird Vitamin B12 an Transcobalamin II gebunden. Transcobalamin II ist ein Nicht-Glykoprotein, welches von vielen Zelllinien produziert wird und Cobalamin zu allen DNA-produzierenden Zellen transportiert (Seetharam 1999). Nur 20% des Serum Vitamin B12 sind an Transcobalamin II gebunden. Diesen Anteil bezeichnet man als holo-Transcobalamin (holo-TC) oder auch als aktives B12. Der Hauptanteil (80%) ist an Haptocorrin (holo-HC genannt) gebunden und hat keine biologische Funktion (s. Abb. 1.6.2). Es wird als zirkulierendes Speichercobalamin angesehen, welches den Speichergehalt der Leber anzeigt (Seetharam 1999).

Da holo-TC für den Transport von Vitamin B12 zu den Zellen zuständig ist, kann es als früher Indikator für eine negative Vitamin B12-Bilanz herangezogen werden und ist wohl ein besserer Marker für den Vitamin B12-Status als das gesamte Plasma Vitamin B12. Es wurde darüber berichtet, dass sich Vitamin B12-Substitution zunächst in einem starken Anstieg an holo-TC bemerkbar macht und erst später ein geringerer Anstieg im holo-HC bemerkbar ist (Lindenbaum et al. 1988; Savage et al. 1994).

Abb.:1.6.2: Bestandteile des Gesamtcobalamin im Blut



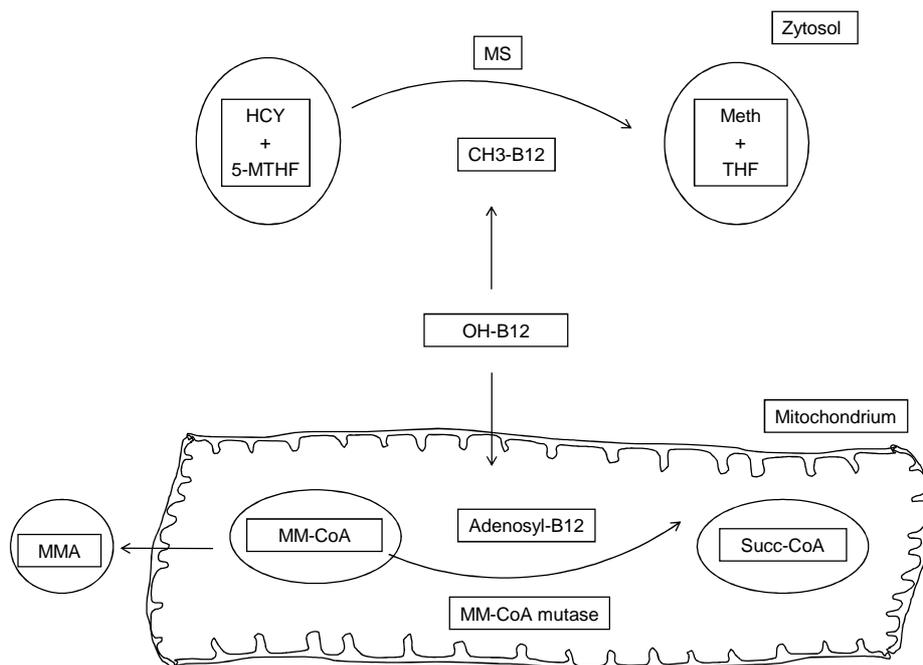
### **Plasmareferenzbereich, tägliche Aufnahme und Speicherung**

Der Referenzbereich für den Plasmaspiegel von Vitamin B12 liegt bei 211-900 pg/ml (156-665 pmol/l). Die empfohlene tägliche Aufnahme liegt bei 3 µg für Erwachsene. Leber, Muskulatur und Niere sind Speicherorgane für Cobalamin. Über den Urin gehen täglich weniger als 1 µg verloren. Der Gesamtbestand an Cobalamin im Körper liegt bei 3 bis 5 mg (*Löffler et al. 2007*).

### **Biochemie des Vitamin B12**

Beim Menschen spielt Cobalamin in nur zwei verschiedenen Derivaten als Koenzym eine Rolle (s. Abb. 1.6.3). Methylcobalamin und 5-Desoxyadenosylcobalamin sind Kofaktoren für das zytosolische Enzym Methioninsynthase und der mitochondrialen Methylmalonyl-CoA-Mutase. Cobalamin determiniert die Aktivität der Methioninsynthase und somit die Remethylierungsgeschwindigkeit von HCY zu Methionin. Dieser Schritt sorgt auch für die weitere Bereitstellung von aktiven Folaten. Bei der Remethylierung wird zunächst eine Methylgruppe von 5-Methyl-THF auf Cobalamin übertragen. Es entsteht Methylcobalamin. Die Methylgruppe wird weiter auf HCY übertragen. Es entsteht wieder Cobalamin und Methionin. Diese Abhängigkeit zeigt, dass Cobalaminmangel zu HCY-Anstieg führt. Adenosylcobalamin ist Kofaktor der Methylmalonyl-CoA-Mutase in den Mitochondrien und somit bei der Isomerisierungsreaktion von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA beteiligt (*Kräutler et al. 2005*). Bei Cobalaminmangel ist diese Reaktion nicht möglich. Methylmalonyl-CoA wird dann alternativ zu Methylmalonsäure (MMA) hydrolysiert. Der MMA-Plasmaspiegel gilt als sensitiver Marker für ein Cobalamindefizit und ist von diagnostischer Bedeutung (*Cox et al. 1962*). Als Cobalamin-Analoga werden dem Vitamin B12 strukturell ähnliche Moleküle bezeichnet, die biologisch inaktiv sind.

Abb.1.6.3: Vitamin B12-abhängige Reaktionen



HCY=Homocystein; 5-MTHF=5-Methyltetrahydrofolat; Meth=Methionin; MMA=Methylmalonsäure; MM-CoA=Methylmalonyl-CoA; MS=Methioninsynthase; Succ-CoA=Succinyl-CoA; THF=Tetrahydrofolat

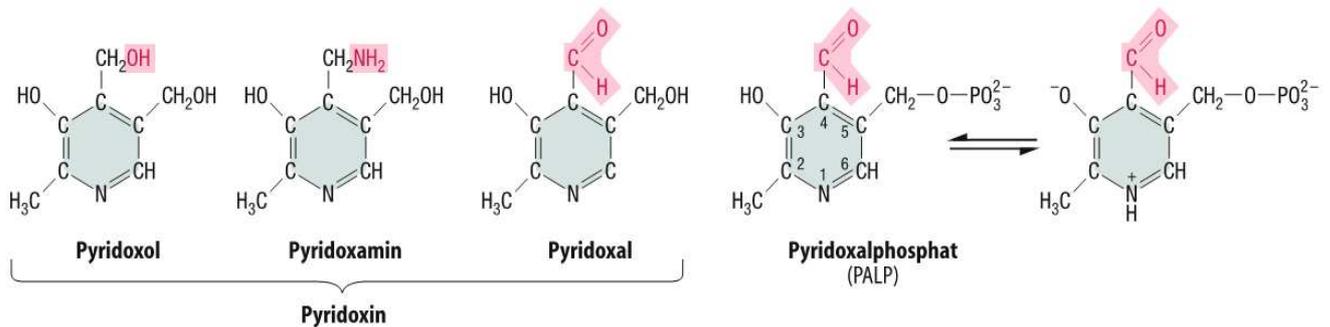
## 1.7 Vitamin B6

Vitamin B6 wird auch als Pyridoxin bezeichnet und fasst eine Gruppe von Verbindungen der 2-methyl-3-hydroxy-4,5-Pyridine mit biologischer Pyridoxinaktivität zusammen.

### Struktur des Vitamin B6

Das Vitamin B6-Grundgerüst besteht aus einem Pyridinring. Die einzelnen Verbindungen unterscheiden sich nur durch Reste und sind leicht ineinander überführbar. Als Alkohol bezeichnet man Vitamin B6 als Pyridoxin (-CH<sub>2</sub>OH), als Aldehyd heißt es Pyridoxal (-CHO) und als Amin Pyridoxamin (-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Als Phosphorsäureester spielen im Organismus Pyridoxin-5-Phosphat (PNP), Pyridoxal-5-phosphat (PLP) und Pyridoxamin-5-Phosphat (PMP) eine Rolle. Vitamin B6 weist im Vergleich zum Folat eine bessere Stabilität auf. Durch Lagerung und Kochen gehen maximal 10-50% des Vitamins verloren.

Abb.1.7.1: Pyridoxol, Pyridoxamin, und Pyridoxal, sowie das Koenzym Pyridoxalphosphat



### Vitamin B6-Quellen in der Nahrung

Besonders in Fleisch, Milch-, und Vollkornprodukten, Kartoffeln und Gemüse ist Vitamin B6 enthalten.

### Absorption und Bioverfügbarkeit des Vitamin B6

Trotz möglicherweise unterschiedlicher Kinetik werden die Vitamin B6-Verbindungen im gesamten und vor allem im proximalen Dünndarm durch passive Resorption gut und effektiv aufgenommen (Hamm et al. 1979). Die Bioverfügbarkeit liegt bei 75%. Vitamin B6 liegt als Kofaktor enzymgebunden vor. Der größte Teil ist an Glykogenphosphorylase gebunden (75-80%). Mehr als 90% des PLP im Plasma ist an Albumin gebunden. Hauptabbauprodukt des PLP ist die 4-Pyridoxinsäure.

### Plasmareferenzbereich, tägliche Aufnahme und Speicherung

Der tägliche Bedarf an Vitamin B6 ist von der aufgenommenen Proteinmenge abhängig und beträgt 1,1-2,0 mg. Während einer Schwangerschaft kann der Bedarf auf 5 mg/d steigen, um den PLP-Spiegel aufrecht zu erhalten (Schuster et al. 1984). Im Plasma sollte der PLP-Spiegel über 20 nmol/l und das Gesamtvitamin B6 über 40 nmol/l liegen. Eigene Speicher gibt es nicht. Das Vitamin ist meist als funktioneller Kofaktor enzymgebunden. Das Gesamtkörper-Vitamin B6 beträgt etwa 1000 µmol.

### Biochemie des Vitamin B6

Derzeit sind mehr als hundert enzymatische Reaktionen bekannt, die Vitamin B6 als Koenzym erfordern (Bender 1994). Beispiele sind die Synthese von Adrenalin, Noradrenalin, Niacin, GABA, Tyramin, Kollagen, Dopamin oder 5-Hydroxytryptamin. Im HCY-Metabolismus ist PLP Koenzym für Serin-Hydroxymethyltransferase, γ-Cystathionase und Cystathionin-β-Synthase. Bei Vitamin B6-Mangel ist Cystathionin, welches Substrat der γ-Cystathionase ist, im Serum bzw. im Urin erhöht. Schon bei geringen B6 Defiziten ist die Transsulfurierung vermindert (Ubbink et al. 1996). Im Tierversuch konnte unter Vitamin B6-Mangel eine Reduk-

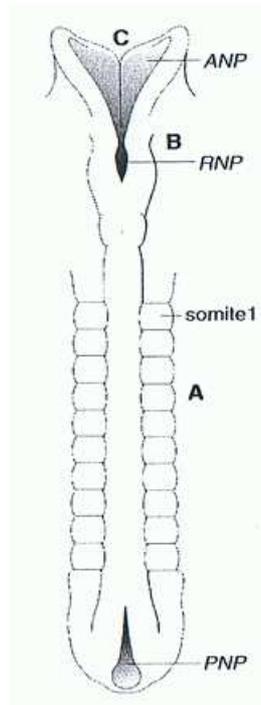
tion der Methioninbildung aus Serin um 81% und eine verminderte Verfügbarkeit von 5-Methyl-THF als Substrat für die Remethylierung festgestellt werden. Weiterhin konnte ein reduzierter Proteinumsatz und ein geringeres Wachstum der Tiere gezeigt werden (*Martinez et al. 2000*).

## **1.8 Geburtsdefekte**

### **Neuralrohrdefekte**

Der Neuralrohrschluss im menschlichen Embryo beginnt drei Wochen nach der Konzeption und ist innerhalb von 28 Tagen abgeschlossen. Im Mausmodell (*Golden et al. 1993*) sowie bei vielen anderen Spezies, wie zum Beispiel dem Huhn (*van Straaten et al. 1996*) konnte gezeigt werden, dass der Neuralrohrschluss an mehreren Stellen beginnt. Der Schluss beginnt in der Zervikalregion (Stelle A) und wird entlang der Neuralrinne sowohl nach kranial als auch nach kaudal fortgeführt. Die zweite Verschlussstelle (Stelle B) liegt zwischen dem späteren Mesencephalon und Rhombencephalon. Hier verläuft der Verschluss ebenfalls bidirektional, sowohl rostral zum Ende der Neuralrinne, als auch kaudal Richtung Verschlussstelle A. Verschlussstelle C liegt am Neuroporus rostralis und verschließt das Neuralrohr in kaudaler Richtung bis zur Verschlussstelle B.

Abb.1.8.1: Neuralrohrverschlussstellen



Es gibt verschiedene Formen von Neuralrohrdefekten, die mithilfe dieses Verschlussstellenmodells in drei große Gruppen unterteilt werden können (Nakatsu *et al.* 2000). Defekte, die sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark betreffen, werden als Cranio-rachischisis totalis bezeichnet und sind nicht mit dem Leben vereinbar. Als Anencephalie bezeichnet man das Fehlen des Schädeldachs und Fehlen bzw. Degeneration wesentlicher Teile des Gehirns infolge des Ausbleibens des Neuralrohrschlusses in der Gehirnregion. Die Feten versterben entweder schon in utero oder kurz nach der Geburt. Defekte, die die Zervikal-, Thorakal- oder Lumbosakralregion betreffen bezeichnet man als Spina bifida. Bei der Spina bifida occulta liegt lediglich ein Defekt des Wirbelbogens vor. Bei der Spina bifida aperta hingegen wölben sich zusätzlich Rückenmarkshäute (Meningozele) und evtl. auch Rückenmarksgewebe (Meningomyelozele) durch den Wirbelbogensdefekt vor (Botto *et al.* 1999).

Eine Dysraphie ist häufig assoziiert mit einer Arnold-Chiari-Anomalie vom Typ II, bei der das Kleinhirn fehlgebildet und das Foramen magnum nach kaudal verlagert ist. Bei diesen Patienten liegt häufig ein Verschlusshydrozephalus vor. Folge der Dysraphie ist eine komplette oder inkomplette Querschnittslähmung mit schlaffer, selten spastischer Parese unterhalb der Läsion, Sensibilitätsstörung, Blasen- und Darmlähmung. Die neurogene Blasenstörung kann zu Nierenfunktionsstörungen führen (Sitzmann 2006). Neuralrohrdefekte kommen relativ häufig vor. Die Prävalenz unterscheidet sich regional relativ stark. Mit 1 auf 2500 Geburten ist sie in Finnland sehr niedrig und mit 1 auf 80 Geburten in Südwales sehr häufig. In der BRD beträgt die Prävalenz etwa 1-3 auf 1000 Geburten. Diese Prävalenzen

können zu niedrig geschätzt sein, da sich durch das verbesserte Screening die Rate an Schwangerschaftsabbrüchen bei Vorliegen von Neuralrohrdefekt erhöht hat (*Cragan et al. 1995*).

Die Gründe für das Entstehen von Neuralrohrdefekten sind multifaktoriell. Das Vorliegen einer genetischen Komponente konnte bewiesen werden, da man folgende Sachverhalte nachweisen konnte: bevorzugtes Vorkommen von NTD bei Frauen, die Prävalenz variiert abhängig von Rasse und Volksstamm (*Buccimazza et al. 1994; Chatkupt et al. 1994*), vermehrtes Vorkommen bei eineiigen Zwillingen (*Garabedian et al. 1994*) und in Familien (*Hall et al. 1988*) und einem zweifach erhöhtem Risiko bei homozygoten Trägerinnen der C677T MTHFR-Mutation (*van der Put et al. 1995 und 1997*).

Als exogene Faktoren ließen sich die Einnahme von Antiepileptika (z.B. Valproat) (*Lammer et al. 1987*), Diabetes mellitus (*Becerra et al. 1990*), fieberhafter Infekt (*Edwards et al. 1995; Graham et al. 1998*) und Übergewicht (*Shaw et al. 1996; Werler et al. 1996; Watkins et al. 1996*) identifizieren. Weiterhin spielen der sozioökonomische Status und die Ernährung eine Rolle (*Wasserman et al. 1998*). Im Jahr 1976 untersuchten Smithells et al. erstmals den Ernährungsstatus bei Frauen, welche ein Kind mit NTD erwarteten (*Smithells et al. 1976*). Die Studie zeigte, dass der Folatstatus der roten Blutzellen reduziert war. In einer darauf folgenden Studie am gleichen Zentrum konnte bei einer Studienpopulation, die Folat substituierte, verglichen mit einer Population, die kein Folat einnahm ein um 86% vermindertes Auftreten von NTD nachgewiesen werden (*Smithells et al. 1983*).

Die MRC-Studie zeigte, dass bei Frauen, die 4 mg Folat pro Tag einnahmen das Risiko für ein erneutes Auftreten eines NTD um 72% vermindert war, verglichen mit einer Gruppe, die kein Folat substituierten (*MRC Vitamin Study Research Group 1991*). Czeizel et al. Berichteten ein vermindertes Risiko für das erstmalige Auftreten eines NTD bei Frauen, die 800 µg Folat pro Tag einnahmen (*Czeizel et al. 1992*). In China führte man eine Interventionsstudie in einer Region mit hoher Prävalenz und einer Region mit niedriger Prävalenz für NTD durch. Es wurde ein signifikant erniedrigtes Risiko bei einer Einnahme von 400 µg täglich nachgewiesen (*Berry et al. 1999*). Diese wissenschaftlichen Arbeiten führten zur übereinstimmenden Meinung, dass perikonzeptionelle Folateinnahme zur Prävention von NTD führt und dass Frauen, die eine Schwangerschaft planen, empfohlen wird, täglich 400 µg Folat einzunehmen. Da die meisten Schwangerschaften ungeplant entstehen, werden in den Vereinigten Staaten seit 1998 alle Getreideprodukte mit 140 µg Folat pro 100 Gramm Getreide angereichert (*Honein et al. 2001*). Neben dem Folatstatus untersuchte man auch den Zusammengang von Vitamin B12-Mangel und dem Auftreten von NTD. Niedrige Konzentrationen von Vitamin B12 im Fruchtwasser sind stark assoziiert mit dem Risiko für NTD (*Dawson et al. 1998*). Die Folatkonzentrationen waren auch bei den Fruchtwasserproben der NTD-Schwangerschaften erniedrigt.

### **Down-Syndrom (Trisomie 21)**

Das Down-Syndrom, auch als Trisomie 21 bezeichnet, ist mit 1:700 Lebendgeborenen die häufigste autosomale Chromosomenaberration. Die Inzidenz ist mit dem mütterlichen Alter korreliert (<30 Jahre: <1:1000, 30-34 Jahre: 1-2:1000, 35-39 Jahre: 2-10:1000, 40-44 Jahre: 10-20:1000, >44 Jahre: 20-40:1000) (*Hernandez et al. 1996*). Die meisten Kinder mit Down-Syndrom werden aber von Müttern geboren, die jünger als 30 Jahre alt sind. In über 90% liegt eine freie Trisomie infolge von Non-Disjunction vor, Chromosom 21 ist dreifach vorhanden (*Antonarakis et al. 1992*). Seltener tritt eine Mosaiktrisomie (2%) mit normaler Zelllinie und Zellen mit freier Trisomie 21 auf. In seltenen familiär auftretenden Fällen ist das zusätzliche Chromosom 21 an ein anderes Autosom angeheftet. Dies bezeichnet man als Translokationstrisomie 21. Klinisch imponiert der charakteristische Phänotyp mit nach außen ansteigenden Lidachsen, Epikanthus und flacher Nasenwurzel. Weiterhin besteht eine geistige Retardierung unterschiedlichen Schweregrads sowie Fehlbildungen der inneren Organe (bei ca. 50% Herzfehler) und eine erhöhte Leukämierate (*Sitzmann 2006*).

Es wird diskutiert, ob HCY und Folatmangel Risikofaktoren für das Auftreten von Down-Syndrom sind. Takamura untersuchte in einer Fall-Kontrollstudie 31 Frauen, die eine Schwangerschaft mit einem Kind mit Down-Syndrom hatten und verglich HCY, Folat, Vitamin B12 und B6 mit 60 Kontrollen. Man fand eine signifikante Erhöhung des HCY und eine signifikante Erniedrigung des Folats bei den Fällen verglichen mit den Kontrollen (*Takamura et al. 2004*). Eine weitere Fall-Kontroll-Studie untersuchte bei normalen (n=41) und Down-Syndrom-Schwangerschaften (n=23) Formiminoglutamat (FIGLU) im Fruchtwasser. FIGLU dient als Ein-Kohlenstoffüberträger für Folat. Bei Folatmangel akkumuliert FIGLU. Im Fruchtwasser der Down-Syndrom-Schwangerschaften konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant erniedrigter FIGLU-Spiegel festgestellt werden. Es zeigte sich also kein Hinweis für Folatmangel als möglicher Risikofaktor für Down-Syndrom. Zwei Enzyme des Folat- und HCY-Metabolismus sind auf Chromosom 21 lokalisiert (Cystathionin- $\beta$ -Synthase und Glutamatformiminotransferase-Cyclodeaminase). Auf Grund der 1,5-fachen Gendosis geht man von einer gesteigerten Aktivität dieser Enzyme aus. Dies würde die Erniedrigung des FIGLU bei den Down-Syndrom-Schwangerschaften erklären (*Baggot et al. 2006*).

### **Ewards-Syndrom (Trisomie 18)**

Die Trisomie 18 tritt bei 1:6000 Neugeborenen auf. Der Chromosomensatz zeigt 47XX bzw. XY+18 Chromosomen. Die Inzidenz ist mit dem Alter der Mutter korreliert. Es zeigen sich schwerste Organfehlbildungen (Herzfehler, Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Ösophagusatresie). Die Lebenserwartung beträgt im Durchschnitt eine Woche (*Sitzmann 2006*).

### **Ulrich-Turner-Syndrom (Monosomie X)**

Bei 1:2000 weiblichen Neugeborenen findet sich eine Monosomie X. Der Chromosomensatz zeigt 45X0 Chromosomen, es ist also nur ein Geschlechtschromosom vorhanden. Klinisch zeigen sich das Ausbleiben der Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale, Infertilität und Minderwuchs. Die Lebenserwartung ist nicht beeinträchtigt (*Sitzmann 2006*).

### **Multipler Sulfatasemangel**

Multipler Sulfatasemangel (multiple sulfatase deficiency; MSD) ist eine seltene (Prävalenz: circa 1:407.000), autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, welche durch die beeinträchtigte Aktivität von mindestens acht Sulfatasen gekennzeichnet ist. MSD wird durch loss-of-function-Mutationen im SUMF1 (sulfatase modifying factor 1 gene) verursacht, welches für das Protein F-Gly-Generating Enzyme kodiert, das in der posttranslationalen Modifikation aller Sulfatasen beteiligt ist (*Dierks et al. 2003*). Klinisch zeigen sich deutliche faziale Anomalien (Hypertelorismus, Mittelgesichtshypoplasien, flache Nasenwurzel, lange Wimpern), begrenzte Gelenkbeweglichkeit, Ichtyosis, Hepatomegalie und muskuläre Hypotonie (*Busche et al. 2008*). Bei MSD kommt es zum fortschreitenden Verlust von physischen und kognitiven Fähigkeiten.

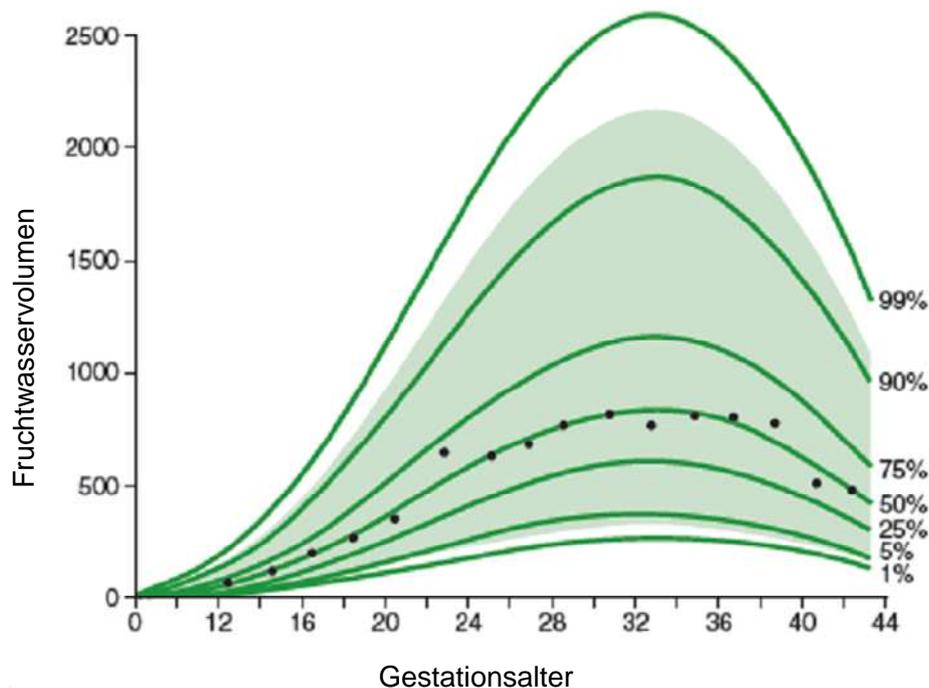
## **1.9 Fruchtwasser**

Fruchtwasser ist in der Schwangerschaft unerlässlich zur Gewährleistung des fetalen Wachstums und Stoffwechsels. Sowohl Zusammensetzung als auch Volumen unterliegen in der Schwangerschaft Veränderungen und strengen Regulationen. Im ersten Trimester ist das Fruchtwasser isotonisch zu mütterlichem und fetalem Plasma, enthält aber nur einen sehr geringen Anteil an Proteinen (*Campbell et al. 1992*). Weiterhin zeigt sich eine erhöhte Konzentration an Zuckeralkoholen, dem Produkt von anaerobem Metabolismus (*Jauniaux et al. 2005*). Man glaubt, dass das Volumen der Flüssigkeit durch Transsudation des Plasmas, sowohl des Fetus durch die nicht keratinisierte fetale Haut, als auch der Mutter durch die uterine Dezidua und/oder die Plazentaoberfläche entsteht (*Faber et al. 1973*). Mit zunehmendem Schwangerschaftsalter unterscheidet sich die Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit von der des Plasmas. Die Osmolalität und der Natriumgehalt nehmen ab, wohl als Ergebnis der Produktion von verdünnendem fetalem Urin (*Gillibrand 1969*). Harnstoff, Kreatinin und Harnsäure steigen im Fruchtwasser in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft auf Werte an, die zwei- bis dreimal höher sind als die Konzentration im fetalen Plasma (*Gillibrand 1969*).

Das Volumen nimmt von etwa 10 ml in der 10. SSW stetig über ca. 630 ml in der 22. SSW auf etwa 770 ml in der 28. SSW zu (*Brace et al. 1994*). Zwischen der 29. und 37. SSW

verändert sich das Volumen nur sehr wenig, um dann nach der 39. SSW stark abzunehmen, was die erhöhte Rate von Oligohydramnion bei übertragenen Kindern erklärt (*Gadd 1966*) (s. Abb 1.9.1). Das Fruchtwasservolumen verändert sich bei fetalen Pathologien (z. B.: Nierengenese, Anencephalie, Ösophagusatresie), wird aber auch beeinflusst durch Änderungen des mütterlichen Hydrationsstatus und fetale Veränderungen wie Anämie und Hypoxie (*Sciscione et al. 1997; Ross et al. 1996*).

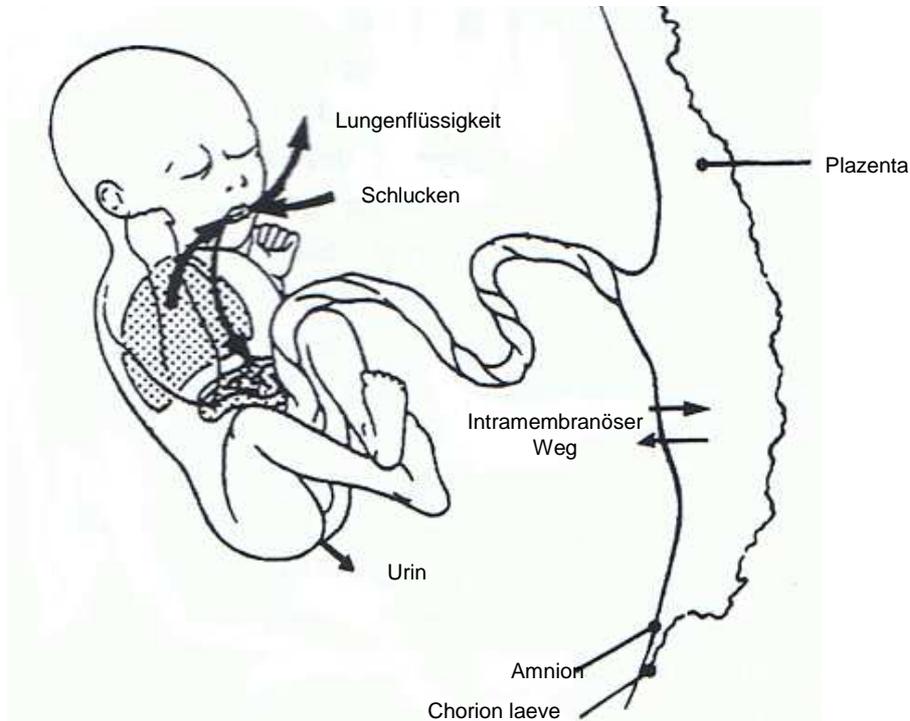
Abb.1.9.1: Fruchtwasservolumen in Abhängigkeit vom Gestationsalter (*Beall et al. 2007*)



In der letzten Hälfte der Schwangerschaft sind die Hauptquellen der Fruchtwasserproduktion der fetale Urin und die Flüssigkeit, die aus der fetalen Lunge sezerniert wird. Durch das Schlucken von Fruchtwasser und die intramembranöse Absorption ins fetale Blut entsteht ein Kreislauf zwischen Abgabe und Aufnahme von Fruchtwasser (Abb. 1.9.2). Der reife Fetus produziert täglich ca. 1000 ml Urin (*Rabinowitz et al. 1989; Fägerquist et al. 2001*), weiterhin werden ca. 1000 ml Lungenflüssigkeit produziert, wovon etwa die Hälfte geschluckt wird, die andere Hälfte wird ins Fruchtwasser abgegeben (*Brace et al. 1989*). Studien an Feten am Ende der Schwangerschaft zeigten, dass der Fetus etwa 210-760 ml täglich schluckt, was nicht der produzierten Menge Urin entspricht (*Pritchard 1966*). Diese Differenz wird durch den intramembranösen Weg absorbiert. Aus der Amnionhöhle über das Amnion gelangt die Flüssigkeit in die fetalen Gefäße (*Gilbert et al. 1989 und 1997*). Andere Wege der Fruchtwasserabsorption wurden untersucht und es wurde festgestellt, dass sie nicht wichtig sind für die Absorption aus der Amnionhöhle. Vor allem der transmembranöse Fluss (aus dem

Fruchtwasser ins mütterliche Blut) ist im Vergleich zum intramembranösen Fluss sehr gering (Anderson et al. 1988 und 1990).

Abb. 1.9.2: Wasserzirkulation zwischen Fetus und Fruchtwasser (nach Beall et al. 2007)



## 2. Probanden und Methoden

### 2.1 Probanden, Blutentnahme und Gewinnung von Fruchtwasser

Für diese Arbeit wurden Blut und Fruchtwasserproben bei Schwangeren entnommen, bei denen eine Amniocentese ohnehin indiziert war, um Chromosomenanomalien oder Neuralrohrdefekte auszuschließen. Die Amniocentese wird bei Schwangeren, die älter als 35 Jahre sind, empfohlen, da mit steigendem mütterlichem Alter die Inzidenz für Chromosomenanomalien, wie z.B. Trisomie 21, ansteigt. Weitere Indikationen für eine Amniocentese sind Ultraschallauffälligkeiten, mütterliche Angst und pathologisches Ersttrimesterscreening. Die meisten Fruchtwasseruntersuchungen finden aus medizinischen Gründen in der 16. oder 17. SSW statt. Spätere Eingriffe werden meist nur bei Verdacht auf Pathologien durchgeführt. Die Risiken der Amniocentese werden durch die Abnahme von 2 ml Fruchtwasser für diese Studie nicht beeinflusst. Ausschlusskriterien waren Zwillings- bzw. Mehrlingsschwangerschaften, ektopische Schwangerschaften, intrauteriner Fruchttod, Typ 1 Diabetes, bakterielle oder virale Infektionen.

Nach entsprechendem Antrag erteilte die Ethikkommission die Erlaubnis zur Durchführung der Studie. Die Probandinnen wurden über den Inhalt der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Im Zeitraum September 2006 bis September 2007 konnten wir 104 Probandinnen in die Studie aufnehmen. Anamnestisch erfassten wir noch folgende Daten anhand eines Fragebogens (s. Anlage Kap. 6.2): mütterliches Alter, Anzahl der Schwangerschaften, Lebendgeburten und Fehlgeburten, Schwangerschaftskomplikationen, Begleiterkrankungen, Medikation und perikonzeptionelle Folat- oder Vitamin B12-Einnahme. Das Gestationsalter wurde ermittelt anhand des Datums der letzten Menstruationsblutung und des Ultraschalls in der Frühschwangerschaft.

Bei der Amniocentese werden 2 ml Fruchtwasser abgenommen und für diese Studie verwendet. Das Fruchtwasser wird direkt nach Abnahme in Kühlbehältern aufbewahrt. Unmittelbar nach der Fruchtwasserpunktion wird den Patientinnen im Liegen *lege artis* Blut abgenommen (eine 10 ml Serummonovette und zwei 2,7 ml EDTA-Monovetten) und ebenfalls auf Eis zwischengelagert. Sowohl Fruchtwasser als auch Blut wurden innerhalb von 30 min nach Entnahme zentrifugiert (10 min bei 4000 rpm, bei 10°C). Danach wurden Serum, EDTA-Plasma und Fruchtwasser in 1,5 ml Gefäße aliquotiert. Für die SAH- und die SAM-Bestimmung wurden je ein 500 µl Aliquot EDTA-Plasma und Fruchtwasser mit 50 µl 1mol/l Essigsäure angesäuert. Die Proben wurden bis zur Analytik bei -80°C gelagert.

## 2.2 Blut und Fruchtwasser Analytik

### HCY-, Cys-, und MMA-Bestimmung mit Hilfe von Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GCMS)

Das GCMS System besteht aus einem HP 6890 Gaschromatographen mit Autosampler und Split-Einlass, einem HP 5973 Massenspektrometer (mit Ionenquelle, Quadrupol-Massenfilter und Detektor) und einer ChemStation für die Steuerung und Ergebnisauswertung. Der Gaschromatograph besteht aus einem Ofen, in dem die Gaschromatographie-Säule beheizt wird. Die GC-Säule ist über ein Interface mit dem Massenspektrometer verbunden. Das Massenspektrometer wird mithilfe einer Vorvakuumpumpe und einer Hochvakuumpumpe (Turbomolekularpumpe) auf einen Druck von 1,3 mPa evakuiert. Das Hochvakuum im Massenspektrometer sorgt für kollisionsfreie Ionenbahnen, erzeugt eine mittlere freie Weglänge, die mindestens so groß wie der Abstand zwischen Ionenquelle und Detektor sein muss, verhindert elektrische Entladungen und erhöht die Nachweisempfindlichkeit.

Im Massenspektrometer werden die über das Interface aus dem Gaschromatographen austretenden Moleküle mit Elektronen mit einer Energie von 70 eV beschossen. Aufgrund der Elektro-Ektrowechselwirkungen verlieren die Moleküle das ankommende und ein gebundenes Elektron (Elektronen-Ionisation). Das entstehende Ion ist in der Regel einfach positiv geladen, es treten jedoch auch Ionen mit anderen Ladungen auf. Die Ionisations-Ausbeute liegt nur bei 0,01%. Die molekularen Ionen fragmentieren in kleinere Teilchen. Die Masse und die Intensität der einzelnen Fragmente erlauben genaue Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Ausgangsmoleküle.

Auf dem Weg zum Detektor müssen die Ionen einen Quadrupol-Massenfilter passieren. Die Bewegung eines Ions, das zwischen die Quadrupolstäbe eintritt, wird bestimmt durch die elektrischen Felder der vorliegenden Gleich- und Hochfrequenz-Spannungen. Nur die Ionen mit einem bestimmten Massen/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) oszillieren im Massenfilter konstant, erreichen den Ausgang des Massenfilters und werden vom Elektronen-Multiplier detektiert. Durch den Elektronen-Multiplier wird eine Signalverstärkung um den Faktor  $10^5$  erzielt.

Die verwendete GCMS Methode für die Bestimmung des Homocysteins und Cystathionins lehnt sich an die von *Stabler* beschriebenen GCMS Methoden an (*Stabler et al. 1988*).

Die verwendete Methode für die MMA-Bestimmung geht auf die von *Allen* beschriebene GCMS-Methode zurück (*Allen et al. 1993*). Die Ionenfragmente des silylierten Homocysteins (Retentionszeit ca. 13 min) haben die folgenden Masse/Ladungsverhältnisse: 420; 424 (für den deuterierten internen Standard). Die Ionenfragmente des silylierten Cystathionins (Retentionszeit ca. 17 min) haben die folgenden Masse/Ladungsverhältnisse: 362; 366 (für den deuterierten internen Standard). Die Ionenfragmente der silylierten MMA (Retentionszeit ca. 10 min) haben die folgenden Masse/Ladungsverhältnisse: 289; 292 (für den deuterierten internen Standard).

### Probenvorbereitung für die HCY- und Cys-Bestimmung

In nummerierte Glasgefäße (1-20) wird 1 ml Wasser für die Chromatographie gegeben.

Für die Serumbestimmung werden hinzugegeben: 200 µl Patientenserum (bzw. Kontrolle), 15 µl interner deuterierter Cystathionin-D<sub>4</sub>-Standard (8,27 µmol/l), 10 µl Homocystein-D<sub>4</sub>-Standard (392 µmol/l) und 30 µl einer frisch angesetzten Dithiotreitol-Lösung (10 mg Dithiotreitol in 1 ml 1M NaOH lösen).

Für die Fruchtwasserbestimmung werden hinzugegeben: 200 µl Fruchtwasser (bzw. Kontrolle), 50 µl interner deuterierter Cystathionin-D<sub>4</sub>-Standard (8,27 µmol/l), 20 µl Homocystein-D<sub>4</sub>-Standard (392 µmol/l) 1:20 vorverdünnt und 30 µl einer frisch angesetzten Dithiotreitol-Lösung (10 mg Dithiotreitol in 1 ml 1N NaOH lösen).

Jeweils gut mischen. Für die Reduktion werden die Proben 30 min bei 42°C inkubiert.

Vorbereitung des Anionenaustauscher-Harzes für die Festphasenextraktion:

Zunächst wird eine bestimmte Menge des trockenen Anionenaustauscher-Harzes (AG MP-1M, mesh 100-200 Fa. Bio-Rad) abgewogen und in einem gleich großen Volumen 1 M HCl gewaschen. Anschließend wird das Anionenaustauscher-Harz mit dem gleichen Volumen Methanol gewaschen und danach bei 60°C über mindestens 3h getrocknet. Die nummerierten Chromatographiesäulen werden mit jeweils 100 mg des getrockneten Anionenaustauscher-Harzes gefüllt. Im Anschluss werden die gefüllten Säulen mit 1 ml Methanol und anschließend mit 3 ml Wasser für die Chromatographie gewaschen.

Anionen-Austausch-Festphasenextraktion:

Nach der Reduktion wird die gesamte Probe mit Hilfe einer Pasteur-Pipette auf die vorbereitete Chromatographiesäule pipettiert. Nun wird die Säule zunächst dreimal jeweils mit 3 ml Wasser für die Chromatographie und schließlich einmal mit 3 ml Methanol gewaschen. Für die Elution werden 1,1 ml 0,4 M Essigsäure-Methanol-Lösung (10 ml 4 M Essigsäure mit 90 ml Methanol mischen) auf die Säule pipettiert und das Eluat unter der Säule in einem entsprechend nummerierten Glasgefäß aufgefangen. Die auf diese Weise gewonnenen Proben werden in einem Eppendorf-Konzentrator bei 60°C vollständig getrocknet. Das Eindampfen dauert in der Regel 3-4 Stunden in Abhängigkeit von der Probenanzahl.

Für die Derivatisierung werden auf die getrockneten Proben jeweils 20 µl Acetonitril und 10 µl MTBDSFA (N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid) pipettiert. Die Proben werden gut gemischt und anschließend im Mikrowellen-Herd 5 min bei 440 W erhitzt.

### Probenvorbereitung für die Methylmalonsäure-Bestimmung

In die beschrifteten Glasgefäße wird 1 ml Wasser für die Chromatographie pipettiert.

Für die Serumbestimmung werden hinzugegeben: 200 µl Patientenserum (bzw. Kontrolle) und 15 µl interner deuterierter MMA-Standard (MMA-D<sub>4</sub> 1635 nmol/l).

Für die Fruchtwasserbestimmung werden hinzugegeben: 100 µl Fruchtwasser und 10 µl interner deuterierter MMA-Standard (MMA-D<sub>4</sub> 1635 nmol/l). Jeweils gut mischen.

Die Proben werden mit Hilfe von Pasteurpipetten auf die vorbereiteten Säulen pipettiert (Vorbereitung der Chromatographie-Säulen s. oben). Danach wird die Säule zunächst einmal mit 3 ml Wasser und dann dreimal mit 3 ml 0,01 M Essigsäure in Methanol (12,5 ml 0,4 M Essigsäure mit 487,5 ml Methanol mischen). Die Elution erfolgt durch Zugabe von 1,1 ml einer Essigsäure/Salzsäure-Lösung (90 ml 4 M Essigsäure mit 10 ml 1 M HCl mischen). Das Eluat wird unter der Säule in einem entsprechend nummerierten Glasgefäß aufgefangen. Die auf diese Weise gewonnenen Proben werden in einem Eppendorf-Konzentrator bei 60°C vollständig getrocknet. Das Eindampfen dauert in der Regel 3-4 Stunden in Abhängigkeit von der Probenanzahl.

Für die Derivatisierung werden auf die getrockneten Proben jeweils 20 µl Acetonitril und 10 µl MTBDSFA (N-Methyl-N-tert.-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid) pipettiert. Die Proben werden gut gemischt und anschließend im Mikrowellen-Herd 5 min bei 440 W erhitzt.

### Messung, Auswertung und Geräteeinstellungen

Für die Bestimmung von Homocystein, Cystathionin und MMA wird eine HP 5 MS 5% Phenylmethylsiloxan Säule mit 30 m Länge (250 µm innerer Durchmesser und 0,25 µm Beschichtungsdicke) verwendet. Als Trägergas wird Helium mit einem Einlassdruck von 64,9 kPa verwendet.

#### Geräteeinstellungen für Homocystein und Cystathionin:

Ofentemperatur: Minimum 80°C, Maximum 310°C

Einlasstemperatur: 230°C

Injektionsvolumen: 1 µl

Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min

Homocystein und Cystathionin werden in einem Lauf gemessen. Für die Bestimmung der MMA sind andere Geräteeinstellungen erforderlich. Der Autosampler wird mit den derivatisierten Proben bestückt und die Messung gestartet. Die Proben werden vollautomatisch nacheinander injiziert, chromatographiert und im Massenspektrometer analysiert. Wenn der Probenlauf beendet ist, wird eine Auswertung der aufgezeichneten Massenspektrogramme vorgenommen. Die Peakfläche der jeweiligen Fragmente verhält sich proportional zur

Konzentration der entsprechenden Analyten. Mithilfe der bekannten Konzentration des internen deuterierten Standards und der entsprechenden Peakfläche kann die Konzentration des entsprechenden Analyten berechnet werden.

Für die Quantifizierung wurden die Peaks der Fragmente herangezogen:

Homocystein:	420 und 424 (interner Standard)
Cystathionin:	362 und 366 (interner Standard)
MMA:	289 und 292 (interner Standard)

Die Analytkonzentration wird mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Analytkonzentration} = \text{Konzentration}_{\text{Standard}} \times \left[ \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Analyt}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Standard}}} \right]$$

Bei jedem Probenlauf wurde zur Qualitätskontrolle ein Poolserum mitgemessen und es wurden CV% (coefficient of variation)-Werte ermittelt. Zwischen den Messungsdurchläufen ergaben sich folgende CV%-Werte:

HCY	(Level: 12 µmol/l)	4%
Cys	(Level: 560 nmol/l)	4,3%
MMA	(Level: 300 nmol/l)	5%

### **Bestimmung von S-Adenosylhomocystein und S-Adenosylmethionin mit Hilfe von LCMS-MS**

Um SAH und SAM selektiv zu messen, wurde eine modifizierte Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Methode für verdünnte stabile Isotope (stable-isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method) nach Gellekink et al. angewendet (Gellekink et al. 2005).

#### **Festphasenextraktion (Solid-phase extraction (SPE))**

SPE-Säulen (Varian inc.), welche Phenylboronsäure enthalten, die bei einem pH von 7-8 cis-diol-Gruppen binden, wurden beschriftet und in Auffanggefäße gestellt. Die Säulen wurden vorbehandelt, indem fünf mal 1 ml mobile Phase (Essigsäure gelöst in Wasser bidest. pH 2,636) und fünf mal 1 ml 20 mM Ammoniumacetat (pH 7,42) hinzugefügt wurde. Nach jeder Hinzugabe wurden die Säulen bei 500 g für 1 min bei 8°C zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R Eppendorf, Hamburg, Germany) und das durchgelaufene Volumen entfernt, um die SPE-Säulen vor Verschmutzung zu schützen.

### Probenvorbereitung

Für die SAH/SAM-Bestimmung wurden bei Abnahme der Proben je ein 500 µl Aliquot EDTA-Plasma und Fruchtwasser mit 50 µl 1 mol/l Essigsäure angesäuert. Vor dem Auftragen der Proben auf die SPE-Säulen wurden 500 µl Plasma mit 50 µl 1 M Ammoniak bzw. 200 µl Fruchtwasser mit 20 µl 1 M Ammoniak neutralisiert (Ziel-pH: 7,4-7,5). Es wurde jeweils 25 µl interner Standard hinzugegeben (3 mM für  $^2\text{H}_3\text{-SAM}$  und 0,8 mM für  $^{13}\text{C}_5\text{-SAH}$ ). Bei den Fruchtwasserproben wurde zum Volumenausgleich noch 200 µl des Ammoniumacetatpuffers hinzugegeben.

### Herstellung der Kalibratoren

Kalibratoren für SAH und SAM und zwei Kontrollen wurden in jedem Probendurchlauf analysiert. Die Kalibratoren wurden hergestellt, indem die Stocklösungen mit Ammoniumacetatpuffer (7,42) zu bestimmten Konzentrationen verdünnt wurden. Nach Probeversuchen stellten wir fest, dass sich die Konzentrationen für SAH und SAM in Plasma und Fruchtwasser deutlich unterschieden, sodass verschiedene Kalibratorreihen benutzt werden mussten. Für Plasma wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 0, 25, 50, 100, 200 nM für SAM und 0, 6, 12, 24, 48 nM für SAH. Für Fruchtwasser wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 0, 50, 100, 200, 300 nM für SAM und 0, 25, 50, 100, 250 nM für SAH. Als Qualitätskontrolle wurden für jeden Probendurchlauf noch eine high-level und eine low-level-Kontrolle analysiert. Für Plasma wählten wir Konzentrationen von 160 nM SAM und 32 nM SAH (high-level), sowie 40 nM SAM und 8 nM SAH (low-level). Für die Fruchtwasserproben wurden 250 nM SAM und 200 nM SAH (high-level), sowie 75 nM SAM und 40 nM SAH (low-level). Für jeden Kalibrator wurde ein Volumen von 500 µl Kalibrator, 25 µl interner Standard und 50 µl Ammoniumacetatpuffer als Volumenausgleich benutzt.

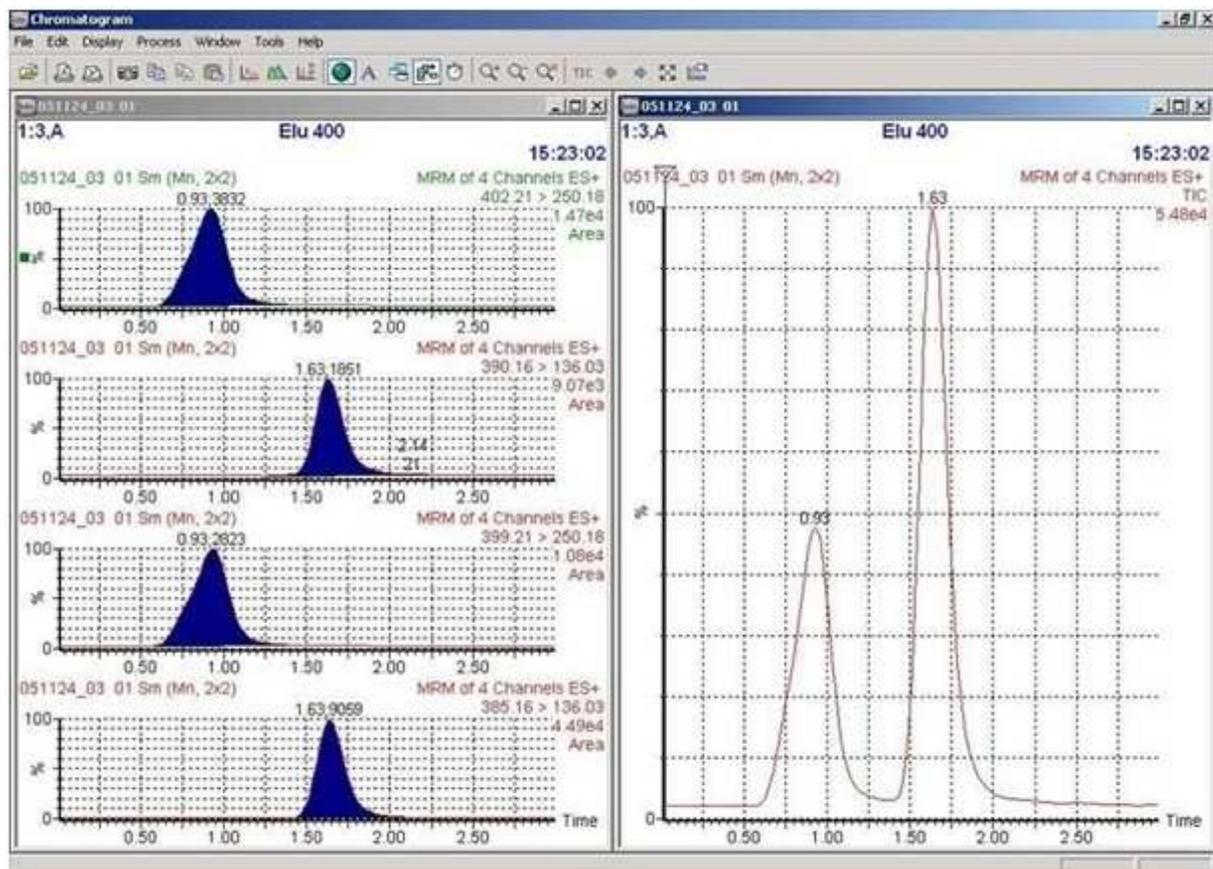
Die Proben und Kalibratoren wurden dann auf die SPE-Säulen aufgetragen, damit diese SAM, SAH und deren interne Standards (3 mM für  $^2\text{H}_3\text{-SAM}$  und 0,8 mM für  $^{13}\text{C}_5\text{-SAH}$ ) binden. Es wurde einmal 2 min bei 250 g mit langsamem Start zentrifugiert und dann noch zweimal mit je 1 ml Acetatpuffer (pH 7,42) für 1 min bei 500 g, um wasserlösliche Verunreinigungen zu entfernen. SAH und SAM wurden dreimal mit je 350 µl mobiler Phase (pH 2,636), durch jeweils zweiminütige Zentrifugation bei 250 g, eluiert. Nach der Festphasenextraktion wurden die Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Messung gelagert.

### HPLC und Tandem-Massenspektrometer-Messung

SAH und SAM wurden gemessen mit Hilfe eines Waters Alliance HT 2795 HPLC System mit einem Micromass Quattro Micro API Tandem Massenspektrometer. Der Fluss wurde auf eine Geschwindigkeit von 0,3 ml/min eingestellt. Es wurde ein Probenvolumen von 20 µl

injiziert. Die Proben wurden injiziert mit einer geeigneten Symmetry Shield RP18 Sicherheitssäule 3,5  $\mu\text{m}$ , 2,1x10 mm auf eine ausgeglichene (mobile Phase) Symmetry Shield RP18 Säule 3,5  $\mu\text{m}$ , 2,1x100 mm, welche die Injektion des vollen Probenvolumens in die Elektrospray-Injektionskammer erlaubt. Die Retentionszeit für SAM beträgt 1,0 min, für SAH 1,8 min. Die SAH- und SAM-Konzentrationen wurden mit Hilfe des LC-ESI-MS/MS mit dem Micromass Quattro LC (Waters) im Positiv-Ionen-Modus (ESI+) gemessen. Für diese vier Kanäle wurden die optimalen Kontrollbedingungen für Mehrfachreaktionen eingestellt: SAM (m/z 399-250),  $^2\text{H}_3$ -SAM (m/z 402-250), SAH (m/z 385-136),  $^{13}\text{C}_5$ -SAH (m/z 390-136). Die Laufzeit betrug 3min pro Analyse. Der CV%-Wert der Methode für SAH und SAM lag bei  $< 7\%$ .

Abb. 2.1 Beispielchromatogramme SAH und SAM inkl. Interner Standards



### Folatbestimmung

Die Bestimmung des Folats am Advia Centaur (Fa. Bayer Diagnostics®) beruht auf einem kompetitiven Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz. Zur Freisetzung des Folats aus endogenen Bindungsproteinen in der Probe wird die Probe mit einem Freisetzungsreagenz vorbehandelt. Das Folat in der Patientenprobe konkurriert mit dem mit Acridiniumester-markierten Folat im Reagenz um eine begrenzte Menge folatbindender Proteine, die kovalent an paramagnetische Partikel gebunden sind. Schließlich

werden die paramagnetischen Partikel gewaschen und mit einem Reagenz behandelt, das mit Acridiniumester zu einer chemiluminometrischen Reaktion führt, bei welcher Licht entsteht. Die Lichtintensität verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Folatkonzentration der Probe. Der CV%-Wert der Methode für die Folatbestimmung lag bei 14%.

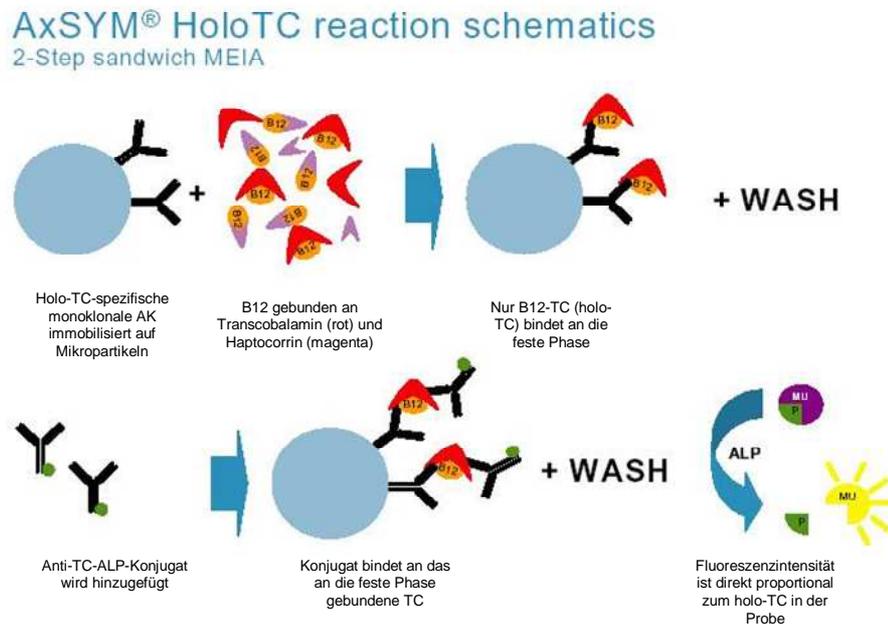
### **Vitamin B12 Bestimmung**

Bei der Vitamin B12 Bestimmung am Advia Centaur (Fa. Bayer Diagnostics®) handelt es sich um einen kompetitiven Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz. Zur Freisetzung des Vitamin B12 aus endogenen Bindungsproteinen wird die Probe mit Natriumhydroxid und DTT vorbehandelt. Vitamin B12 in der Patientenprobe konkurriert mit dem mit Acridiniumester-markierten Vitamin B12 im Reagenz um eine begrenzte Menge an gereinigtem Intrinsic Factor, der kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist. Schließlich werden die paramagnetischen Partikel gewaschen. Durch Zugabe eines Startreagenz wird die Chemilumineszenz-Reaktion gestartet. Zwischen der Vitamin B12-Konzentration und den detektierten relativen Lichteinheiten besteht ein umgekehrt proportionales Verhältnis. Der CV%-Wert der Methode für die Vitamin B12-Bestimmung lag bei 9%.

### **Holo-TC-Bestimmung**

Holo-TC wurde mit dem AxSYM-Assay® der Firma Abbott bestimmt. AxSYM beruht auf der Methode des 2-Step-Sandwich Mikropartikel-Enzymimmunoassays (MEIA) (Abb. 2.2). Zu holo-TC-spezifischen monoklonalen Mausantikörpern, die an Latexmikropartikeln immobilisiert sind, wird die Probe hinzugegeben. In der Probe liegt Vitamin B12 an Haptocorrin und an Transcobalamin gebunden vor. Nur das an Transcobalamin gebundene Vitamin B12 (holo-TC) wird an die feste Phase gebunden und bildet Antigen-Anti-körperkomplexe. Die Suspension wird auf Glasfibrermatrix gebracht und gewaschen, um ungebundene Anteile zu entfernen. Als zweiter Schritt wird ein Konjugat aus anti-Transcobalamin Antikörpern und alkalischer Phosphatase hinzugegeben. Das Konjugat bindet an das Transcobalamin, das schon an die feste Phase gebunden ist. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Das Substrat, 4-Methylumbelliferyl-Phosphat, wird auf die Matrixzelle gegeben. Das mit alkalischer Phosphatase markierte Konjugat katalysiert die Abspaltung einer Phosphatgruppe vom Substrat. Es entsteht das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur holo-TC-Konzentration in der Probe. Das fluoreszierende Produkt wird mit dem optischen Messsystem für MEIA gemessen. Der CV%-Wert der Methode für die holo-TC-Bestimmung lag bei 10%.

Abb. 2.2: MEIA (nach Brady et al.)



### Vitamin B6-Bestimmung

Vitamin B6 wurde im Serum und im Fruchtwasser gleichermaßen mit Hilfe eines Kits (Fa. Immundiagnostik®) an der Gynkotec HPLC bestimmt. Die Zusammensetzung von Laufmittel, Derivatisierungs- und Fällungsreagenz wird von der Fa. Immundiagnostik nicht bekannt gegeben. Das HPLC-Verfahren ist isokratisch (konstante Zusammensetzung des Lösungsmittels). Die Komponenten des HPLC-Systems sind: Probengeber, Pumpe (Gynkotec Modell 480), Säulenofen mit ODS-Hypersil Säule (reverse phase; 5 µm; 150 mm x 4 mm), der Fluoreszenzdetektor RF-10AXL (Fa. Shimadzu) und der PC mit der Software für die Steuerung und die Auswertung. Der CV%-Wert der Methode für die Vitamin B6-Bestimmung lag bei 10%.

### Bestimmung von Albumin und Gesamtprotein

Albumin und Gesamtprotein wurden sowohl im Fruchtwasser als auch im Serum mit Reagenzien der Firma Roche am Hitachi 917 gemäß der Vorschrift der Firma Roche gemessen.

#### Testprinzip Albumin:

Die Bestimmung des Albumins beruht auf einem Farbttest mit Endpunktmethode. Nach Zugabe von Puffer und Substrat zur Probe wird die Reaktion gestartet. Albumin weist bei

einem pH-Wert von 4,1 einen ausreichenden kationischen Charakter auf, um eine Bindung mit dem Anionenfarbstoff Bromcresolgrün (BCG) einzugehen. Es bildet sich ein blaugrüner Komplex. Die Farbintensität der blaugrünen Farbe ist direkt proportional zu der Albuminkonzentration und wird photometrisch gemessen. Der CV%-Wert der Methode für die Albuminbestimmung lag bei 6%.

Testprinzip Gesamtprotein:

Das Prinzip der Gesamtproteinbestimmung beruht auf einem Farbttest. Zur Probe werden Leerwertreagenz und Biuretreakenz hinzugegeben und die Reaktion gestartet. Zweiwertiges Kupfer reagiert in alkalischer Lösung mit der Peptidbindung der Proteine zum charakteristischen purpurfarbenen Biuretkomplex. Mit Natrium-Kalium-Tartrat wird die Ausfällung von Kupferhydroxid und mit Kaliumiodid die Autoreduktion des Kupfers verhindert. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Proteinkonzentration und wird photometrisch gemessen. Der CV%-Wert der Methode für die Gesamtproteinbestimmung lag bei 3%.

### 2.3 Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Geräte

Reagenz	Firma
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Ammoniak	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Biosolve, Heimberg
AG MP-1M-Anionenaustauscherharz	Bio-Rad, München
1,4-Dithiotreitol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D,L-(2-Amino-2-Carboxyethyl)-Homocystein-3,3,4,4-D <sub>4</sub>	CDN Isotopes, Kanada
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Folat Reagenz	Bayer Diagnostics, Fernwald
Gesamtprotein Reagenz, Kalibrator	Roche, Mannheim
Albumin Reagenz, Kalibrator	Roche, Mannheim
Homocystein-3,3,4,4-D <sub>4</sub>	CDN Isotopes, Canada
DL-Homocystein-3,3,3',3',4,4,4',4'-D <sub>8</sub>	Cambridge Isotope Laboratories, USA
DL-(2-Amino-2-Carboxyethyl)-Homocystein-3,3,4,4-D <sub>4</sub> (=Cystathionin-D <sub>4</sub> )	CDN Isotopes, Canada
MBDSTFA	Machery und Nagel, Düren
Methanol für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Methyl-d <sub>3</sub> -Malonsäure	CDN Isotopes, Canada
Vitamin B6 HPLC-Kit	Immundiagnostik, Bensheim
Vitamin B12 Reagenz, Kalibrator	Bayer Diagnostics, Fernwald
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
S-Adenosyl-L-Homocystein	Sigma-Aldrich, USA
S-Adenosyl-L-Methionin-Chlorid	Sigma-Aldrich, USA
<sup>2</sup> H <sub>3</sub> -SAM	Dr. Ehrendorf GmbH, Augsburg
<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -SAH	VU Medical Center, Metabolic Laboratory, Amsterdam
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Poly-Prep Chromatographie Säulen	Bio-Rad, München
Glasgefäße	Glastechnik Gräfenroda GmbH
1,5 ml Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten, Serum, EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
SPE-Säulen	Varian inc.
ADVIA Centaur	Bayer Diagnostics, Fernwald
Analysenwaage ME215P	Sartorius, Göttingen
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Massenspektrometer HP 5973	Hewlett Packard, USA
Gaschromatograph HP 6890	Hewlett Packard, USA
Tischzentrifuge EBA 12	Hettich, Tuttlingen

Hitachi 917	Roche, Mannheim
HPLC Agilent 1100	Agilent, Böblingen
HPLC Fluoreszenzdetektor G1321A	Agilent, Böblingen
Fluoreszenzdetektor RF-10A XL	Shimadzu, Duisburg
Gynkotec HPLC	Dionex, Idstein
Gynkotec Pumpe Modell 480	Dionex, Idstein
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Robocycler Gradient 96	Stratagene, USA
Spannungsquelle EPS 500/400	Pharmacia, Freiburg
Vortex Genie 2	Scientific Industry, USA
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Germany
LCMS-MS	Waters, USA

## **2.4 Statistik**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Version 14.0 (SPSS Chicago, USA) durchgeführt.

Mit Hilfe von SPSS fertigten wir die Box-and-Whisker-Plots an. Zur Prüfung der nicht-parametrischen Korrelation von zwei Parametern wurde der Spearman-Rho-Test benutzt. Für den Vergleich der unverbundenen Stichproben verwendeten wir den U-Test nach Mann-Whitney oder den t-Test für verbundene Stichproben (Fruchtwasser/Serum). Bei Mehrfachvergleichen wurde Oneway ANOVA und Tamhane-T-Test angewendet.  $p \leq 0,05$  gilt als signifikant.

### 3. Ergebnisse

#### Übersicht über die Probandinnen und fetale Maße bei Anamnese

Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht über anamnestische Daten der Schwangeren sowie über fetale Maße bei Anamnese. Im Zeitraum August 2006 bis September 2007 konnten wir 104 schwangere Frauen in die Studie einschließen. Von ihnen waren 97 Schwangere mit intakter Einlingsschwangerschaft und unauffälligem Chromosomensatz. Bei 6 Probandinnen (5,8%) wurde mit Hilfe der Amniocentese eine Pathologie bei ihrem ungeborenen Kind diagnostiziert. Bei einer weiteren Probandin wurde postpartal eine Pathologie des Kindes diagnostiziert. Das Alter der Teilnehmerinnen betrug im Median 37 Jahre, das Gestationsalter im Median 16,7 SSW. Ein Anteil von 14,4% gab an, auch während der Schwangerschaft zu rauchen. Bei 91 Probandinnen (87,5%) war bekannt, dass sie schon vor Beginn der Schwangerschaft bzw. seit der Frühschwangerschaft Vitaminpräparate einnahmen. Es handelte sich um Präparate mit Folat (400-800 µg) und Vitamin B12 (3-3,5 µg) (z.B. Femibion®, Centrum Materna® etc.). Es erwarteten 52 der Probandinnen Mädchen und 51 Jungen, bei einer Probandin lag keine Chromosomenanalyse vor. Vor der Amniocentese wurden per Ultraschall die fetalen Maße ermittelt. Dazu gehören: Kopfumfang, abdominaler Transversaldurchmesser, Abdomenumfang, Femurlänge und geschätztes Gewicht. Das human-genetische Institut in Homburg/Saar ermittelte weiterhin den Alpha-Fetoprotein-Spiegel im Fruchtwasser (Median: 9 U/ml).

Tab. 3.1: Übersicht über die Probandinnen und fetale Maße bei Anamnese, n=104

	<b><u>Median (5-95%-Perzentile)</u></b>
Alter [Jahre]	37 (22-43)
Gestationsalter [SSW]	16,7 (15,5-23)
Größe [cm]	165 (156-177)
Gewicht vor SS [kg]	65 (49-99)
Gewicht bei Anamnese [kg]	67 (51-101)
<b><u>Fetale Maße</u></b>	
Kopfumfang [mm]	131 (118-204)
Abdominaler Transversaldurchmesser [mm]	34 (28-63)
Abdomenumfang [mm]	110 (97-178)
Femurlänge [mm]	22 (18-42)
Schätzwert [g]	187 (150-603)
Alpha-Fetoprotein im FW [U/ml]	9 (3,5-16,4)

### **Blut- und Fruchtwasserparameter der normalen Schwangerschaften**

Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über die Blut- und Fruchtwasserparameter der Schwangeren mit intakter Schwangerschaft. Der Median der HCY-Spiegel im Serum beträgt 4,9  $\mu\text{mol/l}$ . Der Folatspiegel beträgt im Serum im Median 49,6  $\text{nmol/l}$ . Vitamin B12 zeigt im Blut im Median eine Konzentration von 246  $\text{pmol/l}$ . Weitere Marker des Vitamin B12-Status sind holo-TC und MMA. Bei unserem Kollektiv lag der Median für holo-TC im Serum bei 40  $\text{pmol/l}$ . Der MMA-Spiegel im Serum zeigte einen Median von 146  $\text{nmol/l}$ . Der Median für Vitamin B6 beträgt im Blut 29,9  $\text{nmol/l}$ . SAH (Median: 7,6  $\text{nmol/l}$ ) und SAM (Median: 91  $\text{nmol/l}$ ) wurden im Plasma gemessen. Die SAM/SAH Ratio liegt im Plasma deutlich auf der Seite des SAM als Methylgruppendonator.

Im Fruchtwasser fallen niedrigere HCY-Spiegel (Median: 1,17  $\mu\text{mol/l}$ ) als im Serum auf. Cystathionin weist höhere Konzentrationen (Median: 1634  $\text{nmol/l}$ ) als im Serum auf. Die Konzentrationen von SAH (Median: 93  $\text{nmol/l}$ ) und SAM (Median: 100  $\text{nmol/l}$ ) im Fruchtwasser liegen recht eng beieinander, was im Plasma nicht der Fall war. Die SAM/SAH Ratio liegt nicht wie im Plasma deutlich auf Seite des SAM, sondern in einem Teil der Ergebnisse auf der Seite des Gegenspielers SAH (Median: 1,23). Der Median für den Folatspiegel war im Fruchtwasser 15,9  $\text{nmol/l}$ . Der Median für Vitamin B12 lag bei 370  $\text{pmol/l}$ . Für holo-TC ergab sich ein Median von 84  $\text{pmol/l}$ . Die MMA-Werte im Fruchtwasser waren höher als im Serum (Median 392  $\text{nmol/l}$ ). Die Vitamin B6-Konzentrationen weisen ein breites Spektrum auf. Im Fruchtwasser sind die Proteinkonzentrationen im Vergleich zum Serum erniedrigt, der Albuminanteil beträgt aber analog zum Serum ca. 60%.

Tab. 3.2: Blut- und Fruchtwasserparameter der normalen Schwangerschaften, n=97

	<u>Serum bzw. Plasma*</u>	<u>Fruchtwasser*</u>	<u>Quotient S bzw. P/FW#</u>
HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ]	4,9 (3,5-7,8)	1,17 (0,72-3,06)	4,19
Cys [ $\text{nmol/l}$ ]	111 (68-188)	1634 (682-4206)	0,07
MMA [ $\text{nmol/l}$ ]	146 (77-271)	392 (252-715)	0,37
SAH [ $\text{nmol/l}$ ]	7,6 (4,4-14,6)	93 (53-145)	0,08
SAM [ $\text{nmol/l}$ ]	91 (56-122)	109 (54-184)	0,83
SAM/SAH Ratio	11,9 (5,0-21,6)	1,23 (0,51-2,58)	9,67
Vitamin B12 [ $\text{pmol/l}$ ]	246 (154-488)	370 (101-1067)	0,66
Vitamin B6 [ $\text{nmol/l}$ ]	39,9 (11,0-133,9)	27,8 (6,2-153,0)	1,43
holo-TC [ $\text{pmol/l}$ ]	40 (22-90)	84 (9-175)	0,48
Folat [ $\text{nmol/l}$ ]	49,6 (15,1-145,3)	15,9 (8,9-34,4)	3,12
Albumin [ $\text{g/l}$ ]	41 (36-50)	3,8 (2,3-6,0)	10,79
Gesamtprotein [ $\text{g/l}$ ]	71 (63-90)	6,2 (4,3-9,1)	11,45

\*Median (5-95%-Perzentile); #Serum bzw. Plasma/Fruchtwasser

Tabelle 3.3 zeigt die Anzahl an Patientinnen, deren Werte außerhalb von gängigen Blutgrenzwerten lagen. Nur sehr wenige Probandinnen wiesen im Blut HCY-Spiegel  $> 8 \mu\text{mol/l}$  (4%), Cys-Spiegel  $> 300 \text{ nmol/l}$  (0%) oder MMA-Spiegel  $> 300 \text{ nmol/l}$  (2%) auf. Nur wenige (5%) wiesen im Blut einen Vitamin B12- ( $< 156 \text{ pmol/l}$ ) und niemand einen Folatmangel ( $< 7 \text{ nmol/l}$ ) auf. Für Vitamin B6 im Serum lagen 48 der Probandinnen unter der Grenze von  $40 \text{ nmol/l}$ . Für holo-TC lagen 30% der Werte unter der Grenze von  $35 \text{ pmol/l}$ .

Tab 3.3 Anzahl der Probandinnen die außerhalb von gängigen Serumgrenzwerten lagen

<b>Parameter (Grenzwert)</b>	<b>n</b>
HCY ( $>8 \mu\text{mol/l}$ )	4
Cys ( $>300 \text{ nmol/l}$ )	0
MMA ( $>300 \text{ nmol/l}$ )	2
Vitamin B12 ( $<156 \text{ pmol/l}$ )	5
Vitamin B6 ( $<40 \text{ nmol/l}$ )	48
Holo-TC ( $<35 \text{ pmol/l}$ )	30
Folat ( $<7 \text{ nmol/l}$ )	0

### **Serum- und Plasmaparameter der auffälligen Schwangerschaften**

Tabelle 3.4 zeigt die gemessenen Serum- bzw. Plasmawerte der pathologischen Schwangerschaften. Bei Probandin Nr. 1 (NTD) zeigen die mütterlichen Serumparameter Werte außerhalb des bei der gesunden Kontrollgruppe ermittelten Bereichs für Vitamin B12 und holo-TC. Die Werte für Folat und Vitamin B6 sind vergleichbar, aber eher niedrig verglichen mit der unauffälligen Gruppe. Bei Probandin 97 (Fetus mit NTD sakral, Arnold-Chiari-Malformation) zeigten sich als einzige Auffälligkeiten, verglichen mit der gesunden Gruppe, grenzwertig niedrige Vitamin B12- und holo-TC-Spiegel. Der Fetus von Probandin Nr. 2 hat eine Trisomie 21. Wie in der Tabelle zu sehen ist, zeigen die Blutwerte der Mutter einen Mangel an Folat, holo-TC und Vitamin B6. Der MMA-Wert liegt deutlich über dem für die unauffällige Gruppe ermittelten Bereich. Die HCY-Konzentration liegt im hochnormalen Bereich der Kontrollen. Bei Probandin 21 und 74 (beide Fetus mit Turner-Syndrom) liegen alle Blutwerte im bei der Kontrollgruppe ermittelten Normbereich. Bei Nr. 21 ist die holo-TC-Konzentration (32 pmol/l), bei jedoch normalem MMA, etwas niedrig im Vergleich mit der normalen Gruppe. Ähnliches zeigte sich bei Probandin 60 (Fetus mit Trisomie 18): alle Blutwerte lagen im Normbereich, holo-TC war etwas erniedrigt. Probandin Nummer 23 (Multipler Sulfatasemangel) zeigte Vitamin B12-Konzentrationen oberhalb des für die Kontrollgruppe ermittelten Bereichs.

Tab.3.4: Serum- bzw. Plasmaparameter der pathologischen Schwangerschaften

Fallnummer	<u>1</u>	<u>97</u>	<u>2</u>	<u>21</u>	<u>74</u>	<u>60</u>	<u>23</u>
Pathologie	NTD	NTD	Trisomie 21	Turner Syndrom	Turner Syndrom	Edwards Syndrom	Multipler Sulfatasemangel
Chromosomensatz	46XX	46XX	47XY+21	45X0	45X0/46XX	47XY+18	46 XY
Gestationsalter [SSW]	22,57	25	27,14	16,43	15,29	17,14	17,14
HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ] S	5,8	<b>3,3</b>	7,6	5,9	4,7	4,0	4,0
Cys [nmol/l] S	131	86	145	114	87	<b>43</b>	106
MMA [nmol/l] S	154	114	<b>426</b>	145	156	192	83
SAH [nmol/l] P	6,4	4,9	6,9	6,2	9,7	4,7	8,9
SAM [nmol/l] P	80,9	67,9	100,6	109,6	70,6	101,2	100,3
SAM/SAH Ratio	12,6	13,9	14,6	17,7	7,3	21,5	11,27
Folat [nmol/l] S	20,0	44,4	<b>14,8</b>	26,7	80,0	47,9	30,4
Vitamin B12 [pmol/l] S	<b>130</b>	157	225	295	339	266	<b>445</b>
Vitamin B6 [nmol/l] S	19,0	61,6	16,4	28,4	86,0	29,6	37,4
holo-TC [pmol/l] S	<b>19</b>	<b>31</b>	38	<b>32</b>	63	38	58,1
Albumin [g/l] S	43,7	38,3	36,8	40,3	43,1	37,5	50,3
Gesamtprotein [g/l] S	84,1	67,1	65,7	68,6	74,7	67,6	90

markiert: Werte außerhalb des bei der Gruppe der unauffälligen Schwangerschaften ermittelten 5-95%-Perzentilenbereichs, angepasst an Gestationsalter bzw. Werte außerhalb von gängigen Grenzwerten (s. Tab. 3.3).

### **Fruchtwasserparameter der auffälligen Schwangerschaften,**

In Tabelle 3.5 sind die gemessenen Fruchtwasserparameter der pathologischen Schwangerschaften aufgeführt. Bei Probandin 74 (Turner-Syndrom) fällt eine verschobene SAM/SAH Ratio (0,31) mit, im Vergleich zur Gruppe mit unauffälliger Schwangerschaft, sehr niedrigem SAM (44,1) und erhöhtem SAH (143,5) auf. Bei Probandin 1 (NTD) sind die Vitaminparameter Folat, Vitamin B12 und holo-TC, verglichen mit den Kontrollen, erniedrigt. Auch der Vitamin B6 Wert ist sehr niedrig und die HCY-Konzentration liegt deutlich außerhalb des Bereichs, der bei den gesunden Schwangeren ermittelt wurde. Bei Nummer 97 (NTD) zeigen sich ähnliche Tendenzen: die Vitamine und holo-TC liegen unterhalb des bei den unauffälligen Schwangerschaften ermittelten Bereichs. Es fällt eine niedrige Cystathionin-Konzentration auf. Bei Probandin 2 zeigt sich eine HCY-Konzentration, die weit über dem ermittelten Bereich der normalen Schwangerschaften liegt. Die Vitamin-Parameter liegen weitgehend im Normbereich, holo-TC liegt jedoch im sehr niedrigen Bereich. Bei Probandin 2 fällt weiterhin eine für Fruchtwasser ungewöhnlich hohe Albumin- und Proteinkonzentration sowie eine sehr niedrige holo-TC/Albumin Ratio auf. Bei Probandin 23 fanden wir im Fruchtwasser niedrige SAM-Konzentrationen und eine niedrige SAM/SAH-Ratio.

Tab.3.5: Fruchtwasserparameter der pathologischen Schwangerschaften

Fallnummer	<u>1</u>	<u>97</u>	<u>2</u>	<u>21</u>	<u>74</u>	<u>60</u>	<u>23</u>
Pathologie	NTD	NTD	Trisomie 21	Turner Syndrom	Turner Syndrom	Edwards Syndrom	Multipler Sulfatasemangel
Gestationsalter [SSW]	22,57	25	27,14	16,43	15,29	17,14	17,14
HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ]	<b>4,00</b>	2,4	<b>9,70</b>	<b>0,52</b>	1,21	0,88	<b>0,67</b>
Cys [nmol/l]	1973	<b>529</b>	<b>645</b>	714	1146	1491	1340
MMA [nmol/l]	535	.	609	393	329	530	357
SAH [nmol/l]	82,2	70,6	67,4	106,4	<b>143,5</b>	112,5	104
SAM [nmol/l]	119,6	149,7	67,6	101,8	<b>44,1</b>	64,2	<b>39,1</b>
SAM/SAH Ratio	1,45	2,12	1,00	0,96	<b>0,31</b>	<b>0,57</b>	<b>0,38</b>
Folat [nmol/l]	<b>5,7</b>	12,7	11,8	10,4	19,9	14,7	12,49
Vitamin B12 [pmol/l]	<b>31</b>	<b>50</b>	218	824	<b>1461</b>	367	862
Vitamin B6 [nmol/l]	<b>2,0</b>	7,71	<b>274,2</b>	25,6	<b>185,3</b>	23,5	<b>6,49</b>
holo-TC [pmol/l]	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>178</b>	<b>198</b>	98	113
Albumin [g/l]	4,8	4,9	<b>15,0</b>	3,7	<b>6,1</b>	<b>1,9</b>	2,6
Gesamtprotein [g/l]	8,5	8,1	<b>23,3</b>	5,8	<b>9</b>	<b>3,7</b>	4,6
holo-TC/Albumin-Ratio	1,46	1,83	0,87	48,1	32,5	54,4	43,46
HCY/Albumin-Ratio	0,83	0,49	0,65	0,14	0,2	0,46	0,26

markiert: auffällige Werte mit Orientierung am 5-95%-Perzentilenbereich der unauffälligen Schwangerschaften, angepasst an Gestationsalter

### Serum- und Plasmaparameter in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Tabelle 3.6 zeigt nur die Werte der Kontrollschwangerschaften. Um die Abhängigkeit der Variablen vom Gestationsalter zu untersuchen, bildeten wir zwei Gruppen: In die erste Gruppe wurden alle Probandinnen, die die Amniocentese bis zum rechnerischen Gestationsalter von 16,86 SSW (entspricht 16 Wochen + 6 Tage) hatten, integriert. In die zweite Gruppe wurden alle Schwangeren mit Amniocentese ab 17,00 SSW eingeordnet. Einzig bei der Folatkonzentration zeigten sich mit zunehmendem Schwangerschaftsalter niedrigere Konzentrationen ( $p=0,002$ ). Bei Vitamin B6 zeigten sich ähnliche Tendenzen, welche jedoch nicht signifikant waren. Bei HCY, Vitamin B12 und den anderen Metaboliten zeigte sich keine Veränderung.

Tab.3.6: Serum- bzw. Plasmaparameter in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Frauen mit normalem Schwangerschaftsausgang (n=97)

	<u>≤ 16,86 SSW</u> n=65 †	<u>&gt; 16,86 SSW</u> n=33 †	p*
Gestationsalter	16,43 (15,33-16,86)	17,43 (17,00-26,47)	-
HCY [μmol/l] S	4,90 (3,50-7,17)	5,00 (3,48-12,70)	0,748
Cys [nmol/l] S	111 (68-233)	110 (63-177)	0,799
MMA [nmol/l] S	147 (87-265)	137 (49-338)	0,723
SAH [nmol/l] P	7,50 (5,12-15,99)	7,80 (2,40-15,21)	0,600
SAM [nmol/l] P	91 (58-121)	90 (53-131)	0,831
SAM/SAH Ratio	11,9 (4,8-19,6)	11,5 (5,1-24,3)	0,953
Folat [nmol/l] S	60 (14-371)	38 (16-124)	0,002
Vitamin B12 [pmol/l] S	258 (180-602)	233 (140-429)	0,239
Vitamin B6 [nmol/l] S	52 (11-144)	34 (9-103)	0,085
holo-TC [pmol/l] S	44 (23-90)	38 (15-188)	0,143
Albumin [g/l] S	40 (36-55)	41 (36-51)	0,835
Gesamtprotein [g/l] S	72 (63-103)	70 (63-89)	0,669

\* nach Mann-Whitney-U; † Median (5-95%-Perzentile)

### Fruchtwasserparameter in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Analog zu Tabelle 3.6 wurden auch die Abhängigkeit der Fruchtwasserparameter. Hier konnten bei einigen Parametern signifikante Unterschiede der Konzentrationen abhängig vom Gestationsalter gezeigt werden: Folat und Vitamin B12 sowie holo-TC sind niedriger in ihrer Konzentration mit voranschreitender Schwangerschaft. Eine ähnliche, aber nicht signifikante Tendenz zeigt Vitamin B6. SAM als Methylierungsmarker ist mit zunehmendem Gestationsalter höher konzentriert. Mit Tendenz zur Signifikanz ( $p=0,051$ ) zeigen sich für HCY mit höherem Gestationsalter auch höhere Konzentrationen. Auch für MMA sind die Konzentrationen mit voranschreitender Schwangerschaft höher als in der Gruppe mit  $\leq 16$  SSW.

Tab.3.7: Fruchtwasserparameter in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Frauen mit normalem Schwangerschaftsausgang (n=97)

	<u><math>\leq 16,86</math> SSW</u> n=65 †	<u><math>&gt; 16,86</math> SSW</u> n=33 †	p*
Gestationsalter	16,43 (15,33-16,86)	17,43 (17,00-26,47)	-
HCY [ $\mu\text{mol/l}$ ]	1,15 (0,73-1,89)	1,29 (0,62-3,78)	0,051
Cys [nmol/l]	1634 (704-4209)	1651 (604-4596)	0,376
MMA [nmol/l]	374 (240-640)	456 (293-751)	0,053
SAH [nmol/l]	93,5 (45,6-143,2)	93,0 (61,2-159,3)	0,33
SAM [nmol/l]	106,4 (53,5-174,2)	123,2 (49,7-235,8)	0,006
SAM/SAH Ratio	1,16 (0,53-2,59)	1,29 (0,41-2,79)	0,232
Folat [nmol/l]	16,8 (9,1-40,4)	14,5 (5,1-33,4)	0,004
Vitamin B12 [pmol/l]	463 (112-1085)	247 (54-821)	0,004
Vitamin B6 [nmol/l]	31,6 (7,0-115,7)	13,4 (4,6-223,8)	0,063
holo-TC [pmol/l]	94,0 (9,2-218,6)	51,0 (6,6-166,4)	0,001
Albumin [g/l]	3,6 (2,2-5,7)	4,1 (2,6-11,7)	
Gesamtprotein [g/l]	6,1 (4,1-8,9)	6,8 (4,4-17,4)	0,669

\*nach Mann-Whitney-U; † Median (5-95%-Perzentile)

### Vergleich der Blut- mit den Fruchtwasserparametern der normalen Schwangerschaften

In dieser Tabelle sind nur Probandinnen mit normalem Schwangerschaftsausgang eingeschlossen. Die HCY-Konzentration im Fruchtwasser ist niedriger als im Serum, die einzelnen Werte korrelieren stark positiv miteinander. Die Konzentrationen für Cystathionin im Fruchtwasser sind mehr als zehnfach höher als im Serum und die Werte zeigen nur eine sehr schwache Korrelation untereinander. Die Marker des Cobalaminstatus Gesamt-Vitamin B12 und holo-TC sind im Fruchtwasser höher als im Serum und zeigen eine mittelstarke positive Korrelation. Auch MMA ist im Vergleich zum Serum im Fruchtwasser erhöht und die einzelnen Werte zeigen eine schwache positive Korrelation. Folat zeigt im Vergleich zu den Vitamin B12-Markern ein inverses Verhalten: Im Fruchtwasser sind die Konzentrationen signifikant niedriger als im Serum. Die Werte in den beiden Medien zeigen ebenfalls eine mittelstarke positive Korrelation. Ähnliches gilt für Vitamin B6. Sowohl SAH als auch SAM weisen im Fruchtwasser höhere Konzentrationen auf als im Plasma. Der Unterschied fällt jedoch für SAH viel deutlicher aus als für SAM, was sich auch in der Ratio niederschlägt. Diese ist im Median um das 9,7-fache niedriger als im Serum. Alle drei Marker weisen im Vergleich Serum-Fruchtwasser keine Korrelation auf.

Tab.3.8: Vergleich der Parameter in Serum/Plasma und Fruchtwasser bei Frauen mit normalem Schwangerschaftsausgang (n=97)

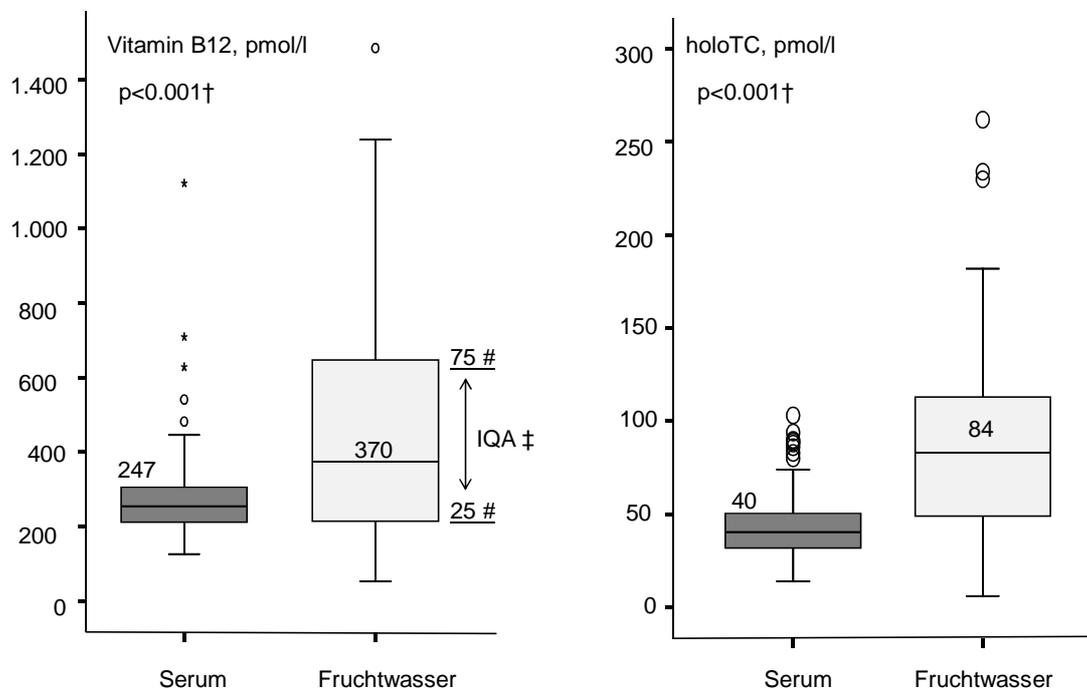
Marker	<u>Blut</u> *	<u>Fruchtwasser</u> *	<u>Tendenz</u> ‡	<u>p #</u>	<u>r †</u>
HCY [µmol/l]	4,9	1,17	↓	<0,001	0,61
Cys [nmol/l]	111	1634	↑↑	<0,001	0,27
MMA [nmol/l]	146	392	↑	<0,001	0,39
SAH [nmol/l]	7,6	93	↑↑	<0,001	n.s.
SAM [nmol/l]	91	109	↑	<0,001	n.s.
SAM/SAH Ratio	11,9	1,23	↓↓	<0,001	n.s.
holo-TC [pmol/l]	40	84	↑↑	<0,001	0,46
Vitamin B12 [pmol/l]	247	370	↑	<0,001	0,50
Folat [nmol/l]	50	16	↓↓	<0,001	0,50
Vitamin B6 [nmol/l]	40	28	↓	<0,001	0,33
Albumin [g/l]	41	3,8	↓↓	<0,001	n.s.
Gesamtprotein [g/l]	71	6,2	↓↓	<0,001	n.s.

\*Median; ‡ im Fruchtwasser im Vergleich zum Serum; # nach t-Test für verbundene Stichproben; † Korrelationskoeffizient nach Spearman-Test zwischen Blut- und Fruchtwasserparametern; n.s.= nicht signifikant

### Vitamin B12 und holo-TC in Fruchtwasser und Serum

Abbildung 3.1 zeigt Box-und-Whisker-Plots für Vitamin B12 und holo-TC verglichen in Serum und Fruchtwasser. Auf sehr hohem Signifikanzniveau kann für beide Marker im Fruchtwasser eine höhere Konzentration als im Serum gezeigt werden. Für Vitamin B12 zeigen die Werte eine viel größere Spannweite als im Serum. Der Interquartilsabstand (75%-Perz.-25%-Perz.) für Vitamin B12 beträgt im Serum 96 pmol/l und im Fruchtwasser 436 pmol/l. Für holo-TC zeigt sich Ähnliches: Der Interquartilsabstand ist im Fruchtwasser deutlich größer als im Serum. Maximum und Minimum als Extremwerte liegen für holo-TC im Fruchtwasser nicht weiter auseinander als im Serum (s. Tab 3.9).

Abb.3.1: Vitamin B12 und holo-TC verglichen in Serum und Fruchtwasser, n=97



† nach t-Test für verbundene Stichproben; ‡ IQA=Interquartilsabstand; # 25%- bzw. 75%-Perzentile

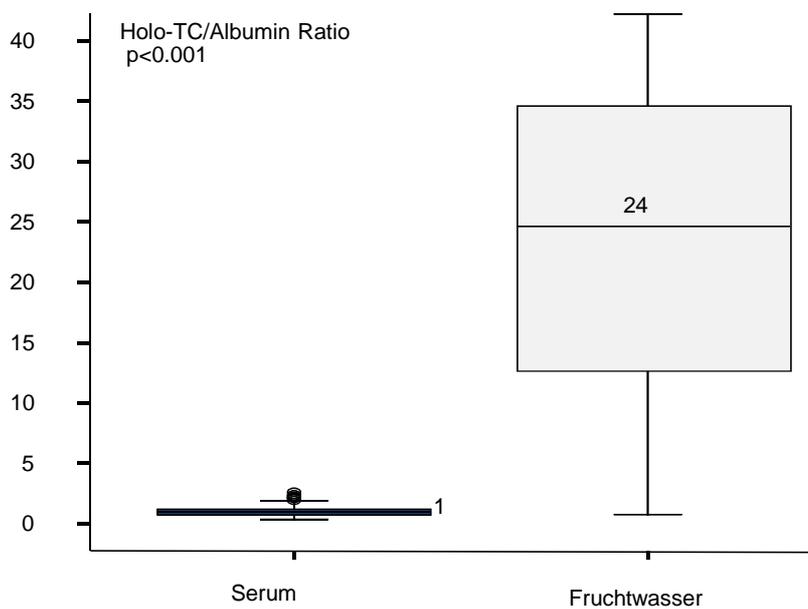
Tab. 3.9 Eckdaten für Vitamin B12 und holo-TC, n=97

Marker	<u>Vitamin B12 [pmol/l]</u>		<u>holo-TC [pmol/l]</u>	
	Serum	FW #	Serum	FW #
Minimum	125	53	14	6
Maximum	1118	1481	422	262
25%-Perz.	208	209	32	49
75%-Perz.	304	645	51	113
IQA*	96	436	19	64

\*Interquartilsabstand (=75%-Perzentile – 25%-Perzentile), # FW=Fruchtwasser

Abbildung 3.2 zeigt die holo-TC/Albumin Ratio in Serum und Fruchtwasser. Im Fruchtwasser ist Albumin sehr viel niedriger und holo-TC höher konzentriert als im Serum (s. Tab. 3.8). Für die holo-TC/Albumin Ratio fällt im Fruchtwasser eine viel größere Streuung der Werte auf als im Serum. Der Median liegt bei 24. Im Serum sind die Werte der holo-TC/Albumin-Ratio niedriger als im Fruchtwasser. Der Median liegt bei 1. Im Serum liegt nur eine sehr geringe Streuung der Werte vor.

Abb. 3.2: holo-TC/Albumin Ratio verglichen mithilfe von Boxplot, n=95

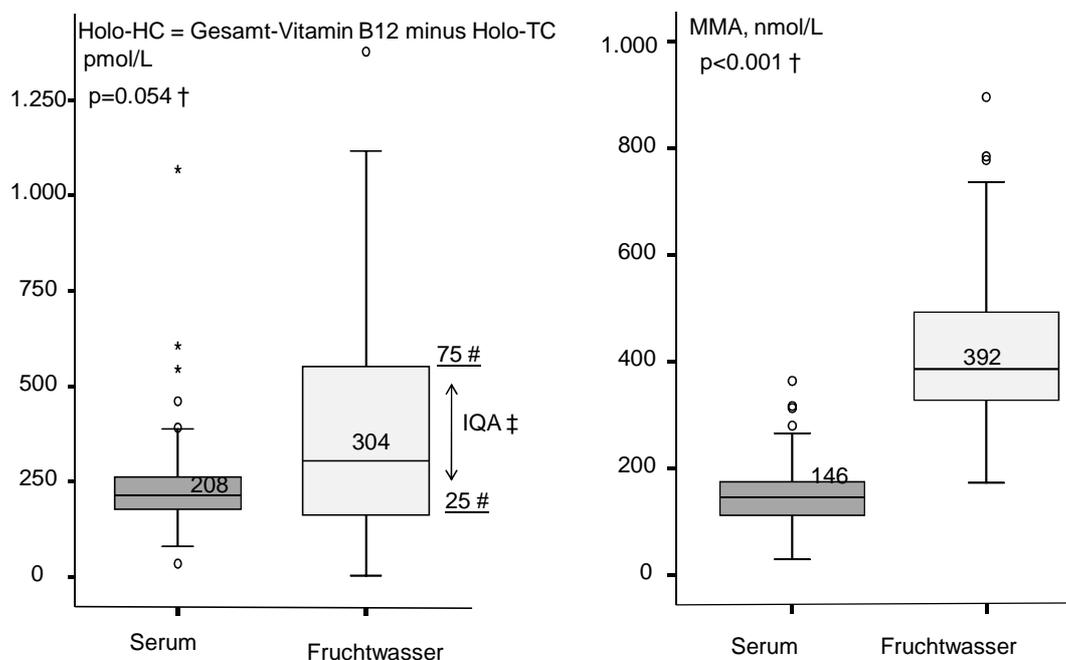


† nach t-Test für verbundene Stichproben

### Holo-HC und MMA in Fruchtwasser und Serum

Abbildung 3.3 zeigt weitere Vitamin B12-Marker im Vergleich Fruchtwasser-Serum: holo-HC und MMA. Holo-HC wurde nicht experimentell bestimmt, sondern rechnerisch aus den Gesamt-Vitamin B12- und den holo-TC-Konzentrationen ermittelt (Gesamt-Vitamin B12 – holo-TC). Es gibt den aktuell inaktiven Vitamin B12-Anteil wieder. Für holo-HC konnte kein signifikanter Unterschied der Konzentrationen zwischen den beiden Medien Fruchtwasser und Serum festgestellt werden. Es zeigt sich für holo-HC im Fruchtwasser jedoch ein deutlich größerer Interquartilsabstand als im Serum (Tab. 3.10). Für MMA zeigt sich, dass die Konzentrationen im Fruchtwasser deutlich höher sind als im Serum. Der Interquartilsabstand ist bei MMA, wie schon bei Vitamin B12 und holo-TC beobachtet, im Fruchtwasser größer als im Serum.

Abb.3.3: Holo-HC und MMA verglichen in Serum und Fruchtwasser, n=97



† nach t-Test für verbundene Stichproben; ‡ IQA=Interquartilsabstand; # 25%- bzw. 75%-Perzentile

Tab. 3.10: Eckdaten für holo-HC und MMA, n=97

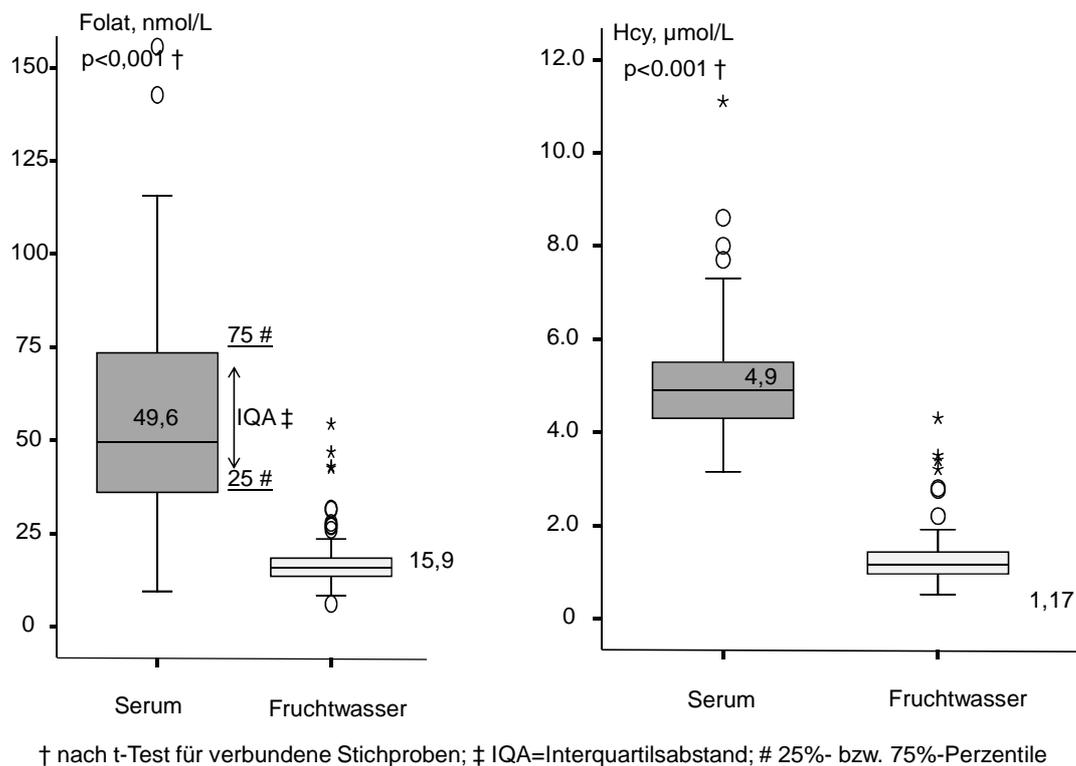
Marker	<b>Holo-HC [pmol/l]</b>		<b>MMA [nmol/l]</b>	
	Serum	FW #	Serum	FW #
Minimum	79	4	30	173
Maximum	1066	2748	364	896
25%-Perz.	177	161	112	328
75%-Perz.	248	544	175	504
IQA *	71	383	63	176

\*Interquartilsabstand (25% - 75%-Perzentile), # Fruchtwasser

### Folat und HCY in Fruchtwasser und Serum

Abbildung 3.4 zeigt Boxplots für die ermittelten Konzentrationen von Folat und HCY in Serum und Fruchtwasser. Beide Parameter weisen im Fruchtwasser signifikant niedrigere Konzentrationen auf als im Serum. Die Werte streuen für beide Parameter im Serum deutlich mehr als im Fruchtwasser. Der Interquartilsabstand für Folat ist im Serum viel größer als im Fruchtwasser (Tab. 3.11). Für HCY beträgt der Interquartilsabstand im Serum 1,22  $\mu\text{mol/l}$  und im Fruchtwasser 0,49  $\mu\text{mol/l}$ .

Abb.3.4: Folat und HCY verglichen in Serum und Fruchtwasser, n=97



Tab. 3.11 Eckdaten für Folat und HCY, n=97

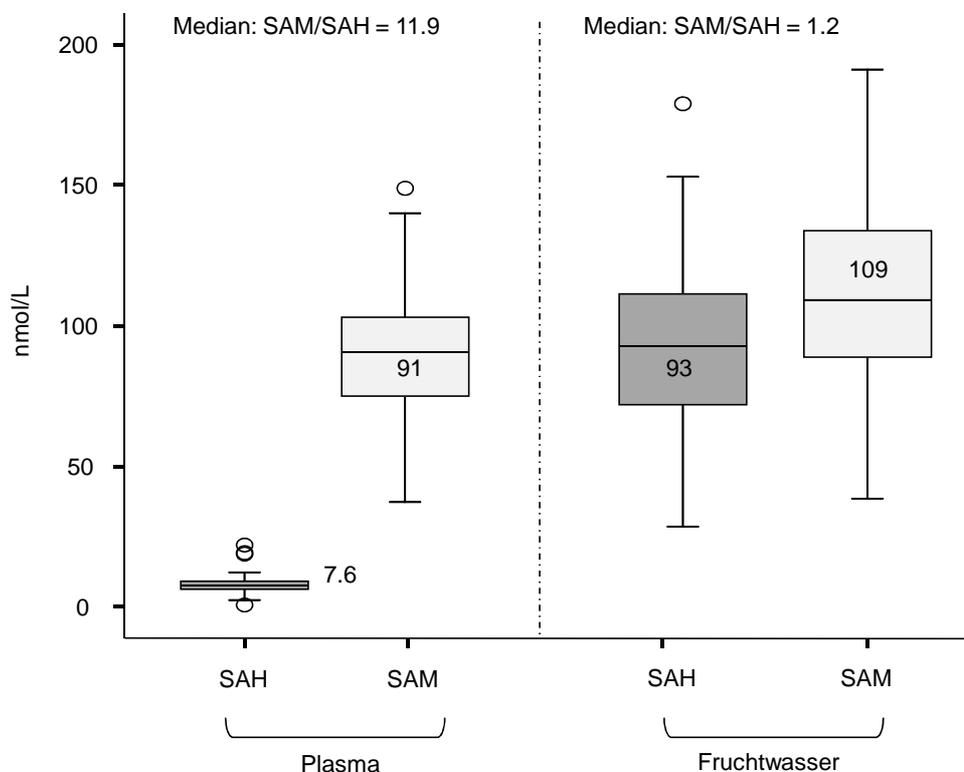
Marker	<u>Folat [nmol/l]</u>		<u>HCY [µmol/l]</u>	
	Serum	FW #	Serum	FW #
Minimum	49,7	3,6	3,2	0,52
Maximum	1395	54,5	15,1	4,3
25-%Perz.	36,1	13,2	4,3	0,96
75-%Perz.	73,3	18,6	5,5	1,44
IQA *	37,2	5,4	1,22	0,485

\*Interquartilsabstand (25% - 75%-Perzentile), # Fruchtwasser

### SAH und SAM in Fruchtwasser und Plasma

Abbildung 3.5 zeigt SAH und SAM im Plasma und im Fruchtwasser. SAM (Median: 91 nmol/l) ist im Plasma höher konzentriert als sein Gegenspieler SAH (Median: 7,6). So liegt auch die SAM/SAH Ratio im Plasma deutlich auf Seite des SAM (Median Ratio: 11,9). Der Boxplot zeigt, dass die gemessenen Werte für SAH im Plasma nicht stark streuen (Minimum: 0,7 nmol/l; Maximum: 18,5 nmol/l), wohl aber für SAM (Minimum: 37,3 nmol/l; Maximum: 148,9 nmol/l). Bei nahezu allen Schwangeren mit normalem Schwangerschaftsausgang ist SAH im Plasma sehr niedrig konzentriert. Für SAM im Plasma beobachteten wir neben sehr hohen Konzentrationen auch Probandinnen mit niedrigen SAM-Werten. Im Fruchtwasser zeigten sich für SAM höhere Konzentrationen als im Plasma, insgesamt waren die Werte im Fruchtwasser aber mit den gemessenen Ergebnissen im Plasma vergleichbar (Median: 109 nmol/l; Minimum: 38,5 nmol/l; Maximum: 298 nmol/l). Für SAH fällt auf, dass die Konzentrationen im Fruchtwasser deutlich höher sind (Median: 93 nmol/l) und dass hier auch die Spannweite der Werte größer ist (Minimum: 28,6 nmol/l; Maximum: 179 nmol/l).

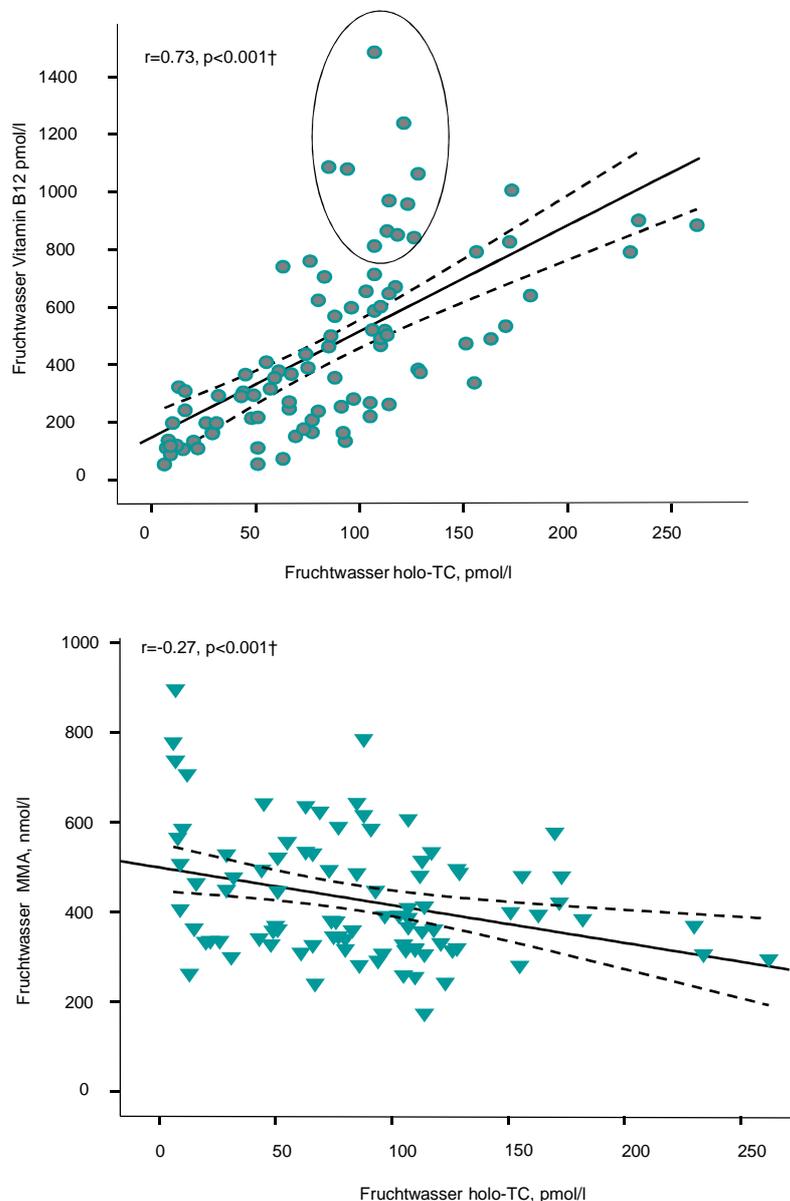
Abb.3.5: Methylierungsmarker in Plasma und Fruchtwasser, n=97



### Korrelation der Vitamin B12-Marker im Fruchtwasser

Abbildung 3.6 zeigt oben die Korrelation von holo-TC im Fruchtwasser mit dem Gesamt-Vitamin B12 im Fruchtwasser. Auf sehr hohem Signifikanzniveau zeigen die beiden Marker eine starke positive Korrelation ( $r=0,73$ ). Die Konzentration des Fruchtwasser-Vitamin B12 ist streng vom Fruchtwasser-holo-TC abhängig. Die Markierung erfasst eine Gruppe mit auffällig hohen Gesamt-Vitamin-B12-Konzentrationen im Fruchtwasser bei nicht adäquat erhöhtem holo-TC. Die untere Abbildung zeigt den Zusammenhang zwischen holo-TC im Fruchtwasser und MMA. Mit steigendem holo-TC fällt MMA leicht ab. Die Korrelation ist jedoch nur schwach negativ ( $r= -0,27$ ,  $p<0,001$ ). Die Konzentration der MMA im Fruchtwasser ist in geringem Maße von der Konzentration des Fruchtwasser-holo-TC abhängig.

Abb.3.6: Korrelation zwischen Vitamin B12 im Fruchtwasser mit holo-TC im Fruchtwasser (oben) und mit MMA im Fruchtwasser (unten)

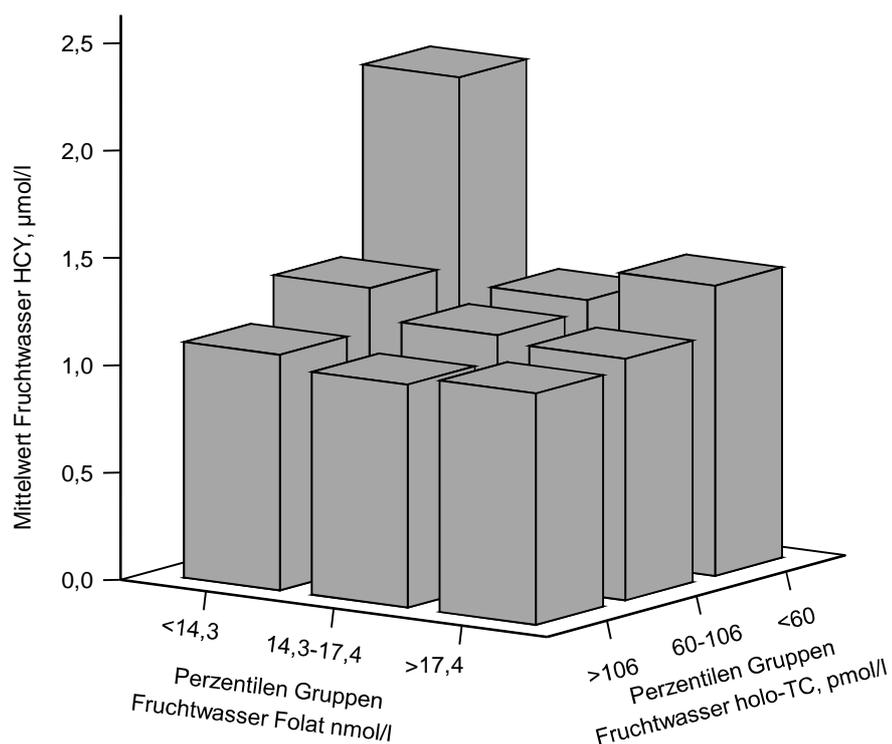


† Spearman-Test

### Zusammenhang zwischen Folat, holo-TC und HCY im Fruchtwasser

Abbildung 3.7 zeigt die Beeinflussung des HCY-Spiegels im Fruchtwasser durch holo-TC und Folat. Auf der x-Achse sind Folat und holo-TC in drei Perzentilengruppen aufgetragen, als abhängige Variable auf der y-Achse der dazugehörige Mittelwert des Fruchtwasser-HCY. Sind die Konzentrationen von Folat und holo-TC ausreichend hoch (2. und 3. Perzentilengruppe), hält sich der HCY-Spiegel im Fruchtwasser unter  $1,5 \mu\text{mol/l}$ . Liegen Folat- und holo-TC-Spiegel in der kleinsten Perzentilengruppe, steigt die HCY-Konzentration stark an. Ist nur einer der Marker Folat oder holo-TC in der niedrigsten Perzentilengruppe, bleibt HCY unter Werten von  $1,5 \mu\text{mol/l}$ .

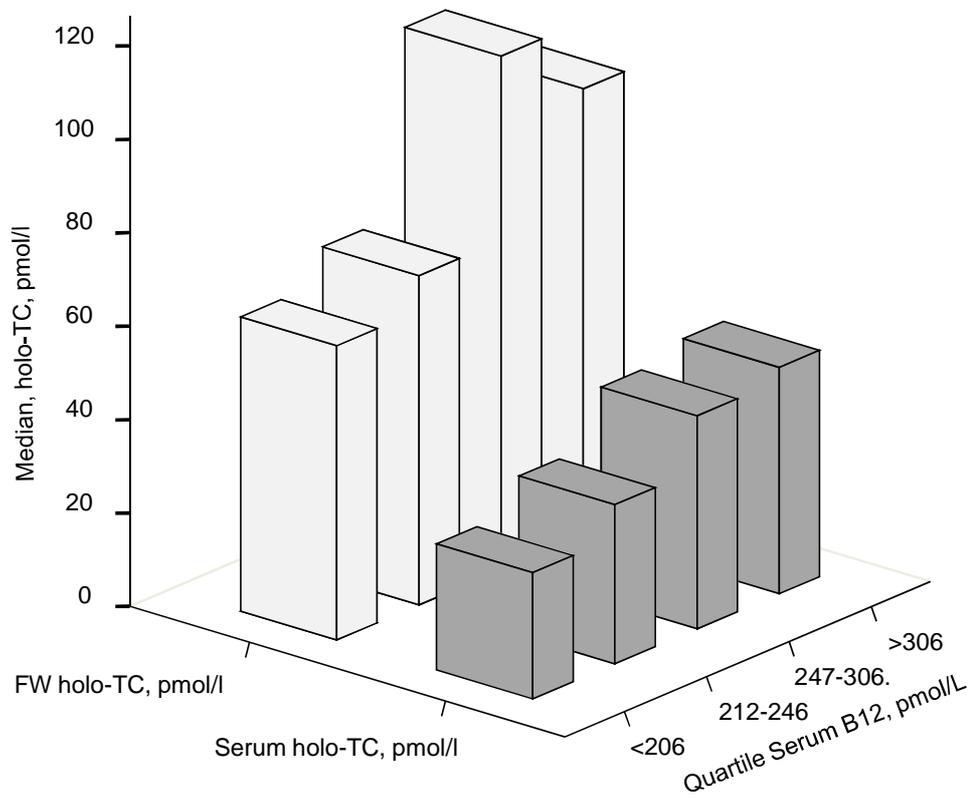
Abb.3.7: Schwangere (unauffällige Schwangerschaft) mit gleichzeitig niedrigen Folat- und holo-TC-Konzentrationen zeigten die höchsten HCY-Werte im Fruchtwasser, n=95



## Abhängigkeit des holo-TC in Fruchtwasser und Serum vom Serum Vitamin B12

Abbildung 3.8 zeigt das Serum Vitamin B12 in Quartile aufgeteilt und passend zum jeweiligen Quartil den Median des Serum- (links) bzw. Fruchtwasser-holo-TC (rechts). Die Höhe des holo-TC im Serum ist streng positiv abhängig von der Gesamt-Vitamin B12-Konzentration im Serum. Mit steigender Konzentration in den Perzentilengruppen des Gesamt-Vitamin B12 im Serum steigt auch der zugehörige Median des Fruchtwasser-holo-TC an. Der Cobalaminstatus in Serum und Fruchtwasser ist voneinander abhängig.

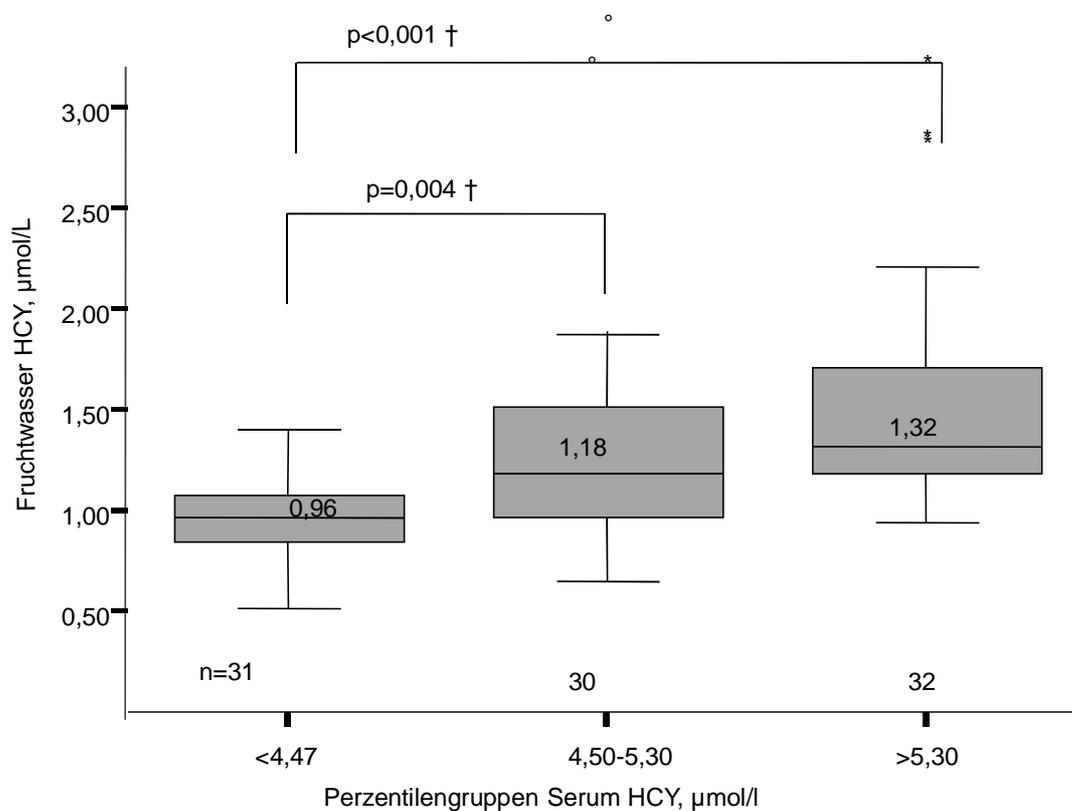
Abb.3.8: Abhängigkeit des holo-TC in Fruchtwasser und Serum vom Serum Vitamin B12, n=95 (unauffällige Schwangerschaft)



### Abhängigkeit des Fruchtwasser-HCY vom Serum-HCY

In Abbildung 3.9 wird die Abhängigkeit der Höhe des Fruchtwasser-HCY von der Konzentration des Serum-HCY dargestellt. Die Serum-HCY Ergebnisse wurden in 3 Perzentilengruppen aufgeteilt und die dazugehörigen Fruchtwasserwerte als Boxplot dargestellt. Mithilfe von ANOVA wurden die einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des Serum-HCY und der des Fruchtwasser-HCY festgestellt werden: Je höher die Konzentration des HCY im Serum, desto höher die Konzentration des HCY im Fruchtwasser.

Abb.3.9: Abhängigkeit des Fruchtwasser-HCY vom Serum-HCY, n=93 (unauffällige Schwangerschaft)

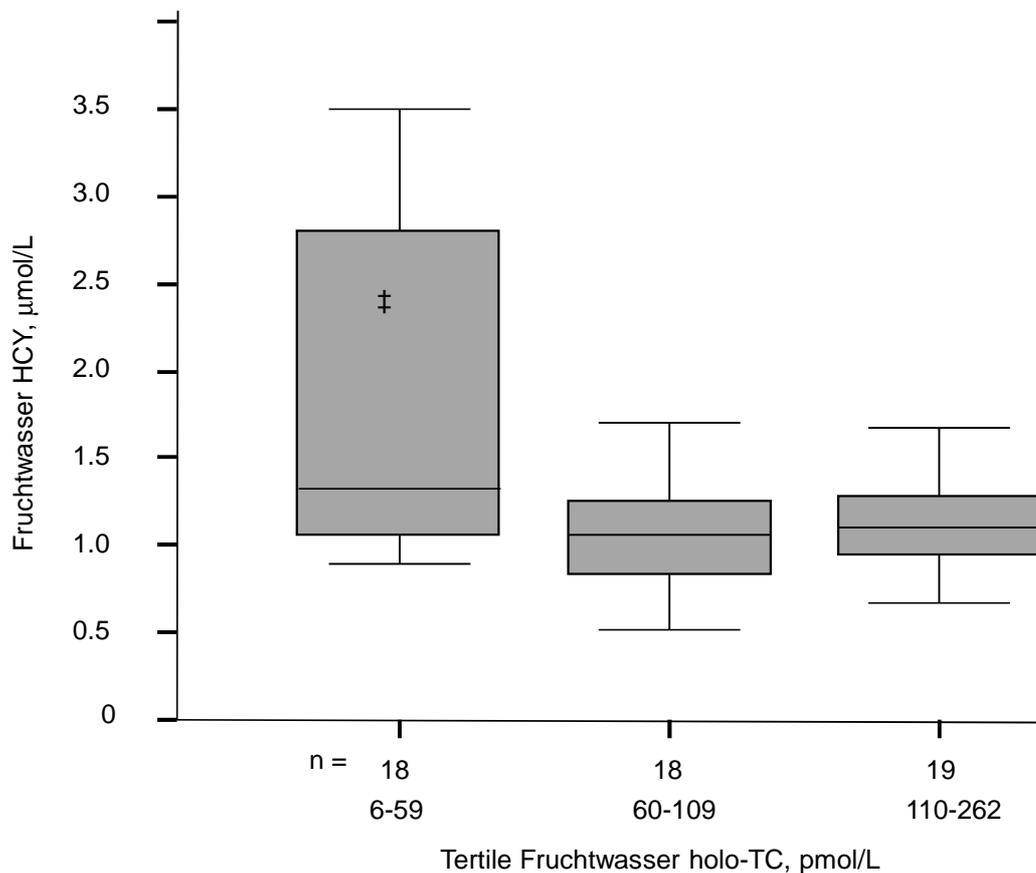


p nach ANOVA

### **Abhängigkeit des Fruchtwasser-HCY vom Fruchtwasser-holo-TC**

In Abbildung 3.10 wurden die holo-TC-Werte im Fruchtwasser in Tertile aufgeteilt und die dazugehörigen Fruchtwasser-HCY-Werte als Boxplot aufgetragen. Mithilfe von ANOVA wurden die Gruppen miteinander verglichen. Vergleicht man die erste Gruppe mit jeder der beiden anderen, so konnte auf hohem Signifikanzniveau für steigende holo-TC-Werte im Fruchtwasser niedrigere HCY-Konzentrationen festgestellt werden. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der holo-TC-Konzentration und der HCY-Konzentration im Fruchtwasser.

Abb.3.12: Abhängigkeit des Fruchtwasser-HCY vom Fruchtwasser-holo-TC, n=95 (unauffällige Schwangerschaft)



‡;  $p < 0.05$  nach ANOVA verglichen mit jeder der beiden Gruppen

## 4. Diskussion

In der Vergangenheit konnten eine Reihe von Schwangerschaftspathologien mit HHCY in Zusammenhang gebracht werden, so gelten HHCY und Folatmangel seit einigen Jahren als Risikofaktor für die unterschiedlichsten Schwangerschaftskomplikationen (*Ray et al. 1999*) wie Präeklampsie (*Herrmann et al. 2005; Mignini et al. 2005*), Plazentainsuffizienz (*El-Khairi et al. 2003*), HELLP-Syndrom (*Herrmann et al. 2004*) und Abruption placentae (*Del Bianco et al. 2004*). Weiterhin sind HHCY und B-Vitamin-Mangel Risikofaktoren für kongenitale Herzkrankungen, Frühgeburtlichkeit und Totgeburten (*Vollset et al. 2000*). NTD sind die häufigsten Missbildungen, die in Zusammenhang mit mütterlichem Folat-Mangel und HHCY gebracht werden können (*Finnell et al. 2002; Shaw et al. 1995 und 2002; Williams et al. 2002; Czeizel et al. 1992; Steegers-Theunissen et al. 1994*). Im Fruchtwasser konnte ein Zusammenhang zwischen Vitamin B12-Mangel (*Dawson et al. 1998; Steen et al. 1998*) und dem Auftreten von NTD nachgewiesen werden, nicht aber zwischen Folatmangel und NTD. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen waren die HCY-Spiegel bei NTD-Schwangerschaften im Fruchtwasser ebenfalls erhöht (*Wenstrom et al. 2000 a und b*). Zur Prävention von NTD und Schwangerschaftskomplikationen wird Schwangeren besonders im ersten Trimester die Supplementierung von Folsäure (400-800 µg) empfohlen. Ziel unserer Arbeit war es, bei gesunden Schwangeren zum Zeitpunkt der Amniocentese in Blut und Fruchtwasser Marker des HCY- und Vitamin B12-Stoffwechsels sowie die Methylierungsmarker SAH und SAM zu untersuchen. Bisher gibt es noch keine Daten über die Konzentration von SAH, SAM und holo-TC im Fruchtwasser. Weiterhin ist noch nicht untersucht, inwiefern die Blut-Spiegel der Metabolite das metabolische Milieu im Fruchtwasser widerspiegeln.

### HCY und Cystathionin im Vergleich Blut/Fruchtwasser

Für HCY im Blut fanden wir bei unserem Kollektiv (Gestationsalter 14,14-27,57 SSW) niedrigere Werte, als sie für gesunde Nichtschwangere gleichen Alters üblich sind (*Ueland et al. 1993*) (5-95%-Perzentile: 3,5-7,8 µmol/l vs. 5-15 µmol/l). Erniedrigte HCY-Konzentrationen im Blut bei Schwangeren im Vergleich zu Nichtschwangeren konnten auch in anderen Studien gezeigt werden (*Megahed et al. 2004; Andersson et al. 1992*). Im Fruchtwasser zeigten sich bei unserem Kollektiv im Median 4,2-fach niedrigere Konzentrationen als im Blut (4,9 µmol/l vs. 1,17 µmol/l; s. Tab. 3.2). Andere Autoren (*Monsen et al. 2006; Wenstrom et al. 2000 a und b; Steen et al. 1998; Steegers-Theunissen et al. 1997*) zeigten für HCY im Fruchtwasser ähnliche Ergebnisse. Albumin, das wichtigste HCY-Bindungsprotein, ist im Fruchtwasser ebenfalls niedriger konzentriert als im Blut (Blut/FW-Quotient: 10,8; s. Tab. 3.2). Auffallend sind die stark erhöhten Cystathioninkonzentrationen im Fruchtwasser verglichen mit den ermittelten Serumkonzentrationen (Blut/FW-Quotient: 0,07; s. Tab.3.2). Im

Jahre 2006 zeigte Monsen für die 16. SSW ähnlich hohe Cystathioninkonzentrationen im Fruchtwasser, welche aber eine weniger starke Streuung aufwiesen als die bei uns ermittelten Cystathionin-Konzentrationen im Fruchtwasser (1300-1800 nmol/l, Median: 1600) (Monsen *et al.* 2006). HCY könnte im Fruchtwasser möglicherweise vermehrt über die Vitamin B6-abhängige Cystathionin- $\beta$ -Synthase abgebaut werden. Es entstünde über diesen Weg vermehrt Cystathionin, was zu erhöhten Cystathionin-Werten führen würde. Weiterhin ist es denkbar, dass der Fetus Cystathionin über den Urin ausscheidet. Es ist bekannt, dass im fetalen Stoffwechsel die Cystathionaseaktivität noch sehr gering ist, da sich diese erst im ersten Lebensjahr voll ausbildet (Gauil *et al.* 1972). Bei unreif geborenen Säuglingen ist die Cystathionase-Aktivität ebenfalls noch vermindert (Viña *et al.* 1995). Bei unreifer Cystathionase-Aktivität und gleichzeitig vermehrt anfallendem Cystathionin staut sich Cystathionin im Fruchtwasser auf. Cystein zeigte bei früheren Untersuchungen im Fruchtwasser niedrigere Konzentrationen als im Serum, was die Überlegung zur unreifen Cystathionase ebenfalls stützt (Rajmakers *et al.* 2004; Monsen *et al.* 2006).

### **Folat, Vitamin B12, holo-TC und MMA im Vergleich Blut/Fruchtwasser**

Gerade für Folat fallen bei dem untersuchten Schwangerenkollektiv im Blut gute Konzentrationen auf, was auf die Folatsupplementation bei 87,5% unserer Probandinnen zurückzuführen war. Keine der Probandinnen zeigte Folatspiegel < 7 nmol/l, welche man als Grenze für Folatmangel ansieht. Die ermittelten Konzentrationen für Folat im Fruchtwasser waren bei unserem Kollektiv im Median circa dreifach niedriger als im Serum (s. Tab. 3.2). Folat wird beim Menschen nur zu einem sehr geringen Teil mit dem Urin ausgeschieden: normalerweise beträgt dieser Anteil 10-20% der resorbierten Menge pro Tag. Möglicherweise scheidet auch der Fetus aufgrund von fast vollständiger Verwertung der resorbierten Menge an Folat nur geringere Mengen an Folat mit dem Urin aus und gibt auch nur sehr geringe Mengen per Diffusion über die nichtkeratinisierte Haut ab. Es ist bekannt, dass die Folat-Blutspiegel von Neugeborenen etwa zweifach höher sind als die ihrer Mütter (Obeid *et al.* 2005). Dieser Fakt lässt darauf schließen, dass Mechanismen existieren, die den Transport von Folat an den Fetus garantieren. Guigliani *et al.* fanden 1985 im plazentaren Gewebe Folatspiegel, die sowohl über denen der Mütter als auch über denen der Neugeborenen lagen (Giugliani *et al.* 1985). Weiterhin konnten spezifische folatbindende Proteine aus der Plazenta isoliert werden (folate receptor  $\alpha$  (FR $\alpha$ ), reduced folate carrier (RFC)) (Antony *et al.* 1981; Yasuda *et al.* 2008). Die Plazenta scheint als Speicherorgan für Folat zu dienen (Henderson *et al.* 1995). Der Fetus entzieht der Plazenta als Kompartiment mit erhöhter Folatkonzentration Folat zur Verwertung. Es besteht ein negativer Gradient zwischen der Mutter, welche Folat über die Plazenta in den fetalen Kreislauf transportiert, und dem Fetus,

der Folat wahrscheinlich größtenteils sofort für die DNA-, Phospholipid-, Protein- und Neurotransmittersynthese umsetzt.

Für Vitamin B6 fanden wir Ähnliches. Der Blut/Fruchtwasser-Quotient beträgt 1,43. Schenker et al. untersuchten 1992 den transplacentaren Transfer von Vitamin B6. Vitamin B6 wird nicht gegen den Konzentrationsgradienten über die Plazenta transportiert (*Schenker et al. 1992*).

Die Produkte zur perikonzeptionellen Vitaminsupplementation (z.B. Femibion®, Centrum Materna® etc.) enthalten circa 3 µg Vitamin B12, was im Bereich der empfohlenen Tageszufuhr liegt und den Mehrbedarf während der Schwangerschaft nicht abdeckt. Im fetalen Stoffwechsel besteht ein ständiger Bedarf an aktivem Vitamin B12, da über die B12-abhängige Methioninsynthase aktives Folat (THF) bereitgestellt wird, welches wiederum Einkohlenstoffeinheiten für die Synthese von Adenin und Guanin bereitstellt. Adenin und Guanin fungieren als DNA-Bausteine für die ständig notwendige DNA-Synthese im fetalen Kreislauf. Obwohl kein Vitamin B12 supplementiert wurde, zeigen sich für Vitamin B12 und holo-TC, im Gegensatz zum Folat, erstaunlicherweise im Fruchtwasser signifikant höhere Werte als im Serum.

Der Fruchtwasserspiegel entspricht jedoch nicht unbedingt dem fetalen Status, sondern wahrscheinlich eher der Konzentration des Vitamins, welches nach der Verwertung durch den Fetus übrigbleibt. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Vitamin B12-Blutspiegel der Feten über den Blutspiegeln der Mütter liegen (*Obeid et al. 2005*). Der Transfer von Vitamin B12 über die Plazenta erfolgt gegen den Konzentrationsgradienten (*Lowenstein et al. 1960*). In einer Studie an plazentarem Gewebe sowie mütterlichem und fetalem Blut von schwangeren Ratten konnte im Verlauf der Schwangerschaft eine progressive Steigerung des Transports von Vitamin B12 zum Fetus festgestellt werden (*Graber et al. 1971*). Die Menge an transportiertem Vitamin B12 pro 24 Stunden war proportional zum fetalen Gewicht. Die Menge des plazentaren Vitamin B12 steigerte sich im Schwangerschaftsverlauf stetig. Die plazentare Konzentration von Vitamin B12 lag immer über der fetalen oder mütterlichen (*Graber et al. 1971*). Eine andere Studie (*Perez-D'Gregorio et al. 1998*) quantifizierte den Transport von Vitamin B12 über die Plazenta mithilfe von radioaktiv markiertem Vitamin B12 an einem dualperfundierten Plazentamodell nach Schneider (*Schneider et al. 1972*). Der Transfer von Vitamin B12 zum Fetus war limitiert, die Plazenta jedoch akkumulierte Vitamin B12 schnell: nach vier Stunden fand man hier 18% der Anfangsdosis. Nach ebenfalls vier Stunden fand man drei Prozent der Anfangsdosis im fetalen Perfusat, mehr als 95% davon lag proteingebunden vor (*Perez-D'Gregorio et al. 1998*). Der Transcobalamin-Rezeptor in der Plasmamembran bindet Transcobalamin-gebundenes-Vitamin B12 und internalisiert den Komplex per Endozytose. Dieser Rezeptor konnte auch im humanen Plazentagewebe in größeren Mengen nachgewiesen werden (*Quadros et al. 2009*).

Holo-TC als Vitamin B12-Marker wurde zuvor noch nie im Fruchtwasser, sondern nur im Serum von schwangeren Frauen bestimmt. Ein Teil unserer Probandinnen zeigte Blut-holo-TC-Spiegel unter 35 pmol/l, bei denen man von einer Vitamin B12-Speicherentleerung ausgeht (*Obeid et al. 2007a*). MMA-Konzentrationen im Blut von mehr als 300 nmol/l zeigen einen intrazellulären Vitamin B12-Mangel an (*Obeid et al. 2007a*). Die gemessene Blut-MMA-95%-Perzentile unseres Kollektivs lag unter 300 nmol/l. Für MMA zeigten wir ebenfalls im Fruchtwasser höhere Konzentrationen als im Serum (s. Tab. 3.8). Diese könnten daraus resultieren, dass der Fetus MMA mit dem Urin ausscheidet und die Vitamin B12-abhängige MMA-CoA-Mutase, die aus MMA Succinyl-CoA bildet, im fetalen Stoffwechsel noch nicht voll funktionsfähig ist.

### **Methylierungsmarker im Vergleich Blut/Fruchtwasser**

Interessant ist weiterhin die Betrachtung der Ergebnisse der Methylierungsmarker SAH und SAM im Fruchtwasser, welche zuvor noch nie in diesem Medium bestimmt wurden. Aufgrund des sehr hohen Methylierungsbedarfs des Fetus während der Entwicklung erwartet man ein erhöhtes SAM, das der wichtigste Überträger von Einkohlenstoffeinheiten ist. Verglichen mit den Serumwerten (56-122 nmol/l) konnten wir im Fruchtwasser signifikant höhere Konzentrationen für SAM (54-184 nmol/l) feststellen. Was jedoch auffiel waren die, verglichen mit den Serumwerten, ungewöhnlich hohen SAH-Konzentrationen im Fruchtwasser (4,4-14,6 nmol/l vs. 53-145 nmol/l). Die Verschiebung der Konzentrationen von SAH und SAM macht sich ebenso in der gebildeten SAM/SAH-Ratio bemerkbar, die sich zu Gunsten des SAH verschiebt (0,51-2,58). Die Konzentrationen des Fruchtwasser-SAH waren höher als in jeglichen biologischen Medien oder Zellkompartimenten, die je untersucht wurden (*Stabler et al. 2004; Obeid et al. 2007b*). In der Frühschwangerschaft stellt man sich das Fruchtwasser als dynamisches Gleichgewicht vor zwischen den Mengen, die vom Fetus aufgenommen und wieder abgegeben werden. Dennoch sind die Konzentrationen des SAH und SAM im Fruchtwasser denen im Urin nicht ähnlich (*Stabler et al. 2004*) und zeigen auch keine Korrelation mit dem Fruchtwasser-Kreatinin ( $r=0,20$ ;  $p=0,081$ ). Dies deutet auf das Vorhandensein eines speziellen Regulationsmechanismus hin, der möglicherweise nur in der fetalen Phase funktioniert und bei welchem Hypomethylierung die DNA-Replikation und die Expression verschiedener Gene fördert. Diese Überlegungen sind konform mit einer DNA-Demethylierung, die in extraembryonalen Zellen während der frühen Entwicklung von Tieren beobachtet wurde (*Monk et al. 1987*). Eine weitere biochemisch denkbare Möglichkeit wäre die fehlende Reife der SAH-Hydrolase im fetalen Stoffwechsel, die SAH zu HCY hydrolysiert. Allerdings konnte in einer Studie an schwangeren Ratten zum Zeitpunkt der Neurulation die SAH-Hydrolase sowohl in fetalem als auch in plazentarem Gewebe nachgewiesen werden (*Vanaerts et al. 1995*).

Wir fanden eine signifikante positive Korrelation zwischen der Fruchtwasser-SAH/Albumin-Ratio auf der einen Seite und den Ratios von Fruchtwasser-SAM/Albumin und Fruchtwasser-HCY/Albumin auf der anderen Seite. Dies deutet darauf hin, dass eine verstärkte Produktion von SAH begleitet ist von verstärkter Produktion von HCY und dessen Remethylierung zu SAM via Methionin.

In einer brasilianischen Studie wurden HCY, Vitamin B12 sowie SAH und SAM im Plasma von Mutter und Kind bei der Geburt bestimmt. Die ermittelten HCY-Konzentrationen waren in der Nabelschnurvene bei den Kindern höher, deren Mütter niedrige Vitamin B12-Werte aufwiesen. Bei Vitamin B12-Mangel zeigten sich bei den Schwangeren erhöhte SAH-Werte und erniedrigte SAM- und Methioninkonzentrationen. Die SAM/SAH Ratio war bei Vitamin B12-Mangel sowohl bei den schwangeren Müttern als auch bei ihren Neugeborenen erniedrigt, also zugunsten des SAH verschoben. Auf Grund dieser Beobachtungen kommt man zu der Annahme, dass wegen der engen Verknüpfung von SAH und SAM zu zahlreichen enzymatischen Methylierungsreaktionen bei schwangeren Frauen mit Vitamin B12-Mangel ein unausgeglichener Methylierungsstatus vorliegt (*Guerra-Shinohara et al. 2004*). In unserer Arbeit zeigte sich kein Zusammenhang zwischen niedrigeren Vitamin B12-Konzentrationen und erhöhten SAH-Konzentrationen.

### **Rolle der Proteine im Fruchtwasser**

Es ist bekannt, dass Fruchtwasser eine proteinärmere Körperflüssigkeit ist als Blut (*Ostergard 1970*). Die Konzentrationen des Gesamtprotein im Fruchtwasser betragen bei unserem Kollektiv etwa 10% derer im Serum (63-90 g/l vs. 4,3-9,1 g/l). Vergleicht man bei unserem Kollektiv den Anteil von Albumin am Gesamtprotein im Fruchtwasser, so beträgt er analog zum Serum circa 60%. Die Proteinbindung, beispielsweise für HCY, ist im Fruchtwasser möglicherweise deshalb geringer als im Serum, da Albumin, das Hauptträgerprotein von HCY (*Refsum et al. 1985*), im Fruchtwasser sehr niedrige Konzentrationen aufweist. Hält man sich diesen Umstand vor Augen ist es umso erstaunlicher, dass holo-TC, welches ein Protein ist, im Fruchtwasser höher konzentriert ist als im Serum und dass die holo-TC/Albumin Ratio im Fruchtwasser im Median circa 24 mal höher ist als im Serum. Dies gibt Hinweise auf eine zentrale Stellung von holo-TC bei Stoffwechselwegen im Fruchtwasser. Möglicherweise dient holo-TC im fetalen Stoffwechsel als Vitamin B12-Speicher.

### **Korrelationen zwischen Blutmarkern und Fruchtwassermarkern**

Eine weitere Überlegung zur Durchführung dieser Studie war, inwiefern man aus mütterlichen Blutwerten Voraussagen über den Vitamin B12-, Folat-, HCY-, und Methylierungsstatus im Fruchtwasser treffen kann sowie inwiefern die Konzentrationen der Vitamine, des HCY und der Metabolite im Fruchtwasser durch plazentaren Transfer oder eher durch fetale renale Ausscheidung oder Diffusion über die fetale nichtkeratinisierte Haut zustande kommen. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Konzentrationen der Metabolite ebenso vom plazentaren und fetalen Metabolismus und Transport betroffen sind (*Jauniaux et al. 2005*).

Für die Vitamin B12-Marker konnten wir eine enge Verknüpfung zwischen Blut und Fruchtwasser zeigen. Sowohl Vitamin B12 als auch holo-TC zeigten im Vergleich Serum-Fruchtwasser eine mittelstarke positive Korrelation. Holo-TC im Fruchtwasser konnte als strenger positiver Prädiktor für Vitamin B12 im Fruchtwasser identifiziert werden ( $r=0,73$ ). MMA im Fruchtwasser ist zumindest teilweise vom Vitamin B12-Status im Fruchtwasser abhängig (s. Abb. 3.7). Diese Ergebnisse zeigen, dass der mütterliche und der fetale Vitamin B12-Haushalt in engem Zusammenhang stehen. Bei unserem Kollektiv zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen holo-TC im Fruchtwasser und HCY im Fruchtwasser (s. Abb. 3.12): bei steigenden holo-TC-Werten zeigten sich signifikant niedrigere HCY-Konzentrationen im Fruchtwasser. Ein ähnlicher Zusammenhang lässt sich in Bezug auf Folat nicht mehr nachweisen. Folglich ist bei Menschen mit Folatsupplementation Vitamin B12 (mit holo-TC als Marker) der entscheidende Faktor zur Remethylierung von HCY.

Mütterliches Serum-HCY und die Fruchtwasser-HCY-Konzentrationen weisen eine recht starke Korrelation auf ( $r=0,61$ ). Ähnliches gilt für Folat und Vitamin B12, die beide im Vergleich Fruchtwasser-Serum eine Korrelation von  $r=0,5$  aufweisen. Schwangere, die gleichzeitig niedrige holo-TC- und Folatwerte im Fruchtwasser aufwiesen, zeigten im Fruchtwasser die höchsten HCY-Werte (s. Abb. 3.7). Ebenso fällt auf, dass es zwischen den niedrig normalen Plasma-SAH-Werten und den auffällig hohen Fruchtwasser SAH-Werten keinen Zusammenhang gibt. Möglicherweise gibt es im Fruchtwasserstoffwechsel Mechanismen, welche die SAH/SAM-Ratio zur SAH-Seite verschieben, um so Zellteilung zu ermöglichen.

### **Abhängigkeit der getesteten Parameter vom Gestationsalter**

Nach Prüfung der Parameter in Abhängigkeit vom Gestationsalter (s. Tab. 3.6 und 3.7) zeigten sich im Fruchtwasser folgende Besonderheiten: Während die Konzentrationen für Gesamtprotein mit fortgeschrittener Schwangerschaft stabil bleiben, sinken die Konzentrationen für Folat, Vitamin B12 und holo-TC ab. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Konzentrationen nicht auf Grund von Volumenänderungen, sondern auf Grund von

Änderungen im fetalen Stoffwechsel verändern. Mit höherem Gestationsalter werden Vitamin B12, Folat und holo-TC im fetalen Stoffwechsel möglicherweise vermehrt benötigt und daher gespeichert und nicht mehr ausgeschieden. Die Konzentrationen für SAM steigen mit fortgeschrittener Schwangerschaft ebenfalls an, was für einen wachsenden Bedarf an Einkohlenstoffeinheiten sprechen könnte.

### **Vitamin B-Stoffwechsel und Geburtsdefekte**

Heute gilt es als bewiesen, dass Folatmangel die Inzidenz von NTD erhöht (*Dawson et al. 1998; Eskes 1998; Shaw 1995*). Bei NTD beobachtete man auch erhöhte HCY-Werte, sowohl im Fruchtwasser als auch im Serum (*Mills et al. 1995 und 1996*), sowie erniedrigte Vitamin B12-Konzentrationen im Fruchtwasser (*Economides et al. 1992; Steen et al. 1998*). In einer Studie bezüglich NTD und Nicht-NTD-Schwangerschaften wurden verminderte Vitamin B12-Konzentrationen im Fruchtwasser zusammen mit erhöhter Vitamin B12-Bindungskapazität gefunden, was bei NTD-Fällen auf einen gestörten Vitamin B12-Transport zum Fetus hinweist (*Gardiki-Kouidou et al. 1988*). Frühere Studien zeigten eine Assoziation zwischen erhöhtem Plasma-HCY und Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, Frühgeburtslichkeit und erniedrigtem Geburtsgewicht (*Vollset et al. 2000; Hogg et al. 2000*). Die Ergebnisse all dieser Studien zeigen die Wichtigkeit der Untersuchung des HCY-Metabolismus während und vor allem zu Beginn der Schwangerschaft, um Geburtsdefekten, Schwangerschafts- oder postpartalen Komplikationen vorzubeugen. Die gemessenen Konzentrationen der Parameter verglichen wir mit den ermittelten Bereichen der Frauen mit unauffälliger Schwangerschaft. Eine Assoziation zwischen abnormem Folat- und HCY- und Vitamin B12-Metabolismus und NTD-Schwangerschaft ist bekannt (*Eskes et al. 1998; Mills 1995 und 1996; Groenen et al. 2004*). Unsere Ergebnisse zeigen bei beiden NTD-Schwangerschaften im Fruchtwasser verminderte Folatkonzentrationen sowie einen Vitamin B12-Mangel, der sich in verminderten Konzentrationen von Gesamt-Vitamin B12 und holo-TC darstellt.

### **Vitamin B-Stoffwechsel und NTD**

Wir untersuchten zwei Schwangerschaften mit NTD-Feten (Probandin 1 und 97): Probandin 1 zeigte trotz anamnestischer Folatsubstitution relativ niedrige Folatwerte im Serum und weiterhin niedrige Vitamin B12- und holo-TC-Konzentrationen (s. Tab 3.4). Bei Probandin 97, deren Fetus einen sehr ausgeprägten NTD zusammen mit einer Arnold-Chiari-Malformation aufwies, zeigten sich im Serum keine Auffälligkeiten. Im Fruchtwasser zeigten beide einen Vitamin B12-Mangel, welcher auch schon in früheren Studien mit NTD assoziiert werden konnte (*Dawson et al. 1999; Economides et al 1992*). Die Folatspiegel lagen im Fruchtwasser im Bereich der ermittelten Werte für gesunde Schwangere. Man kann davon aus-

gehen, dass beide Probandinnen trotz Folatsubstitution einen funktionellen Folatmangel aufwiesen, da bei beiden ein Vitamin B12 Mangel vorlag. Dies zeigt wiederum die Bedeutung der präkonzeptionellen Folat- und Vitamin B12-Substitution, um NTD aufgrund von funktionellem Folatmangel vorzubeugen. Probandin 1 zeigte zusätzlich eine HHCY im Fruchtwasser. Bezüglich der erstmals im Fruchtwasser untersuchten Methylierungsmarker SAH und SAM konnten wir im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine Besonderheiten feststellen.

### **Vitamin B-Stoffwechsel und Down-Syndrom**

Bei Probandin 2 (Down-Syndrom) zeigte sich im Serum eine HHCY, eine erhöhte MMA-Konzentration sowie ein Folat- und Vitamin B6-Mangel. HHCY und Folatmangel könnten Hinweis auf einen abnormen Folatmetabolismus sein, welcher schon in Verbindung mit Down-Syndrom-Schwangerschaften gebracht werden konnte (*Meguid et al. 2008; Biselli et al. 2008*). James et al. zeigten 1999 bei Down Syndrom-Müttern höhere HCY-Werte als bei gesunden Kontrollschwangerschaften und ein häufigeres Auftreten des C/T bzw. T/T als C/C Genotyps der MTHFR bei Müttern von Kindern mit Trisomie 21 (*James et al. 1999*). Bei Müttern von Kindern mit Down-Syndrom fand man erniedrigte Folat- und erhöhte HCY-Konzentrationen im Blut (*Takamura et al. 2004*) und weiterhin eine erhöhte Methotrexat-Zytotoxizität der Lymphozyten. Dies ist ein Zeichen für abnormalen Folat- und Methylierungsstoffwechsel (*James et al. 1999*).

Im Fruchtwasser zeigte sich bei unserer Probandin mit Down-Syndrom-Schwangerschaft ein HCY-Spiegel, der 8,3-fach höher ist als der Median, der bei der Gruppe mit unauffälliger Schwangerschaft ermittelt wurde. Ebenso sind die Werte für Albumin und Gesamtprotein im Vergleich erhöht. Cystathionin und holo-TC zeigen, verglichen mit der gesunden Gruppe, erniedrigte Konzentrationen. Die hohe HCY-Konzentration lässt sich durch den ebenfalls erhöhten Albuminspiegel nur unzureichend erklären: die HCY/Albumin-Ratio war bei dieser Probandin doppelt so hoch wie der Median der normalen Schwangerschaften. Möglicherweise wird HCY im Fruchtwasser bei Down-Syndrom Schwangerschaften trotz der Dreifachkopie an CBS und ausreichender Konzentrationen an Folat und Vitamin B12 (Coenzym der Methioninsynthese) nicht ausreichend über diesen Weg metabolisiert. Die niedrige Konzentration von Cystathionin im Fruchtwasser bei dieser Probandin würde diese These stützen. Es gibt Hinweise darauf, dass Feten mit Down-Syndrom schon während der Schwangerschaft erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind (*Perrone et al. 2007*). Perrone et al. testeten im Fruchtwasser Isoprostane, einen neuen Marker für freie radikal-katalysierte Lipidperoxidation bei normalen, IUGR- und Down-Syndrom-Schwangerschaften. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen konnten bei den Down-Syndrom-Schwangerschaften neunfach höhere Isoprostan-Konzentrationen gefunden werden (*Perrone et al. 2007*). Um dem oxidativen Stress gewachsen zu sein, muss im Fruchtwasser wohl vermehrt Glutathion gebildet

werden. Die gefundene erniedrigte Cystathionin-Konzentration im Fruchtwasser von Probandin 2 könnte auch aus vermehrter Verstoffwechslung zu Glutathion resultieren. In einem Einzelfallbericht von 2001 wurden HCY, SAH, SAM, MTHFR-Genotyp und DNA-Methylierung im Blut eines Kindes mit Down-Syndrom und NTD und im Blut der Mutter untersucht (*Al-Gazali et al. 2001*). Die Mutter zeigte stark erhöhte HCY- (35  $\mu\text{mol/l}$ ) und SAH- sowie erniedrigte SAM-Konzentrationen. Die Lymphozyten-DNA war hypomethyliert. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich bei unserer Probandin nicht. Bei dem untersuchten Kind zeigten sich erniedrigte HCY- und Methioninspiegel. Die Cystathioninkonzentration lag fünffach über Normalniveau, was durch die Überexpression der CBS erklärbar ist (*Al-Gazali et al. 2001*).

### **Vitamin B-Stoffwechsel und Turner-Syndrom und Trisomie 18**

Die Chromosomenanomalien Turner-Syndrom und Trisomie 18 wurden bisher nicht mit Fehlregulationen im HCY-Stoffwechsel und unausgeglichenem Methylierungsstatus in Verbindung gebracht. Eine Studie zeigte bei Frauen mit Turner-Syndrom ein vermehrtes Auftreten der MTHFR A1298C-Mutation, die in einer geringeren Effizienz des Enzyms resultiert (*Oliveira et al. 2008*). Die MTHFR C677T-Mutation war nicht mit dem Auftreten des Turner-Syndroms assoziiert (*Oliveira et al. 2008*). Die von uns untersuchten Probandinnen, die ein Kind mit Trisomie 18 oder Turner Syndrom erwarteten, wiesen im Fruchtwasser, verglichen mit der Normalgruppe, sehr niedrige HCY-Konzentrationen bei normalen bis hochnormalen Vitaminspiegeln auf (s. Tab. 3.5). Bei allen untersuchten Chromosomenanomalien (Probandin 2, 21, 74, 60) lag die SAM/SAH-Ratio im Fruchtwasser  $\leq 1$ . Dies ist ein Hinweis auf einen unausgeglichenen Methylierungsstatus im Fruchtwasser dieser Feten. Die molekularen Mechanismen, welche chromosomales Nondysjunction determinieren, sind noch nicht gut erforscht, doch Dysfunktionen in Folatmetabolismus und Methylierung können in DNA-Hypomethylierung und in abnormer Chromosomenteilung (Aneuploidie) resultieren. Zur Validierung dieser Hinweise auf eventuelle Hypomethylierung im Fruchtwasser bei Schwangerchaften mit Chromosomenanomalien müssen Studien mit größerer Probandenzahl folgen.

### **Vitamin B12-Stoffwechsel und Multipler Sulfatasemangel**

Im Serum von Probandin 23 (multipler Sulfatasemangel) fiel ein erhöhter Spiegel an Vitamin B12 auf, was sich anamnestisch durch zusätzliche Vitamin B12-Supplementierung erklären lässt. Im Fruchtwasser zeigte die Probandin ein niedriges SAM und eine niedrige SAM/SAH-Ratio (s. Tab 3.5). Untersuchungen bezüglich Hypomethylierung und Störungen im HCY-, oder Folatstoffwechsels existieren bisher nicht. Unsere Probandin zeigte, ähnlich den Probandinnen 2, 21, 74 und 60 (Feten mit Chromosomenanomalien), Zeichen der Hypomethylierung im Fruchtwasser.

### Vergleich der Ergebnisse mit früheren Studien

Die folgenden Tabellen vergleichen die ermittelten Mediane unseres Kollektivs mit normalem Schwangerschaftsausgang mit den Ergebnissen früherer Studien. Unsere Ergebnisse für HCY im Fruchtwasser bestätigen die im Vergleich zum Serum gefundenen niedrigen HCY-Konzentrationen anderer Studien (s. Tab. 4.1). Unsere Ergebnisse für Vitamin B12 im Fruchtwasser sind mit denen anderer Autoren (*Monsen et al. 2006; Dawson et al. 1999; Steen et al. 1992; Economides et al. 1992*) vergleichbar.

Tab. 4.1 Vergleich von HCY und Vitamin B12 im Fruchtwasser anhand verschiedener Studien

<b>Autor</b>	<b>HCY* [<math>\mu\text{mol/l}</math>]</b>	<b>Vitamin B12 [<math>\text{pmol/l}</math>]*</b>
Unsere Studie (n=97)	1,17	409
Monsen 2006 (n=483)	1,3	646
Wenstrom 2000b (n=80)	1,09	-
Steen 1998 (n=63)	2,2	400
Dawson 1999 (n=29)	-	618
Economides (n=24)	-	207

\*Median

SAH und SAM wurde bisher noch nicht im Medium Fruchtwasser untersucht. Die ermittelten Plasmakonzentrationen der Methylierungsmarker unseres Kollektivs verglichen wir mit früheren Arbeiten (s. Tab. 4.2 - *Obeid et al. 2007; Stabler et al. 2004; Gellekink et al. 2005; Guerra-Shinohara et al. 2004*). Die Daten von Obeid et al. wurden im gleichen Labor mit der gleichen Methode wie bei unserer Studie erhoben. Die von uns ermittelten Werte für SAM sind mit denen von Obeid, Stabler und Gellekink erhobenen Daten vergleichbar. Für Plasma-SAH fanden wir deutlich niedrigere Werte als die anderen Autoren: dies könnte ein Hinweis auf generell niedrigere SAH-Plasma-Konzentrationen bei Schwangeren verglichen mit Nichtschwangeren sein. Guerra-Shinohara zeigte bei Geburt niedrigere SAM-Konzentrationen im mütterlichen Plasma und höhere SAH-Konzentrationen, verglichen mit unserer und den anderen Studien. Diese Diskrepanz könnte durch schlechteren Vitaminstatus der brasilianischen Schwangeren erklärt werden.

Tab. 4.2 Vergleich der SAM- und SAH-Plasmakonzentrationen anhand verschiedener Studien

Autor	SAM [nmol/l]	SAH [nmol/l]
Unsere Studie	90*; 89,5 <sup>∞</sup>	7,5*; 8,0 <sup>∞</sup>
Obeid 2007#	113*	16,8*
Stabler 2004#	109 <sup>∞</sup>	15,0 <sup>∞</sup>
Gellekink 2005#	94,5 <sup>∞</sup>	12,3 <sup>∞</sup>
Guerra-Shinohara† 2004	75 <sup>∞</sup>	22 <sup>∞</sup>

#Nicht-Schwangere; †bei Geburt; \*Median; <sup>∞</sup>Mittelwert

## **Kernaussagen**

Zusammenfassend lassen sich folgende Kernaussagen der Studie darstellen:

1. Marker des mütterlichen B-Vitamin-Stoffwechsels hängen mit Markern des fetalen Stoffwechsels, gemessen im Fruchtwasser zwischen 14-27 SSW, zusammen.
2. Erhöhte SAH-Konzentrationen im Fruchtwasser halten ein Milieu der Hypomethylierung aufrecht und sorgen so für einen hohen Turnover von Methylgruppen.
3. Sowohl Vitamin B12 als auch Folat im Fruchtwasser sind signifikante Bestimmungsgrößen für HCY im Fruchtwasser.
4. Vitaminsupplementation war verknüpft mit höheren Vitaminkonzentrationen im Fruchtwasser.
5. Vitamin B12-Mangel und niedrige Folatwerte in Serum und Fruchtwasser bei den NTD-Schwangerschaften - trotz Supplementation - geben Hinweise auf einen gestörten Transport zum Fetus.

## **Empfehlung**

Die Erkenntnisse dieser Studie führen zu folgenden Empfehlungen:

1. Bei Frauen, die eine Schwangerschaft planen, sowie bei solchen, die in früheren Schwangerschaften Geburtsdefekte oder Schwangerschaftskomplikationen aufwiesen, sollte präkonzeptionell eine Vitamin B-Diagnostik berücksichtigt werden.  
Bei vorangegangenen Geburtsdefekten (NTD, Chromosomenanomalie) oder wiederholten Aborten sollte die Bestimmung von Folat und den Vitamin B12-Markern (Gesamt-Vitamin B12, holo-TC, MMA) in Serum und Fruchtwasser erwogen werden.
2. Die Rolle der Vitamin B12-Supplementierung zur Prävention von NTD sollte neu bewertet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die bekannt positiven Auswirkungen auf die Risikoverminderung von Geburtsdefekten (NTD) und Schwangerschaftskomplikationen legen eine Substitution von Folat und Vitamin B12 in ausreichender Dosierung (Folat 400-800 µg/d und Vitamin B12 500 µg/Woche) nahe.

## 5. Literaturverzeichnis

1. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U: „Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness.“ *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1003-9.
2. Afman LA, Van Der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ: „Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects.“ *QJM.* 2001 Mar;94(3):159-66.
3. Al-Gazali LI, Padmanabhan R, Melnyk S, Yi P, Pogribny IP, Pogribna M, Bakir M, Hamid ZA, Abdulrazzaq Y, Dawodu A, James SJ: „Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect.“ *Am J Med Genet.* 2001 Oct 1;103(2):128-32
4. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J: „Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency. Elevation of 2-methylcitric acid I and II levels in serum, urine, and cerebrospinal fluid of patients with cobalamin deficiency.“ *Metabolism.* 1993 Aug;42(8):978-88.
5. Anderson DF, Faber JJ, Parks CM: „Extraplacental transfer of water in the sheep.“ *J Physiol.* 1988 Dec;406:75-84.
6. Anderson DF, Borst NJ, Boyd RD, Faber JJ: „Filtration of water from mother to conceptus via paths independent of fetal placental circulation in sheep.“ *J Physiol.* 1990 Dec;431:1-10.
7. Andersson A, Hultberg B, Brattström L, Isaksson A: „Decreased serum homocysteine in pregnancy.“ *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992 Jun;30(6):377-9.
8. Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M et al. : „The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms.“ *Am J Hum Genet.* 1992 Mar;50(3):544-50.
9. Antony AC, Utley C, Van Horne KC, Kolhouse JF: „ Isolation and characterization of a folate receptor from human placenta.“ *J Biol Chem.* 1981 Sep 25;256(18):9684-92.
10. Antony AC, Kane MA, Portillo RM, Elwood PC, Kolhouse JF: „Studies of the role of a particulate folate-binding protein in the uptake of 5-methyltetrahydrofolate by cultured human KB cells.“ *J Biol Chem.* 1985 Dec 5;260(28):14911-7.
11. Attilakos A, Papakonstantinou E, Schulpis K, Voudris K, Katsarou E, Mastroianni S, Garoufi A: „Early effect of sodium valproate and carbamazepine monotherapy on homocysteine metabolism in children with epilepsy.“ *Epilepsy Res.* 2006 Oct;71(2-3):229-32. Epub 2006 Aug 4.
12. Baggot PJ, Eliseo AJ, Kalamarides JA, Shoemaker JD: „A folate-dependent metabolite in amniotic fluid from pregnancies with normal or trisomy 21 chromosomes.“ *Fetal Diagn Ther.* 2006;21(1):148-52.
13. Beall MH, van den Wijngaard JP, van Gemert MJ, Ross MG: „Amniotic fluid water dynamics.“ *Placenta.* 2007 Aug-Sep;28(8-9):816-23. Epub 2007 Jan 23.
14. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD: „Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study.“ *Pediatrics.* 1990 Jan;85(1):1-9.
15. Bender DA: „Novel functions of vitamin B6.“ *Proc Nutr Soc.* 1994 Nov;53(3):625-30.
16. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J, Hong SX, Correa A: „Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention.“ *N Engl J Med.* 1999 Nov 11;341(20):1485-90.
17. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC: „Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil.“ *Genet Mol Res.* 2008 Jan 22;7(1):33-42.

18. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN: „Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3290-5.
19. Bosco P, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL: „Methionine synthase (MTR) 2756 (A → G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome.“ *Am J Med Genet A*. 2003 Sep 1;121A(3):219-24.
20. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD: „Neural-tube defects.“ *N Engl J Med*. 1999 Nov 11;341(20):1509-19. Review.
21. Brady J, Wilson L, McGregor L, Vazquez M, Valente E, Orning L: „Direct Assay for the Quantitative Assessment of Holo-Transcobalamin in Serum and Plasma“ Axis-Shield Diagnostics Ltd, Dundee, Scotland and Axis-Shield ASA, Oslo, Norway
22. Brace RA, Wolf EJ: „Normal amniotic fluid volume changes throughout pregnancy.“ *Am J Obstet Gynaecol*. 1989 Aug;161(2):382-8.
23. Brace RA, Wlodek ME, Cock ML, Harding R: „Swallowing of lung liquid and amniotic fluid by the ovine fetus under normoxic and hypoxic conditions.“ *Am J Obstet Gynecol*. 1994 Sep;171(3):764-70.
24. Brattström L, Israelsson B, Lindgårde F, Hultberg B: „Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency.“ *Metabolism*. 1988 Feb;37(2):175-8.
25. Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L: „Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis.“ *Circulation*. 1998 Dec 8;98(23):2520-6.
26. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG: „The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia.“ *Obstet Gynecol Annu*. 1972;1:177-91.
27. Buccimazza SS, Molteno CD, Dunne TT, Viljoen DL: „Prevalence of neural tube defects in Cape Town, South Africa.“ *Teratology* 1994 Sep;50(3):194-9.
28. Busche A, Hennermann JB, Bürger F, Proquitté H, Dierks T, von Arnim-Baas A, Horn D: „Neonatal manifestation of multiple sulfatase deficiency.“ *Eur J Pediatr*. 2008 Dec 10.
29. Campbell J, Wathen N, Macintosh M, Cass P, Chard T, Mainwaring Burton R: „Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy.“ *Br J Obstet Gynaecol*. 1992 Jul;99(7):563-5.
30. Cantoni GL: „Activation of methionine for transmethylation.“ *J Biol Chem*. 1951 Apr;189(2):745-54.
31. Carlsen SM, Følling I, Grill V, Bjerve KS, Schneede J, Refsum H: „Metformin increases total serum homocysteine levels in non-diabetic male patients with coronary heart disease.“ *Scand J Clin Lab Invest*. 1997 Oct;57(6):521-7.
32. Carmel R, Jacobsen DW: „Homocysteine in Health and Disease“ Cambridge University Press, 2001 ISBN 0521653193, 9780521653190
33. Carson NA, Neill DW: „Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland.“ *Arch Dis Child*. 1962 Oct;37:505-13.
34. Cattaneo M: „Does tamoxifen enhance endothelial function by lowering the plasma levels of homocysteine?“ *Circulation*. 2001 Dec 11;104(24):E146-7.

35. Chandler CJ, Wang TT, Halsted CH: „Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization.” *J Biol Chem.* 1986 Jan 15;261(2):928-33.
36. Chatkupt S, Skurnick JH, Jaggi M, Mitruka K, Koenigsberger MR, Johnson WG: „Study of genetics, epidemiology, and vitamin usage in familial spina bifida in the United States in the 1990s.” *Neurology.* 1994 Jan;44(1):65-70.
37. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP: „S-Adenosylmethionine and methylation.” *FASEB J.* 1996 Mar;10(4):471-80.
38. Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R: „Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects.” *Am J Med Genet.* 1999 May 21;84(2):151-7.
39. Cox EV, White AM: „Methylmalonic acid excretion: an index of vitamin-B12 deficiency.” *Lancet.* 1962 Oct 27;2(7261):853-6.
40. Cragan JD, Roberts HE, Edmonds LD, Khoury MJ, Kirby RS, Shaw GM, Velie EM, Merz RD, Forrester MB, Williamson RA, Krishnamurti DS, Stevenson RE, Dean JH: „Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis--United States, 1985-1994” *MMWR CDC Surveill Summ.* 1995 Aug 25;44(4):1-13.
41. Czeizel AE, Dudás I: „Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation.” *N Engl J Med.* 1992 Dec 24;327(26):1832-5.
42. Danishpajoo IO, Gudi T, Chen Y, Kharitonov VG, Sharma VS, Boss GR: „Nitric oxide inhibits methionine synthase activity in vivo and disrupts carbon flow through the folate pathway.” *J Biol Chem.* 2001 Jul 20;276(29):27296-303. Epub 2001 May 22.
43. Dawson EB, Evans DR, Van Hook JW: „Amniotic fluid B12 and folate levels associated with neural tube defects.” *Am J Perinatol.* 1998;15(9):511-4.
44. Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Van Hook JW: „Amniotic fluid B12, calcium, and lead levels associated with neural tube defects.” *Am J Perinatol.* 1999;16(7):373-8.
45. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, van Geijn HP: „Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia.” *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Oct;173(4):1042-8.
46. De Bree A, van der Put NM, Mennen LI, Verschuren WM, Blom HJ, Galan P, Bates CJ, Herrmann W, Ullrich M, Dierkes J, Westphal S, Bouter LM, Heine RJ, Stehouwer CD, Dekker JM, Nijpels GN, Araújo F, Cunha-Ribeiro LM, Refsum H, Vollset S, Nygard O, Ueland PM: „Prevalences of hyperhomocysteinemia, unfavorable cholesterol profile and hypertension in European populations.” *Eur J Clin Nutr.* 2005 Apr;59(4):480-8.
47. De la Haba G, Cantoni GL: „The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine.” *J Biol Chem.* 1959 Mar;234(3):603-8.
48. Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, Pietropaolo F: „Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia” *Minerva Ginecol.* 2004 Oct;56(5):379-83.
49. De Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Geijn HP: „Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies.” *Br J Obstet Gynaecol.* 1997 Nov;104(11):1248-54.
50. Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K: „Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme.” *Cell.* 2003 May 16;113(4):435-44.
51. Donnelly JG: „Folic acid.” *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2001 Jun;38(3):183-223.

52. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D: „Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease.“ *Lab Invest.* 2001 May;81(5):645-72.
53. Duthie SJ, Hawdon A: „DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro.“ *FASEB J.* 1998 Nov;12(14):1491-7.
54. Economides DL, Ferguson J, Mackenzie IZ, Darley J, Ware II, Holmes-Siedle M: „Folate and vitamin B12 concentrations in maternal and fetal blood, and amniotic fluid in second trimester pregnancies complicated by neural tube defects.“ *Br J Obstet Gynaecol.* 1992 Jan;99(1):23-5.
55. Edwards MJ, Shiota K, Smith MS, Walsh DA: „Hyperthermia and birth defects.“ *Reprod Toxicol.* 1995 Sep-Oct;9(5):411-25. Review.
56. El-Khairy L, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM: „Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study.“ *Am J Clin Nutr.* 2003 Feb;77(2):467-72.
57. Eskes TK: „Neural tube defects, vitamins and homocysteine.“ *Eur J Pediatr.* 1998 Apr;157 Suppl 2:S139-41. Review.
58. Faber JJ, Gault CF, Green TJ, Long LR, Thornburg KL: „Chloride and the generation of amniotic fluid in the early embryo.“ *J Exp Zool.* 1973 Mar;183(3):343-52.
59. Fägerquist M, Fägerquist U, Odén A, Blomberg SG: „Fetal urine production and accuracy when estimating fetal urinary bladder volume.“ *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001 Feb;17(2):132-9.
60. Feinberg AP, Rainier S, DeBaun MR: „ Genomic imprinting, DNA methylation, and cancer.“ *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1995;(17):21-6.
61. Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R: „DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms.“ *Semin Cancer Biol.* 2002 Oct;12(5):389-98.
62. Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JL, Pick AM: „Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine.“ *Biochem Biophys Res Commun.* 1975 Sep 2;66(1):81-7.
63. Finnell RH, Shaw GM, Lammer EJ, Volcik KA: „Does prenatal screening for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in high-risk neural tube defect pregnancies make sense?“ *Genet Test.* 2002 Spring;6(1):47-52.
64. Friedel HA, Goa KL, Benfield P: „S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism.“ *Drugs.* 1989 Sep;38(3):389-416.
65. Fukagawa NK, Martin JM, Wurthmann A, Prue AH, Ebenstein D, O'Rourke B: „Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations.“ *Am J Clin Nutr.* 2000 Jul;72(1):22-9.
66. Gadd RL: „The volume of the liquor amnii in normal and abnormal pregnancies.“ *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1966 Feb;73(1):11-22.
67. Garabedian BH, Fraser FC: „A familial association between twinning and upper-neural tube defects.“ *Am J Hum Genet.* 1994 Nov;55(5):1050-3.
68. Gardiki-Kouidou P, Seller MJ: „Amniotic fluid folate, vitamin B12 and transcobalamins in neural tube defects.“ *Clin Genet.* 1988 Jun;33(6):441-8.
69. Garg R, Malinow M, Pettinger M, Upson B, Hunninghake D: „Niacin treatment increases plasma homocyst(e)ine levels.“ *Am Heart J.* 1999 Dec;138(6 Pt 1):1082-7.

70. Gaughan DJ, Kluijtmans LA, Barbaux S, McMaster D, Young IS, Yarnell JW, Evans A, Whitehead AS: „The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations.” *Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):451-6.
71. Gaull G, Sturman JA, Räihä NC: „Development of mammalian sulfur metabolism: absence of cystathionase in human fetal tissues.” *Pediatr Res*. 1972 Jun;6(6):538-47.
72. Gellekink H, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van Rooij A, Struys EA, den Heijer M, Blom HJ: „Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma.” *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1487-92. Epub 2005 May 26.
73. German DC, Bloch CA, Kredich NM: „Measurements of S-adenosylmethionine and L-homocysteine metabolism in cultured human lymphoid cells” *J Biol Chem*. 1983 Sep 25;258(18):10997-1003.
74. Gilbert WM, Brace RA: „The missing link in amniotic fluid volume regulation: intramembranous absorption.” *Obstet Gynecol*. 1989 Nov;74(5):748-54.
75. Gilbert WM, Eby-Wilkens E, Tarantal AF: „The missing link in rhesus monkey amniotic fluid volume regulation: intramembranous absorption.” *Obstet Gynecol*. 1997 Mar;89(3):462-5.
76. Gillibrand PN: „Changes in the electrolytes, urea and osmolality of the amniotic fluid with advancing pregnancy.” *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1969 Oct;76(10):898-905.
77. Gimsing P, Toft L, Felbo M, Hippe E: „Vitamin B12 binding proteins in amniotic fluid.” *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1985;64(2):121-6.
78. Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF, Spuijbroek MD, Steegers-Theunissen RP, Blom HJ, Boers GH, Eskes TK: „Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction.” *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996 May;66(1):23-9.
79. Golden JA, Chernoff GF: „Intermittent pattern of neural tube closure in two strains of mice.” *Teratology* 1993 Jan;47(1):73-80.
80. Graber SE, Scheffel U, Hodgkinson B, McIntyre PA: „Placental transport of vitamin B12 in the pregnant rat.” *J Clin Invest*. 1971 May;50(5):1000-4.
81. Graham JM Jr, Edwards MJ, Edwards MJ: „Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans.” *Teratology*. 1998 Nov;58(5):209-21.
82. Groenen PM, van Rooij IA, Peer PG, Gooskens RH, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP: „Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bifida.” *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):11-7.
83. Grubben MJ, Boers GH, Blom HJ, Broekhuizen R, de Jong R, van Rijt L, de Ruijter E, Swinkels DW, Nagengast FM, Katan MB: „Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial.” *Am J Clin Nutr*. 2000 Feb;71(2):480-4.
84. Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Peres S, Pagliusi RA, Sampaio Neto LF, D'Almeida V, Irazusta SP, Allen RH, Stabler SP: „Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns.” *Am J Clin Nutr*. 2004 Nov;80(5):1312-21.
85. Giugliani ER, Jorge SM, Gonçalves AL: „Serum and red blood cell folate levels in parturients, in the intervillous space of the placenta and in full-term newborns.” *J Perinat Med*. 1985;13(2):55-9.
86. Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H: „Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading.” *Clin Chem*. 1993 Jul;39(7):1390-7.

87. Guttormsen AB, Ueland PM, Lønning PE, Mella O, Refsum H: „Kinetics of plasma total homocysteine in patients receiving high-dose methotrexate therapy.” *Clin Chem.* 1998 Sep;44(9):1987-9.
88. Hak AE, Polderman KH, Westendorp IC, Jakobs C, Hofman A, Witteman JC, Stehouwer CD: „Increased plasma homocysteine after menopause.” *Atherosclerosis.* 2000 Mar;149(1):163-8.
89. Hall JG, Friedman JM, Kenna BA, Popkin J, Jawanda M, Arnold W: „Clinical, genetic, and epidemiological factors in neural tube defects.” *Am J Hum Genet.* 1988 Dec;43(6):827-37.
90. Hamm MW, Mehansho H, Henderson LM: „Transport and metabolism of pyridoxamine and pyridoxamine phosphate in the small intestine of the rat.” *J Nutr.* 1979 Sep;109(9):1552-9.
91. Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans AE: „The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia” *QJM.* 1996 Aug;89(8):571-7
92. Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC: „ Maternal-to-fetal transfer of 5-methyltetrahydrofolate by the perfused human placental cotyledon: evidence for a concentrative role by placental folate receptors in fetal folate delivery.” *J Lab Clin Med.* 1995 Aug;126(2):184-203.
93. Herbert V: „Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay.” *Am J Clin Nutr.* 1988 Sep;48(3 Suppl):852-8. Review.
94. Herbert V: „Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians.” *Am J Clin Nutr.* 1994 May;59(5 Suppl):1213S-1222S.
95. Herrmann W, Quast S, Ullrich M, Schultze H, Bodis M, Geisel J: „Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation.” *Atherosclerosis.* 1999 May;144(1):91-101.
96. Herrmann W, Schorr H, Bodis M, Knapp JP, Müller A, Stein G, Geisel J: „ Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects.” *Eur J Clin Invest.* 2000 Dec;30(12):1083-9.
97. Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K, Rassoul F, Richter V: „Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians.” *Clin Chem.* 2001 Jun;47(6):1094-101.
98. Herrmann W, Hübner U, Koch I, Obeid R, Retzke U, Geisel J: „Alteration of homocysteine catabolism in pre-eclampsia, HELLP syndrome and placental insufficiency.” *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(10):1109-16.
99. Herrmann W, Isber S, Obeid R, Herrmann M, Jouma M: „Concentrations of homocysteine, related metabolites and asymmetric dimethylarginine in preeclamptic women with poor nutritional status.” *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(10):1139-46.
100. Hernandez D, Fisher EM: „Down syndrome genetics: unravelling a multifactorial disorder.” *Hum Mol Genet.* 1996;5 Spec No:1411-6.
101. Hogg BB, Tamura T, Johnston KE, Dubard MB, Goldenberg RL: „Second-trimester plasma homocysteine levels and pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, and intrauterine growth restriction.” *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Oct;183(4):805-9
102. Holm J, Hansen SI, Høier-Madsen M: „ A high-affinity folate binding protein in human amniotic fluid. Radioligand binding characteristics, immunological properties and molecular size.” *Biosci Rep.* 1990 Feb;10(1):79-85.
103. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY: „Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects.” *JAMA.* 2001 Jun 20;285(23):2981-6.

104. Hum DW, Bell AW, Rozen R, MacKenzie RE: „Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydro-folate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase.” *J Biol Chem*. 1988 Nov 5;263(31):15946-50.
105. Hvas AM, Lous J, Ellegaard J, Nexø E: „Use of plasma methylmalonic acid in diagnosing vitamin B-12 deficiency in general practice.” *Scand J Prim Health Care*. 2002 Mar;20(1):57-9.
106. Infante-Rivard C, Rivard GE, Yotov WV, Théorêt Y: „Perinatal reference intervals for plasma homocysteine and factors influencing its concentration.” *Clin Chem*. 2002 Jul;48(7):1100-2.
107. Infante-Rivard C, Rivard GE, Gauthier R, Théorêt Y: „Unexpected relationship between plasma homocysteine and intrauterine growth restriction.” *Clin Chem*. 2003 Sep;49(9):1476-82
108. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P, Zappia V: „Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia.” *Lancet*. 2003 May 17;361(9370):1693-9.
109. Jacobsen DW: „Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease.” *Clin Chem*. 1998 Aug;44(8 Pt 2):1833-43. Review.
110. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL, Gaylor DW: „Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome.” *Am J Clin Nutr*. 1999 Oct;70(4):495-501..
111. James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA: „Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology.” *J Nutr*. 2002 Aug;132(8 Suppl):2361S-2366S
112. Jauniaux E, Gulbis B, Gerloo E: „Free amino acids in human fetal liver and fluids at 12-17 weeks of gestation.” *Hum Reprod*. 1999 Jun;14(6):1638-41.
113. Jauniaux E, Hempstock J, Teng C, Battaglia FC, Burton GJ: „Polyol concentrations in the fluid compartments of the human conceptus during the first trimester of pregnancy: maintenance of redox potential in a low oxygen environment.” *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):1171-5. Epub 2004 Nov 23.
114. Jencks DA, Mathews RG: „Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium.” *J Biol Chem*. 1987 Feb 25;262(6):2485-93.
115. Jonkers IJ, de Man FH, Onkenhout W, van der Laarse A, Smelt AH: „Implication of fibrate therapy for homocysteine.” *Lancet*. 1999 Oct 2;354(9185):1208.
116. Kagan BL, Sultzer DL, Rosenlicht N, Gerner RH: „Oral S-adenosylmethionine in depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.” *Am J Psychiatry*. 1990 May;147(5):591-5.
117. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Cook HY: „Total homocyst(e)ine in plasma and amniotic fluid of pregnant women.” *Metabolism* 1986 Oct;35(10):889-91.
118. Kang SS, Wong PW, Norusis M: „Homocysteinemia due to folate deficiency.” *Metabolism*. 1987 May;36(5):458-62
119. Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, Wagner C: „Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine.” *Am J Clin Nutr*. 2001 Dec;74(6):723-9.
120. Kerr SJ: „Competing methyltransferase systems.” *J Biol Chem*. 1972 Jul 10;247(13):4248-52.

121. Kharb S: „Total free radical trapping antioxidant potential in pre-eclampsia.” *Int J Gynaecol Obstet.* 2000 Apr;69(1):23-6.
122. Kräutler B: „Vitamin B12: chemistry and biochemistry.” *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug;33(Pt 4):806-10. Review.
123. Kunz BA: „Mutagenesis and deoxyribonucleotide pool imbalance.” *Mutat Res.* 1988 Jul-Aug;200(1-2):133-47. Review.
124. Lachmeijer AM, Arngrímsson R, Bastiaans EJ, Pals G, ten Kate LP, de Vries JI, Kostense PJ, Aarnoudse JG, Dekker GA: „Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia.” *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Feb;184(3):394-402.
125. Lammer EJ, Sever LE, Oakley GP Jr: „Teratogen update: valproic acid.” *Teratology.* 1987 Jun;35(3):465-73.
126. Lieber CS, Casini A, DeCarli LM, Kim CI, Lowe N, Sasaki R, Leo MA: „S-adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon.” *Hepatology.* 1990 Feb;11(2):165-72.
127. Lien EA, Nedrebø BG, Varhaug JE, Nygård O, Aakvaag A, Ueland PM: „Plasma total homocysteine levels during short-term iatrogenic hypothyroidism.” *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Mar;85(3):1049-53
128. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH: „Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis.” *N Engl J Med.* 1988 Jun 30;318(26):1720-8.
129. Löffler G; Petrides PE; Heinrich PC (Hrsg.): „Biochemie und Pathobiochemie” Reihe: Springer-Lehrbuch 8. Aufl. 2007 ISBN: 978-3-540-32680-9
130. Loew D, Eberhardt A, Hesecker H, Kübler W: „Zur Plasmakinetik und Elimination der Folsäure“ 1987 *Klin Wochenschr* 65:520–524
131. Lowe KE, Osborne CB, Lin BF, Kim JS, Hsu JC, Shane B: „Regulation of folate and one-carbon metabolism in mammalian cells. II. Effect of folylpoly-gamma-glutamate synthetase substrate specificity and level on folate metabolism and folylpoly-gamma-glutamate specificity of metabolic cycles of one-carbon metabolism.” *J Biol Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21665-73.
132. Lowenstein L, Lalonde M, Deschenes EB, Shapiro L: „Vitamin B12 in pregnancy and the puerperium.” *Am J Clin Nutr.* 1960 May-Jun;8:265-75.
133. Lucock MD, Priestnall M, Daskalakis I, Schorah CJ, Wild J, Levene MI: „Nonenzymatic degradation and salvage of dietary folate: physicochemical factors likely to influence bioavailability” *Biochem Mol Med.* 1995 Jun;55(1):43-53.
134. Lucock M: „Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes.” *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct;71(1-2):121-38.
135. Malinow MR: „Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases.” *J Intern Med.* 1994 Dec;236(6):603-17. Review.
136. Malinow MR, Rajkovic A, Duell PB, Hess DL, Upson BM: „The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocyst(e)ine suggests a potential role for maternal homocyst(e)ine in fetal metabolism.” *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Feb;178(2):228-33.
137. Martinez M, Cuskelly GJ, Williamson J, Toth JP, Gregory JF 3<sup>rd</sup>: „Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration.” *J Nutr.* 2000 May;130(5):1115-23.

138. Marzusch K, Dietl J, Klein R, Hornung D, Neuer A, Berg PA: „Recurrent first trimester spontaneous abortion associated with antiphospholipid antibodies: a pilot study of treatment with intravenous immunoglobulin.” *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996 Nov;75(10):922-6.
139. Matsubara K, Neafsey EJ, Collins MA: „Novel S-adenosylmethionine-dependent indole-N-methylation of beta-carbolines in brain particulate fractions.” *J Neurochem*. 1992 Aug;59(2):511-8.
140. Medina M, Urdiales JL, Amores-Sánchez MI: „Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions.” *Eur J Biochem*. 2001 Jul;268(14):3871-82.
141. Megahed MA, Taher IM: „Folate and homocysteine levels in pregnancy.” *Br J Biomed Sci*. 2004;61(2):84-7.
142. Meguid NA, Dardir AA, Khass M, Hossieny LE, Ezzat A, El Awady MK: „MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian mothers with Down syndrome children.” *Dis Markers*. 2008;24(1):19-26.
143. Melnyk S, Pogribna M, Miller BJ, Basnakian AG, Pogribny IP, James SJ: „Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells.” *Cancer Lett*. 1999 Nov 1;146(1):35-44.
144. Mignini LE, Latthe PM, Villar J, Kilby MD, Carroli G, Khan KS: „Mapping the theories of preeclampsia: the role of homocysteine.” *Obstet Gynecol*. 2005 Feb;105(2):411-25.
145. Mijatovic V, Kenemans P, Netelenbos C, Jakobs C, Popp-Snijders C, Peters-Muller ER, van der Mooren MJ: „Postmenopausal oral 17beta-estradiol continuously combined with dydrogesterone reduces fasting serum homocysteine levels.” *Fertil Steril*. 1998 May;69(5):876-82.
146. Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM: „Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects.” *Lancet*. 1995 Jan 21;345(8943):149-51.
147. Mills JL, Scott JM, Kirke PN, McPartlin JM, Conley MR, Weir DG, Molloy AM, Lee YJ: „Homocysteine and neural tube defects.” *J Nutr*. 1996 Mar;126(3):756S-760S.
148. Miner SE, Evrovski J, Cole DE: „Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update.” *Clin Biochem*. 1997 Apr;30(3):189-201.
149. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR, Weir DG, Scott JM: „Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations.” *Lancet*. 1997 May 31;349(9065):1591-3.
150. Monk M, Boubelik M, Lehnert S: „Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development.” *Development*. 1987 Mar;99(3):371-82.
151. Monsen AL, Schneede J, Ueland PM: „Mid-trimester amniotic fluid methionine concentrations: a predictor of birth weight and length.” *Metabolism*. 2006 Sep;55(9):1186-91.
152. MRC Vitamin Study Research Group: „Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group.” *Lancet*. 1991 Jul 20;338(8760):131-7.
153. Mudd SH, Uhlendorf BW, Freeman JM, Finkelstein JD, Shih VE: „Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity.” *Biochem Biophys Res Commun*. 1972 Jan 31;46(2):905-12.
154. Mudd, SH, Levy HL, Skovby F: „Disorders of Transsulfuration.” *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Ed. C. R. Scriver et al. New York: McGraw-Hill Publishing Co., 1995. 1279-327.

155. Murphy MM, Scott JM, McPartlin JM, Fernandez-Ballart JD: „The pregnancy-related decrease in fasting plasma homocysteine is not explained by folic acid supplementation, hemodilution, or a decrease in albumin in a longitudinal study.” *Am J Clin Nutr.* 2002 Sep;76(3):614-9.
156. Nakatsu T, Uwabe C, Shiota K: „Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects.” *Anat Embryol (Berl).* 2000 Jun;201(6):455-66.
157. Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK: „Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss.” *Hum Reprod.* 2000 Apr;15(4):954-60.
158. Norlund L, Grubb A, Fex G, Leksell H, Nilsson JE, Schenck H, Hultberg B: „The increase of plasma homocysteine concentrations with age is partly due to the deterioration of renal function as determined by plasma cystatin C.” *Clin Chem Lab Med.* 1998 Mar;36(3):175-8.
159. Obeid R, Munz W, Jäger M, Schmidt W, Herrmann W: „Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status.” *Am J Clin Nutr.* 2005 Jul;82(1):133-9.
160. Obeid R, Herrmann W: „Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid.” *Clin Chem Lab Med.* 2007a.;45(12):1746-50.
161. Obeid R, Kostopoulos P, Knapp JP, Kasoha M, Becker G, Fassbender K, Herrmann W.: „Biomarkers of folate and vitamin B12 are related in blood and cerebrospinal fluid.” *Clin Chem.* 2007b. Feb;53(2):326-33. Epub 2007 Jan 2.
162. Oliveira KC, Bianco BB, Verreschi IT, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MV: „Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients.” *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008 Nov;52(8):1374-81.
163. Ostergard DR: „The physiology and clinical importance of amniotic fluid. A review.” *Obstet Gynecol Surv.* 1970 Apr;25(4):297-319.
164. Palan PR, Mikhail MS, Romney SL: „Placental and serum levels of carotenoids in preeclampsia.” *Obstet Gynecol.* 2001 Sep;98(3):459-62.
165. Perez-D'Gregorio RE, Miller RK: „Transport and endogenous release of vitamin B12 in the dually perfused human placenta.” *J Pediatr.* 1998 Mar;132(3 Pt 2):S35-42.
166. Perrone S, Longini M, Bellieni CV, Centini G, Kenanidis A, De Marco L, Petraglia F, Buonocore G.: „Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome.” *Clin Biochem.* 2007 Feb;40(3-4):177-80. Epub 2006 Nov 21.
167. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL: „Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12.” *Am J Clin Nutr.* 1994 Oct;60(4):559-66.
168. Powers RW, Evans RW, Majors AK, Ojimba JI, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM: „Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation.” *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Dec;179(6 Pt 1):1605-11.
169. Pritchard JA: „Fetal swallowing and amniotic fluid volume.” *Obstet Gynecol.* 1966 Nov;28(5):606-10.
170. Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM: „The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin.” *Blood.* 2009 Jan 1;113(1):186-92. Epub 2008 Sep 8.
171. Rabinowitz R, Peters MT, Vyas S, Campbell S, Nicolaidis KH: „Measurement of fetal urine production in normal pregnancy by real-time ultrasonography.” *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Nov;161(5):1264-6.

172. Raijmakers MT, Roes EM, Zusterzeel PL, Steegers EA, Peters WH: „Thiol status and antioxidant capacity in women with a history of severe pre-eclampsia.” *BJOG*. 2004 Mar;111(3):207-12.
173. Rajkovic A, Mahomed K, Malinow MR, Sorenson TK, Woelk GB, Williams MA: „Plasma homocyst(e)ine concentrations in eclamptic and preeclamptic African women postpartum.” *Obstet Gynecol*. 1999 Sep;94(3):355-60.
174. Ray JG, Laskin CA: „Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review.” *Placenta*. 1999 Sep;20(7):519-29.
175. Ray JG, Blom HJ: „Vitamin B12 insufficiency and the risk of fetal neural tube defects.” *QJM*. 2003 Apr;96(4):289-95. Review.
176. Rees MM, Rodgers GM: „Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis.” *Thromb Res*. 1993 Sep 1;71(5):337-59.
177. Refsum H, Helland S, Ueland PM: „Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine.” *Clin Chem*. 1985 Apr;31(4):624-8.
178. Refsum H, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE: „Homocysteine and cardiovascular disease.” *Annu Rev Med*. 1998;49:31-62. Review.
179. Resch KL : „Homocystein : Störungen des B6-, B12- und Folsäure-metabolismus.” Ponte Press 1996 ISBN 3-920329-17-5 S. 63-89
180. Robinson K, Gupta A, Dennis V, Arheart K, Chaudhary D, Green R, Vigo P, Mayer EL, Selhub J, Kutner M, Jacobsen DW: „Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations.” *Circulation*. 1996 Dec 1;94(11):2743-8.
181. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J: „Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 24;93(26):15227-32.
182. Ross MG, Cedars L, Nijland MJ, Ogundipe A: „Treatment of oligohydramnios with maternal 1-deamino-[8-D-arginine] vasopressin-induced plasma hypoosmolality.” *Am J Obstet Gynecol*. 1996 May;174(5):1608-13.
183. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH: „Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies.” *Am J Med*. 1994 Mar;96(3):239-46.
184. Schenk BE, Festen HP, Kuipers EJ, Klinkenberg-Knol EC, Meuwissen SG: „Effect of short- and long-term treatment with omeprazole on the absorption and serum levels of cobalamin.” *Aliment Pharmacol Ther*. 1996 Aug;10(4):541-5.
185. Schenker S, Johnson RF, Mahuren JD, Henderson GI, Coburn SP: „Human placental vitamin B6 (pyridoxal) transport: normal characteristics and effects of ethanol.” *Am J Physiol*. 1992 Jun;262(6 Pt 2):R966-74.
186. Schneede J, Refsum H, Ueland PM: „Biological and environmental determinants of plasma homocysteine.” *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(3):263-79.
188. Schneider H, Panigel M, Dancis J: „Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine.” *Am J Obstet Gynecol*. 1972 Nov 15;114(6):822-8.
189. Scholze A, Rinder C, Beige J, Riezler R, Zidek W, Tepel M: „Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse pressure and endothelial function in patients with end-stage renal failure.” *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):369-74. Epub 2004 Jan 19.
190. Schuster K, Bailey LB, Mahan CS: „Effect of maternal pyridoxine X HCl supplementation on the vitamin B-6 status of mother and infant and on pregnancy outcome.” *J Nutr*. 1984 May;114(5):977-88.

191. Sciscione AC, Costigan KA, Johnson TR: „Increase in ambient temperature may explain decrease in amniotic fluid index.“ *Am J Perinatol.* 1997 May;14(5):249-51.
192. Seetharam B: „Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B12).“ *Annu Rev Nutr.* 1999;19:173-95.
193. Selhub J, Miller JW: „The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine.“ *Am J Clin Nutr.* 1992 Jan;55(1):131-8.
194. Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, Morland K, Harris JA: „Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects.“ *Epidemiology.* 1995 May;6(3):219-26.
195. Shaw GM, Velie EM, Schaffer D: „Risk of neural tube defect-affected pregnancies among obese women.“ *JAMA.* 1996 Apr 10;275(14):1093-6.
196. Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH: „Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida.“ *Am J Med Genet.* 2002 Feb 15;108(1):1-6.
197. Sierra EE, Goldman ID: „Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates.“ *Semin Oncol.* 1999 Apr;26(2 Suppl 6):11-23.
198. Sitzmann FC: „Duale Reihe Pädiatrie“ Thieme Verlag 3., überarb. Aufl. 2006 ISBN: 9783131253330
199. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J: „Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences.“ *Lancet.* 1983 May 7;1(8332):1027-31.
200. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ: „Vitamin deficiencies and neural tube defects.“ *Arch Dis Child.* 1976 Dec;51(12):944-50.
201. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J: „Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry.“ *J Clin Invest.* 1988 Feb;81(2):466-74.
202. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH: „Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency.“ *Blood.* 1993 Jun 15;81(12):3404-13.
203. Stabler SP, Allen RH: „Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry.“ *Clin Chem.* 2004 Feb;50(2):365-72. Epub 2003 Dec 4.
204. Stanger, O. „Homocystein: Grundlagen, Klinik, Therapie, Prävention“ Verlag Wilhelm Maudrich Wien-München-Bern 2004 ISBN 3-85175-766-1
205. Stauber M, Weyerstahl T: „Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe“ Thieme Verlag 3. Aufl. 2007 ISBN: 9783131253439
206. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK: „Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects?“ *Metabolism.* 1994 Dec;43(12):1475-80.
207. Steegers-Theunissen RP, Wathen NC, Eskes TK, van Raaij-Selten B, Chard T: „Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy.“ *Br J Obstet Gynaecol.* 1997 Jan;104(1):20-4.
208. Steen MT, Boddie AM, Fisher AJ, Macmahon W, Saxe D, Sullivan KM, Dembure PP, Elsas LJ: „Neural-tube defects are associated with low concentrations of cobalamin (vitamin B12) in amniotic fluid.“ *Prenat Diagn.* 1998 Jun;18(6):545-55.

209. Steinberg SE, Fonda S, Campbell CL, Hillmann RS: „Folate utilization in Friend erythroleukemia cells.” *J Cell Physiol.* 1983 Feb;114(2):252-6.
210. Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S, Aoyagi K: „Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan.” *Eur J Nutr.* 2004 Oct;43(5):285-7. Epub 2004 Jan 6.
211. Temple ME, Luzier AB, Kazierad DJ: „Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis.” *Ann Pharmacother.* 2000 Jan;34(1):57-65.
212. Trimble KC, Molloy AM, Scott JM, Weir DG: „The effect of ethanol on one-carbon metabolism: increased methionine catabolism and lipotrope methyl-group wastage.” *Hepatology.* 1993 Oct;18(4):984-9.
213. Ubbink JB, van der Merwe A, Delpont R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, Vermaak WJ: „The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism.” *J Clin Invest.* 1996 Jul 1;98(1):177-84.
214. Ueland PM: „Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase.” *Pharmacol Rev.* 1982 Sep;34(3):223-53.
215. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow R, Andersson A, Allen RH.: „Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications.” *Clin Chem* 1993;39:1764-1779.
216. Ueland PM, Mansoor MA, Guttormsen AB, Müller F, Aukrust P, Refsum H, Svardal AM: „Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status--a possible element of the extracellular antioxidant defense system.” *J Nutr.* 1996 Apr;126(4 Suppl):1281S-4S.
217. Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J: „Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos.” *Teratology* 1994 Nov;50(5):348-60.
218. VanAerts LA, Poirot CM, Herberts CA, Blom HJ, De Abreu RA, Trijbels JM, Eskes TK, Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J: „Development of methionine synthase, cystathionine-beta-synthase and S-adenosyl-homocysteine hydrolase during gestation in rats.” *J Reprod Fertil.* 1995 Mar;103(2):227-32.
218. van der Molen EF, Arends GE, Nelen WL, van der Put NJ, Heil SG, Eskes TK, Blom HJ: „A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy.” *Am J Obstet Gynecol.* 2000 May;182(5):1258-63.
219. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ: „Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida.” *Lancet.* 1995 Oct 21;346(8982):1070-1.
220. van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ: „Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis.” *QJM.* 1997 Feb;90(2):111-5.
221. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ: „Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview.” *Exp Biol Med (Maywood).* 2001 Apr;226(4):243-70. Review.
222. van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, von Blomberg BM, Büller HR: „High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia.” *Am J Obstet Gynecol.* 1999 May;180(5):1146-50.
223. Van Straaten HW, Janssen HC, Peeters MC, Copp AJ, Hekking JW: „Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic.” *Dev Dyn.* 1996 Nov;207(3):309-18

224. Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R: „Total homocysteine in pediatric patients.” *Clin Chem.* 1997 Apr;43(4):690-2.
225. Viña J, Vento M, García-Sala F, Puertes IR, Gascó E, Sastre J, Asensi M, Pallardó FV: „L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency.” *Am J Clin Nutr.* 1995 May;61(5):1067-9.
226. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, Emblem BM, Tverdal A, Gjessing HK, Monsen AL, Ueland PM: „Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study.” *Am J Clin Nutr.* 2000 Apr;71(4):962-8.
227. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR: „Changes in homocysteine levels during normal pregnancy.” *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Mar;180(3 Pt 1):660-4.
228. Wang H, Yoshizumi M, Lai K, Tsai JC, Perrella MA, Haber E, Lee ME: „Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine.” *J Biol Chem.* 1997 Oct 3;272(40):25380-5.
229. Wasserman CR, Shaw GM, Selvin S, Gould JB, Syme SL: „Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects.” *Am J Public Health.* 1998 Nov;88(11):1674-80.
230. Watkins ML, Scanlon KS, Mulinare J, Khoury MJ: „Is maternal obesity a risk factor for anencephaly and spina bifida?” *Epidemiology.* 1996 Sep;7(5):507-12.
231. Welch GN, Loscalzo J: „Homocysteine and atherothrombosis.” *N Engl J Med.* 1998 Apr 9;338(15):1042-50. Review.
232. Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Cliver S, Tamura T: „Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites.” *Am J Med Genet.* 2000a Jan 3;90(1):6-11.
233. Wenstrom KD, Johanning GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Tamura T.: „Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype in the etiology of neural tube defects.” *Am J Med Genet.* 2000b Jan 3;90(1):12-6.
234. Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA: „Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects.” *JAMA.* 1996 Apr 10;275(14):1089-92.
235. Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, Sever LE, Miller LA, Meaney FJ, Levitt M: „Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States.” *Teratology.* 2002 Jul;66(1):33-9.
236. Williams WM, Huang KC: „Renal tubular transport of folic acid and methotrexate in the monkey” *Am J Physiol.* 1982 May;242(5):F484-90.
237. Wolos JA, Frondorf KA, Davis GF, Jarvi ET, McCarthy JR, Bowlin TL: „Selective inhibition of T cell activation by an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase.” *J Immunol.* 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3264-73. a
238. Wolos JA, Frondorf KA, Esser RE: „Immunosuppression mediated by an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. Prevention and treatment of collagen-induced arthritis.” *J Immunol.* 1993 Jul 1;151(1):526-34. b
239. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK: „Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss.” *Fertil Steril.* 1993 Nov;60(5):820-5.
240. Yasuda S, Hasui S, Yamamoto C, Yoshioka C, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K: „Placental folate transport during pregnancy.” *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Sep;72(9):2277-84. Epub 2008 Sep 7.

241. Zaina S, Lindholm MW, Lund G: „Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia?“ J Nutr. 2005 Jan;135(1):5-8.

241. Zoccolella S, Iliceto G, deMari M, Livrea P, Lamberti P: „Management of L-Dopa related hyperhomocysteinemia: catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitors or B vitamins? Results from a review.“ Clin Chem Lab Med. 2007;45(12):1607-13. Review.

## 6. Anlagen

### 6.1 Aufklärung und Einwilligung

#### Information und Einwilligungserklärung zur klinischen Studie:

Zusammenhang zwischen Folat, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocystein und Methylierungsstatus in Blut und Fruchtwasser von schwangeren Frauen mit unterschiedlichem Schwangerschaftsausgang

Sehr geehrte Schwangere,

die Nährstoffversorgung bei schwangeren Frauen spielt bei der Entwicklung des Kindes eine entscheidende Rolle, wobei Folat, Vitamin B12 und Vitamin B6 wegen ihrer Rolle im Intermediärstoffwechsel von großer Bedeutung sind. Heute gilt es als bewiesen, dass die regelmäßige Einnahme von Folat vor und während der Schwangerschaft zur Reduktion von Neuralrohrdefekten beiträgt.

Aufgrund der möglichen schwerwiegenden Konsequenzen einer erniedrigten Konzentration an Vitamin B12 und Folat beim Feten empfiehlt sich eine möglichst frühzeitige Diagnostik zur Erkennung eines eventuellen Vitamin B-Mangels in der Schwangerschaft.

Ziel der vorliegenden Studie ist es zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen Folat-, Vitamin B6- und Vitamin B12-Status im mütterlichen Blut und Fruchtwasser gibt. Homocystein, Methylmalonsäure und Holotranscobalmin gelten als sensitive und spezifische Indikatoren des Vitamin B12-Status.

Folat, Vitamin B6 und B12 sind wichtige Marker für die Methylierungsfähigkeit der Zelle. Besonders wichtig sind diese während der Schwangerschaft, weil dann die Zellproliferationsrate und somit der Bedarf an Methylgruppen außergewöhnlich hoch ist.

Hintergrund dieser Studie ist die Frage, ob unterschiedliche Serumkonzentrationen dieser Vitamine in Zusammenhang mit dem Vitaminstatus im Fruchtwasser und dem Schwangerschaftsausgang stehen. Somit könnten diese Vitamine bei erniedrigten mütterlichen Serumwerten eine Rolle im Rahmen von angeborenen Missbildungen spielen.

Für die Durchführung dieser Studie benötigen wir gesunde Schwangere, bei denen im Rahmen der Amnioncentese 3 ml Fruchtwasser und 15 ml venöses Blut abgenommen werden. Als Vergleichsgruppe benötigen wir Frauen, bei deren Kindern ein Neuralrohrdefekt oder Down-Syndrom vermutet wird.

Deshalb möchten wir Sie bitten, sich an dieser Studie zu beteiligen. Die Ergebnisse werden helfen zu klären, ob es Gründe gibt, die Prävention dahingehend zu optimieren.

Die während der Studie erhobenen Daten werden anonymisiert ausgewertet und unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes lediglich autorisierten Personen zugänglich gemacht.

*Ihre Ansprechpartnerin im Rahmen der Studie ist:*

OÄ Dr. med. Silke Jacob  
Universitäts-Frauenklinik  
Kirrberger Strasse  
66421 Homburg/Saar  
Tel.: 06841-1628145

Homburg, den 01.08.2006

OÄ Dr. med. Jacob

---

Mit Ihrer Unterschrift erklären Sie, dass Sie diese Probandeninformation gelesen und verstanden haben und freiwillig zur Teilnahme an der Untersuchung bereit sind. Ferner stimmen Sie mit Ihrer Unterschrift der Weitergabe der während der Studie erhobenen Daten an autorisierte Dritte zu. Sie haben das Recht, jederzeit die Teilnahme an der Untersuchung ohne Nennung von Gründen zu widerrufen.

---

Ort, Datum

Name

eigenhändige Unterschrift

**6.2 Fragebogen**

Datum .....

Fall- oder Kontrollnummer.....

<b>Name</b> ..... <b>Adresse/Tel.</b> .....	<b>Diagnosen</b> <input type="radio"/> NTD-Schwangerschaft <input type="radio"/> Down-Syndrom-Schwangerschaft <input type="radio"/> IUGR-Schwangerschaft <input type="radio"/> Normale Schwangerschaft
<b>Alter der Mutter (Jahre)</b> ..... <b>Schwangerschaftszeitpunkt (Woche/Tag)</b> ..... <b>basiert auf</b> ..... <b>Lebendgeburten</b> ..... <b>Anzahl Fehlgeburten/Schwangerschafts-</b> <b>abbrüche</b> ..... <b>Komplikationen bei der aktuellen</b> <b>Schwangerschaft</b> ..... ..... .....	<b>Aktuelle Einnahme v. Folat, B12, B6, Fe<sup>++</sup></b> <b>Seit wann?</b> ..... <b>Dosierung</b> ..... <b>Medikation</b> ..... ..... <b>Gewicht (kg)</b> ..... <b>Größe (cm)</b> .....  <b>Gewichtszunahme Schwangersch. (kg)</b> ..... <b>Schulabschluss</b> .....  <u><b>Vorerkrankungen</b></u> <b>Diabetes mellitus</b> ..... <b>Rauchen</b> ..... <b>Gerinnungsstörung</b> ..... <b>MTHFR-Mutation</b> .....
Andere Anmerkungen:	

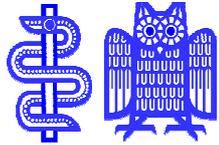
# 7. Poster

Präsentiert auf der 6. Konferenz über Homocysteinmetabolismus-Weltkongress der Hyperhomocysteinämie; Saarbrücken/Deutschland, 05.-09. Juni 2007

## Homocysteine and Methylation Markers (AdoMet, AdoHcy) in Plasma and Amniotic Fluid from Pregnant Women with Normal Birth Outcome

R. Obeid<sup>1</sup>, E. Raabe<sup>1</sup>, S. Weber<sup>2</sup>, W. Schmidt<sup>2</sup>, and W. Herrmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Hospital of the Saarland, Homburg/Saar, Germany  
<sup>2</sup>Department of Gynecology, University Hospital of the Saarland, Germany



### Introduction

The requirements for the B-vitamins (folate, vitamin B12 and B6) are exceptionally high during pregnancy due to increased maternal metabolic rate and fetal demands. Folate, vitamin B12 and B6 function as cofactors in one-carbon metabolism, DNA-synthesis and in numerous methylation reactions. These metabolic pathways are particularly active in the developing embryo. B-vitamins participate in homocysteine (Hcy) catabolism and production of S-adenosyl methionine (AdoMet), the universal methyl donor in all living cells. AdoMet is generated from methionine and further converted into S-adenosyl homocysteine (AdoHcy) after donating its methyl group to other cellular components. AdoHcy is hydrolysed into Hcy that can be converted via AdoHcy-hydrolase into AdoHcy. The rate of change in amniotic fluid (AF) volume is a strong function of gestational age. In early gestation, significant amount of amniotic fluid are present before the establishment of fetal micturition or deglutition. The most likely mechanism for the formation of amniotic fluid before the micturition is an active transport of solute by the amnion into the amniotic space. Fetal urine is a major source of amniotic fluid that first enters the amniotic space at 8-11 weeks. At the same time the fetus begins swallowing amniotic fluids. Other sources of amniotic fluids during gestation are: the movement of water and solute between amniotic fluid and fetal blood, water transport across the permeable fetal skin, and secretion of fluids by fetal lungs. Peer studies evaluated concentrations of B-vitamins and total Hcy (tHcy) in AF. Low concentrations of folate and vitamin B12 in AF were related to an increased risk for birth defects. There are no data about concentrations of AdoMet and AdoHcy in amniotic fluids. We studied the concentrations of B-vitamins, tHcy, AdoMet, and AdoHcy in amniotic fluids from pregnant women with normal birth outcome.

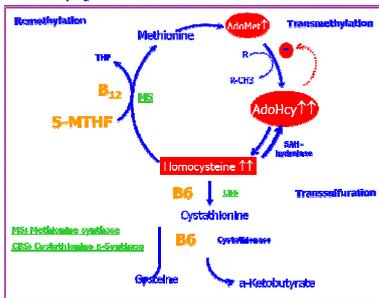


Figure 1. Homocysteine metabolism

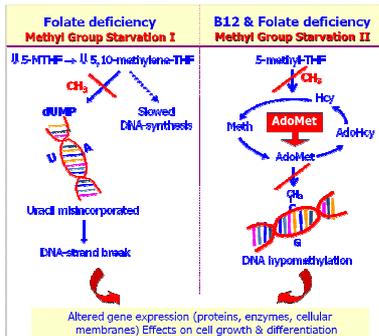


Figure 2. The role of methyl group deficiency in DNA damage  
 MS: Methionine synthase, AdoMet: S-adenosylmethionine, AdoHcy: S-adenosylhomocysteine, 5-MTHF: 5-methyltetrahydrofolate

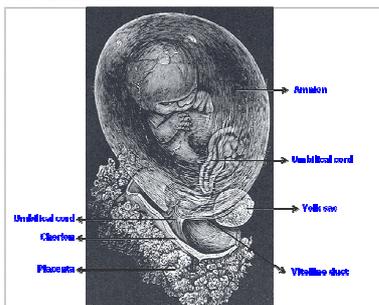


Figure 3. Dean film stereoscopic photographs lent by Prof. A. Thomson, Oxford

### Amniotic fluid and plasma markers

Marker	Plasma/serum	Amniotic fluid	P	r
tHcy, µM	5.1 (2.0)	1.2 (0.8)	<0.001	0.71
AdoHcy, nM	7.4 (2.0)	88 (30)	<0.001	ns
AdoMet, nM	97 (37)	113 (45)	<0.001	ns
AdoMet/AdoHcy	13.0 (3.0)	1.3 (0.7)	<0.001	ns
Cystathionine, nM	115 (45)	1621 (306)	<0.001	0.34
holoTC, pmol/L	43 (10)	0.5 (0.1)	<0.001	0.48
Total B12, pmol/L	273 (113)	375 (149)	<0.001	0.63
Folate, nmol/L	42 (24)	15.1 (7.5)	<0.001	0.60
Vitamin B6, nmol/L	44 (40)	30 (54)	<0.001	0.33

Data are geometric means (SD). P according to paired t-test. All pregnant women in this table had normal outcome. r: correlation coefficients between plasma and AF markers according to Spearman test

### AdoMet in plasma and amniotic fluid

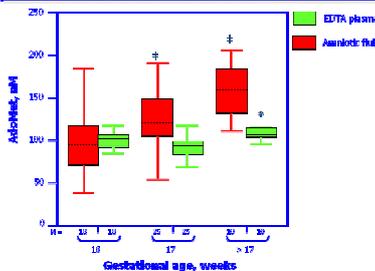


Figure 5. \* p<0.05 comparing AF:plasma with the other gestational age group  
 † p<0.05 comparing plasma:plasma with the other gestational age group

### AF-markers and gestational age

Amniotic fluid markers	Gestational age
tHcy	0.30 *
AdoMet	0.28
AdoHcy	Ns
AdoMet/AdoHcy	Ns
Cys	Ns
MMA	Ns
Folate	-0.33
B12	-0.29
holoTC	-0.29
B6	-0.22

r<sub>s</sub>: correlation coefficients. Ns: not significant.

### Serum and AF-tHcy are correlated

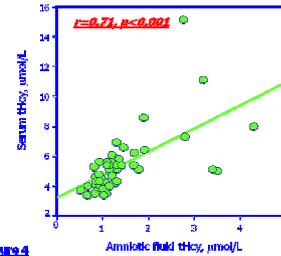


Figure 4

### AF-tHcy is related to AF-holoTC

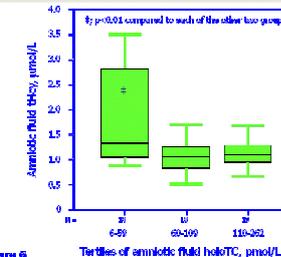


Figure 6

### AF-holoTC is strongly related to AF-B12

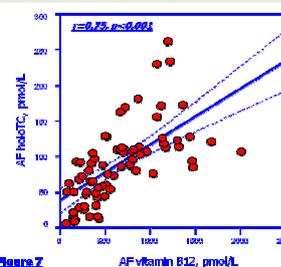


Figure 7

### Amniotic fluid and blood markers in pregnancies with unfavorable outcome

Case number	Gestational age weeks	diagnosis	tHcy µmol/L	Cys nmol/L	SAH nmol/L	SAM nmol/L	Folate nmol/L	B12 pmol/L	B6 nmol/L
1 AF	22.6	NTU	4	1973	82	120	5.7	31	2.3
			Serum	5.8	131	6.4	81	20	130
2 AF	27.1	Trisomy 21 Down syndrome	10.5	645	67	66	11.8	21.8	30.1
			Serum	7.8	145	6.9	101	14.8	225
21 AF	16.4	Karyosomy X Turner syndrome	1.9	714	196	192	18.4	824	28
			Serum	5.9	114	6.2	110	26.7	295
60 AF	17.1	Edward syndrome Trisomy 18	0.28	1491	113	64	14.7	NA	26
			Serum	NA	NA	4.7	101	NA	NA

Data from the normal population are presented in table 1. Note a relationship between gestational age and amniotic fluid markers. AF: amniotic fluid; NA: not available; Cys: cystathionine. Note that the fetus of patient 2 (with the lowest AF-Cys) had 2 copies of cystathionine beta synthase. This suggests that AF markers originate from fetus metabolism. This is supported by the fact that almost no difference was found between maternal serum Cys.

Table 2

### Subjects & Methods

**Subjects:**  
 The study included 78 pregnant women (median age 37 years; gestational age 16.7 weeks) who were referred for amniotic fluid testing at the department of Gynecology, University Hospital of the Saarland. Blood and AF samples were collected within one hour from each other. Concentrations of tHcy, cystathionine, AdoMet, AdoHcy, folate, B12 and holo-transcobalamin (holoTC) were measured in both blood and AF. AdoMet and AdoHcy assay. EDTA plasma and AF samples were immediately treated with 1N: acetic acid and aliquots were stored at -80°C until analysis.

**Methods:**  
 Concentrations of AdoMet and AdoHcy in plasma and AF were measured by using LC-MS/MS. Concentrations of tHcy and cystathionine (Cys) were measured in serum and AF samples utilizing GC/MS. The concentrations of total vitamin B12 and folate were determined in serum and AF utilizing a chemiluminescence immunoassay. Concentrations of holo-transcobalamin (holoTC) in serum and AF were measured by a 2-step sandwich assay (AoSYM).

### Summary

- Maternal blood tHcy and vitamin status are the most important determinants of AF markers.
- AF methylation markers (AdoMet and AdoHcy) are not related to mother's methylation status.
- Because folate and vitamin B12 were significant determinants of AF-tHcy, low folate and vitamin B12 status could increase tHcy thus increasing the risk of birth defects.
- Strong changes of AF markers were found in few cases with birth defects. More cases are required to confirm these results.

## 8. Dank

Herzlichen Dank möchte ich dem ehemaligen Direktor der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätskliniken in Homburg (Saar), Herrn **Prof. Dr. W. Herrmann** aussprechen für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Nutzungsmöglichkeit von Material und Räumlichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Juniorprofessorin Dr. R. Obeid**, die mir stets für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit zur Seite stand und mich motivierte.

Des Weiteren danke ich dem gesamten **Team der Schwangerenambulanz** der Universitäts-Frauenklinik in Homburg Saar (Direktor: **Prof. Dr. med. Drs. h. c. Werner Schmidt**) und im Speziellen Frau **S. Weber** und Frau **Dr. S. Jacob**, den verantwortlichen Oberärztinnen und Frau **K. Meyer** für die stets angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Frau **M. Sand-Hill**, der leitenden MTA des Zentrallabors, Frau **B. Bartl**, Frau **C. Dillinger** und Herrn **C. Heugel** sei herzlich gedankt für Hilfe beim Erlernen der Methoden und die stete Hilfsbereitschaft.

Ich danke den Mitarbeitern des Zentrallabors: Herrn **Prof. Dr. J. Geisel**, Frau **Dr. H. Schorr**, Frau **Dr. N. Umanskaya**, Herrn **J.-P. Knapp**, Herrn **Dr. U. Hübner** und Frau **C. Teunis**, welche jeder auf seine Weise mit zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich im Besonderen **meinen Eltern** und **meinem Bruder** danken für Geduld, Motivation und emotionale Unterstützung.

Diese Studie wurde zum Teil von **HOMFOR 2006** finanziell unterstützt.

## 9. Lebenslauf

<b>Name</b>	Eva Raabe	
<b>Geboren am</b>	22.05.1984	
<b>Geburtsort</b>	Saarbrücken	
<b>Adresse</b>	Saarbrückerstr. 185b 66292 Riegelsberg Tel.: 06806/48821 email: eva.raabe@web.de	
<b>Eltern</b>	Bernhard Raabe, Dipl. Betriebswirt (VWA)  Birgit Raabe, Versicherungskauffrau	
<b>Schulausbildung</b>	1990 – 1994	Grundschule Hilschbach, Riegelsberg
	1994 – 2003	Marienschule, Saarbrücken
	06 / 2003	Allgemeine Hochschulreife (DN 1,5)
<b>Studium</b>	seit 10 / 2003	Humanmedizin, Universität des Saarlandes
	09 / 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (DN 3,0)
	02 / 2009	Eintritt ins Praktische Jahr (PJ) Caritasklinik St. Theresia Saarbrücken
<b>Famulaturen</b>	08 / 2006	Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar (Gynäkologie)
	03 / 2007	Klinikum Saarbrücken (Allgemeinchirurgie)
	08 / 2007	Klinikum Südstadt, Rostock (Onkologie)
	08 / 2008	Praxis Dres. Wagner, Brandner, Hauptmann (Gynäkologie)