

Aus der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des
Universitätsklinikums des Saarlandes

Abteilung für Neonatologie (Direktor: Prof. Dr. L. Gortner)

***Untersuchungen zum Homocysteinestoffwechsel bei
Frühgeborenen:***

***Genetische und nutritive Einflussfaktoren sowie Folgen für
die Entwicklung der Frühgeborenen***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

vorgelegt von Julia Hedwig Woerner

geb. am 07.03.1984 in Zweibrücken

Homburg/Saar im November 2010

Inhaltsverzeichnis

1. **Abstract Deutsch:**S. 1-6

2. **Abstract Englisch:**S. 7-11

3. Einleitung:

3.1. Intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR).....S. 12-24

3.1.1. Definition der intrauterinen Wachstumsretardierung

3.1.2. Häufigkeiten des Auftretens einer intrauterinen Wachstumsretardierung

3.1.3. Ätiologie der intrauterinen Wachstumsretardierung

3.1.4. Diagnostik einer intrauterinen Wachstumsretardierung

3.1.5. Einteilung und Klassifikation der intrauterinen Wachstumsretardierung

3.1.6. Komplikationen, längerfristige Folgen und Prognose einer intrauterinen Wachstumsretardierung

3.2. Bedeutung der MTHFR (Methylenetetrahydrofolatreduktase)..S. 24-25

3.2.1. Definition und Struktur der MTHFR

3.2.2. Die wichtigsten MTHFR-Polymorphismen und ihr Einfluss auf die Homocysteinkonzentration

3.3. Homocystein und Hyperhomocysteinämie.....S. 26-44

3.3.1. Aufbau und Funktion der Aminosäure Homocystein

3.3.2. Homocysteinstoffwechsel

3.3.3. Bedeutung der MTHFR im Homocysteinstoffwechsel

3.3.4. Schlüsselrolle der Folsäure im Homocysteinstoffwechsel

3.3.5. Definition einer Hyperhomocysteinämie

3.3.6. Ursachen einer Hyperhomocysteinämie

3.3.7. Klinische Relevanz erhöhter Homocysteinspiegel

3.4. Folsäure.....S. 44-46

3.4.1. Definition und Funktion der Folsäure

3.4.2. Schlüsselrolle der Folsäure im Homocysteinstoffwechsel

3.5. Fragestellung und Zielsetzung der Studie.....S. 47-49

4. Patientenkollektiv, Material und Methoden

4.1. Beschreibung des Patientenkollektives.....S. 50-51

4.2. Erfassung der klinischen Daten der Studienteilnehmer.....S. 51-53

4.3. Labortechnische Geräte, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Kits und Verbrauchsmaterialien.....S. 54-56

4.3.1. Labortechnische Geräte

4.3.2. Chemikalien, Puffer und Lösungen

4.3.3. Kits

4.3.4. Master- und Assay-Mixe für die TaqMan-PCR	
4.3.5. Einwegmaterialien	
4.3.6. Primer und Sonden	
4.4 Untersuchungsmethoden.....	S. 56-69
4.4.1. Gewinnung und Bearbeitung des Nabelschnurblutes	
4.4.2. DNA-Extraktion und Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	
4.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
4.4.3.1. Grundlagen der konventionellen PCR	
4.4.3.2. Taqman-Polymerasekettenreaktion	
4.4.3.3. Durchführung der TaqMan-PCR	
4.4.4. Bestimmung der Homocysteinkonzentration mittels Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay	
4.4.5. Bestimmung der Folsäurekonzentration mittels Chemilumineszenz- Immunoassay	
4.5. Statistische Auswertung.....	S.70
5. <u>Ergebnisse:</u>	
5.1. Deskriptive und klinische Daten der Studienteilnehmer:.....	S. 71-79
5.1.1. Deskriptive Beschreibung des Studienkollektivs	
5.1.2. Verteilung der untersuchten Merkmale innerhalb des Studienkollektivs	
5.1.3. Verteilung der Mutationen innerhalb der Studienpopulation	
5.1.3.1. MTHFR-Polymorphismus C677T	
5.1.3.2. MTHFR-Polymorphismus A1298C	
5.1.4. Verteilung der gemessenen Homocystein- und Folsäurekonzentrationen	
5.1.4.1. Homocysteinkonzentrationen	
5.1.4.2. Folsäurekonzentrationen	
5.1.5. Verteilung potentieller mütterlicher Einflussfaktoren innerhalb der beiden Gruppen	
5.1.5.1. Nikotinkonsum der Mutter während der Schwangerschaft	
5.1.5.2. Arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft	
5.1.5.3. Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft	
5.2. Komplexe Ergebnisse gemäß der Fragstellung.....	S. 80-95
6. <u>Diskussion der Ergebnisse</u>	
6.1. Methodendiskussion.....	S.96-101
6.2. Ergebnisdiskussion.....	S. 101-141
7. <u>Literaturverzeichnis:</u>	S. 142-155
8. <u>Abkürzungsverzeichnis:</u>.....	S.156-157

9. <u>Tabellenverzeichnis:</u>	S. 158-160
10. <u>Abbildungsverzeichnis:</u>	S.161
11. <u>Publikationen:</u>	S.162
12. <u>Dank:</u>	S.163
13. <u>Deklaration:</u>	S. 164
14. <u>Anhang: Fragebögen:</u>	S. 165-170

1. Abstract Deutsch:

Untersuchungen zum Homocysteinestoffwechsel bei

Frühgeborenen:

Genetische und nutritive Einflussfaktoren, sowie Folgen für die Entwicklung der Frühgeborenen

Hintergründe:

Ein für das Gestationsalter zu niedriges Geburtsgewicht (SGA = small for gestational age) gilt als wesentlicher Risikofaktor für eine erhöhte Morbidität und Mortalität der Kinder.

Die Ursachen für eine solche intrauterine Wachstumsstörung (IUGR) sind vielfältig. In unseren westlichen Breiten zählen vor allem kindliche und mütterliche Erkrankungen, sowie Infektionen, Alkohol- und Zigarettenabusus zu den wesentlichen Ursachen.

In den Entwicklungsländern hingegen ist die weit verbreitete Mangelernährung als Hauptursache anzusehen.

Neben den erwähnten Faktoren werden aber auch immer wieder Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen von Thrombophilien, wie z.B. Polymorphismen im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR), einem Schlüsselenzym im Homocysteinestoffwechsel, und der Entstehung einer IUGR diskutiert.

In zahlreichen Studien konnten für homozygote Merkmalsträger im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhte Homocysteinkonzentrationen nachgewiesen werden. Diese wiederum sind ein bekannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, sowie für die Entstehung von Arteriosklerose und thromboembolischen Komplikationen.

Vor diesem Hintergrund ist es ebenfalls von großem Interesse zu untersuchen, in wieweit neben den genetischen auch nutritive Faktoren einen Einfluss auf die Höhe der Homocysteinkonzentration nehmen.

Zu den beeinflussenden Faktoren zählt auch das Vitamin Folsäure, von dem bekannt ist, dass es bei ausreichender Substitution zu einer Reduktion der Homocysteinkonzentration und damit zu einer Risikoreduktion für den Merkmalsträger führen kann.

Ziele

Ziel unserer Untersuchungen war die Analyse von Homocystein- und Folsäurespiegeln an einem Kollektiv von 149 Frühgeborenen.

Weiterhin untersuchten wir einige bekannte genetische und nutritive Einflussfaktoren auf ihre potentielle Beeinflussung der Homocysteinkonzentrationen der Kinder.

In einem weiteren Schritt wurden Folgen für die Entwicklung der Kinder und ursächliche Faktoren für die Entstehung einer Intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) bei unseren Probanden analysiert.

Material und Methoden:

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission des Saarlandes wurden für unsere Untersuchungen unmittelbar nach der Geburt der Kinder wenige Milliliter venöses Nabelschnurblut entnommen.

Das Blut wurde binnen der ersten Stunde nach der Entnahme zentrifugiert und das Plasma und die korpuskulären Bestandteile getrennt voneinander eingefroren.

Aus dem Plasma erfolgten mit freundlicher Unterstützung des Zentrallabors des Universitätsklinikums des Saarlandes die Bestimmung der Homocysteinkonzentration mittels Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays (FPIA) und die Bestimmung der Folsäurespiegel mit Hilfe eines kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassays (CLIA).

In unserem eigenen Forschungslabor isolierten wir mit Hilfe des QIAmp DNA-Extraktionsverfahrens die für die weiteren Untersuchungen benötigte DNA aus dem Vollblut.

Nach Überprüfung der Reinheit des DNA-Isolates erfolgte mittels der TaqMan-PCR-Technologie eine Analyse der DNA auf das Vorliegen einer der beiden häufigsten Polymorphismen im MTHFR-Gen, dem C677T- und dem A1298C-Polymorphismus. Neben den experimentellen Untersuchungen wurden die klinischen Daten der Frühgeborenen und ihrer Eltern in Form eines standardisierten Fragebogens erfasst. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte schließlich mit SPSS für Windows.

Ergebnisse:

Insgesamt untersuchten wir 149 Frühgeborene, die im Zeitraum von September 2005 bis Januar 2008 in der Klinik für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes geboren wurden.

Hierbei handelte es sich um 78 männliche und 71 weibliche Frühgeborene. Von den 149 untersuchten Kindern konnte bei 33 Probanden (22,1%) eine IUGR nachgewiesen werden, im Vergleich zu 116 (77,9%) Frühgeborenen ohne Wachstumsretardierung.

Auffallend war ein relativ hoher Anteil an Mehrlingsgeburten in unserem Kollektiv, von insgesamt 65 Zwillingsfrühgeborenen und 2 Drillingspärchen, die am ehesten durch die Tatsache zu erklären ist, dass unsere Untersuchungen an einem großen Perinatalzentrum durchgeführt worden sind.

Das durchschnittliche Gestationsalter für das Gesamtkollektiv liegt bei einem Median von 35,00 [32,0-36,9] Schwangerschaftswochen (SSW).

Bei Betrachtung der beiden Untergruppen ergibt sich bei den Kindern mit einer IUGR ein Median von 35,7 [33,4-36,9] SSW und in der normalgewichtigen Gruppe ein Median von 34,9 [32,0-36,9] SSW.

Bei Betrachtung des Geburtsgewicht aller Kinder ergab sich ein Median von 2300g [1240-3900].

Für die Frühgeborenen mit einer IUGR lag es bei 1890 g [1240-2450] und für die normalgewichtigen Frühgeborenen bei 2410 g [1450-3900].

Statistische Analysen der Daten ergaben bezüglich der beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied im Geburtsgewicht und im Gestationsalter zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Neugeborenen. Für das Geschlecht konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Analysen bezüglich der Verteilung der beiden untersuchten Polymorphismen im MTHFR-Gen erbrachten keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der einzelnen Genotypen zwischen den beiden Gruppen.

Die Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen mit einer IUGR lagen bei einem Median von 5,06 $\mu\text{mol/l}$ [3,11-10,70] im Vergleich zu Kindern ohne eine IUGR, bei denen der Median bei 5,93 $\mu\text{mol/l}$ [1,92-15,27] lag. Signifikanzanalysen konnten keinen signifikanten Unterschied aufzeigen. Es ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Probanden.

Die Folsäurekonzentrationen waren mit einem Median von 13,40 ng/ml [4,74-31,45] bei den Wachstumsretardierten und einem Median von 13,08 ng/ml [5,64-39,65] bei den eutrophen Kindern ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

Signifikant höhere Folsäurekonzentrationen konnten bei den Kindern gezeigt werden, deren Mütter während der Schwangerschaft ein Folsäurepräparat eingenommen hatten.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Folsäure- und den Homocysteinenspiegeln der Probanden konnte nicht nachgewiesen werden.

Es zeigte sich jedoch ein eindeutig negativer Trend im Sinne von einem Auftreten von niedrigeren Homocysteinkonzentrationen bei Frühgeborenen mit hohen Folsäurespiegeln.

Auffallend war ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen Kindern, von Müttern mit schwangerschaftsinduzierter arterieller Hypertonie und Kindern normotoner Mütter. Analysen bezüglich möglicher Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht der Kinder ergaben eine signifikante Einflussnahme durch die Merkmale Gestationsalter, Mehrlingsschwangerschaft, mütterlicher Nikotinkonsum und mütterliche Hypertonie während der Schwangerschaft.

Berechnungen mittels der linearen Regression zeigten, dass das Gestationsalter den größten Einfluss auf das Geburtsgewicht der Probanden hat.

Weiterhin suchten wir auch nach signifikanten Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR. Mittels statistischer Analysen konnte eine signifikante Einflussnahme für die Merkmale Homocysteinspiegel, mütterlicher Nikotinkonsum sowie mütterliche arterielle Hypertonie während der Schwangerschaft nachgewiesen werden.

Eine Betrachtung der Odds Ratios (OR) erbrachte für den Homocysteinspiegel ein OR von 1,336 im Vergleich zu einem OR von 0,204 für den mütterlichen Nikotinkonsum und einem OR von 0,208 für die arterielle Hypertonie der Mutter. Auf Grund dieser statistischen Ergebnisse muss man davon ausgehen, dass die Homocysteinkonzentration in unserem Kollektiv den größten Einfluss auf die Entstehung einer IUGR hat.

Diskussion:

In unseren Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es sehr viele Faktoren gibt, die auf unterschiedliche Art und Weise eine Rolle im Homocysteinestoffwechsel spielen. In Bezug auf diese Merkmale besteht jedoch kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Frühgeborenen. Es war ebenfalls kein Unterschied zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen

Frühgeborenen festzustellen. Die von uns vermutete signifikante Beeinflussung der Homocysteinkonzentrationen unserer Frühgeborenen durch das Vorliegen eines Polymorphismus im MTHFR-Gen konnte nicht bewiesen werden.

Die von vielen Autoren bereits vermutete positive Einflussnahme von hohen Folsäurespiegeln im Sinne einer Senkung der Homocysteinkonzentrationen, konnte in unserem Kollektiv nicht als signifikant dargestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein Trend dahingehend, dass Probanden mit hohen Folatspiegeln tendenziell niedrigere Homocysteinkonzentrationen aufwiesen.

Auffallend war jedoch ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft eine arterielle Hypertonie aufwiesen und Kindern normotoner Mütter. Eine Erklärung hierfür könnte die im Zusammenhang mit hohen mütterlichen Homocysteinkonzentrationen bereits mehrfach beschriebene Entstehung einer Placentainsuffizienz sein. Ursache hierfür scheint die atherogene und thromboembolische Potenz von Homocystein zu sein. Über diesen Weg kann es auf Grund der fehlenden Filterfunktion der Placenta zu einem Angleich der kindlichen an die mütterlichen Homocysteinkonzentration kommen. Zur endgültigen Klärung dieses Zusammenhanges sind aber noch weitere Studien mit deutlich größeren Fallzahlen und einer größeren Varianz der Probanden notwendig.

Von Interesse war außerdem herauszufinden, welche Faktoren einen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht und die Entwicklung einer IUGR in unserem Kollektiv hatten.

Hierbei zeigte sich in Bezug auf das Geburtsgewicht eine signifikante Einflussnahme durch die in diesem Zusammenhang sehr gut bekannten Merkmale: Gestationsalter, Mehrlingsschwangerschaft, mütterlicher Nikotinkonsum und mütterliche Hypertonie. In Bezug auf die Entstehung einer IUGR konnte bei unseren Studienteilnehmern eine signifikante Beeinflussung durch die Merkmale Homocysteinspiegel, mütterliche arterielle Hypertonie und mütterlicher Nikotinkonsum während der Schwangerschaft aufgezeigt werden.

Bei den beiden letzten Merkmalen handelt es sich um schon seit längerer Zeit bekannte Risikofaktoren für die Entstehung einer IUGR.

Eine signifikante Einflussnahme durch die Höhe der Homocysteinkonzentrationen könnte wiederum über die Entstehung einer Placentainsuffizienz und eine daraus

möglicherweise folgende Mangelversorgung des Feten mit konsekutiver Ausbildung einer intrauterinen Wachstumsretardierung zu erklären sein.

Bei der Betrachtung unserer gesamten Ergebnisse muss jedoch immer bedacht werden, dass unsere Daten nur anhand eines kleinen und sehr selektierten Kollektivs von Teilnehmern ermittelt wurden und daher nicht uneingeschränkt übertragbar sind.

Schlüsselwörter:

IUGR (intrauterine Wachstumsretardierung); SGA (small für gestational age);
Geburtsgewicht; Frühgeburtlichkeit; Homocystein, Folsäure; MTHFR
(Methylentetrahydrofolatreduktase)-Polymorphismen: C677T, A1298C

2. Abstract English:

Studies on homocysteine metabolism in premature infants: Genetic and nutritional factors and the consequences for the development of premature infants

Backgrounds:

One for the gestational age too low birth weight (SGA = small for gestational age) is considered a major risk factor for increased morbidity and mortality of children.

The causes for such an intrauterine growth retardation are varied.

In our western latitudes these are particularly diseases of the child and his mother and infections, alcohol and nicotineabusus on the main causes.

In developing countries the widespread malnutrition is the main cause.

In addition to the aforementioned factors there is mostly a discussion about the relationship between the availability of thrombophilias polymorphisms in the methylentetrahydrofolate reductase gene (MTHFR), a key enzyme involved in homocysteine metabolism, and the onset of IUGR.

Numerous studies have demonstrated for homozygous carriers of the polymorphism, that there is an increase in homocysteine concentrations.

These increases are a known as major risk factors for cardiovascular diseases and for the development of atherosclerosis and thromboembolic complications.

Against this background, it was also of great interest to investigate to what extent in addition to genetic and nutritional factors may influence the level of homocysteine concentration.

These influencing factors include the vitamin folic acid from which it is known that an adequate substitution leads to a reduction in homocysteine concentration, leading to a risk reduction for the affected individuals.

Objectives

The aim of our study was the analysis of homocysteine and folate levels in a cohort of 149 premature babies.

Furthermore, we examined several known genetic and nutritional factors on their potential effect on homocysteine concentrations of the children.

In a further step, impact on the development of children and causative factors for the development of intrauterine growth retardation were analyzed in our subjects.

Material and methods:

Following approval by the ethics committee of the Saarland we took for our investigations immediately after the birth of the children a few milliliters of venous cord blood.

The blood was centrifuged within the first hour after collection and plasma and corpuscular components separately frozen.

From plasma with the kind support of the central laboratory of the University Hospital of Saarland was the determination of homocysteine concentration by fluorescence polarization immunoassay (FPIA) and the determination of folate levels with the help of a competitive chemiluminescent immunoassay (CLIA).

In our own research laboratory, we isolated using the QIAmp DNA extraction method for the further investigations required DNA from whole blood.

After checking the purity of the isolate DNA was performed using the TaqMan PCR technology to analyze the DNA for the presence of the two most common polymorphisms in the MTHFR gene, the C677T and the A1298C polymorphism.

In addition to the experimental investigations, we carried a collection of clinical data of infants and their parents in the form of a standardized questionnaire.

The statistical analysis of the data was finally done with SPSS for Windows.

Results:

Overall, we studied 149 preterm infants in the period September 2005 to January 2008 which were born in the Department of Gynecology of the University of the Saarland.

In this group there were 78 male and 71 female premature babies.

Under 149 children who were examined we detected in 33 subjects (22.1%) an IUGR, compared to 116 (77.9%) preterm infants without growth retardation.

Noticeable was a relatively high proportion of multiple births in this cohort of 65 twin infants and twice triplets. This could be explained by the fact that our investigation has been carried out on a large perinatalcenter.

The average gestational age for the total sample is a median of 35.00 [32.0 to 36.9] weeks of gestation (SSW).

When considering the two subgroups is apparent in the children with IUGR a median of 35.7 SSW [33.4 to 36.9] and a median of 34.9 [32.0 to 36.9] SSW in the normal

weight group.

Looking at the birth weight of all children resulted in a median of 2300g [1240-3900]. For the preterm infants with IUGR, it was 1890 g [1240-2450], and for the normal weight premature infants it was 2410 g [1450-3900].

Statistical analysis of data regarding the two groups showed a significant difference in birth weight and gestational age in preterm infants with IUGR and eutrophic preterm children. For the sex was no significant difference be identified.

Provided analysis regarding the distribution of two polymorphisms in the MTHFR gene had no significant difference in the distribution of individual genotypes between the two groups.

The homocysteineconcentration of the preterms with IUGR were at a median of 5.06 mmol/l [3.11 to 10.70] compared to children without IUGR, where the median was 5.93 mmol/l [1.92 -15.27]. Significance analysis could show no significant difference. There was also no significant difference in the concentrations between male and female subjects.

The folate concentrations showed with a median of 13.40 ng/ml [4.74 to 31.45] for growth retarded and a median of 13.08 ng/ml [5.64 to 39.65] in the eutrophic children also not a significant difference.

Significantly higher concentrations of folic acid could be demonstrated in the children whose mothers had taken folic acid during pregnancy.

A clear relationship between folate and the homocytseinelevels of the subjects could not be detected.

But it appeared a clear negative tendency in the sense of an occurrence of lower homocysteine concentrations in premature infants with high folic acid levels.

A striking difference in homocysteine concentrations between children, whose mothers showed pregnancy induced hypertension (PIH) and children of normotensive mothers.

Analysis on possible factors influencing the birth weight of the children showed a significant influence by the characteristics: gestational age, multiple pregnancy, maternal smoking and pregnancy induced hypertension (PIH).

Calculations using the linear regression showed that gestational age has the greatest impact on birth weight of the subjects.

Furthermore, we also looked for significant factors influencing the emergence of IUGR. Means of statistical analysis showed a significant influence on the

characteristics: homocysteine concentration, maternal smoking habits and maternal arterial hypertension during pregnancy.

A consideration of the odds ratios (OR) showed an OR for the homocysteine level of 1.336 compared with an OR of 0.204 for the maternal smoking and an OR of 0.208 for the hypertension of the mother during pregnancy. Based on these statistical results must be assumed that the homocysteine concentration has the greatest impact on our collective and the emergence of IUGR.

Discussion:

In our studies we have also shown that there are many factors which play in different ways a role in homocysteine metabolism. With regard to these characteristics, we could not show a difference between male and female infants. There is also no difference between preterm infants with IUGR and eutrophic preterm infants.

We were unable to demonstrate any genetic influence on homocysteine concentrations of our premature infants by two polymorphisms in the MTHFR gene. The authors already discussed by many positive influence of high folic acid levels in terms of a reduction in homocysteine concentrations, could not be shown to be significant in our collective. It appeared a trend so that subjects showed high folate levels tend to have lower homocysteine concentrations.

Notice was a significant difference in the levels of homocysteine concentrations between children, which mothers showed an arterial hypertension during pregnancy, and children of normotensive mothers. One explanation could be related to high maternal homocysteine concentrations has repeatedly described the emergence of a placental insufficiency. The reason for this seems to be the atherogenic and thrombotic potency of homocysteine. In this way homocysteine can lead due to the lack of filtering function of the placenta to a matching of the child to the maternal homocysteine concentration. Final clarification of these connection further studies with significantly greater numbers and greater variance of the subjects are necessary.

Of our interest was also to find out which factors had a significant effect on birth weight and the development of IUGR in our collective.

It was shown in relation to birth weight, a significant influence in this context by the well-known characteristics: gestational age, multiple pregnancy, maternal smoking and pregnancy induced hypertension (PIH).

In relation to the emergence of a IUGR in our study participants were significantly influenced by the characteristics of homocysteine, maternal arterial hypertension and maternal smoking habits during pregnancy.

The last two characteristics are known for long time as risk factors for the the development of an IUGR.

A significant influence by the level of homocysteine concentrations in turn could be explained to the emergence of an placental insufficiency. Placental insufficiency can lead to malnutrition of the fetus with subsequent formation of an intrauterine growth retardation.

In the case of considering all our results there must always be considered that our data were based only on a very small and very special group of participants and therefore they are not fully an easily transmissible to other groups.

Keywords:

IUGR (intrauterine growth retardation), SGA (small for gestational age), birth weight, prematurity, homocysteine, folic acid, MTHFR (methylentetrahydrofolate reductase) polymorphisms: C677T, A1298C, PIH (pregnancy induced hypertension)

3. Einleitung

3.1. Intrauterine Wachstumsretardierung

3.1.1. Definition einer Intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) und Abgrenzung zu SGA (small for gestational age)

Das Geburtsgewicht ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung eines Neugeborenen, da Abweichungen von der Norm mit einer erheblichen Zunahme der Morbidität und der Mortalität der Kinder verbunden sind.

Ausgehend von dem Geburtsgewicht kann unter Zuhilfenahme von Perzentilen eine Einteilung der Neugeborenen in verschiedene Gruppen vorgenommen werden.

Bei den Perzentilen handelt es sich um Prozenstränge, die jeweils vom Gestationsalter abhängige Gewichts- oder Körpergrößenangaben darstellen.

Mit ihrer Hilfe kann ein Vergleich des jeweiligen Geburtsgewichtes mit dem Normgewicht gleichaltriger Kinder erfolgen und somit eine Aussage über das intrauterine Wachstum getroffen werden.

Von besonderem Interesse ist vor allem ein zu geringes intrauterines Wachstum, da für diese Kinder in zahlreichen Studien sowohl eine erhöhte intrauterine Morbidität und Mortalität, als auch eine erhöhte postnatale Komplikationsrate und Mortalitätsrate nachgewiesen werden konnte.

Bei den Neugeborenen mit zu geringem Geburtsgewicht muss man zwei verschiedene Erscheinungsformen, das SGA- und das IUGR-Syndrom unterscheiden.

Unter dem Begriff SGA (small for gestational age) werden alle hypotrophen Neugeborene zusammengefasst, die mit ihrem Geburtsgewicht oder ihrer Geburtslänge unterhalb einer bestimmten Percentile für ihre ethnische Gruppe und ihr Gestationsalter liegen.

In den meisten Fällen wird hierfür von der 10. Percentile ausgegangen.

Demnach müsste in jeder zehnten Schwangerschaft ein SGA- oder ein IUGR-Fetus vorliegen. (67,158,180)

International wird als Grenze häufig auch eine Abweichung von Geburtsgewicht und/oder Geburtslänge von mehr als 2 Standardabweichungen von der

populationsspezifischen Norm bzw. dem Mittelwert für Länge und/oder Gewicht angegeben.

Dieser Grenzwert entspricht ungefähr der 3. Perzentile. (112)

Bei dieser Definition handelt es sich um eine rein statistische Definition, die eine heterogene Gruppe von Neugeborenen mit zu niedrigem Geburtsgewicht erfasst und nicht gleichbedeutend mit einem pathologischen Wachstum ist.

Sie ist vielmehr Ausdruck verschiedener konstitutioneller Faktoren wie beispielsweise Geschlecht des Kindes, Körpergröße der Eltern, Gewichtszunahme während der Schwangerschaft und ethnischer Herkunft der Eltern. (211,62)

Zu dieser Gruppe werden deshalb auch alle gesunden Neugeborenen gezählt, die kleiner als der Durchschnitt sind oder sich im Bereich der unteren Normgrenzen für ihr Geburtsgewicht oder ihre Geburtslänge befinden (ca. 50-70%). (224, 147, 34)

Diese Kinder sind zwar klein, aber zeigen dennoch ein proportioniertes Wachstum und schöpfen ihr Wachstumspotential in utero vollständig aus.

Daher sind diese Neugeborenen nicht von einer Wachstumsstörung im eigentlichen Sinne betroffen und sind deshalb weniger durch perinatale Komplikationen gefährdet.

Im Gegensatz hierzu steht der Begriff der IUGR, der intrauterinen growth retardation. Mit diesem Begriff wird ein Teil der SGA-Kinder bezeichnet, die eine pathologische Wachstumsrestriktion aufweisen, d.h. die ihr genetisches Wachstumspotential in utero aufgrund einer fetoplacentaren Insuffizienz unterschiedlicher Ursache nicht erreicht haben. (34)

Zur Beschreibung dieser Kinder wird in der Literatur synonym auch der Begriff der fetalen Wachstumsrestriktion (fetal growth restriction/ FGR) gebraucht.

Für diese Gruppe von Neugeborenen konnte in zahlreichen Studien eine erhöhte perinatale Mortalität und Morbidität nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 20-40 % der Kinder, die im Rahmen eines intrauterinen Fruchttodes versterben, die IUGR- oder SGA-Definition erfüllen.

(229,34)

Anhand der beiden Definitionen kann man deutlich erkennen, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Beschreibungen für Symptomgruppen mit zahlreichen Überschneidungen handelt.

Ein Beispiel hierfür ist die Tatsache, dass alle Kinder mit einer IUGR auch gleichzeitig als SGA-Kinder klassifiziert werden und damit zu klein für ihr jeweiliges Gestationsalter sind, aber nicht alle SGA-Kinder auch eine IUGR aufweisen müssen. Andererseits gibt es einige Feten mit einer IUGR, die jedoch nicht als SGA bezeichnet werden dürfen, da ihr geschätztes Geburtsgewicht oberhalb der Grenzwerte liegt.

Sowohl bei der Definition des SGA-Kindes, als auch bei der Definition einer IUGR handelt es sich um keine richtige Diagnose, sondern eher um die Beschreibung eines Symptomenkomplexes, dem viele verschiedene Ursachen zugrunde liegen können. Im Folgenden wird vor allem auf die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) näher eingegangen.

3.1.2. Häufigkeiten des Auftretens von IUGR- und SGA-Kindern

Die Häufigkeiten für das Auftreten von Kindern mit einem SGA-Syndrom oder einer IUGR hängen von der untersuchten Population, geographischen Gegebenheiten und der jeweils angewandten Definition und Grenzwerten für eine Wachstumsretardierung ab.

Gemäß einer Studie von Resnik et al. werden ca. 10% aller Neugeborenen als SGA klassifiziert. (169)

Wird die 10. Perzentile als Grenzwert benutzt, so findet man laut Angaben von Crombach et al. bei 50-60 % der SGA-Kinder gleichzeitig eine IUGR.

Sie gehen weiterhin davon aus, dass ca. 4-8 % aller Kinder in Westeuropa und ca. 6-30% aller Neugeborenen in den Entwicklungsländern als IUGR klassifiziert werden. (35, 61)

Für die Beurteilung unseres Kollektivs von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass unter Frühgeborenen ein erhöhter Anteil an Kindern mit einer IUGR zu finden ist (20 % bei Einlingen und 30 % bei Zwillingen). (227, 72)

Auch in einigen weiteren Studien wurde der Zusammenhang zwischen einer IUGR und Frühgeburtslichkeit bestätigt.

So gehen Lackmann et.al. in ihrer Publikation aus dem Jahre 2001 beispielsweise von einem um das 2- 3 fach erhöhten Risiko für das Auftreten einer IUGR bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen aus. (107)

3.1.3. Ätiologie der IUGR

Bei den Ursachen für die Entstehung einer IUGR muss primär zwischen mütterlichen und kindlichen Faktoren unterschieden werden.

Weitere Gründe können durch plazentare oder uteroplazentare Faktoren entstehen.

Des Weiteren kann man extrinsische/umweltbedingte von intrinsischen/genetischen Ursachen abgrenzen.

In 5-40% der Fälle liegt eine Wachstumsretardierung ohne eindeutig zu klärende Ätiologie vor. (35, 169)

Ausschlaggebend für den Typ und den Schweregrad einer IUGR ist der Zeitpunkt der Entstehung bzw. bei exogen verursachten Wachstumsrestriktionen der Zeitpunkt, die Art und die Einwirkdauer eines schädigenden Agens.

Der überwiegende Teil der IUGR-Fälle ist auf extrinsische Faktoren zurückzuführen. (229)

3.1.3.1. Maternale Faktoren

Auf der mütterlichen Seite zählt zu den führenden Ursachen in den westlichen Industrieländern mit einem Anteil von 30-50 % die Placentainsuffizienz.

Eine Placentainsuffizienz kann entweder primär durch Erkrankungen, die die Placenta direkt betreffen, wie beispielsweise eine Placenta praevia, Placentainfarkte, eine Abruptio placentae oder sekundär, z.B. im Rahmen von Thrombophilien wie beispielsweise Faktor-V-Leiden, MTHFR-Polymorphismen oder Autoimmunerkrankungen auftreten.

Einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung einer Placentainsuffizienz leisten auch mütterliche Erkrankungen, allen voran vor allem die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus. (35, 141)

In all diesen Fällen resultiert hieraus eine unzureichende Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff für den Feten und damit eine Unterversorgung des Feten.

Ursachen für eine solche Mangelversorgung des Feten können jedoch noch zahlreiche weitere Faktoren wie beispielsweise eine Fehl- oder Unternährung der Mutter, sowie eine Malabsorption im Rahmen von gastrointestinalen Erkrankungen sein.

Aber auch eine chronische Hypoxie aufgrund von Fehlbildungen, wie beispielsweise maternale Herzfehler oder pulmonale Erkrankungen der Mutter, wie z. B. Asthma bronchiale, zystische Fibrose oder aufgrund eines Aufenthaltes in großen Höhen können Gründe für eine Mangelversorgung des Feten sein.

Weiterhin relativ häufig für die Entstehung einer IUGR verantwortlich sind genetische Ursachen (5-10%) und Infektionen der Mutter.

Weitere Einflussfaktoren sind außerdem Mehrlingsgeburten (3-5%), maternale Grunderkrankungen wie z.B. langjähriger Diabetes mellitus mit Makro- und Mikroangiopathien, arterielle Hypertonie (< 3%), Genussmittelabusus von Alkohol, Drogen oder Nikotin (3-5%) und Umwelteinflüsse oder Strahlenexposition (<3%).

Aber auch Medikamente, z.B. mit antikonvulsiver Wirkung, können für die Entstehung einer IUGR verantwortlich sein.

Ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Wachstumsrestriktion spielen schwangerschaftsinduzierte Erkrankungen aus dem Kreis der EPH-Gestosen.

Von besonderer Bedeutung sind in diesem Kontext vor allem die Präeklampsie und die schwangerschaftsinduzierte Hypertonie. (231, 113, 4)

Es zeigen sich außerdem Zusammenhänge zwischen der Entstehung einer Placentainsuffizienz und einer mütterlichen Thrombophilie, wie beispielsweise dem Vorliegen einer Mutation im MTHFR-Gen.

Aber auch sozioökonomische Faktoren können an der Entstehung einer IUGR beteiligt sein. So konnten Wen et. al. in einer 1990 durchgeführten Studie zeigen, dass vor allem jüngere, alleinstehende Frauen und Frauen mit einem niedrigeren sozioökonomischen Status für die Geburt eines SGA-Kindes prädisponiert sind.

(223)

Bei globaler Betrachtung der maternalen Ursachen einer IUGR dominieren jedoch eindeutig die Mangel- bzw. Fehlernährung der Mutter während der Schwangerschaft, sowie konnatale Infektionen.

Beweis hierfür ist der in Studien mehrfach bestätigte Zusammenhang zwischen einer ungenügenden Gewichtszunahme der Mutter während der Schwangerschaft und der Geburt eines Kindes mit einem zu niedrigen Geburtsgewicht. (191, 192, 223)

3.1.3.2. Fetale Faktoren

Von seiten des Kindes zählen vor allem genetische Faktoren und hier in besonderem Maße die Chromosomenanomalien wie beispielsweise die Trisomien, zu den Hauptgründen für die Entstehung einer IUGR (10-20%). (180, 158, 99)

Weitere wichtige Ursachen sind konnatale Infektionen der TORCHES-Gruppe, wie beispielsweise Toxoplasmose, Röteln, Cytomegalie, Lues u.a. (bis zu 5 %) (158), kindliche Fehlbildungen oder syndromale Erkrankungen (8-20%) (158), sowie zahlreiche weitere kindliche Erkrankungen, wie z.B. angeborene Stoffwechselerkrankungen.

In einigen Studien wird auch ein Ungleichgewicht im Hormonhaushalt der Kinder als Ursache für eine IUGR angenommen.

So konnte beispielsweise in einer Studie von Larasse et. al. eine negative Korrelation zwischen dem Somatomedin IGF-1 und dem Geburtsgewicht aufgezeigt werden. (109)

Zusammenfassend kann von einer engen Wechselwirkung mit gegenseitiger Beeinflussung zwischen maternalen und fetalen Faktoren ausgegangen werden, die die Versorgungslage des Feten auf vielfältige Art und Weise stören und gefährden können.

maternale Faktoren	fetale Faktoren
Placentainsuffizienz	genetische Faktoren
maternale Grunderkrankungen	Infektionen
Fehl- oder Unterernährung	kindliche Fehlbildungen
Malabsorption	syndromale Erkrankungen
chronische Hypoxie	Stoffwechselerkrankungen
Infektionen	
genetische Ursachen	
Mehrlingsgeburten	
schwangerschaftsinduzierte Erkrankungen: EPH-Gestosen	
Thrombophilien	
sozioökonomische Faktoren	
toxische Einflüsse: Medikamente, Drogen, Alkohol, Nikotin	
Strahlenexposition	

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ätiologie einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR)

3.1.4. Diagnostik der IUGR

In den meisten Fällen wird der Verdacht auf das Vorliegen einer IUGR oder eines SGA-Kindes bereits während der Schwangerschaft gestellt.

Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Erfragung verschiedener Risikokonstellationen, die gehäuft zu einer IUGR führen können und gemäß einer Studie von Crombach et.al. bei 50-70% der betroffenen Schwangeren vorliegen. (34)
Beispiele für solche Risikofaktoren sind:

- niedriger sozialer Status der Mutter
- niedriges oder sehr hohes Alter der Mutter
- Mangelernährung der Mutter während der Schwangerschaft
- geringes maternales Ausgangsgewicht bzw. zu geringe Gewichtszunahme der Mutter während der Schwangerschaft
- vorausgegangene IUGR-Geburt
- vorausgegangene Tot-, Fehl- oder Frühgeburten
- Drogen-, Alkohol-, Medikamenten- und Nikotinabusus während der Schwangerschaft
- arterielle oder schwangerschaftsinduzierte Hypertonie der Mutter
- Diabetes mellitus oder Gestationsdiabetes
- Präeklampsie

Grundvoraussetzung für die Diagnosestellung ist eine exakte Kenntnis bzw. genaue Bestimmung des Gestationsalters.

Hierzu sollten wenn möglich am Besten die sonographisch ermittelten biometrischen Daten des Feten aus dem 1. Trimester herangezogen werden. (135)

Die Diagnosestellung mittels klinischer Untersuchungen, wie beispielsweise der Bestimmung des Symphysen-Fundus-Abstandes oder der abdominellen Palpation, haben sich in zahlreichen Studien als zu ungenau und damit der sonographischen Methode gegenüber als unterlegen erwiesen.

(181, 183, 116, 173, 154, 22, 5)

Von den meisten Autoren wird die fetale Gewichtsschätzung mittels sonographischer Bestimmung verschiedener Kopf- und Abdomenumfängen als zuverlässigste pränatale Methode zur Diagnose eines SGA-Kindes angesehen.

Als weiteres Diagnosekriterium wird häufig auch noch die Fruchtwassermenge, anhand der Ermittlung des AFI (= Amniotic Fluid Index), miteinbezogen.

(149, 28, 180)

Bei beiden Verfahren ist jedoch eine alleinige Untersuchung nicht zur Diagnosesicherung ausreichend, sondern nur die regelmäßige, serielle Untersuchung mit Verlaufsbeobachtung aussagekräftig genug, um die Diagnose einer intrauterinen Wachstumsretardierung zu stellen.

Einer Studie von Baschat und Weiner zufolge ist die Kombination aus fetaler Biometrie und dopplersonographischer Untersuchung des fetomaternalen Gefäßbettes die Methode mit der höchsten Entdeckungsrate einer IUGR.

Weiterhin ermöglicht dieses Vorgehen oft auch gleichzeitig eine Prädiktion drohender perinataler Komplikationen. *(12)*

Der Doppler-Sonographie kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu, da sie in der Lage ist, zwischen einem SGA- und einem IUGR-Kind zu unterscheiden.

So spricht eine pathologische Biometrie bei unauffälligem Doppler eher für das Vorliegen eines SGA, während eine pathologische Dopplersonographie für eine IUGR spricht. *(180)*

Aber auch nach der Geburt gibt es zwei Methoden, anhand derer die Verdachtsdiagnose einer IUGR überprüft werden kann.

Neugeborene mit einer IUGR fallen postnatal häufig durch einen pathologischen Ponderal-Index, bzw. durch eine erniedrigte birth weight ratio (BWR) auf. *(124)*

Beim Ponderal-Index werden Körpergröße und Körpergewicht in Relation zu einander gesetzt (Körpergewicht durch Körpergröße $[g \times 100 / cm^3]$).

Als pathologisch gelten hierbei Werte $< 2,3$ für Neugeborene ab der 38.SSW bzw.

Werte $< 2,05-2,28$ für Neugeborene zwischen der 30+0 und der 37+6 SSW.

(133, 177)

Für die Berechnung des BWR wird die Relation vom Geburtsgewicht zum Normalgewicht in Abhängigkeit vom Gestationsalter und dem Geschlecht berücksichtigt. Ein BWR von $0,76-0,89$ wird hierbei als Hinweis auf eine milde IUGR und ein BWR $< 0,75$ als Hinweis auf eine schwere IUGR angesehen. *(124)*

Bei klinischer oder sonographischer Verdachtsdiagnose auf das Vorliegen eines SGA-Kindes oder einer IUGR sollte zunächst immer eine Ursachenabklärung erfolgen. Hierbei sollte vor allem an kindliche Fehlbildungen, Infektionskrankheiten oder relevante maternale Erkrankungen gedacht werden. Gegebenenfalls kann die Diagnose mit invasiven Verfahren, wie beispielsweise einer Amniozentese, gesichert werden. (180)

Nach der Diagnosestellung wird die kontinuierliche Überwachung des hypoxiegefährdeten Kindes mittels verschiedener Verfahren, wie beispielsweise der Doppler-Sonographie, von allen Autoren als wichtigste Maßnahme erachtet. Ziel der Überwachung ist, neben der Abwendung möglicher vitaler Gefährdungen des Fetus, die Bestimmung des optimalen Entbindungszeitpunktes. (180)

Das besondere Problem hierbei liegt in der Ermittlung eines optimalen Entbindungszeitpunktes, wobei zwischen einer drohenden Frühgeburt mit entsprechender Unreife der Organe und einem Verbleib in utero bei einer drohenden Minderversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff entschieden werden muss. (180)

Aus diesem Grunde sollte es sich jeweils um eine individuelle Entscheidung handeln, die in enger Zusammenarbeit zwischen Gynäkologen und Neonatalogen unter Einbeziehung der Eltern getroffen werden sollte.

3.1.5. Einteilung und Klassifikation der IUGR

Eine IUGR kann anhand von 3 Kriterien in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Eine Möglichkeit der Klassifikation erfolgt mit Hilfe der Körperproportionen der Neugeborenen.

Hierbei wird zwischen einer symmetrischen/hypoplastischen und einer asymmetrischen/disproportionierten Form unterschieden.

Bei der ersten Form sind sämtliche biometrisch erfassten Maße des Neugeborenen d.h. Körpergewicht, Körpergröße und Kopfumfang gleichermaßen von dem Wachstumsrückstand betroffen, weshalb die Körpermaße dennoch proportioniert sind.

Diese Form liegt bei ca. 20-30 % aller IUGR-Fälle vor. (226, 229, 34)

Bei der asymmetrischen Form kommt es zu einem relativen Wachstumsrückstand des Rumpfes im Vergleich zum Kopf, weshalb man auch von einer Dysproportionierung spricht.

Ursache hierfür ist eine aufgrund der Mangelversorgung stattfindende Blutumverteilung zugunsten lebenswichtiger Organe und zulasten der abdominalen Organe. Diese zweite Form ist wesentlich häufiger und liegt bei ca. 70-80 % aller IUGR-Fälle vor. (34)

Bei diesen Kindern liegt das Geburtsgewicht unter dem definierten Grenzwert, die Geburtslänge entspricht jedoch meistens dem Normwert.

Daraus lässt sich schließen, dass die Körperlänge und der Kopfumfang im Vergleich zum Geburtsgewicht bei diesen Fällen nur gering von der Wachstumsretardierung betroffen sind. (229, 228, 226, 105)

Die beiden Formen gehen fließend ineinander über.

Welche der beiden Formen bei einem Neugeborenen jeweils in Erscheinung tritt, hängt entscheidend vom Zeitpunkt der Entstehung der IUGR ab. (180)

Auf Grund dieser Tatsache existiert auch noch eine weitere Einteilungsmöglichkeit der IUGR, die sich am zeitlichen Beginn der Wachstumsstörung orientiert.

Man unterscheidet hierbei eine frühe Form mit einem Beginn vor der 28. SSW und eine späte Form mit einem Beginn nach der 28. SSW.

Bei einer Entstehung vor der 28. SSW kommt es meistens zur Ausbildung der symmetrischen Form, während aus einer späteren Entstehung häufig eine asymmetrische Wachstumsretardierung resultiert. (114,35)

Weiterhin kann auch noch eine Klassifikation anhand des Schweregrades der Wachstumsrestriktion vorgenommen werden.

In diesem Falle wird zwischen einer leichten und einer schweren Verlaufsform unterschieden.

Die schwere Verlaufsform ist definiert durch einen Abdomenumfang, bzw. ein sonographisch ermitteltes pränatales Schätzwert oder ein Geburtsgewicht kleiner der 3. Perzentile.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Kinder mit der schweren Verlaufsform die höchste fetale und neonatale Mortalität und Morbidität aufweisen. (35, 127, 152)

3.1.6. Komplikationen, längerfristige Folgen und Prognose einer IUGR

Wie bereits erwähnt, zeigen Kinder mit einer IUGR eine deutlich erhöhte Mortalität und Morbidität im Vergleich zu Neugeborenen ohne Wachstumsretardierung. (29, 127, 104, 148, 196, 175)

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zahl intrapartaler Todesfälle bei Kindern mit einer IUGR um das 3-10 fache höher liegt als bei Kindern mit normalem Wachstum.

Aber auch die perinatale Mortalität liegt mit 2-4 % deutlich über der normalgewichtiger Kinder. (35)

Neben der Mortalität zeigen sich auch deutliche Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Komplikationen während der Geburt und einer IUGR.

So wird davon ausgegangen, dass ca. 50% aller IUGR-Kinder Zeichen eines „fetal distress“ wie z.B. variable Dezelerationen unter der Geburt zeigen, wodurch sich auch die hohe Sectio-Rate bei diesem Kollektiv erklären lässt. (35)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Neugeborenen häufiger pathologische APGAR-Werte sowie pH-Werte zeigen und damit häufiger einer neonatologischen Intensivüberwachung zugeführt werden müssen als normalgewichtige Neugeborene. (90, 98)

Im Gegensatz hierzu konnte bei konstitutionell kleinen Kindern keine erhöhte Komplikationsrate im Vergleich zu normalgewichtigen Feten in Terminnähe gefunden werden. (91)

Aber auch in der Neonatalzeit konnten einige Komplikationen gehäuft bei Kindern mit einer IUGR, vor allem bei Vorliegen der asymmetrischen Form, nachgewiesen werden.

Hierzu zählen beispielsweise Hyperbilirubinämie, Hypoglykämien, Hypothermie, Polyzythämie, Apnoeepisoden, intraventrikuläre Hämorrhagien, neonatale Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis und Folgeerkrankungen des Atemnotsyndroms wie z.B. die bronchopulmonale Dysplasie.

Außerdem werden bei diesen Kindern signifikant häufiger neurologische Auffälligkeiten und kognitive Defekte beobachtet, die häufig auch in der späteren Entwicklung noch nachweisbar sind. (34, 168, 167, 14, 63, 132)

In einigen Studien konnte weiterhin noch gezeigt werden, dass die Prognose bei Kindern mit einer asymmetrischen Wachstumsretardierung trotz erhöhter perinataler Komplikationen besser ist, als bei Kindern mit einer symmetrischen IUGR. (158, 180, 182)

In Langzeituntersuchungen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass der klinische Verlauf bei der frühen IUGR meist schwerer ist als der, der asymmetrischen, späteren Form. (34)

Ein weiteres, sehr bedeutendes Problem stellen erhöhte Erkrankungsraten im Erwachsenenalter von Kindern mit einer IUGR dar. (8, 11, 10)

Hierbei wird ein Zusammenhang zwischen einer SGA- oder IUGR-Geburt und der späteren Entstehung eines metabolischen Syndroms gesehen.

Diese Diskussion entstand erstmals, als 1989 in einer retrospektiven epidemiologischen Studie aus England ein Zusammenhang zwischen einer Wachstumsretardierung in der Fetalzeit und einer erhöhten Sterblichkeitsrate an kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter beschrieben wurde. (7)

Es wird davon ausgegangen, dass ein gestörtes intrauterines Wachstum und ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Insulinresistenz mit nachfolgendem Diabetes, mit einem hohen Blutdruck, sowie mit pathologischen Werten der Blutfette und den daraus entstehenden kardiovaskulären und endokrin-metabolischen Erkrankungen assoziiert ist.

Als Ursache hierfür wird eine bereits intrauterin stattfindende metabolische und autonome Fehlprogrammierung von Hormon- und Stoffwechselfvorgängen angenommen, die zu einer Hormonresistenz mit den genannten Folgen führen kann.
(230, 9)

Dieser Zusammenhang wird als Barker-Hypothese bezeichnet und konnte seit seiner Erstbeschreibung durch die Forschergruppe um David Barker in zahlreichen Studien und Tiermodellen belegt werden.
(8, 9, 10)

3.2. Bedeutung der MTHFR **(Methylen tetrahydrofolat Reduktase)**

3.2.1. Definition und Struktur der MTHFR

Die 5-Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) ist ein cytosolisches Schlüsselenzym des Folsäure-Metabolismus.

Das Gen für die MTHFR ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 an Position 36.3 lokalisiert und besteht aus 11 Exons.

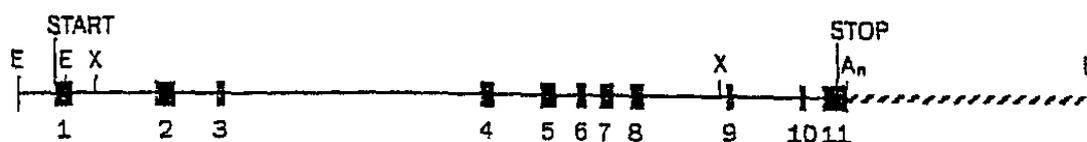


Abbildung 1: Struktur des MTHFR-Gens (63)

Die Exons zeigen Größen zwischen 102-432 Basenpaaren (bp) und die Introns sind zwischen 250 bp bis zu 4,2 kbp (Kilo Basenpaaren) groß.

Die menschliche MTHFR stellt ein Dimer dar, bestehend aus einer N-terminalen Domäne mit einer Größe von 40 kDa (kilo Dalton) und einer C-terminalen Domäne mit einer Größe von 37 kDa (kilo Dalton).

Die katalytische Domäne mit den Bindungstellen für das Enzymsubstrat und FAD, sowie NADPH befindet sich im N-terminalen Bereich zwischen Exon 1 und Exon 6. Der restliche Bereich des Gens von Exon 7-11 entspricht der regulatorischen Domäne, die für die Enzymaktivität von entscheidender Bedeutung ist.

Bei der MTHFR handelt es sich um ein Flavoprotein, das FAD bindet und dessen Reaktionen von FAD und NADPH abhängig sind.

Das Enzym katalysiert die enzymatische Reduktion von 5,10-Methylen-tetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat.

Bei 5-Methyltetrahydrofolat handelt es sich um die biologisch aktive Form der Folsäure, die als Methylgruppendonator im Homocystein-Stoffwechsel benötigt wird. Aber auch bei zahlreichen anderen biochemischen Reaktionen wird die aktivierte Folsäure benötigt.

Über diesen Weg kann über die MTHFR-Aktivität direkt die Homocystein-Konzentration reguliert werden und indirekt über die Verfügbarkeit von Methylgruppen auch zahlreiche weitere biochemische Prozesse wie z.B. die DNA-Synthese kontrolliert und beeinflusst werden.

Es wurden mittlerweile zahlreiche Mutationen beschrieben, die zu qualitativ unterschiedlichen MTHFR-Formen und metabolischen Konsequenzen führen können.

3.2.2. Die wichtigsten MTHFR-Polymorphismen und ihr Einfluss auf die Homocysteinkonzentration

Auf die in Bezug auf den Homocystein-Stoffwechsel wichtigsten Mutationen im MTHFR-Gen und deren Folge für die Homocystein-Blut-Spiegel wird im Abschnitt genetische Ursachen einer Hyperhomocysteinämie näher eingegangen

3.3. Homocystein

3.3.1. Aufbau und Funktion der Aminosäure Homocystein

Homocystein ist eine nicht-proteinogene, schwefelhaltige Aminosäure (1-Amino-3-mercaptobuttersäure), d.h. eine Aminosäure, die für die Synthese von Proteinen nicht benötigt wird.

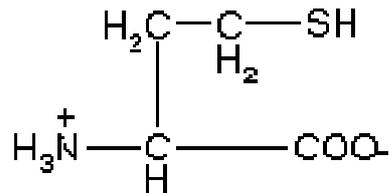


Abbildung 2: Strukturformel der Aminosäure Homocystein

Auf Grund dieser Tatsache gibt es auch keine DNA-Kodierung für diese Aminosäure und Homocystein kommt demzufolge auch nicht in natürlich vorkommenden Eiweißen vor, sondern entsteht ausschließlich als Zwischenprodukt im Rahmen des Methionin-Stoffwechsels.

Methionin ist eine essentielle Aminosäure, von der die Menschen täglich ca. 2 g mit der Nahrung zu sich nehmen.

In unserem Körper wird Methionin direkt nach der Aufnahme ins Blut zu S-Adenosyl-Methionin (SAM) verstoffwechselt, einem der bedeutensten Methylgruppen-Spender unseres Stoffwechsels.

Durch die Abgabe seiner Methylgruppe im Rahmen von zahlreichen biochemischen Reaktionen entsteht aus S-Adenosyl-Methionin (SAM) Homocystein.

Die wichtigste bisher bekannte Aufgabe von Homocystein im Aminosäurenstoffwechsel besteht ebenfalls in einer Bereitstellung von Methylgruppen für weitere biochemische Reaktionen.

Im Plasma liegt Homocystein hauptsächlich in gebundener, oxidierter Form oder in Form von reinen oder gemischten Disulfiden vor.

70-80 % der Aminosäure sind über eine Disulfidbrücke an Proteine, vor allem an Albumin gebunden.

Das restliche Homocystein liegt entweder als Homocystin-Dimer oder als Homocystein-Cystein-Disulfid vor.

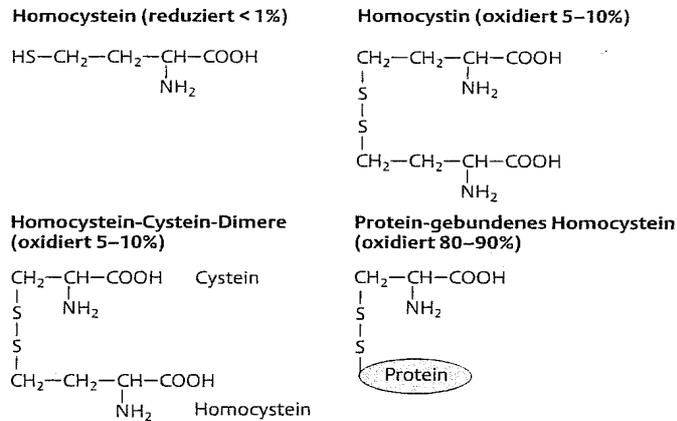


Abbildung 3 : Strukturformeln der verschiedenen Homocystein-Formen

Nur ein sehr geringer Teil (< 1%) der Aminosäure kommt in der freien, d.h. reduzierten Form vor.

Homocystein und seine Disulfid-Formen werden alle renal eliminiert und mit dem Urin ausgeschieden.

Die tägliche Homocystein-Produktion eines Menschen wird auf ca. 20 mmol geschätzt, wovon ein Großteil vom menschlichen Körper wieder remetabolisiert wird. (56)

Die normalen Plasmakonzentrationen liegen beim Erwachsenen zwischen 5 und 15 μM , wobei Männer tendenziell zu höheren Konzentrationen neigen.

Die bei Kindern (< 15 Jahren) gemessenen Konzentrationen liegen im Durchschnitt zwischen 4–8 μM . (164, 165, 136)

3.3.2. Homocysteinestoffwechsel

Auf Grund der Tatsache, dass es sich bei Homocystein um eine potentiell zelltoxische Substanz handelt, versucht der menschliche Körper die intrazelluläre Konzentration dieser Aminosäure möglichst gering und konstant zu halten.

Um dieses Ziel zu erreichen, kann Homocystein von den Zellen verstoffwechselt und/oder aus der Zelle ins Plasma exportiert werden. (50, 30, 204)

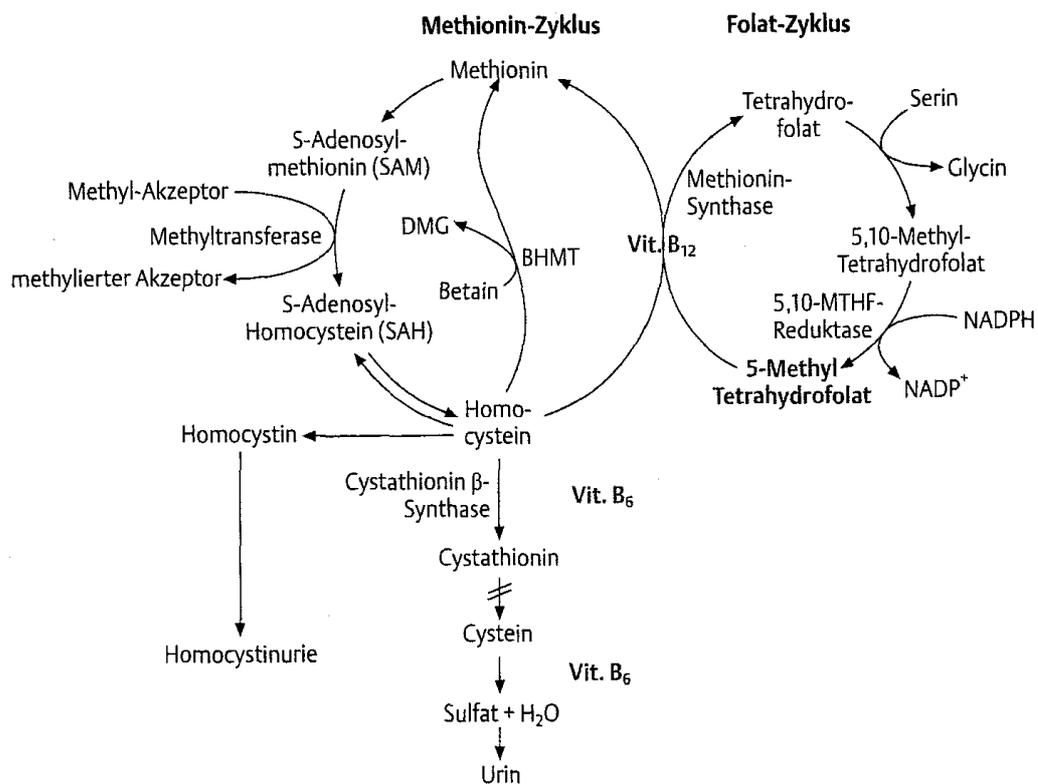


Abbildung 4: Homocysteinestoffwechsel

Das ins Plasma exportierte Homocystein wird vor allem in der Niere durch Remethylierung metabolisiert und nur ein geringer Teil wird anschließend mit dem Urin ausgeschieden. (59)

Die Aminosäure Homocystein befindet sich an einer Schnittstelle von zwei Stoffwechselwegen im Methionin-Metabolismus und kann deshalb über zwei verschiedene Wege verstoffwechselt werden. (184)

Der intrazelluläre Metabolismus von Homocystein verläuft entweder über die Remethylierung zu Methionin oder über die irreversible Transsulfurierung zu Cystein und Alpha-Ketobutyrat, die anschließend renal eliminiert werden.

Beide Stoffwechselwege stehen normalerweise miteinander im Gleichgewicht.

3.3.2.1. Remethylierung

Die Remethylierung zu Methionin kann durch zwei verschiedene Reaktionen erreicht werden, je nachdem ob 5-Methyltetrahydrofolat oder Betain als Methylgruppendonator verwendet werden.

Im ersten Fall wird in einer Vitamin B12 abhängigen Reaktion, die durch die Methioninsynthase (MS/5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyl-Transferase) katalysiert wird, durch Abgabe einer Methylgruppe 5-Methyltetrahydrofolat zu Tetrahydrofolat reduziert.

Die abgegebene Methylgruppe wird auf Homocystein übertragen, welches dadurch zu Methionin umgewandelt wird.

Das entstandene Tetrahydrofolat reagiert in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen (Vitamin B6) Reaktion unter Umwandlung von Serin zu Glycin weiter zu dem Zwischenprodukt 5-10-Methylentetrahydrofolat.

Durch das Enzym 5-10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) wird 5-10-Methylentetrahydrofolat unter Verbrauch von NADPH wieder zu dem Methylgruppendonator 5-Methyltetrahydrofolat umgewandelt, welches erneut mit Homocystein zu Methionin reagieren kann.

Die Methioninbildung durch 5-Methyltetrahydrofolat als Methylgruppendonator ist von Vitamin B12 als Cofaktor für die Methioninsynthase und der Menge, der mit der Nahrung aufgenommenen Folsäure abhängig.

Das hierfür benötigte Enzym kommt in allen Geweben des menschlichen Körpers vor. (16 205)

Die zweite Möglichkeit zur Bildung von Methionin wird durch das Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) katalysiert.

In diesem Falle dient Betain als Methylgruppendonator und überträgt seine Methylgruppe auf Homocystein, wodurch Methionin und Dimethylglycin (DMG) entstehen.

Das entstandene Methionin reagiert unter Verbrauch von Adenosyltriphosphat (ATP) weiter zum aktivierten S-Adenosylmethionin (SAM), welches als universeller Methylgruppendonator für zahlreiche biochemische Reaktionen benötigt wird. Wenn SAM im Rahmen einer biochemischen Reaktion seine Methylgruppe abgegeben hat (Demethylierung) wird es zu S-Adenosyl-Homocystein (SAH) umgewandelt, welches katalysiert durch die SAH-Hydrolase wieder zu Homocystein und Adenosin hydrolysiert werden kann.

Auf Grund der Tatsache, dass SAH und SAM um die gleichen Bindungsstellen konkurrieren, kann auf diesem Wege die Remethylierung allosterisch inhibiert werden.

Der zweite Weg zur Methioninbildung verläuft unabhängig von Vitamin B 12 und findet neueren Studien zufolge hauptsächlich im Leber- und Nierengewebe statt. (128, 27)

Durch die beiden beschriebenen Remethylierungswege ist der menschliche Körper in der Lage seine Konzentrationen an dringend benötigtem Methionin dauerhaft konstant zu halten und gleichzeitig das zelltoxische Homocystein zu eliminieren. So kann bei Methioninmangel beispielsweise durch Steigerung der Aktivität der Methionin-Synthase eine größere Menge an Methionin durch Remethylierung gewonnen werden, als dies im Normalfall geschieht.

Auf Grund der Tatsache, dass der Betain-Weg bisher nur in zwei menschlichen Organen nachgewiesen werden konnte und weiterhin gezeigt werden konnte, dass es auch bei steigendem Substratangebot kaum zu einer Aktivitätszunahme des katalysierenden Enzyms kommt, kann gemäß einer Studie von Jacobson et. al. von einer untergeordneten Rolle dieses Weges bei der Remethylierung ausgegangen werden. (86)

3.3.2.2. Transsulfurierung

Bei der Reaktion der Transsulfurierung kommt es zu einem irreversiblen Umbau von nicht mehr benötigtem Homocystein zu für die Zellen ungefährlichem Cystein.

Diese Umwandlung erfolgt in zwei Teilschritten und dient in größerem Maße der Elimination von Homocystein als der Regeneration anderer Stoffe.

Im ersten Schritt entsteht katalysiert durch die Cystathion- β -Synthase (CBS), aus Homocystein und Serin durch Kondensation Cystathion.

Diese Reaktion ist Pyridoxalphosphat (Vitamin B6) abhängig und findet beim Menschen vor allem in Leber, Nieren, Dünndarm und Pankreas statt. (117)

Als nächstes erfolgt die ebenfalls Pyridoxalphosphat-abhängige Spaltung von Cystathion durch die Cystathion- γ -Lyase (CGL/ γ -Cystathionase) zu der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein und zu Alpha-Ketobutyrat.

Cystein wird schließlich im Rahmen des katabolen Aminosäurenstoffwechsels zu Taurin und anorganischem Schwefel/Sulfat oxidiert und auf diesem Wege renal ausgeschieden.

Der gesamte Transsulfurierungsweg ist gemäß einer Studie von Jacobson et al aus dem Jahre 1998 beim Menschen auf bestimmte Organe wie z.B. Leber, Niere, Gehirn und Pankreas beschränkt. (49, 87)

Im Normalfall besteht ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen den beiden Verstoffwechslungsmöglichkeiten.

Remethylierung und Transsulfurierung reichen aber dennoch meistens nicht aus, um das gesamte für die Zelle schädliche Homocystein umzuwandeln.

Aus diesem Grund wird ein Teil des Homocysteins direkt aus der Zelle ausgeschleust und über die Nieren ausgeschieden.

Da beide Stoffwechselwege einer Sättigungskinetik unterliegen, kommt es bei entsprechend hohen Homocysteinkonzentrationen zu einer vermehrten direkten Ausscheidung von Homocystein mit dem Urin, der Homocysteinurie.

3.3.3. Bedeutung der MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase)

Die 5-10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) ist ein cytosolisches Schlüsselenzym des Folsäure-Metabolismus.

Das Gen für die MTHFR ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 an Position 36.3 lokalisiert und besteht aus 11 Exons. (69)

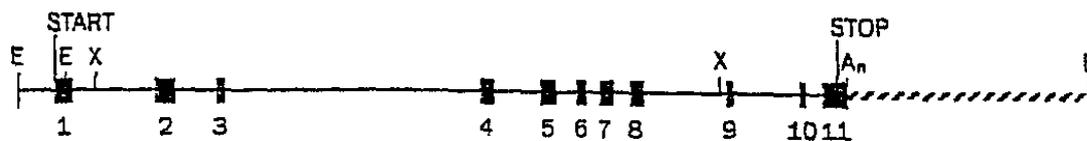


Abbildung 5 : Struktur des MTHFR-Gens (69)

Die Exons zeigen Größen zwischen 102-432 Basenpaaren (bp) und die Introns sind zwischen 250 bp bis zu 4,2 kbp (Kilo Basenpaaren) groß.

Die menschlichen MTHFR stellt ein Dimer dar, bestehend aus einer N-terminalen Domäne mit einer Größe von 40 kDa (kilo Dalton) und einer C-terminalen Domäne von 37 kDa (kilo Dalton).

Die katalytische Domäne mit den Bindungsstellen für das Enzymsubstrat und FAD, sowie NADPH befindet sich im N-terminalen Bereich zwischen Exon 1 und Exon 6. Der restliche Bereich des Gens von Exon 7-11 entspricht der regulatorischen Domäne, die für die Enzymaktivität von entscheidender Bedeutung ist.

In diesem Bereich befindet sich auch die Bindungsstelle für SAM, einen allosterischen Inhibitor der MTHFR.

Die Inhibition kann durch steigende Konzentrationen an SAH wieder aufgehoben werden.

Bei der MTHFR handelt es sich um ein Flavoprotein, dass FAD bindet und dessen Reaktionen von FAD und NADPH abhängig sind.

Das Enzym katalysiert die enzymatische Reduktion von 5-10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat.

Bei 5-Methyltetrahydrofolat handelt es sich um die biologisch aktive Form der Folsäure, die als Methylgruppendonator im Homocysteinestoffwechsel benötigt wird.

Aber auch bei zahlreichen anderen biochemischen Reaktionen wird die aktivierte Folsäure benötigt.

Über diesen Weg kann über die MTHFR-Aktivität direkt die Homocystein Konzentration reguliert werden und indirekt über die Verfügbarkeit von Methylgruppen auch zahlreiche weitere biochemische Prozesse wie z.B. die DNA-Synthese kontrolliert und beeinflusst werden.

Es wurden mittlerweile zahlreiche Mutationen beschrieben, die zu qualitativ unterschiedlichen MTHFR-Formen und metabolischen Konsequenzen führen können.

Auf die in Bezug auf den Homocystein-Stoffwechsel wichtigsten Mutationen im MTHFR-Gen und deren Folge für die Homocystein-Blut-Spiegel wird im Abschnitt genetische Ursachen einer Hyperhomocysteinämie näher eingegangen.

3.3.4. Schlüsselrolle der Folsäure im Homocysteinstoffwechsel

Wie bei der Beschreibung des Homocystein-Stoffwechsels bereits erkennbar wurde, ist die Folsäure einer der wichtigsten Cofaktoren bei der Remethylierung von Homocystein zu Methionin und wird auch bei zahlreichen weiteren Reaktionen als Methylgruppenspende eingesetzt.

Der Bedarf eines nicht-schwangeren Erwachsenen an Folsäure beträgt täglich ca. 200-400 µg. (138)

In zahlreichen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die tatsächlich mit der Nahrung aufgenommene durchschnittliche Tagesdosis in Europa häufig unter den empfohlenen Richtwerten liegt. (39)

Die für unseren Körper benötigte Folsäure ist vor allem enthalten in Milch, Getreide, Leber, Hülsenfrüchten und grünem Gemüse.

Sie wird vom Menschen mit der Nahrung aufgenommen und gelangt über Endozytose durch unsere Darmepithelzellen ins Blut.

Auf diesem Wege erreicht sie auch die Leber, die in der Lage ist, einen Vorrat für ungefähr 4 Monate zu speichern. (71, 79)

Aber auch bei zahlreichen weiteren Stoffwechselreaktionen und der DNA-Synthese wird Folsäure benötigt.

Auf Grund dieser mannigfachen Beteiligung an Stoffwechselfvorgängen kann ein Mangel an Folsäure zu schwerwiegenden Störungen, beispielsweise in der DNA- oder Proteinsynthese führen.

Diese Störungen werden vor allem an sich schnell teilenden Geweben oder Zellverbänden, wie z.B. dem blutbildenden System sichtbar.

Ein Folsäuremangel äußert sich hier beispielsweise als hyperchrome makrozytäre Anämie. (209)

In zahlreichen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Folsäure-Mangel während der Schwangerschaft und dem Auftreten von Neuralrohr-Defekten bei den Neugeborenen nachgewiesen werden. (110, 100, 134)

In letzter Zeit wurde zunehmend auch ein Einfluss auf die Prävention der Atherosklerose und die Entwicklung bzw. den Verlauf von Krebserkrankungen durch Folsäure vermutet. (79, 89)

In einigen Studien wurde sogar ein Einfluss der Folsäure auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität angenommen. (197, 122)

Für unsere Untersuchungen von besonderem Interesse sind jedoch die Beobachtungen einer Beeinflussung der Homocystein-Spiegel durch Folsäure-Einnahme, auf die im Kapitel Hyperhomocysteinämie und deren Ursachen noch näher eingegangen wird.

3.3.5. Definition einer Hyperhomocysteinämie

Unter einer Hyperhomocysteinämie (Homocysteinämie) versteht man das Auftreten erhöhter Konzentrationen von Homocystein im Blut mit eventuell nachfolgender Schädigung verschiedener Organe.

Eine Homocysteinurie hingegen ist definiert als Sammelbezeichnung für mehrere autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörungen mit erhöhter Konzentration von Homocystein in Blut und Urin.

Hierbei wird zwischen angeborener und erworbener Form unterschieden.

Bereits im Jahr 1992 wurde in einer Studie von Kang et. al. eine Einteilung der Hyperhomocysteinämien anhand der gemessenen Blutspiegel vorgenommen.

Man legte damals eine Einteilung in moderate (Werte zwischen 16-30 μM), intermediäre (zwischen 31-100 μM) und schwere Hyperhomocysteinämie (Werte > 100 μM) fest. (96)

Gemäß den aktuellen Richtlinien der "D.A.CH-Liga Homocystein" sollte die Plasma-Homocysteinkonzentration bei Erwachsenen heute < 10 μM liegen.

Von einer moderaten Hyperhomocysteinämie wird bereits ab einer Plasmakonzentration von 12 μM gesprochen. (36)

Auf Grund der Vielfalt der am Homocysteinstoffwechsel beteiligten Enzyme und Cofaktoren sind viele genetische und nutritiv bedingte Störungen dieses Stoffwechsels möglich. (96)

Auf die häufigsten Ursachen wird im Folgenden näher eingegangen.

3.3.6. Ursachen einer Hyperhomocysteinämie

3.3.6.1. Genetische Störungen

3.3.6.1.1. Defekte im Transsulfurierungsweg

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass genetische Faktoren zu Hyperhomocysteinämie führen können.

Zu den häufigsten genetischen Ursachen für erhöhte Homocysteinkonzentrationen zählt ein Defekt in der Transsulfurierung von Homocystein zu Cystein bedingt durch eine Punktmutation im Gen, das die Cystathion- β -Synthase (CBS) codiert.

Diese Mutation ist gleichzeitig auch für die Entstehung einer Homocystinurie Typ I (klassische Homocystinurie) verantwortlich. (131, 45)

Der genetische Defekt liegt auf dem Chromosom 21 an der Position 22.3 und wird autosomal-rezessiv vererbt.

Folge des Enzymdefektes ist, dass Homocystein aufgrund einer verminderten Substrataffinität des Enzyms Cystathion- β -Synthase zu dieser Aminosäure, nicht mehr zu Cystathion abgebaut werden kann, weshalb es zu einem Anstieg der Konzentrationen von Homocystein im Blut und im Urin kommt.

Bei der homozygoten Form der Erkrankung konnten nüchtern Blutspiegel an Homocystein von mehr als 400 $\mu\text{mol/l}$ nachgewiesen werden. (137)

Diese in ihrem Auftreten eigentlich sehr seltene Stoffwechselerkrankung (1:50.000-1:300.000 Geburten) ist durch sehr variable, zum Teil jedoch sehr schwerwiegende klinische Symptome mit multipler Organbeteiligung charakterisiert.

Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch einen marfanoiden Habitus mit Linsenektopie, progredienter Myopie, Arachnodaktylie, Trichterbrust und Hochwuchs. Weiterhin kann es zu Osteoporose, Verhaltensstörungen, psychomotorischen Entwicklungsstörungen, mentaler Retardierung und einer Neigung zu Thromboembolien und schwerer, sehr früh auftretender Arteriosklerose kommen. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine starke Erhöhung von Homocystein und Methionin im Plasma, sowie ein positiver Nachweis von Homocystein im Urin. Bereits 1968 wurde durch Carey et al. gezeigt, dass die homozygote Form der Erkrankung unbehandelt bereits in jungen Jahren tödlich verlaufen kann. (23)

Aber auch bei heterozygoten Merkmalsträgern kann die Enzymaktivität um bis zu 50 % vermindert sein und damit zu erhöhten Homocystein-Spiegeln führen. (102)

3.3.6.1.2. Defekte im Remethylierungsweg

Neben den bereits beschriebenen Störungen im Transsulfurierungsweg können auch Defekte im Remethylierungsweg zu erhöhten Homocystein-Konzentrationen führen. Hierzu zählen beispielsweise die autosomal-rezessiv vererbten Punktmutationen im Gen, das für die 5-10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) codiert.

Besonders häufig betreffen diese Mutationen das Nukleotid 677 (C677T) in Exon 4 des MTHFR-Gens.

Dieser Mutation folgt eine Transition der Basen Cytosin gegen Thymin an Position 677 in der katalytischen Domäne des Gens.

In der Folge kommt es auf der Proteinebene zu einer Substitution der Aminosäure Alanin durch Valin an Position 222 des Polypeptids. (97, 60)

Hierdurch entsteht eine bei einer Temperatur von 46 °C thermolabile Variante der MTHFR.

Die Aktivität des Enzyms bei einer der menschlichen Körpertemperatur entsprechenden Temperatur von 37 °C ist bei homozygoten Trägern der Mutation auf weniger als die Hälfte (35-50%) der normalen Aktivität reduziert und führt zu moderat erhöhten Homocystein-Werten. (73, 94)

Die Restaktivität des Enzyms liegt bei Heterozygoten bei ca. 65 % der normalen Enzymaktivität. (95, 47, 60)

Infolge der reduzierten Enzymaktivität kommt es zu einer verringerten Umwandlung von 5,10-Methylentetrahydrofolat zu 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) und dadurch zu niedrigeren Spiegeln an 5-MTHF.

Aufgrund dessen steht für die Remethylierung von Homocystein weniger aktivierte Folsäure zu Verfügung und es kann daher zu einem Anstieg der Homocystein-Konzentrationen im Blut kommen. (15, 95, 94)

Der durch den Defekt der Remethylierung erzeugte Folsäure-Mangel wird auch als Folat-Falle bezeichnet. (57)

Die Prävalenz für das Vorliegen der C677T Mutation variiert zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen erheblich.

Auch die regionale Verbreitung zeigt deutliche Schwankungen mit einem erkennbaren Nord-Süd-Gefälle und einem Maximum in den südlichen Ländern. (36)

Angelo et. al. gaben in den Ergebnissen ihrer Untersuchungen aus dem Jahre 1997 eine geschätzte Prävalenz von 4-10 % an und stellten im diesem Zusammenhang die Behauptung auf, dass es sich bei dieser Mutation um die häufigste Ursache einer milden Hyperhomocysteinämie handelt. (37)

Anhand von Studien wurde geschätzt, dass dieser genetische Defekt in Deutschland bei 5-15 % der Bevölkerung in der homozygoten und bei ca. 35 % in der heterozygoten Form vorliegt. (36, 31)

Ob die erwähnten Punktmutationen zu erhöhten Homocystein-Spiegeln führen oder keinen Einfluss auf die Blutspiegel haben wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert und konnte noch nicht eindeutig geklärt werden.

Es gibt zahlreiche Studien, die zumindest für die homozygote Variante einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Trägern einer solchen Mutation und erhöhten Homocystein-Spiegeln sehen. (60, 73, 46, 179)

So beschreibt die Forschungsgruppe um Kluijtmans et. al. beispielsweise für homozygote Träger der Mutation ein dreifach erhöhtes Risiko, bereits in jungen Jahren eine arteriosklerotische Gefäßerkrankung zu entwickeln. (102)

Die heterozygote Form führt meist nicht zu erhöhten Blutspiegeln. (54, 25)

Andererseits gibt es jedoch auch Untersuchungen, in denen ein solcher Zusammenhang nicht herausgestellt wird. (119, 206, 200)

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Träger dieser Mutation besonders gut auf eine Gabe von Folsäure ansprechen, und es stellte sich heraus, dass die Plasmaspiegel an Homocystein und Folsäure bei diesen Patienten durch die orale Substitution von Folsäure normalisiert werden konnten.

Hieraus lässt sich ein bedeutender Zusammenhang zwischen den MTHFR-Mutationen und einer ausreichenden Bereitstellung von Folsäure für den Homocystein-Stoffwechsel ableiten.

Bei homozygoten Trägern der Mutation wird daher von einem im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhten Folsäurebedarf ausgegangen. (36)

Manche Autoren gehen sogar soweit zu behaupten, dass bei ausreichender Folsäure-Zufuhr, die Polymorphismen bedeutungslos für den Homocystein-Spiegel seien. (73, 15, 95, 94)

Neben den bereits erwähnten genetischen Ursachen gibt es noch zahlreiche weitere Mutationen, die über verschiedene Wege den Homocystein-Spiegel beeinflussen können.

Ein Beispiel hierfür ist z.B. ein weiterer MTHFR-Polymorphismus, der Polymorphismus A1298C.

Durch diese Mutation kommt es an Position 1298 des MTHFR-Gens zu einer Transition der Basen Adenin gegen Cytosin, die auf der Proteinebene zu einem Austausch der Aminosäure Glutamat gegen Alanin führt.

Für diese Mutation konnte ebenfalls in einigen Studien ein Zusammenhang zu erhöhten Homocystein-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die D.A.C.H.-Liga Homocystein geht davon aus, dass bei homozygoten Merkmalsträgern bei einer Temperatur von 37 °C die Aktivität der MTHFR auf ca. 60 % der normalen Aktivität vermindert ist. (36)

Es ist allerdings von keiner Thermolabilität des Enzyms berichtet worden und von einer allein durch diese Mutation bedingten Beeinflussung des Homocystein-Spiegels wird ebenfalls nicht ausgegangen.

Einige Arbeitsgruppen haben weiterhin auch noch den Einfluss von Mutationskombinationen auf den Homocystein-Spiegel untersucht.

So konnten Haviv et. al. beispielsweise 2002 in ihren Untersuchungen an Hämodialyse-Patienten signifikant erhöhte Homocystein-Konzentrationen messen, wenn die Patienten die Genotyp-Kombination TT 677/AA 1298 aufwiesen. (74)

Aber auch die Kombination beider heterozygoter Genotypen (CT677/AC1298) konnte in einigen Studien mit erhöhten Homocystein-Spiegeln in Zusammenhang gebracht werden. (51,52)

Die D.A.C.H.-Liga Homocystein geht in diesem Falle von einer Interaktion der beiden Mutationen aus, die zu einer Erhöhung der Homocystein-Konzentrationen um 1 µmol/l führt. (36)

Weitere Beispiele für genetische Einflussfaktoren auf den Homocystein-Spiegel sind z.B. ein Mangel an dem Enzym Methionin-Synthase, weitere MTHFR-Mutationen, sowie zahlreiche Störungen des Vitamin B12 Stoffwechsel. (65, 220)

3.3.6.2. nutritive Einflüsse

Der Einfluss von nutritiven, d.h. durch die Ernährung bedingten Faktoren lässt sich anhand der zahlreichen Beteiligung von Co-Faktoren am Homocystein-Metabolismus und deren essentiellen Bedeutung für einen funktionierenden Homocystein-Methionin-Stoffwechsel belegen.

Von besonderem Interesse sind hierbei die Vitamine des B-Komplexes, Vitamin B6 und B12, sowie Folsäure. (201)

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Folsäure der Cofaktor ist, der die Homocystein-Werte am stärksten beeinflusst. (18, 202)

Hierbei sind vor allem zwei Aspekte wichtig.

Zum einen konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass bei sehr vielen Menschen ein Folsäure-Mangel vorliegt, weshalb zahlreiche Länder ihre Nahrungsmittel prophylaktisch mit Folsäure anreichern.

Gründe hierfür sind auch darin zusehen, dass die Entstehung von weiteren Erkrankungen, wie z.B. Neuralrohrdefekt, auf einen Folsäure-Mangel zurückgeführt werden kann.

Zum anderen haben Forschungen ergeben, dass im Falle des Vorliegens einer MTHFR-Mutation der Folsäurestatus ausschlaggebend dafür ist, ob es zu Veränderungen der Homocysteinkonzentrationen kommt oder nicht.

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass selbst homozygote Träger der Mutation, die einen hohen Folsäureplasmaspiegel zeigten, trotz der verminderten Enzymaktivität nahezu normale Homocystein-Konzentrationen aufweisen.

Allerdings geht man in diesem Zusammenhang davon aus, dass diese Personen auf eine höhere Folatzufuhr angewiesen sind, als normal üblich. (88)

Von Interesse ist hierbei auch der von Selhub et. al. festgestellte Zusammenhang zwischen sich im unteren Normbereich befindenden Vitamin-Konzentrationen aber dennoch erhöhten Homocystein-Spiegeln.

In dieser Studie wurde ein Mangel an den genannten Vitaminen für 2/3 der Fälle von erhöhten Homocystein-Konzentrationen verantwortlich gemacht. (184)

Ein weiterer Beleg für die Bedeutung der nutritiven Einflussfaktoren ist die Tatsache, dass verschiedene Forschungsgruppen einen Rückgang der Homocystein-Konzentrationen bei ihren Probanden nach Verabreichung von alleiniger Folsäure oder von Kombinationen aus Folsäure, Vit B6 und Vit B12 verzeichnen konnten. (203,215, 218)

3.3.6.3. weitere Einflussfaktoren

Neben den genannten gibt es noch zahlreiche weitere Faktoren, die auf unterschiedlichste Art und Weise Einfluss auf den Homocystein-Spiegel nehmen. Hierzu zählt beispielsweise das Alter der Testperson, da es sich gezeigt hat, dass mit zunehmendem Alter die Homocystein-Konzentrationen ansteigen. (125) Für dieses Phänomen wurde bisher noch keine endgültige Erklärung gefunden. Als Ursache werden jedoch eine eingeschränkte Nierenfunktion im Alter, eine altersabhängig absinkende Aktivität der Cystathionin- β -Synthase, sowie eine im Alter absinkende und vermutlich auf Mangelernährung zurückzuführende Konzentration an Co-Faktoren für die am Homocystein-Stoffwechsel beteiligten Enzyme vermutet. (125, 92,188)

In einer von Herrmann et. al. im Jahre 2000 durchgeführten Studie konnte mit steigendem Lebensalter sowohl eine Zunahme der Prävalenz, als auch der Höhe der Homocystein-Konzentrationen gezeigt werden. (77)

Weiterhin gilt ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Probanden und der Höhe der Homocystein-Spiegel als gesichert.

Bei Männern wurden im Durchschnitt um 21% höhere Konzentrationen gefunden, als bei gleichaltrigen Frauen. (118, 113)

Die Ursachen hierfür sind bisher noch nicht ausreichend erforscht.

Es wird jedoch vermutet, dass sowohl niedrige Östrogen-Konzentrationen als auch erhöhte Testosteron-Spiegel ursächlich sein könnten. (212)

In einer anderen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Homocystein-Spiegel bei Frauen nach der Menopause gemeinsam mit dem Risiko an einer KHK

zu erkranken ansteigen, weshalb ein Zusammenspiel mit den Geschlechtshormonen als Ursache der differenten Werte als wahrscheinlich erscheint. (157, 170, 2)

Aber auch im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten oder gestörten Organfunktionen konnten erhöhte Homocystein-Konzentrationen beobachtet werden. Zum Kreis dieser Erkrankungen zählen einige maligne Erkrankungen wie beispielsweise Pankreas-, Mamma- und Ovarial-Carcinome. Die Ursache für diesen Zusammenhang wird in einem gestörten oder sogar verhinderten Methioninstoffwechsel in Tumorzellen gesehen. (125)

Andere Erkrankungen, die mit erhöhten Homocystein-Werten einhergehen können, sind z.B. die Niereninsuffizienz, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Funktionsstörungen der Schilddrüse oder die Psoriasis.

Die essentielle Bedeutung der Nierenfunktion für den Homocysteinhaushalt ist auf die fast vollständige Organbindung der Cystathion- β -Synthase an die Niere zurückzuführen.

Dieser Zusammenhang wird auch daran erkennbar, dass mit steigenden Kreatinin-Werten und damit mit abnehmender Nierenfunktion, die Homocystein-Konzentrationen ebenfalls ansteigen. (16, 55, 187)

Weiterhin gilt als gesichert, dass Medikamente die Verstoffwechslung von Homocystein und Methionin direkt beeinflussen können oder über eine Interaktion mit den Co-Faktoren des Homocystein-Stoffwechsels zu erhöhten Homocystein-Konzentrationen beitragen können.

Hierzu zählen beispielsweise Theophyllin, Folsäure-Antagonisten wie z.B. Methotrexat, Antiepileptika, zahlreiche Diuretika, Vitamin-B6-Antagonisten, L-Dopa, Metformin, Protonenpumpenhemmer, Fibrate, Zytostatika usw.

In weiteren Studien konnte auch eine Beeinflussung der Homocystein-Spiegel durch Zigarettenkonsum (155), sowie übermäßigem Kaffee- und Alkoholgenuss und Bewegungsmangel nachgewiesen werden. (144, 33)

In diesem Zusammenhang sollte vor allem darauf geachtet werden, dass viele Patienten häufig eine Kombination mehrerer dieser Risikofaktoren zusammen

aufweisen und sich diese Faktoren unter Umständen in ihren Wirkungen gegenseitig verstärken können.

So konnte beispielsweise ein 12-fach erhöhtes Risiko an einer KHK zu erkranken nachgewiesen werden, wenn der Proband sowohl erhöhte Homocystein-Konzentrationen als auch einen Zigarettenkonsum aufwies. (195)

3.3.7. Klinische Relevanz erhöhter Homocysteinspiegel

Der Homocysteinestoffwechsel findet in fast allen Zellen des menschlichen Körpers statt.

Deshalb erscheint es auch nicht verwunderlich, dass sich erhöhte Homocystein-Werte in Form von Erkrankungen fast aller Organsysteme äußern können.

Bei der Manifestation der Symptome wird eine Dosis-Wirkungsbeziehung, sowie eine entscheidende Beeinflussung durch die Dauer der Wirkungszeit angenommen. (36)

Bereits 1969 wurde großes Interesse an der Aminosäure Homocystein gezeigt, als es einer Forschungsgruppe um McCully gelang einen Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen und arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen aufzuzeigen, den er später als „homocysteine theory of arteriosclerosis“ veröffentlichte. (130,131)

In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass Homocystein einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung von arteriosklerotische Gefäßerkrankungen (70), koronare Herzkrankheit (44, 210), Myokardinfarkte (189), venöse Thrombosen (76), sowie Schlaganfälle (32, 153) darstellt.

Zunehmend gibt es auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und kognitiven Störungen bis hin zu dementiven Erkrankungen. (126, 186, 111)

Weiterhin konnte in einer Studie von Nygard et. al. aus dem Jahre 1997 bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit eine Korrelation zwischen der Höhe der Homocystein-Spiegel und der Gesamtmortalität nachgewiesen werden. (144)

In zahlreichen Untersuchungen konnte auch ein Einfluss von erhöhten Homocystein-Konzentrationen bei schwangeren Frauen auf den Verlauf und den Ausgang der Schwangerschaften aufgezeigt werden. (142, 143)

So wurde vor allem von niedrigeren Geburtsgewichten auf Seiten der Kinder, von häufigeren Aborten und vorzeitiger Placentalösung berichtet. (142, 143)

Weiterhin wird ein Zusammenhang zwischen erhöhten Blutspiegeln an Homocystein und der Entwicklung einer Präeklampsie, sowie dem Auftreten von Neuralrohrdefekten diskutiert. (159, 190, 160)

Aber auch milde Homocystein-Erhöhungen auf 10-15 $\mu\text{mol/l}$ wurden in jüngster Zeit mit dem Auftreten von kardiovaskulären Symptomen und cerebralen Insulten in Zusammenhang gebracht, vor allem wenn weitere Risikofaktoren wie beispielsweise Adipositas oder Hypercholesterinämie gleichzeitig vorliegen. (174)

3.4. Folsäure

3.4.1. Definition und Funktion der Folsäure

Die Folsäure, die auch als Vitamin B9, Vitamin B11 oder Folat bezeichnet wird, ist ein 1941 entdecktes, hitze- und lichtempfindliches Vitamin aus dem Komplex der B-Vitamine.

Der Name Folsäure stammt vom lateinischen Begriff folium (= Blatt) ab, in Anlehnung an die Spinatblätter, aus denen dieses Vitamin erstmals isoliert wurde.

Chemisch gesehen setzt sich die Folsäure aus einem Pteridin-Derivat, einer para-Aminobenzoessäure und einer L-Glutaminsäure zusammen und hat die Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$.

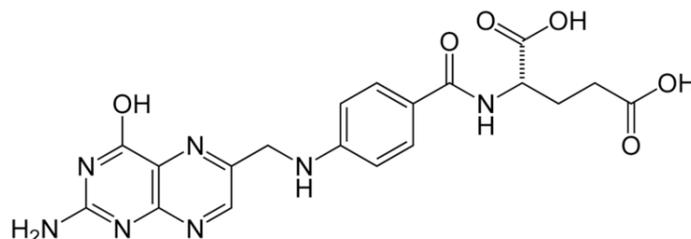


Abbildung 6: Strukturformel der Folsäure

Der tägliche Bedarf eines erwachsenen Menschen an Folsäure beträgt ca. 200-400 μg . Für Schwangere und Kinder gelten entsprechend höhere Bedarfswerte. (138)

In zahlreichen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die tatsächlich mit der Nahrung aufgenommene durchschnittliche Tagesdosis in Europa häufig unter den empfohlenen Richtwerten liegt. (39)

Die für unseren Körper benötigte Folsäure ist vor allem enthalten in Milch, Getreide, Vollkornprodukten, Leber, Hülsenfrüchten, Nüssen, Eigelb und grünem Gemüse. Auch in Obst, Fisch und Fleisch finden sich geringe Mengen.

Da Folsäure für uns Menschen ein essentielles Vitamin ist, muss sie unserem Körper mit der Nahrung zugeführt werden.

Das Vitamin gelangt dann über Endozytosevorgänge durch unsere Darmepithelzellen ins Blut.

Auf diesem Wege erreicht sie auch die Leber, die in der Lage ist einen Vorrat für ungefähr 4 Monate zu speichern. (71)

Durch ihre zentrale Stellung in der Purinbiosynthese ist die Folsäure für die DNA-Replikation essentiell notwendig und spielt daher insbesondere in der Schwangerschaft, sowie bei sich häufig teilenden Zellen (z. B. Knochenmark) eine entscheidende Rolle.

Des Weiteren agieren die Folsäure und ihre reduzierten Formen, das Dihydro- und das Tetrahydrofolat (DHF, THF), als Überträger von Kohlenstoff in Form von Methyl-, Methenyl-, Formyl- und anderen Resten bei zahlreichen biochemischen Reaktionen.

Auf Grund dieser mannigfachen Beteiligung an Stoffwechselfvorgängen kann ein Mangel an Folsäure zu schwerwiegenden Störungen im menschlichen Organismus führen.

Diese Störungen werden vor allem an sich schnell teilenden Geweben oder Zellverbänden wie z.B. dem Blutbildenden System sichtbar.

Ein Folsäuremangel äußert sich hier beispielsweise als hyperchrome makrozytäre Anämie. (209)

Eine weitere entscheidende Rolle spielt das Vitamin während der Schwangerschaft für die Entwicklung des Embryos und hier in besonderem Maße für die Entwicklung des Nervensystems und seiner Strukturen.

In zahlreichen Studien konnte so beispielsweise ein Zusammenhang zwischen Folsäure-Mangel während der Schwangerschaft und dem Auftreten von Neuralrohr-Defekten bei den Neugeborenen nachgewiesen werden. (110, 100, 134)

In letzter Zeit wurde zunehmend auch ein Einfluss auf die Prävention der Atherosklerose und die Entwicklung bzw. den Verlauf von Krebserkrankungen durch Folsäure vermutet. (79, 89)

In einigen Studien wurde sogar ein Einfluss der Folsäure auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität angenommen. (197, 122)

3.4.2. Schlüsselrolle der Folsäure im Homocysteinestoffwechsel

Wie bei der Beschreibung des Homocystein-Stoffwechsels bereits erkennbar wurde, ist die Folsäure einer der wichtigsten Cofaktoren bei der Remethylierung von Homocystein zu Methionin.

Für unsere Untersuchungen von besonderem Interesse sind jedoch die Beobachtungen einer Beeinflussung der Homocystein-Spiegel durch Folsäure-Einnahme, auf die im Kapitel Hyperhomocysteinämie und deren Ursachen näher eingegangen wird.

3. 5. Fragestellungen und Zielsetzung der Studie

Zahlreichen Studien belegen, dass Störungen des intrauterinen Wachstums einen bedeutenden Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität und Morbidität in der Neonatalperiode darstellen. (132, 228, 34)

Frühgeborene sind hiervon in besonderem Maße betroffen, wie die Ergebnisse zahlreicher Forschungsgruppen zeigen. (35, 61)

Als Ursachen der intrauterinen Wachstumsretardierung kommen zahlreiche Faktoren in Frage. Als ein möglicher ursächlicher Faktor werden angeborene Thrombophilien und darunter auch Störungen im Homocysteinstoffwechsel diskutiert. (40, 207, 66)

Der Homocysteinstoffwechsel spielt eine zentrale Rolle im menschlichen Organismus und wird von zahlreichen genetischen Faktoren wie beispielsweise Polymorphismen im Gen der Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) beeinflusst.

Gleichzeitig wird der Homocysteinhaushalt aber auch durch zahlreiche nutritive Faktoren und hier insbesondere durch die Folsäure reguliert.

Inwieweit die genannten Einflussfaktoren des Homocytseinspiegels für die Ätiologie einer intrauterinen Wachstumsretardierung von Bedeutung sind, wird in der Literatur bisher kontrovers diskutiert. (207, 66, 214)

Ziel unserer Studie ist es daher, den Einfluss von genetischen und nutritiven Faktoren auf den Homocysteinspiegel bei Frühgeborenen mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) zu untersuchen.

Hierfür wurden auf der genetischen Ebene 2 Polymorphismen im MTHFR-Gen untersucht und auf der biochemischen Ebene Bestimmungen der Homocystein- und Folsäure-Plasma-Spiegel der Frühgeborenen vorgenommen.

Folgende Fragestellungen standen hierbei im Mittelpunkt unser Untersuchungen:

1. Themenkomplex: Verteilung der Polymorphismen im MTHFR-Gen und deren Einfluss

a) **Wie ist die Verteilung des C677T- und des A1298C-Polymorphismus im Studienkollektiv?**

b) Existieren Unterschiede in dem Auftreten der einzelnen Genotypen zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen?

c) Gibt es Unterschiede zwischen unseren Daten und der Häufigkeit des Auftretens der Polymorphismen in der normalen Bevölkerung?

2. Themenkomplex: Homocysteinspiegel

- a) **Gibt es Unterschiede in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen?**
- b) Zeigen sich Differenzen zwischen der Höhe der von uns gemessenen Homocystein-Konzentrationen und den Konzentrationen in der normalen Bevölkerung?
- c) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Polymorphismen im MTHFR-Gen und dem Auftreten von erhöhten Homocystein-Konzentrationen im Nabelschnurblut der Neugeborenen?
- d) Gibt es signifikante Unterschiede in den Folsäure-Spiegeln zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen?
- e) Zeigen Neugeborene von Müttern, die während der Schwangerschaft Folsäure eingenommen haben, höhere Folsäure-Plasma-Spiegel als Kinder, deren Mütter keine Folsäure eingenommen haben?
- f) Besteht ein Zusammenhang zwischen den Homocystein- und den Folsäurespiegeln der Frühgeborenen?
- g) Gibt es eine signifikante Beziehung zwischen dem Gestationsalter der Frühgeborenen und den Homocystein-Konzentrationen?
- h) Hat mütterlicher Nikotinkonsum während der Schwangerschaft einen Einfluss auf die Homocystein-Konzentrationen der Kinder?
- i) Zeigen sich signifikante Unterschiede in der Höhe der Homocystein-Spiegel zwischen männlichen und weiblichen Frühgeborenen?
- j) Zeigen Frühgeborene von Müttern mit arterieller Hypertonie signifikant höhere Homocystein-Konzentrationen als Kinder, deren Mütter keine arterielle Hypertonie während der Schwangerschaft zeigten?
- k) Liegen die Homocysteinkonzentrationen bei den Kindern aus der arteriellen Hypertonie-Gruppe umso höher, je niedriger das Geburtsgewicht der Frühgeborenen ist?

3. Themenkomplex: Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen

- a) **Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines der beiden Polymorphismen im MTHFR-Gen und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen?**

- b) Existiert eine signifikante Beziehung zwischen dem Homocysteinspiegel und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen?
- c) Welche der untersuchten Merkmale haben einen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen?
- d) Für welches Merkmal lässt sich die größte Einflussnahme nachweisen?

4. Themenkomplex: Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR

- a) **Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des C677T oder des A1298C Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Vorliegen einer IUGR?**
- b) Welche der untersuchten Merkmale haben einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer IUGR?
- d) Für welches Merkmal lässt sich die größte Einflussnahme nachweisen?

4. Material und Methoden

4.1. Patientenkollektiv:

In unserer Studie untersuchten wir die klinischen, genetischen und biochemischen Daten von insgesamt 149 Neugeborenen, die während des Studienzeitraumes von September 2005 bis Januar 2008 in der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums des Saarlandes geboren wurden.

Bei den von uns ausgewählten Studienteilnehmern handelt es sich ausschließlich um Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 32+0 Schwangerschaftswochen (SSW) und 36+6 SSW.

Das Gestationsalter wurde nach der Menstruationsanamnese oder mit Hilfe der pränatalen Ultraschalluntersuchung in der Frühschwangerschaft (10.-12. SSW) bestimmt.

Das durchschnittliche Gestationsalter aller an der Studie teilnehmender Frühgeborener lag bei 35,00 [32,0-36,9] Schwangerschaftswochen.

Das durchschnittliche Geburtsgewicht betrug 2300,00 [1240-3900] g, wobei es zu beachten gilt, dass sich unter den teilnehmenden Kindern 65 Zwillingsfrühgeborene und 2 Drillingspärchen befinden.

Ursächlich für die große Anzahl an Mehrlingsschwangerschaften ist, dass unsere Untersuchungen an einem Perinatalzentrum durchgeführt wurden, wo generell ein höherer Anteil an Risikoschwangerschaften betreut wird.

Eine weitere Ursache ist sicherlich auch in der Tatsache zu sehen, dass das von uns gewählte Gestationsalter als Einschlusskriterium für unsere Studienteilnehmer, dem Alter entspricht, in dem normalerweise ein Großteil der Zwillingspaare geboren werden.

Bei den in die Studie aufgenommen Patienten handelt es sich fast ausschließlich um Kinder von Eltern mit kaukasischer Abstammung aus Deutschland, Amerika, Russland, der Türkei, Tschechien und Holland.

Lediglich bei 2 Kindern war ein Elternteil asiatischer Herkunft.

Mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens wurden prospektiv die klinischen Daten der Frühgeborenen erhoben.

Jedem Teilnehmer wurde eine anonyme ID-Nummer zugewiesen, deren Bezug zu dem jeweiligen Patienten nur durch die Studienleitung zu erkennen war und die

schriftliche Einverständniserklärung der Eltern zur Teilnahme an der Studie wurde eingeholt.

Das Verfahren wurde vor Beginn der Untersuchungen durch die Ethikkommission des Saarlandes genehmigt.

4.2. Erfassung der klinischen Daten der Studienteilnehmer

4.2.1. Erfassung der klinischen Daten der Frühgeborenen

Die klinischen Daten der Kinder wurden nach deren Entlassung aus dem Kinderzimmer oder aus unserer Kinderklinik aus den Patientenakten entnommen und in einem standardisierten Datenbogen festgehalten.

Im ersten Abschnitt dieses Fragebogens wurden allgemeine Angaben wie Name, Vorname, Geburtsdatum, Geschlecht und Auftreten von Mehrlingsschwangerschaften notiert.

Der darauffolgende Abschnitt beschäftigt sich mit dem Schwangerschaftsverlauf und den Besonderheiten während der Schwangerschaft, sowie den perinatal wichtigen Daten wie z.B. dem Geburtsmodus, dem Gestationsalter, dem Geburtsgewicht, der Körperlänge, dem Kopfumfang, den APGAR-Werten nach 1,5 und 10 Minuten und dem Nabelschnur pH-Wert.

Im Anschluss daran folgen Angaben zu Auffälligkeiten oder Fehlbildungen, postnatalen Komplikationen, Notwendigkeit einer Beatmung oder CPAP-Therapie mit Beatmungs- bzw. CPAP-Therapiedauer, Bedarf an Sauerstoff mit Angabe des maximalen Bedarfes und der Bedarfsdauer sowie Notwendigkeit einer Surfactant-Gabe.

Weiterhin wurde auf das Auftreten eines Atemnotsyndroms (ANS) mit Angabe des Schweregrades, auf das Auftreten einer intraventriculären Hämorrhagie (IVH) und einer Frühgeborenenretinopathie jeweils mit Stadienangaben geachtet.

Der letzte Abschnitt des Patiententeils des Datenerhebungsbogens beschäftigt sich mit dem Vorliegen eines potentiellen infektiologischen Geschehens, mit einem besonderen Augenmerk auf einer fraglichen konnatalen Sepsis oder Pneumonie.

Hierzu wurden Laborwerte wie beispielsweise das maximale CRP, das maximale iT-Ratio, der Keimnachweis in einer Blutkultur aber auch falls vorhanden der Procalcitonin-Spiegel zu Rate gezogen.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Gabe von Antibiotika im Rahmen einer potentiellen Infektion erfolgt ist, und ob ein radiologischer Befund Hinweise auf eine vorliegende Pneumonie zeigte.

Zum Schluss wurden sämtliche weiteren Therapiemaßnahmen wie z.B. Medikamentengaben, Operationen, Phototherapie etc. aufgezählt und die Gesamtdauer des stationären Aufenthaltes, sowie, falls erfolgt, die Verweildauer auf der Kinderintensivstation angegeben.

4.2.2. Erfassung der laborchemischen Daten der Frühgeborenen

In dem darauf folgenden Abschnitt des Datenerhebungsbogens wurden Auszüge aus den Labordaten der Frühgeborenen festgehalten.

Beachtet wurden hierbei Hämoglobin- und Hämatokrit-Werte, sowie die Zahl der Leukozyten bei der ersten Blutentnahme nach der Geburt.

Weiterhin wurden die Werte für Retikulozyten, Normoblasten und der maximale Bilirubinwert während des stationären Aufenthaltes angegeben.

Ebenfalls in diesem Abschnitt wurden die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen auf die MTHFR-Polymorphismen C677T und A1298C, sowie die Ergebnisse der biochemischen Messungen der Homocystein- und Folsäurespiegel festgehalten.

4.2.3. Erfassung der Daten der Eltern

Der Großteil der klinisch wichtigen Daten der Eltern wurde im Rahmen eines Gesprächs von den Eltern erfragt und in dem Datenerhebungsbogen festgehalten.

Bei Unklarheiten, sowie zur Vervollständigung der Medikamentenanamnese der Mütter und zur Klärung eines potentiellen Vorliegens eines Amnioninfektionssyndroms, wurden die mütterlichen Patientenakten eingesehen.

4.2.3.1. Erfassung der mütterlichen Daten

Die Erhebung der mütterlichen Daten erfolgte in ähnlichem Aufbau wie zuvor schon die Erhebung der kindlichen Daten.

Zu Beginn wurden allgemeine Angaben wie Name, Vorname, Geburtsdatum, Ethnizität, Nationalität, Schulabschluss, Beruf und Körpergröße erfragt.

Darauf folgten Angaben zu Körpergewicht vor der Schwangerschaft und unmittelbar vor der Geburt, Anzahl der Schwangerschaften und evtl. vorhandene Aborte oder

Totgeburten, Geburtsmodus und Entstehung der Schwangerschaft: spontan, ICSI oder IVF.

Als nächstes wurde nach dem Auftreten eines vorzeitigen Blasensprunges und nach einer potentiell durchgeführten Lungenreifung gefragt.

Weiterhin wurden Angaben zum Rauchverhalten generell und während der Schwangerschaft, sowie über die Durchführung eines oralen Glucose-Toleranztestes mit Ergebnissen gemacht.

Die Mütter wurden außerdem nach dem Vorliegen einer Erkrankung im Allgemeinen und speziell nach dem Vorliegen eines Diabetes mellitus, einer arteriellen Hypertonie und einer Allergie, sowie eventuell erfolgten Therapien dieser Erkrankungen befragt. Zum Schluss wurde die Einnahme von Medikamenten während der Schwangerschaft mit einem besonderen Augenmerk auf der Einnahme von Folsäure vermerkt.

4.2.3.2. Erfassung der väterlichen Daten

Die Väter der Studienteilnehmer wurden in allgemeinen Teil ebenfalls zu Name, Vorname, Geburtsdatum, Ethnizität, Nationalität, Schulabschluss, Beruf, Größe und Körpergewicht befragt.

Des Weiteren wurden sie nach potentiell vorhandenen Erkrankungen befragt.

4.3. Labortechnische Geräte, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Kits und Verbrauchsmaterialien

4.3.1. Labortechnische Geräte

Geräteart	Gerätebezeichnung	Herstellerfirma
Kühlblock	Kühlblock	Eppendorf AG, 22339 Hamburg
Photometer	Bio-Photometer	Eppendorf AG, 22339 Hamburg
Pipetten	Reference autoclavable, Physio Care Concept: Probenvolumen: 0.5-10 µl 0,1-2.5 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Eppendorf AG, 22339 Hamburg
TaqMan	7500 Real Time PCR-System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermometer	Digitalthermometer GTH 1200	Greisinger Electronic GmbH, 93128 Regenstauf
Thermoblock	Ori-Block OB-3	Techne
Vortexer 1	VWR lab dancer S40 IP42	VWR, Batavia, IL 60510
Vortexer 2	Vibrofix VF1 Electronic	Janke&Kuntzel, IKA-Werk, Staufen
Zentrifuge	EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, 78532 Tuttligen
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf AG, 22339 Hamburg

Tabelle 2 : Labortechnische Geräte

4.3.2. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalie, Puffer oder Lösungen	Bezugsquelle
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ethanol absolut PA	Riedel-de Haen Laborchemikalien GmbH, Seelze
Puffer AE	QIAGEN GmbH, Hilden
Puffer AL	QIAGEN GmbH, Hilden
Puffer AW1	QIAGEN GmbH, Hilden
Puffer AW2	QIAGEN GmbH, Hilden
Proteinkinase K	QIAGEN GmbH, Hilden

Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen

4.3.4. Kits

Bezeichnung	Inhalt	Bezugsquelle
QIAamp ® DNA Mini Kit	QIAamp Spin Columns Collection tubes (2ml) Buffer AL Buffer ATL Buffer AW 1 Buffer AW 2 Buffer AE Proteinase K	QIAGEN GmbH, Hilden QIAGEN GmbH, Hilden

Tabelle 4: Kits

4.3.4. Master- und Assay-Mixe für die TaqMan-PCR

Bezeichnung	Inhalt	Bezugsquelle
TaqMan Universal PCR Mastermix (P/N 4304437)	AmpliTaq Gold DNAPolymerase Amp Erase UNG dNTPs with dUTP passive Reference Dye (ROX dye) optimized buffer components MgCl ₂	Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan® SNP Genotyping Assay für die Mutation C677T (P/N 4331183)	2 unlabelled PCR primers: forward and reverse 1 VIC® dye – MGB labeled probe detects the Allele 1 sequence 1 6FAM™ dye – MGB labeled probe detects the Allele 2 sequence	Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan® SNP Genotyping Assay für die Mutation A1298C (P/N 4331349)	2 unlabelled PCR primers: forward and reverse 1 VIC® dye – MGB labeled probe detects the Allele 1 sequence 1 6FAM™ dye – MGB labeled probe detects the Allele 2 sequence	Applied Biosystems, Weiterstadt

Tabelle 5: Master- und Assay-Mixe für die TaqMan-PCR

4.3.5. Einwegmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
EDTA-Blutröhrchen Einmal- Handschuhe, Reha-Soft, Powderfree Sterile Einmal-Kanülen: Sterican Einmal-Küvetten, UV-transparent, Lichtweghöhe 8.5 - 10mm Optical 96-Well reaction Plate Optical Adhesive Cover	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Paul Hartmann AG, Heidenheim B. Braun Melsungen AG, Melsungen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Applied Biosystems, Weiterstadt Applied Biosystems, Weiterstadt
Pipettenspitzen mit und ohne Filter: Biosphere max. Probenvolumen: 10 µl (farblos) 200 µl (gelb) 1000 µl (blau)	Plastibrand: Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Rühr-Spatel Reagiergefäße 0,5 und 1,5 ml aus PP (PCR-clean) und nicht-PCR-clean)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Tabelle 6: Einwegmaterialien

4.3.6. Primer und Sonden

4.3.6.1. Primerdesign:

Polymorphismus	Kennung	Primerart	Primersequenz
C677T	rs1801130	*	*
A1298C	rs1801131	forward primer reverse primer	5'-GGA GGA GCT GCT GAA GAT GTG-3' 5'-TGG TTC TCC CGA GAG GTA AAG A-3'

Tabelle 7: Primerdesign

* Die Sequenzen der Primer sind nur der Firma Applied Biosystems bekannt, die Primer sind enthalten in dem TaqMan® SNP Genotyping Assay für die Mutation C677T mit der Artikel-Nummer: 4331183

4.3.6.2. Sondendesign:

Die Sequenzen der Sonden sind ebenfalls nur der Firma Applied Biosystems bekannt und wurden von uns einsatzbereit direkt von Applied Biosystems bezogen.

4.4. Untersuchungsmethoden

4.4.1. Gewinnung des venösen Nabelschnurblutes

Bei allen Probanden wurde unmittelbar nach der Geburt mittel einer sterilen Einmalkanüle und Einwegspritze 1-2 ml EDTA-Blut aus der Nabelschnurvene entnommen.

Die Proben wurden innerhalb der ersten 2 Stunden nach Entnahme abzentrifugiert und Plasma und korpuskuläre Bestandteile von einander getrennt.

Die Proben wurden mit der jeweiligen ID-Nummer des Studienteilnehmers versehen und im Gefrierschrank bei -20°C bis zu ihrer Weiterverarbeitung aufbewahrt.

4.4.2. DNA-Extraktion und Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem QIAamp® DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen aus 200 µl Vollblut nach den Angaben des Herstellers.

Das Prinzip der DNA-Extraktion besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten:

Zuerst werden die Blutzellen im Lysinpuffer durch Zugabe einer Proteinkinase K aufgebrochen. Anschließend wird ein Puffermedium und Ethanol zugegeben und das Gemisch nach mehreren Inkubations- und Zentrifugationsschritten auf eine Spinsäule pipetiert.

Hierbei kommt es zu einer Adsorption der DNA durch die QIAamp-Membran der Spinsäule.

Die nun folgenden Schritte bestehen aus mehrfachen Zugaben verschiedener Pufferlösungen und zahlreichen Zentrifugationsgängen und dienen alle der Reinigung der DNA und der Entfernung von Nebenprodukten.

Zum Schluss kommt es, nach der Zugabe eines letzten Puffers, zur Eluierung der membrangebundenen DNA, die daraufhin im Filtrat gelöst vorliegt.

Im Anschluss verdünnten wir die erhaltene DNA im Verhältnis von 1:26 mit Aqua dest., bestimmten mit Hilfe eines Photometers die DNA-Konzentration in ng/µl Filtrat, sowie die Reinheit des Filtrates durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm.

Zur weiteren Bearbeitung wurden die Filtrate mit einer ID-Nummer versehen und ebenfalls bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Adsorption, welche dem Adsorptionsmaximum der DNA entspricht, ist der in der Probe enthaltenen DNA-Menge direkt proportional.

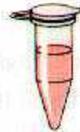
Durch die Adsorptionsmessung bei 280 nm, entsprechend dem Adsorptionsmaximum für Proteine, sowie der Berechnung des Quotienten der Adsorptionen A_{260}/A_{280} , konnte eine Aussage über eine eventuelle Verunreinigung des Filtrates mit Proteinen gemacht werden.

Reine DNA zeigt hierbei ein Adsorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 1,7-1,9.

Weiterhin wurde auch noch die Adsorption bei 230 nm und der Adsorptionsquotient A_{260}/A_{230} bestimmt, der ebenfalls eine Beurteilung des Reinheitsgehaltes erlaubt und möglichst gegen 0 tendieren sollte.

QIAamp spin column procedure

Sample



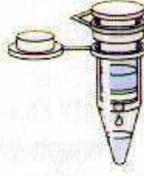
Lyse



Bind



Wash



Elute



**Pure genomic DNA
or
viral DNA**

Abbildung 7: Protokoll der Spin-Variante des QIAamp DNA Blood Mini Verfahrens
Quelle: Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits 10/2002

4.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.4.3.1 .Grundlagen der konventionellen PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist in eine in-vitro Methode zur Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Ziel-Sequenz und wurde Mitte der achtziger Jahre von Kary B Mullis entwickelt. (127)

Mit dieser Technik ist es möglich bestimmte Expressionmuster von Genen zu charakterisieren, sowie bestimmte DNA-Strukturen nachzuweisen und zu analysieren.

Der Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion entspricht der DNA-Replikation in vivo, bei der ein Enzym, die sog. DNA-Polymerase, entlang einer Nukleinsäurenmatrix, der Template-DNA, den dazu komplementären Strang synthetisiert.

Für die PCR wird eine Taq-Polymerase verwendet, die sehr hitzeresistent ist und entweder aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus* gewonnen oder gentechnisch hergestellt wird. (183, 19)

Neben Polymerase und Nukleotiden werden für die Durchführung einer PCR Primer als Startermoleküle/Ansatzpunkte für die DNA-Polymerase benötigt.

Primer sind einzelsträngige synthetisch hergestellte Oligonukleotide.

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion wird der Bereich, der vervielfältigt werden soll, das Amplikon, durch ein gegenläufig orientiertes Primerpaar, bestehend aus einem Forward- (Sense-) und einem Reverse-(Antisense-)Primer, eingerahmt.

Die Sequenz zwischen den Primern wird durch die DNA-Polymerase vervielfältigt.

Die entsprechenden Primer werden hierfür mit einem Primer-Design-Programm erstellt und müssen für ein optimales PCR-Ergebnis bestimmte Kriterien erfüllen.

So sollten sie aus mindestens 18 und höchstens aus 30 Nukleotiden bestehen und der Guanosin (G) und Cytosin (C)- Gehalt sollte bei 40-60% liegen. Wiederholungen von drei oder mehr G oder C, bzw. das Vorliegen eines T am 3'-Ende sollten vermieden werden.

Weiterhin sollte das eingeschlossene Amplikon zwischen 100 und 150 Nukleotiden groß sein und beide Primer die gleiche Schmelztemperatur von ca. 60 °C aufweisen. Außerdem sollten die Primer weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können, weshalb Komplementaritäten zwischen den Primern und innerhalb der Primer vermieden werden sollten.

Falls möglich, sollten die Primer weiterhin eine Exon-Exon-Schnittstelle überspannen. (148, 158, 5)

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der wiederholten Abfolge verschiedener Temperaturzyklen, in denen jeweils nacheinander die drei Schritte Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Extension) ablaufen. Die genannten Schritte werden in sog. Thermocyclern durchgeführt.

Zuerst wird die zu amplifizierende DNA-Matrize durch eine Temperaturerhöhung denaturiert. Der DNA-Doppel-Strang löst sich auf und es entstehen zwei einzelsträngige Template-DNA-Stränge.

Somit wird die Anlagerung/Hybridisierung der Primer im nächsten Schritt an die komplementären Sequenzen des DNA-Einzelstranges ermöglicht.

Nach Bindung an die komplementäre Basensequenz des Amplikons legt der Primer den Startpunkt am 5'-Ende des neu zu synthetisierenden DNA-Stranges fest.

Als nächstes katalysiert die DNA-Polymerase, ausgehend vom 5'-Ende, eine Amplifikation in Richtung des 3'-Endes und es kommt zur Anlagerung einzelner komplementärer Nukleotide bis zum Ende der Sequenz.

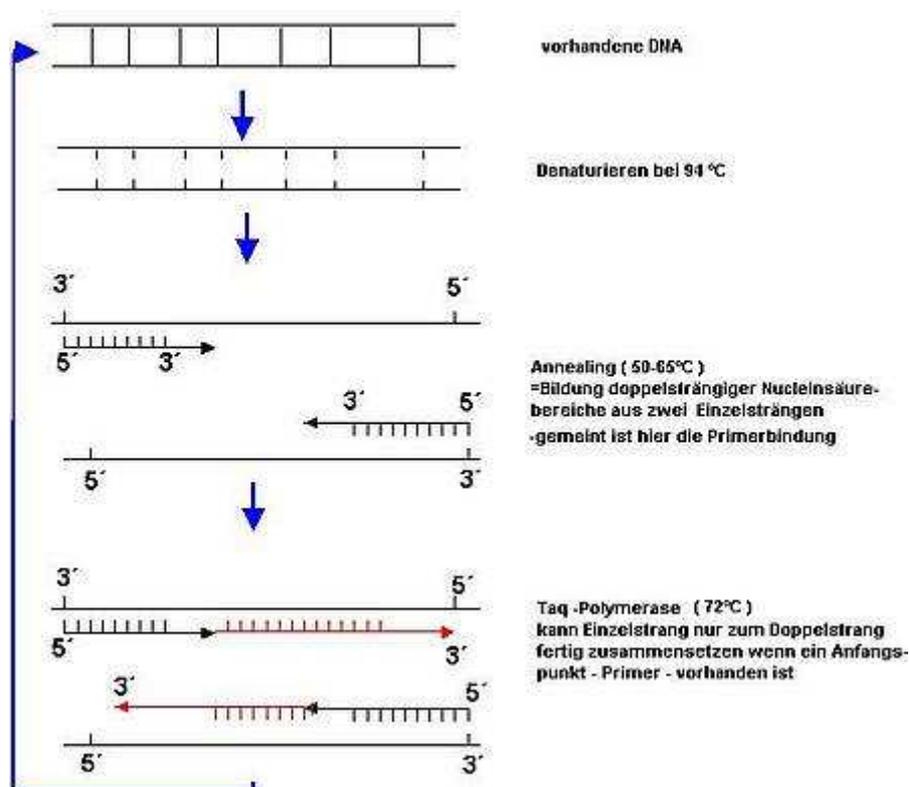


Abbildung 8: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Quelle: www.bioron.net

Pro Zyklus kommt es auf diese Weise zu einer Verdoppelung der ursprünglich vorhandenen Menge an Ziel-DNA.

Gegen Ende des PCR-Laufes geht die DNA-Vermehrung von ihrer exponentiellen Phase allmählich in eine Plateau-Phase über.

Ursachen hierfür sind einerseits abnehmende Mengen an benötigten Substraten, wie z.B. Nukleotiden oder Primern, und andererseits zahlreiche weitere Faktoren, wie beispielsweise Enzymdenaturierungen oder die sog. Endproduktinhibition, bei der es zu einer Hemmung der Polymerase durch entstehende Pyrophosphate und doppelsträngige DNA kommt. (75, 83)

Zusammenfassend werden für die Durchführung einer PCR folgende Komponenten benötigt:

- zu kopierende DNA-Matrize/Template-DNA
- DNA-Polymerase
- 2 verschiedene Primer
- Desoxynukleotide: Gemisch aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs = dATP, dTTP, dCTP, und dGTP)
- geeignetes Puffermedium

Normalerweise stehen die dNTPs, der Puffer und die Polymerase als fertige Lösung in Form eines Mastermixes zur Verfügung. (5)

4.4.3.2. Grundlagen der Real-time PCR mittels TaqMan-Technologie

Bei der Real-time PCR mittels TaqMan-Technologie handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR, die einige Vorteile, sowie eine enorme Zeitersparnis und Arbeitserleichterung mit sich gebracht hat.

Die Real-time PCR bietet im Gegensatz zur konventionellen PCR die Möglichkeit, sowohl einen qualitativen, als auch einen quantitativen Nachweis des PCR-Produktes zu erreichen.

Ein weiterer entscheidender Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass hierbei die Messung der PCR-Produkte bereits während der Amplifikation mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden erfolgen kann und nicht erst nach Abschluss der PCR.

Des Weiteren ist bei diesen Verfahren das Kontaminationsrisiko deutlich geringer, da Amplifikation und Detektion in einem geschlossenen System ablaufen.

Außerdem muss keine Nachbearbeitung der PCR-Produkte zur Detektion erfolgen, woraus eine erheblichen Zeitersparnis, sowie ebenfalls eine Verringerung des Kontaminationsrisikos resultieren. (44, 97)

Für die Durchführung einer Real-Time-PCR wird zusätzlich zu den Komponenten einer konventionellen PCR eine weitere Oligonukleotid-Sequenz, die sogenannte Sonde oder TaqProbe, benötigt.

Bei dieser Sequenz handelt es sich um fluorophormarkierte Oligonukleotide, die komplementär zu einer bestimmten Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes sind.

Aufgrund der Tatsache, dass diese Sonden nur an bestimmte Sequenzen binden, sind sie hochspezifisch und sehr sensitiv.

Die Sonde wird so gewählt, dass sie zwischen den beiden Primern hybridisiert und an ihrem 3'-Ende mit einer Phosphat-Gruppe blockiert ist. Hierdurch wird verhindert, dass die Sonde selbst durch die Polymerase verlängert wird.

Die Sonde ist außerdem an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter; engl. To report: berichten) und an ihrem 3'-Ende mit einer fluoreszenzauslöschenden Verbindung (Quencher; engl. To quench: löschen) markiert.

In unseren Experimenten wurde das Fluoreszin Derivat FAM am 5'-Ende als Reporter und das Rhodamin-Derivat VIC am 3'-Ende als Quencher eingesetzt. Der Quencher am 3'-Ende unterdrückt hierbei, bei bestehender räumlicher Nähe zwischen Quencher und Reporter, die Fluoreszenz des durch Licht angeregten Reporters am 5'-Ende der Sonde.

Im Falle des Vorhandenseins der Zielsequenz im PCR-Ansatz binden sowohl die Primer, als auch die Sonde komplementär an diese Sequenz.

Im nächsten Schritt verlängert die DNA-Polymerase die spezifisch gebundenen Primer und stößt dabei nach einer gewissen Zeit auf die zwischen den beiden Primern spezifisch gebundene Sonde.

Der Aufbau der Sonden basiert auf dem Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (fluorescent resonance energy transfer, FRET).

Hierbei handelt es sich um ein physikalisches Phänomen zwischen zwei fluorogenen Molekülen, die sich in einem bestimmten Abstand zu einander befinden und überlappende Emissions- und Absorptionsspektren besitzen.

Ein Donor-Fluorochrom (Reporter) gibt hierbei bei Anregung durch eine Lichtquelle einen Teil seiner Energie an ein sich in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Molekül (Quencher) weiter.

Das Reporter-Signal wird gequencht, d.h. gelöscht.

Das Akzeptormolekül reagiert darauf mit der Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge.

Das Fluoreszenzsignal des Quenchers ist also deutlich sichtbar, während das Signal des Reporters stark erniedrigt ist, solange Reporter und Quencher sich in räumlicher Nähe zueinander befinden.

Aufgrund der Tatsache, dass die DNA-Polymerase neben ihrer 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch noch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wird die Sonde ebenfalls schrittweise abgebaut.

Die Exonuklease-Aktivität ist doppelstrangspezifisch, so dass nur gebundene Sonden abgebaut werden.

Durch das Zerschneiden der Sonde kommt es zu einer räumlichen Trennung zwischen Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und Quencher und der FRET kann nicht mehr stattfinden.

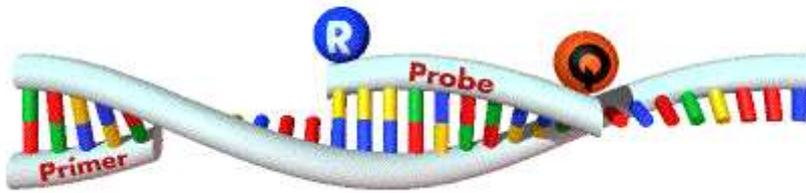
In der Folge können neben den Quencher-Signalen nun auch die von dem Reporter-Molekül nach Anregung durch Licht ausgesandten Fluoreszenz-Signale detektiert werden.

Das Reporter-Signal wird folglich stärker sichtbar und das Quencher-Signal schwächer.

Ursache hierfür ist die Tatsache, dass im Laufe der PCR-Reaktion das Reporter-Signal entsprechend der Amplifikation des PCR-Produktes immer weiter ansteigt, da immer neue Reporter-Moleküle freigesetzt werden.

Der Anstieg des Fluoreszenzsignales ist dem Zuwachs des PCR-Amplifikates dabei direkt proportional. (117)

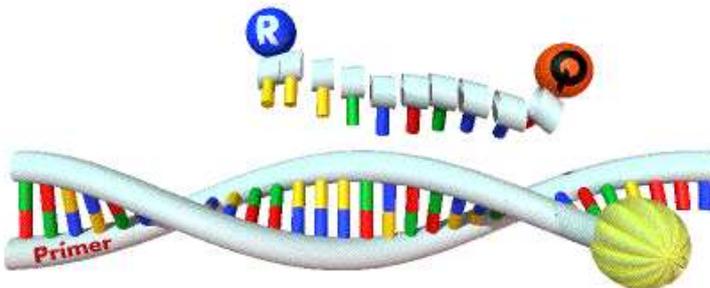
Es stellt somit ein Maß für den Fortschritt der PCR-Reaktion dar und kann im Reaktionsverlauf kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet werden. (49, 69, 73, 179, 197)



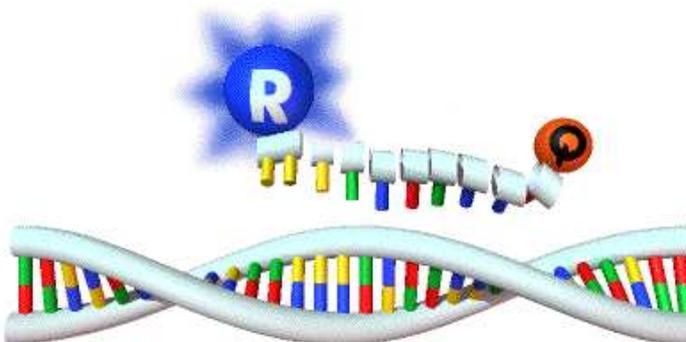
1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer (Abbildung zeigt die Anlagerung des Forward Primers)



2. Primer-Extension und Sondenhydrolyse



3. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt



4. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal

Abbildung 9: Einfluß der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan PCR

Quelle: 7700 SDS Workshop Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie Vers. 2.1
Dr. Thomas A. Schild Applied Biosystems GmbH Weiterstadt

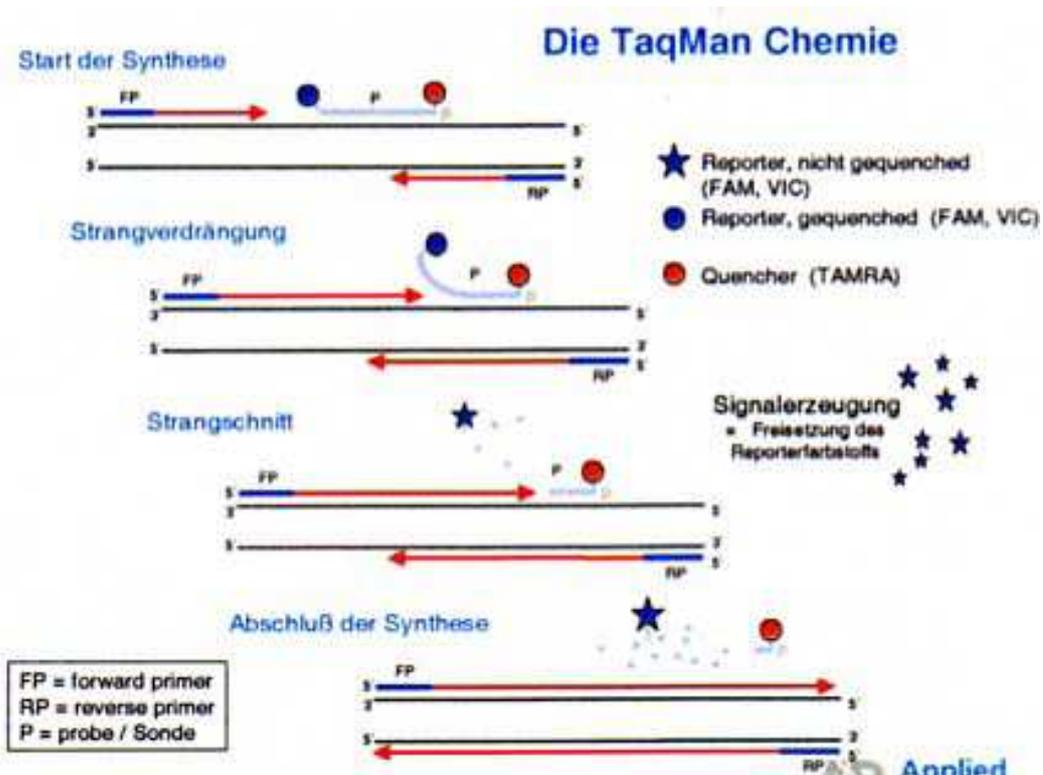


Abbildung 10: Prinzip der TaqMan-PCR

Quelle: www.appliedbiosystems.com

Ähnlich dem Primerdesign muss auch eine TaqMan-Sonde bestimmte Voraussetzungen erfüllen und wird ebenfalls computergestützt ermittelt.

Wichtig für das Sondendesign ist, dass die Schmelztemperatur der Sonde um ca. 10 °C höher als die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer liegt, sowie der GC-Gehalt der Sonde zwischen 20 und 80 % liegt.

Weiterhin sollte ihre Gesamtlänge idealerweise zwischen 20 und 40 Basenpaaren liegen und an ihrem 5'-Ende sollte sich kein Guanin (G) befinden, da Guanin einen Quenching-Effekt aufweisen kann.

Abgesehen davon dürfen nicht mehr als 3 gleiche Nukleotide in Folge in der Sondensequenz auftreten und eine Komplementarität des Sonden-Designs zu den PCR-Primern sollte vermieden werden.

Das 3'-Ende ist wie bei den Primern durch eine Phosphatgruppe blockiert. (39, 164)

4.4.3.3. Durchführung der TaqMan-PCR

Vor der Durchführung der TaqMan-PCR wurden die DNA-Filtrate mit aqua dest. soweit verdünnt, dass in jeder der zu untersuchenden Proben die gleiche DNA-Konzentration von 5 ng/µl Probenvolumen vorlag.

Anschließend wurde für jede Probe ein PCR-Ansatz erstellt.

Dieser bestand jeweils aus:

- 10 µl TaqMan Universal Master Mix
- 0,5 µl Assay Mix für die jeweils zu untersuchende Mutation
- 5,5, µl DNA freies aqua dest.

entsprechend einem Gesamtvolumen von 16 µl.

Im nächsten Schritt wurde die PCR-Ansätze jeweils in doppelter Ausführung in die zugeordneten Wells der TaqMan-96-Well-Platte pipettiert, die sich zu diesem Zeitpunkt auf einem Kühlblock befand, um einen vorzeitigen Reaktionsbeginn zu verhindern.

Anschließend wurde zu 47 der Ansätze pro Well je 4 µl der entsprechenden DNA-Probe hinzu gegeben.

Zwei PCR-Ansätze dienten als Nullwerte bzw. Kontrollen der Messergebnisse und wurden mit NTC (non template controls) bezeichnet.

In diesen Fällen wurde in die Wells anstelle von DNA, DNA freies aqua dest. pipettiert.

Nach Abschluss aller Pipettierschritte wurde die Opticell-Well-Platte mit einer Schutzfolie überzogen und zur Durchmischung der einzelnen Komponenten sowie zum Absinken der Substanzen auf den Boden der Wells zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Platte in das TaqMan-Gerät gestellt und mithilfe des 7500 Real Time PCR-Systems der Firma Applied Biosystems nach folgendem Schema analysiert:

Reaktionsschritte	Reaktions-temperatur	Reaktions-dauer	Anzahl der Wiederholungen /Zyklen
Initiierung	50°C	2 min	1x
Aktivierung der TaqPolymerase und initiale Denaturation	95°C	10 min	1x
Denaturierung	92°C	15 sec	40x
Annealing und Extension	60°C	1 min	40x
abschließenden Extension	60°C	wenige sec	1x

Tabelle 8: Reaktionsablauf der TaqMan-PCR

Nach Abschluss der einzelnen Messschritte konnte anhand der gemessenen Ergebnisse eine Aussage über den Mutationsstatus der einzelnen Probanden gemacht werden.

4.4.4. Bestimmung der Homocysteinkonzentration mittels Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA)

Die Bestimmung der Homocysteinkonzentrationen aus den Plasmaproben erfolgte im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin-Zentrallabor der Universität des Saarlandes mit Hilfe eines Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays (FPIA).

Bei dieser Methode handelt es sich um ein indirektes, homogenes Immunoassay, bei dem die zu untersuchende Probe mit einem Tracer kompetitiv um die Bindung an einen gelösten freien Antikörper konkurriert.

Der Tracer ist hierbei mit einem Fluorophor markiert und wird mit polarisiertem Licht angeregt.

Je nach der Menge an Tracern, die an den Antikörper gebunden sind, hat das polarisierte Licht entweder einen hohen, oder einen niedrigen Polarisationsgrad.

Enthält die zu untersuchende Probe eine hohe Konzentration des zu bestimmenden Analyten, so kann weniger Tracer an den Antikörper gebunden werden.

Je höher die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes ist, desto weniger Tracer bindet an den Antikörper, und desto niedriger ist demzufolge der Polarisationsgrad des emittierten Lichtes.

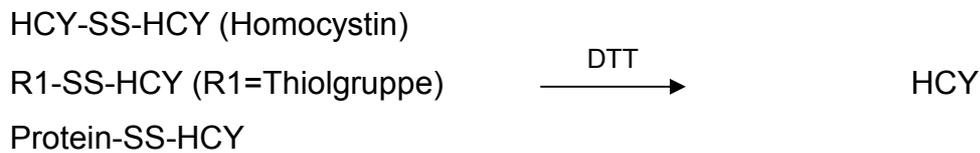
Aus dem Polarisationsgrad des emittierten Lichtes / der Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes, kann die Probenkonzentration berechnet werden.

In unserem Falle wurde mittels des AxSYM System der Firma Abbott die Gesamt-Homocystein-Konzentration in den Plasma-Proben der Frühgeborenen quantitativ bestimmt.

Hierbei handelt es sich um eine vollautomatisierte Methode, die im Wesentlichen in drei Schritten erfolgt.

Zuerst müssen die über Disulfidbrücken gebundenen Homocystein-Formen (Homocystin, gemischte Disulfide und proteingebundene Homocystein-Formen) zu freiem Homocystein reduziert werden.

Zu diesem Zweck wird der Probe Dithiothreitol (DTT) zugesetzt, das die Reduktion zu freiem Homocystein katalysiert.



Das freie Homocystein wird anschließend durch die SAH-Hydrolase enzymatisch unter Zugabe von Adenosin im Überschuss zu S-Adenosylhomocystein und Wasser umgewandelt.



Im anschließenden Immunoassay konkurriert SAH mit einem Tracer-Molekül (Fluorescein markiertes S-Adenosyl-Cystein) um die Bindungsstellen an einem monoklonalen anti-SAH-Antikörper.

Der Antikörper erkennt spezifisch Homocystein.

Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes wird von dem Gerät gemessen.

Das Messsignal ist hierbei umgekehrt proportional zur Analytkonzentration.

Aus diesem Verhältnis kann das Gerät die gesuchten Homocystein-Konzentrationen berechnen.

4.4.5. Bestimmung der Folsäure-Konzentration mittels kompetitivem Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA)

Die Bestimmung der Folsäure-Konzentrationen aus den Plasmaproben erfolgte im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin-Zentrallabor der Universität des Saarlandes mit Hilfe eines kompetitiven Chemilumineszenz-Immunoassays.

Hierbei handelt es sich um ein vollautomatisiertes, kompetitives

Zwei-Schritt-Sandwich Immunoassay mit direkter Chemilumineszenz-Messung.

In unserem Fall wurden die Messungen mit Hilfe des ADVIA Centaur Folsäure-Testes der Firma Bayer HealthCare LLC durchgeführt.

Bei diesem Verfahren konkurriert die Folsäure in der Patientenprobe mit Acridiumester-markierter Folsäure (Tracer) im Lite-Reagenz des Testes um eine begrenzte Menge an folsäurebindendem Protein.

Für die Durchführung des Testes werden 150 µl Patientenserum benötigt.

Die nachfolgenden Schritte werden alle vollautomatisch von dem ADVIA Centaur Gerät durchgeführt.

Um die im Plasma enthaltene Folsäure von ihren Bindungsproteinen zu trennen, erfolgte zunächst eine Zugabe von 50 µl DTT (Dithiothreitol) und 50 µl Realising Reagenz (Natriumhydroxid) zu der Probe, sowie eine Inkubationsdauer dieser Substanzen von 2,5 min bei 37 °C.

Im folgenden Schritt wird dem Gemisch 200 µl Solid Phase Reagenz (gereinigtes Folsäure-bindendes Protein (Rind), das kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist) und 100 µl Folsäure-Bindeprotein zugegeben und das Ganze erneut für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Hierbei bindet die freigesetzte Folsäure der Probe kovalent an das an paramagnetische Partikel gebundene folsäurebindende Protein aus dem zugesetzten Reagenz.

Als nächstes wird zu der Probe 100 µl Lite Reagenz hinzugefügt, das mit Acridiumestern-markierte Folsäure enthält, und erneut eine Inkubationsdauer von 2,5 min bei 37 °C eingehalten.

Während dieser Zeit bindet nun die zugesetzte markierte Folsäure an die in begrenzter Menge vorliegenden, freigebliebenen folsäurebindenden Proteine der Solid-Phase.

Nach einigen Trennungs- und Waschschritten folgt die Auslösung der Chemilumineszenz-Reaktion durch die an den Komplexen gebundenen Tracer-Moleküle und die Zugabe von je 300 µl Reagenz A (Säure/ BSA Puffer mit Natriumacid) und Reagenz B (Base/Natriumhydroxid).

Die Menge der dabei ausgestrahlten relativen Lichteinheiten (RLUs) wird von dem Gerät gemessen, und mit Hilfe von sog. Kalibratorkurven können die Folsäure-Konzentrationen der jeweiligen Proben berechnet werden.

Zwischen den von dem System gemessenen RLU-Werten und der Folsäure-Konzentration in der Probe besteht eine umgekehrt-proportionale Beziehung.

4.5. Statistische Auswertung

Die Daten der Frühgeborenen und der Eltern wurden sowohl elektronisch in einer Datenbank als auch in Papierform erfasst.

Nach Komplettierung des Datensatzes erfolgte die Umwandlung der Daten in eine Excel-Tabelle und ein Import der Daten in das Programm SPSS für Windows zur Durchführung der statistischen Berechnungen.

Alle statistischen Analysen erfolgten mit SPSS für Windows (Version 15.0).

Nach Abschluss der Berechnungen erfolgte freundlicherweise eine Kontrolle der Auswahl der einzelnen Analyseverfahren sowie der Ergebnisse durch Herrn PD Dr. Gräber, den Leiter des Institutes für Biometrie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Herrn Gräber gilt an dieser Stelle daher mein ganz besonderer Dank.

5. Ergebnisse

5.1. Deskriptive und klinische Daten der Studienteilnehmer:

5.1.1. Deskriptive Beschreibung des Studienkollektivs

	Häufigkeit [n]	Prozent [%]
IUGR	33	22,1
NON-IUGR	116	77,9
Gesamt	149	100

Das Studienkollektiv setzt sich aus insgesamt 149 Teilnehmern zusammen. Hierbei zeigt sich, dass unter den Gesamtteilnehmern bei 33 der Frühgeborenen (22,1%) eine IUGR vorliegt, im Vergleich zu 116 Frühgeborenen (77,9%), die von einer IUGR nicht betroffen sind.

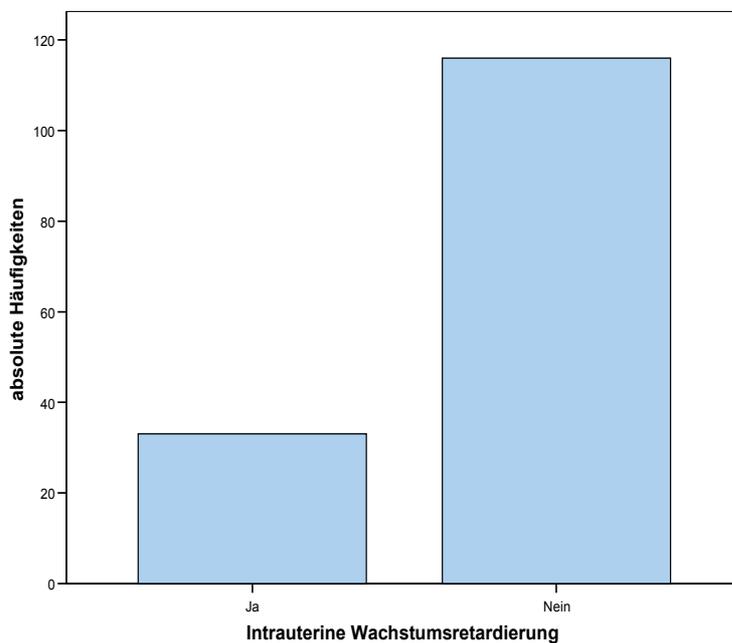


Abbildung 11 : Häufigkeit des Auftretens einer intrauterinen Wachstumsretardierung

5.1.2. Verteilung der untersuchten Merkmale innerhalb des Studienkollektivs

Tabelle 9 zeigt die Geschlechtsverteilung der Studienteilnehmer, sowie den Geburtsmodus und die Anzahl an Mehrlingsgeburten, jeweils für Kinder mit und solche ohne eine IUGR.

	IUGR (n)	Non-IUGR (n)	Gesamtkollektiv (n)
Anzahl (n)	33	116	149
Geschlechtsverteilung: männlich	15	63	78
weiblich	18	53	71
Mehrlinge	20	48	68
Geburtsmodus: spontan	5	25	30
Sectio	28	91	119

Tabelle 9: Absolute Häufigkeiten in Bezug auf das Geschlecht, das Vorliegen von Mehrlingen und den Geburtsmodus

Für die Geschlechtsverteilung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung des Merkmals Mehrlinge und Signifikanzanalysen bezüglich der beiden Untergruppen ergibt sich ein p-Wert von 0,05, so dass von einem signifikant unterschiedlichen Vorkommen einer IUGR zwischen Mehrlingen und Einlingen auszugehen ist.

Die nachfolgende Tabelle zeigt den Median, sowie den Range für das Gestationsalter, das Geburtsgewicht, die Geburtslänge, sowie den Kopfumfang jeweils für die beiden Studienpopulationen und für das Gesamtkollektiv.

	IUGR	NON-IUGR	Gesamtkollektiv
Gestationsalter [SSW]	35,7 [33,4-36,9]	34,9 [32,0-36,9]	35,00 [32,0-36,9]
Geburtsgewicht [g]	1890 [1240-2450]	2410 [1450-3900]	2300 [1240-3900]
Geburtslänge [cm]	43,0 [38,0-50,0]	47,0 [41,0-53,0]	46,0 [38,0-53,0]
Kopfumfang [cm]	30,0 [26,0-34,0]	32,0 [28,0-26,0]	32,0 [26,0-36,0]

Tabelle 10: Darstellung von Median und Range für das Gestationsalter, das Geburtsgewicht, die Geburtslänge und den Kopfumfang der Frühgeborenen

Mittels statistischer Berechnung mit dem Kruskal-Wallis-Test und Signifikanzanalyse mit dem Chi-Quadrat-Test konnten signifikante Unterschiede sowohl im Gestationsalter (p-Wert 0,01), als auch im Geburtsgewicht (0,00) zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und normalgewichtigen Frühgeborenen nachgewiesen werden.

5.1.3. Verteilung der Mutationen innerhalb der Studienpopulation

5.1.3.1. MTHFR-Polymorphismus C677T

Intrauterine Wachstumsretardierung	MTHFR-Polymorphismus C677T	Häufigkeit [n]	Prozent [%]
IUGR	Wildtyp	19	57,6
	heterozygot	12	36,3
	homozygot	2	6,1
Non-IUGR	Wildtyp	49	42,2
	heterozygot	49	42,2
	homozygot	18	15,6
Geamtkollektiv	Wildtyp	68	45,6
	heterozygot	61	40,9
	homozygot	20	13,5

Tabelle 11: Verteilung des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

Tabelle 11 stellt die Verteilung des MTHFR-Polymorphismus C677T innerhalb der einzelnen Studienpopulationen dar. Die Verteilung ist in der Abbildung 8 nochmals graphisch dargestellt.

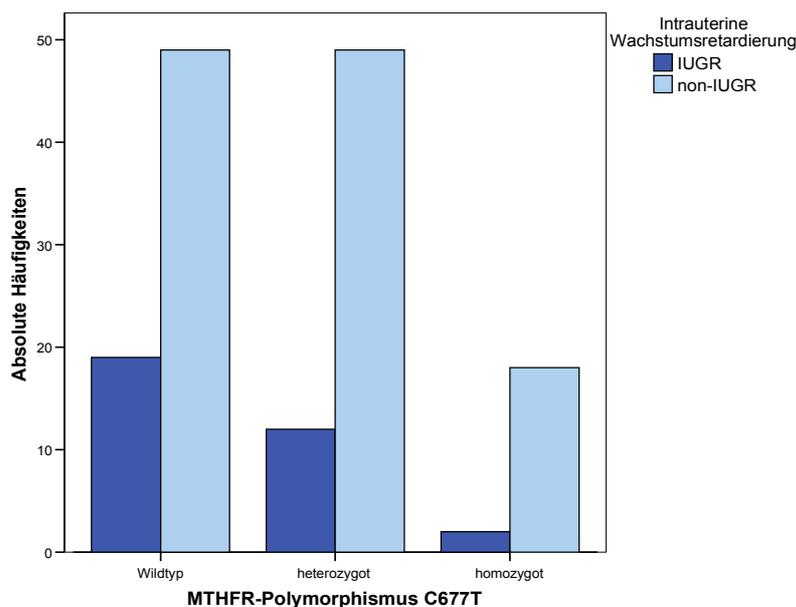


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Verteilung des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

5.1.3.2. MTHFR-Polymorphismus A1298C

Intrauterine Wachstumsretardierung	MTHFR-Polymorphismus A1298C	Häufigkeit [n]	Prozent [%]
IUGR	Wildtyp	8	24,2
	heterozygot	23	69,7
	homozygot	2	6,1
Non-IUGR	Wildtyp	46	39,7
	heterozygot	55	47,4
	homozygot	15	12,9
Geamtkollektiv	Wildtyp	54	36,2
	heterozygot	78	52,4
	homozygot	17	11,4

Tabelle 12: Verteilung des A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

Die Tabelle 12 zeigt die Verteilung des MTHFR-Polymorphismus A1298C innerhalb der einzelnen Studienpopulationen. Die Verteilung ist in der Abbildung 9 nochmals graphisch dargestellt.

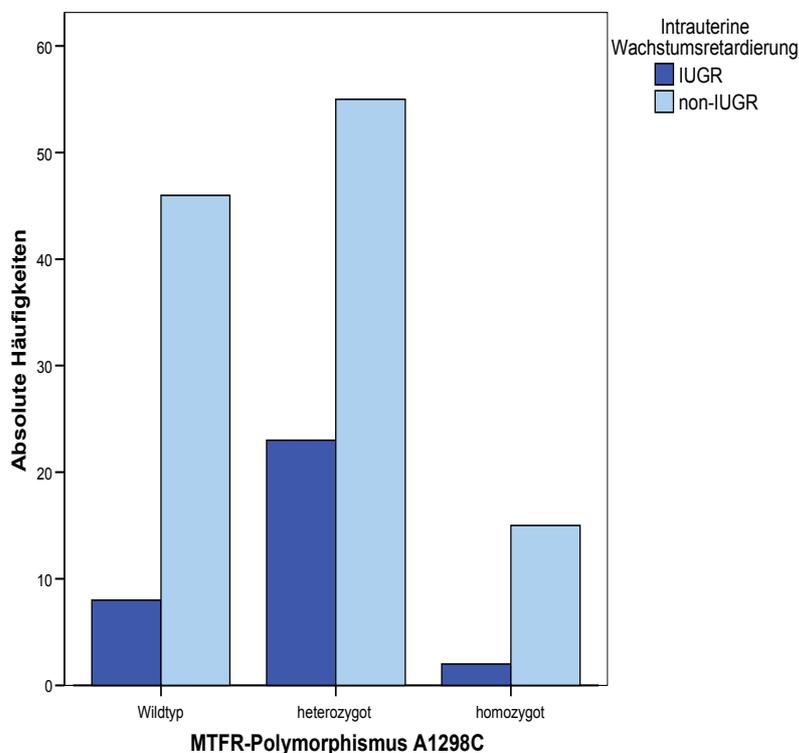


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung des A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

5.1.4. Verteilung der gemessenen Homocystein- und Folsäurekonzentrationen

5.1.4.1. Homocysteinkonzentrationen

Intrauterine Wachstumsretardierung	Homocysteinspiegel [µmol/l]		
	Median	Minimum	Maximum
IUGR	5,06	3,11	10,70
Non-IUGR	5,93	1,92	15,27
Gesamtkollektiv	5,75	1,92	15,27

Tabelle 13: Median und Range der Homocysteinkonzentrationen in den beiden Subgruppen

Tabelle 13 zeigt die Höhe der Homocysteinspiegel mit Median und Range jeweils für die einzelnen Gruppen.

5.1.4.2. Folsäurekonzentrationen

Intrauterine Wachstumsretardierung	Folsäurespiegel [ng/ml]		
	Median	Minimum	Maximum
IUGR	13,40	4,74	31,45
Non-IUGR	13,08	5,64	39,65
Gesamtkollektiv	13,08	4,74	39,65

Tabelle 14: Median und Range der Folsäurekonzentrationen in den beiden Subgruppen

Die Tabelle 14 zeigt die Höhe der Folsäurespiegel mit Median und Range jeweils für die einzelnen Gruppen

5.1.5. Verteilung potentieller mütterlicher Einflussfaktoren innerhalb der beiden Gruppen

5.1.5.1. Nikotinkonsum der Mutter

Intrauterine Wachstumsretardierung	Nikotinkonsum während der Schwangerschaft			
	ja		nein	
	Häufigkeit [n]	Prozent [n]	Häufigkeit [n]	Prozent [n]
IUGR	14	42,4	19	57,6
Non-IUGR	14	12,1	102	87,9
Gesamtkollektiv	28	18,8	121	81,2

Tabelle 15: Häufigkeit des mütterlichen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft in den beiden Subgruppen

Tabelle 15 zeigt die Häufigkeit des mütterlichen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft für die untersuchten Gruppen.

Statistische Analysen mittels einer Kreuztabelle und Signifikanzberechnungen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes ergeben einen p-Wert von 0,000, so dass von einem signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der Entstehung einer IUGR in Abhängigkeit vom mütterlichen Nikotinabusus auszugehen ist.

5.1.5.2. Arterielle Hypertonie der Mutter

Intrauterine Wachstums- retardierung	Arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft			
	ja		nein	
	Häufigkeit [n]	Prozent [n]	Häufigkeit [n]	Prozent [n]
IUGR	12	36,4	21	63,6
Non-IUGR	22	19,0	94	81,0
Gesamtkollektiv	34	22,8	115	77,2

Tabelle 16: Häufigkeit des Vorliegens einer arteriellen Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft bezogen auf die beiden Subgruppen

Tabelle 16 zeigt die Häufigkeit des Vorliegens einer arteriellen Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft für die untersuchten Gruppen.

Statistische Berechnungen einer signifikanten Einflussnahme einer mütterlichen arteriellen Hypertonie auf die Entstehung einer IUGR bei den Frühgeborenen ergibt im Chi-Quadrat-Test einen p-Wert von 0,036, der einen signifikanten Einfluss beweist.

Hiermit zeigt sich eindeutig ein signifikant höherer Anteil an Kindern mit einer IUGR unter Müttern mit einer bekannten arteriellen Hypertonie.

5.1.5.3. Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft

Intrauterine Wachstumsretardierung	Folsäureeinnahme der Mutter während der Schwangerschaft				Keine Angaben	
	ja		nein			
	Häufigkeit [n]	Prozent [%]	Häufigkeit [n]	Prozent [%]	Häufigkeit [n]	Prozent [%]
IUGR	22	66,7	11	33,3	-	-
Non-IUGR	86	74,1	29	25,0	1	0,9
Gesamtkollektiv	108	72,5	40	26,8	1	0,7

Tabelle 17: Häufigkeit der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft in den beiden Subgruppen

Tabelle 17 zeigt die Häufigkeit der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft für die untersuchten Gruppen.

Statistische Berechnungen bezüglich der mütterlichen Folsäureeinnahme ergaben keine signifikanten Unterschiede in den beiden Untergruppen (p-Wert 0,564), so dass die Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft in unserem Kollektiv keinen Einfluss auf die Entstehung einer IUGR hat.

5.2. Komplexe Ergebnisse gemäß der Fragestellung:

5.2.1. Verteilung der Polymorphismen im MTHFR-Gen und deren Einfluss

5.2.1.1. Fragestellung :

- 1) *Wie ist die Verteilung des C677T- und des A1298C-Polymorphismus im Studienkollektiv?*
- 2) *Existieren Unterschiede in dem Auftreten der einzelnen Genotypen zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen?*

5.2.1.1.1. C677T- Polymorphismus:

			Intrauterine Wachstumsretardierung		Gesamt
			IUGR	non-IUGR	
MTHFR-Polymorphismus C677T	Wildtyp	Anzahl	19	49	68
		% von MTHFR-Polymorphismus C677T	27,9%	72,1%	100,0%
		% von Intrauterine Wachstumsretardierung	57,6%	42,2%	45,6%
	heterozygot	Anzahl	12	49	61
		% von MTHFR-Polymorphismus C677T	19,7%	80,3%	100,0%
		% von Intrauterine Wachstumsretardierung	36,3%	42,2%	40,9%
homozygot	Anzahl	2	18	20	
	% von MTHFR-Polymorphismus C677T	10,0%	90,0%	100,0%	
	% von Intrauterine Wachstumsretardierung	6,1%	15,6%	13,5%	
Gesamt	Anzahl	33	116	149	
	% von MTHFR-Polymorphismus C677T	22,1%	77,9%	100,0%	
	% von Intrauterine Wachstumsretardierung	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabelle 18: Verteilung des C677T-Polymorphismus im Studienkollektiv

Es existiert kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,97) in der Verteilung der einzelnen Genotypen zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen.

5.2.1.1.2. A1298C-Polymorphismus:

			Intrauterine Wachstumsretardierung		Gesamt
			IUGR	non-IUGR	
MTFR-Polymorphismus A1298C	Wildtyp	Anzahl	8	46	54
		% von MTFR-Polymorphismus A1298C	14,8%	85,2%	100,0%
		% von Intrauterine Wachstumsretardierung	24,2%	39,7%	36,2%
	heterozygot	Anzahl	23	55	78
		% von MTFR-Polymorphismus A1298C	29,5%	70,5%	100,0%
		% von Intrauterine Wachstumsretardierung	69,7%	47,4%	52,3%
	homozygot	Anzahl	2	15	17
		% von MTFR-Polymorphismus A1298C	11,8%	88,2%	100,0%
		% von Intrauterine Wachstumsretardierung	6,1%	12,9%	11,4%
Gesamt	Anzahl	33	116	149	
	% von MTFR-Polymorphismus A1298C	22,1%	77,9%	100,0%	
	% von Intrauterine Wachstumsretardierung	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabelle 19: Verteilung des A1298C-Polymorphismus im Studienkollektiv

Es liegen keine signifikanten Unterschiede (p-Wert 0,075) in der Verteilung der einzelnen Genotypen zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und Frühgeborenen ohne IUGR vor.

5.2.2. Homocysteinspiegel

5.2.2.1. Fragestellung:

Gibt es signifikante Unterschiede in den Homocystein -Spiegeln zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen?

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe des nicht-parametrischen Testes für K-unabhängige Stichproben und Signifikanzberechnung mittels des Kruskal-Wallis-Testes besteht kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,233) in den Homocystein-Spiegeln zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen.

5.2.2.2. Fragestellung:

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des C677T oder des A1298C Polymorphismus im MTHFR-Gen bzw. den verschiedenen Genotypen und dem Auftreten von erhöhten Homocystein-Konzentrationen im Nabelschnurblut der Neugeborenen?

5.2.1.2.1. C677T Polymorphismus:

			Homocystein-Spiegel
Wildtyp	N	Gültig	68
		Fehlend	0
	Mittelwert		6,1100
	Median		5,1350
	Standardabweichung		2,36864
	Minimum		2,43
heterozygot	N	Gültig	60
		Fehlend	1
	Mittelwert		6,5105
	Median		6,1700
	Standardabweichung		2,22167
	Minimum		3,11
homozygot	N	Gültig	20
		Fehlend	0
	Mittelwert		6,0980
	Median		5,8350
	Standardabweichung		2,79673
	Minimum		1,92
		Maximum	12,18

Tabelle 20: Mittelwert, Median, Range und Standardabweichung der Homocysteinkonzentrationen in Bezug auf die einzelnen Genotypen des C677T-Polymorphismus

Nach einem Vergleich der Mittelwerte der Homocysteinkonzentrationen für die einzelnen Genotypen mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse kann kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,598) zwischen dem Vorliegen des C677T-Polymorphismuses im MTHFR-Gen und der Höhe der Homocysteinkonzentrationen festgestellt werden.

Weiterhin kann kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden.

5.2.1.2.2. A1298C Polymorphismus

			Homocystein-Spiegel
Wildtyp	N	Gültig	53
		Fehlend	1
	Mittelwert		5,9932
	Median		5,7800
	Standardabweichung		2,33655
	Minimum		1,92
heterozygot	N	Gültig	78
		Fehlend	0
	Mittelwert		6,2204
	Median		5,5800
	Standardabweichung		2,19383
	Minimum		2,43
homozygot	N	Gültig	17
		Fehlend	0
	Mittelwert		7,3671
	Median		7,2800
	Standardabweichung		2,98256
	Minimum		3,19
		Maximum	11,42

Tabelle 21: Mittelwert, Median, Range und Standardabweichung der Homocysteinkonzentrationen in Bezug auf die einzelnen Genotypen des A1298C-Polymorphismus

Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse zum Vergleich der Mittelwerte der Homocysteinkonzentrationen für die einzelnen Genotypen konnte kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,109) zwischen dem Vorliegen des A1298C-Polymorphismuses im MTHFR-Gen und der Höhe der Homocysteinkonzentrationen festgestellt werden.

Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Genotypen bewiesen werden.

5.2.2.3. Fragestellung:

Gibt es signifikante Unterschiede in den Folsäure-Spiegeln zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen?

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe des nicht-parametrischen Testes für K-unabhängige Stichproben und Signifikanzberechnung mittels des Kruskal-Wallis-

Testes besteht kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,807) in den Folsäure-Spiegeln zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen.

5.2.2.4. Fragestellung:

Zeigen Neugeborene von Müttern, die während der Schwangerschaft Folsäure eingenommen haben, höhere Folsäurespiegel und niedrigere Homocystein-Spiegel als Frühgeborene, deren Mütter keine Folsäurepräparate genommen haben?

5.2.2.4.1. Folsäurespiegel

Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft			Folsäure-Spiegel
ja	N	Gültig	107
		Fehlend	1
	Mittelwert		14,7694
	Median		14,2000
	Standardabweichung		5,00789
	Minimum		5,64
	Maximum		39,65
nein	N	Gültig	40
		Fehlend	0
	Mittelwert		11,9755
	Median		10,4250
	Standardabweichung		5,81821
	Minimum		4,74
	Maximum		32,84
Keine Angaben	N	Gültig	1
		Fehlend	0
	Mittelwert		10,9500
	Median		10,9500
	Minimum		10,95
	Maximum		10,95

Tabelle 22: Mittelwert, Median, Standardabweichung und Range der Folsäurekonzentrationen der Frühgeborenen in Relation zu der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft

Nach statistischer Berechnung mittels des Kruskal-Wallis-Testes zeigt sich ein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,000) in der Höhe der Folsäurespiegel bei Frühgeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft Folsäurepräparate eingenommen hatten, im Vergleich zu Frühgeborenen, deren Mütter auf eine Einnahme verzichtet hatten.

5.2.2.4.2. Homocysteinspiegel

Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft		Homocystein-Spiegel	
ja	N	Gültig	107
		Fehlend	1
	Mittelwert		6,1900
	Median		5,4700
	Standardabweichung		2,48123
	Minimum		1,92
	Maximum		15,27
nein	N	Gültig	40
		Fehlend	0
	Mittelwert		6,5550
	Median		6,3000
	Standardabweichung		2,00992
	Minimum		3,36
	Maximum		9,98
Keine Angaben	N	Gültig	1
		Fehlend	0
	Mittelwert		3,5400
	Median		3,5400
	Minimum		3,54
	Maximum		3,54

Tabelle 23: Mittelwert, Median, Standardabweichung und Range der Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen in Relation zu der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft

Nach statistischer Berechnung mittels des Kruskal-Wallis-Testes zeigt sich kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,217) in der Höhe der Homocysteinspiegel bei Frühgeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft Folsäurepräparate eingenommen hatten, im Vergleich zu Frühgeborenen, deren Mütter auf eine Einnahme verzichtet hatten.

5.2.2.5. Fragestellung:

*Besteht ein Zusammenhang zwischen den Homocystein- und den Folsäurespiegeln?
d.h. zeigen Frühgeborene mit hohen Homocysteinspiegeln niedrigere
Folsäurekonzentrationen und zeigen Frühgeborene mit niedrigen
Homocysteinspiegeln höhere Folsäurekonzentrationen?*

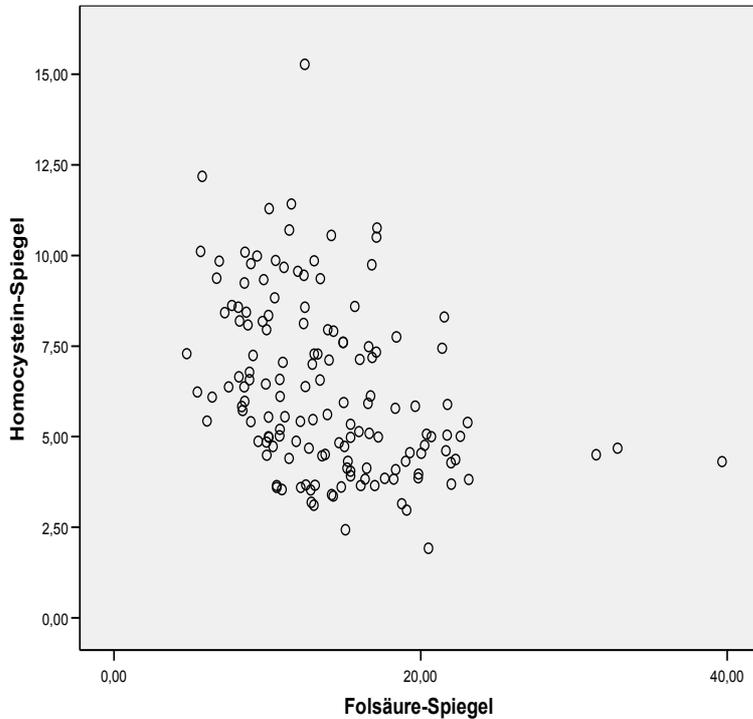


Abbildung 14: Korrelation zwischen den Homocystein- und den Folsäure-Spiegeln der Frühgeborenen

Bei statistischer Berechnung mittels einer bivarianten Korrelationsanalyse ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $-0,425$. Daher besteht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Homocystein- und den Folsäurespiegeln der Frühgeborenen. Der p-Wert lag bei $0,1$.

Entsprechend der statistischen Berechnungen besteht keine signifikante Beeinflussung zwischen den Homocystein- und den Folsäurespiegeln. Es zeigt sich jedoch ein eindeutig negativer Trend im Sinne von Auftreten von höheren Folsäurekonzentrationen bei Frühgeborenen mit niedrigeren Homocysteinspiegeln und umgekehrt. Es besteht also eine umgekehrte Proportionalität zwischen den Homocystein- und den Folsäurespiegeln.

5.2.2.6. Fragestellung:

Gibt es einen signifikante Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter der Frühgeborenen und den Homocystein-Konzentrationen?

Statistische Berechnungen mittels der bivarianten Korrelationsanalyse nach Pearson ergaben einen Korrelationskoeffizienten von 0,036 sowie einen p-Wert von 0,661. Es besteht also kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter der Frühgeborenen und den Homocystein-Konzentrationen.

5.2.2.7. Fragestellung:

Zeigen Frühgeborene von Müttern, die während der Schwangerschaft Nikotin konsumiert haben, höhere Homocysteinkonzentrationen als Frühgeborene, die keiner Nikotinexposition ausgesetzt waren?

		Homocystein-Spiegel	
Nikotinkonsum während der Schwangerschaft	N	Gültig	28
		Fehlend	0
	Mittelwert		7,0071
	Median		6,1700
	Standardabweichung		2,56095
	Minimum		3,60
	Maximum		15,27
Kein Nikotinkonsum während der Schwangerschaft	N	Gültig	120
		Fehlend	1
	Mittelwert		6,0989
	Median		5,4500
	Standardabweichung		2,29307
	Minimum		1,92
	Maximum		12,18

Tabelle 24: Einfluss des mütterlichen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft auf die Höhe der Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe des nicht-parametrischen Testes für K-unabhängige Stichproben und Signifikanzberechnung mittels des Kruskal-Wallis-Testes (p-Wert 0,062) besteht kein signifikanter Einfluss zwischen einem Nikotinkonsum der Mutter während der Schwangerschaft und erhöhten Homocystein-Konzentrationen der Frühgeborenen.

5.2.2.8. Fragestellung:

Zeigen sich signifikante Unterschiede in den Homocysteinkonzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Probanden?

		Homocystein-Spiegel	
männlich	N	Gültig	78
		Fehlend	0
	Mittelwert		6,2947
	Median		5,5800
	Standardabweichung		2,52323
	Minimum		2,43
	Maximum		15,27
weiblich	N	Gültig	70
		Fehlend	1
	Mittelwert		6,2440
	Median		5,8600
	Standardabweichung		2,19089
	Minimum		1,92
	Maximum		11,29

Tabelle 25: Unterschiede in den Homocysteinkonzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Frühgeborenen

Nach statistischer Berechnung mittels des Chi-Quadrat-Testes ergeben sich knapp keine signifikanten Unterschiede (p-Wert 0,053) in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Frühgeborenen.

5.2.2.9. Fragestellung:

Zeigen Frühgeborene von Müttern mit arterieller Hypertonie signifikant höhere Homocystein-Konzentrationen als Kinder, deren Mütter keine arterielle Hypertonie während der Schwangerschaft zeigten?

Arterielle Hypertonie der Mutter		Homocystein-Spiegel	
ja	N	Gültig	34
		Fehlend	0
	Mittelwert		7,5803
	Median		7,7350
	Standardabweichung		2,81998
	Minimum		2,97
	Maximum		15,27
nein	N	Gültig	114
		Fehlend	1
	Mittelwert		5,8802
	Median		5,4000
	Standardabweichung		2,06831
	Minimum		1,92
	Maximum		12,18

Tabelle 26: Einfluss einer mütterlichen arteriellen Hypertonie während der Schwangerschaft auf die Höhe der Homocystein-Spiegel der Frühgeborenen

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe des nicht-parametrischen Testes für K-unabhängige Stichproben und Signifikanzberechnung mittels des Kruskal-Wallis-Testes (p-Wert 0,002) besteht ein signifikanter Unterschied in den Homocysteinkonzentrationen zwischen Frühgeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft eine arterielle Hypertonie aufwiesen und Kindern von Müttern mit normalen Blutdruckwerten.

5.2.2.10. Fragestellung:

Liegen die Homocysteinkonzentrationen bei den Kindern aus der arteriellen Hypertonie-Gruppe umso höher, je niedriger das Geburtsgewicht der Frühgeborenen ist?

Statistischer Berechnungen mittels einer bivarianten Korrelationsanalyse ergaben für die Gruppe mit arteriellem Hypertonus der Mutter einen Korrelationskoeffizienten von -0,124 und einen p-Wert von 0,485.

Statistische Analysen der Werte der zweiten Gruppe hingegen ergaben einen Korrelationskoeffizienten von 0,136 und einen p-Wert von 0,150.

Aufgrund der ermittelten Daten ist in beiden Gruppen kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Homocysteinkonzentrationen und dem Geburtsgewicht der Kinder erkennbar.

In der Gruppe mit der arteriellen Hypertonie zeigt sich jedoch ein eindeutig negativer Trend (Korrelationskoeffizient -0,124) im Sinne von Auftreten von tendenziell höheren Homocysteinkonzentrationen bei Frühgeborenen mit niedrigerem Geburtsgewicht.

5.2.3. Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen

5.2.3.1. Fragestellung

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer der beiden Polymorphismen im MTHFR-Gen und dem Geburtsgewichtes der Frühgeborenen?

5.2.3.1.1. C677T-Polymorphismus

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse besteht kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,944) zwischen dem Vorliegen des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen.

Weitherin besteht auch kein signifikanter Zusammenhang bei Betrachtung der beiden Subkollektive. Für Frühgeborene mit einer IUGR ergab sich ein p-Wert von 0,655 und für Frühgeborene ohne IUGR ein p-Wert von 0,372.

5.2.3.1.2. A1298C-Polymorphismus

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse besteht kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,957) zwischen dem Vorliegen des A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen.

Weiterhin besteht auch kein signifikanter Zusammenhang bei Betrachtung der beiden Subkollektive. Für Frühgeborene mit einer IUGR ergab sich ein p-Wert von 0,094 und für Frühgeborene ohne IUGR ein p-Wert von 0,881.

5.2.3.2. Fragestellung

Besteht ein Zusammenhang zwischen den Homocysteinspiegeln und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen?

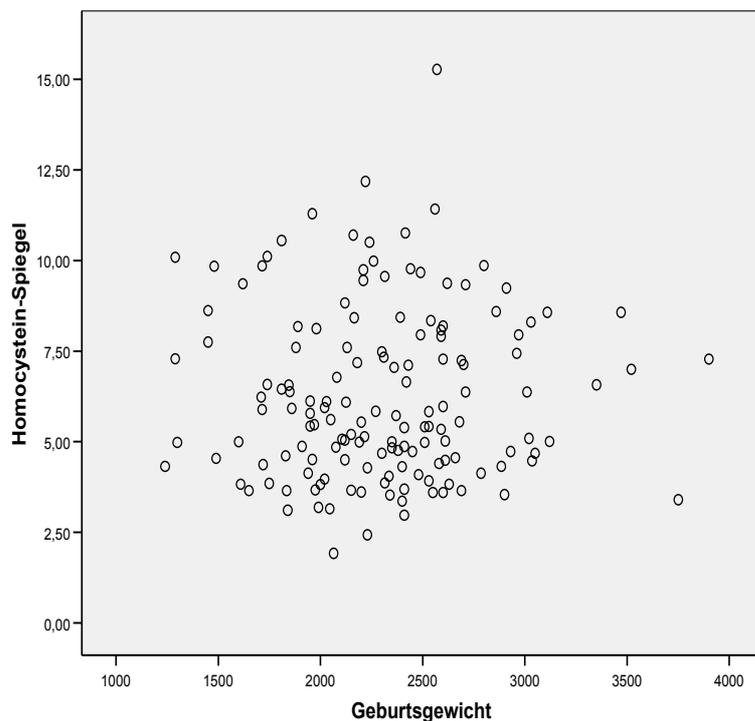


Abbildung 15: Streudiagramm der Korrelation zwischen den Homocystein-Spiegeln und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen

Wie in dem Streudiagramm bereits sichtbar wird besteht, kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und der Höhe der Homocystein-Spiegel der Frühgeborenen.

Bei statistischer Berechnung mittels einer bivarianten Korrelationsanalyse ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,31, damit besteht keine eindeutige Korrelation. Der p-Wert lag bei 0,705.

5.2.3.3. Fragestellung:

- 1) *Welche Faktoren haben einen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen?*
- 2) *Welches Merkmal hat den größten Einfluss auf das Geburtsgewicht in unserem Kollektiv?*

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe der linearen Regression ergaben sich folgende p-Werte zur Beurteilung eines potentiellen Einflusses auf das Geburtsgewicht:

Merkmal	p-Wert (Signifikanzniveau)
Geschlecht	0,382
Gestationsalter	0,000
Mehrlinge	0,002
Nikotinkonsum während der Schwangerschaft	0,009
Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft	0,863
Arterielle Hypertonie der Mutter	0,048
Homocystein-Spiegel	0,151
Folsäure-Spiegel	0,352
MTHFR- Polymorphismus C677T	0,912
MTHFR-Polymorphismus A1298C	0,691

Tabelle 27: Signifikanzniveau der einzelnen Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen

Ausgehend von einem Signifikanzniveau von 0,05 für einflussnehmende Merkmale zeigt sich eine signifikante Beeinflussung des Geburtsgewichtes durch das Gestationsalter, das Vorliegen einer Mehrlingsschwangerschaft, den mütterlichen Nikotinkonsum während der Schwangerschaft und das Vorliegen einer mütterlichen arteriellen Hypertonie.

Bei den übrigen untersuchten Merkmalen wie dem Geschlecht der Kinder, der mütterlichen Folsäureeinnahme, den kindlichen Homocystein- und Folsäurespiegeln, sowie dem Vorhandensein eines der beiden Polymorphismen, ist nicht von einer signifikanten Einflussnahme auszugehen.

Unsere statistischen Berechnungen mittels der linearen Regression zeigten, dass das Gestationsalter den größten Einfluss auf das Geburtsgewicht hat ($\beta=0,578$). In absteigender Reihenfolge spielen weiterhin das Vorliegen einer Mehrlingsschwangerschaft ($\beta=0,230$), der mütterliche Nikotinkonsum ($\beta=0,195$) und das Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie der Mutter ($\beta=0,143$) eine entscheidende Rolle für die Höhe des Geburtsgewichtes.

5.2.4. Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR

5.2.4.1. Fragestellung:

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des C677T oder des A1298C Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Vorliegen einer IUGR?

5.2.4.1.1. C677T-Polymorphismus

Nach statistischer Berechnung mittels des Chi-Quadrat-Testes besteht kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,197) zwischen dem Auftreten des C677T Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Vorliegen einer IUGR.

5.2.4.1.2. A1298C-Polymorphismus

Nach statistischer Berechnung mittels des Chi-Quadrat-Testes besteht kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,075) zwischen dem Auftreten des A1298C Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Vorliegen einer IUGR.

5.2.4.2. Fragestellung:

- 1) Welche Faktoren haben einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung einer IUGR?
- 2) Welches Merkmal hat den größten Einfluss auf die Entstehung einer IUGR im untersuchten Kollektiv?

Nach statistischer Berechnung mit Hilfe der logistischen Regression ergaben sich folgende p-Werte zur Beurteilung eines potentiellen Einflusses auf die Entstehung einer IUGR:

Merkmal	p-Wert (Signifikanzniveau)
Geschlecht	0,269
Gestationsalter	0,070
Mehrlinge	0,236
Nikotinkonsum während der Schwangerschaft	0,010
Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft	0,908
Arterielle Hypertonie der Mutter	0,009
Homocystein-Spiegel	0,028
Folsäure-Spiegel	0,479
MTHFR- Polymorphismus C677T	0,222
MTHFR-Polymorphismus A1298C	0,613

Tabelle 28: Signifikanzniveau der einzelnen Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR bei den Frühgeborenen

Ausgehend von einem Signifikanzniveau von 0,05 für einflussnehmende Merkmale, zeigt sich eine signifikante Beeinflussung der Entstehung einer IUGR durch einen mütterlichen Nikotinkonsum während der Schwangerschaft, eine arterielle Hypertonie der Mutter, sowie die kindlichen Homocystein-Plasma-Konzentrationen.

Bei Betrachtung des Odds Ratios der signifikanten Einflussgrößen zeigt sich, dass der Homocysteinspiegel der Frühgeborenen mit einem OR von 1,336 in unserem Kollektiv den größten Einfluss auf die Entstehung einer IUGR hat.

Eine Erhöhung der Homocysteinkonzentration der untersuchten Kinder um eine Einheit führt in diesem Falle zu einem um 33% höheren Risiko für die Entstehung einer IUGR.

Eine Risikozunahme konnte weiterhin für den mütterlichen Nikotinkonsum (OR=0,204) und für das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie der Mutter (OR=0,208) nachgewiesen werden.

Gemäß der ermittelten Odds Ratios ergibt sich für das Vorliegen eines der beiden Merkmale jeweils eine Erhöhung des Risikos um 20% im Vergleich zu Müttern ohne eines dieser Merkmale für die Geburt eines Kindes mit einer IUGR.

6. Diskussion

6.1. Methodendiskussion

6.1.1 Patientenkollektiv

Als Studienkollektiv dienten Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 32+0 und 36+6 SSW, die in dem Zeitraum von September 2005 bis Januar 2008 in der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität des Saarlandes geboren wurden.

Das durchschnittliche Gestationsalter lag bei 35,0 SSW [32,0-36,9].

Bei der Auswahl unseres Patientenkollektivs wurden keine Ausschlusskriterien bezüglich der Ursache der Frühgeburtlichkeit definiert, so dass lediglich das Gestationsalter ausschlaggebend für die Einschließung in die Studie war.

Die Erklärung für die Auswahl genau dieses Gestationsalters lag zum einen daran, dass alle Frühgeborenen < 32.0 SSW in einer anderen Studie untersucht wurden und zum anderen, dass in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte, dass Kinder, die mit diesem Gestationsalter geboren werden, ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer IUGR und die damit verbundene peri- und postnatale Morbidität und Mortalität aufweisen. (29, 127, 104, 148, 196, 175)

Unter den Teilnehmern befanden sich 71 weibliche, sowie 78 männliche Frühgeborene.

Des Weiteren beinhaltet unsere Studienpopulation 136 Mehrlinge. Hierbei handelt es sich um 65 Zwillinge und 2 Drillingsfrühgeburten.

Als Erklärung für die hohe Anzahl an Mehrlingen in unserer Studienpopulation sehen wir einerseits die Tatsache, dass es sich bei unserem Studienort um ein Perinatalzentrum handelt, an dem generell immer mehr Risikoschwangerschaften entbunden werden.

Zum anderen liegt eine weitere Ursache sicher auch in dem von uns ausgewählten Gestationsalter als Haupteinschlusskriterium der Neugeborenen und der Tatsache, dass ein Großteil der Mehrlingsschwangerschaften innerhalb dieses Zeitrahmens entbunden werden mussten.

Innerhalb des angegebenen Gestationsalters gab es von fetaler oder maternaler Seite keine weiteren Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme.

Das Einverständnis der Eltern bezüglich der Teilnahme ihres Kindes an der Studie, sowie der Erfassung einiger klinischer Daten war Voraussetzung für die Beteiligung an unseren Untersuchungen.

6.1.2. Probengewinnung:

Die für unsere Zwecke benötigte DNA isolierten wir aus EDTA-Vollblut, das unmittelbar nach der Geburt aus der Nabelvene der Frühgeborenen entnommen wurde. Die Entnahme erfolgte nach den üblichen hygienischen Standards einer Blutentnahme und die Röhrchen wurden unmittelbar nach der Entnahme zur Vermeidung von Verwechslungen mit dem Namen des Probanden beschriftet. Um die Stabilität des Probenmaterials zu gewährleisten, wurden die EDTA-Röhrchen innerhalb einer Stunde nach Entnahme zentrifugiert und Plasma und korpuskuläre Bestandteile voneinander getrennt.

Zur Sicherung einer korrekten Zuordnung der jeweiligen Probe zu dem jeweiligen Studienteilnehmer sowie einer Anonymisierung der Teilnehmer wurde jede Probe mit einer ID-Nummer versehen.

Anschließend wurde das gewonnene Material bis zu seiner Weiterverarbeitung in Gefrierschränken bei -80°C gelagert.

Aufgrund der sehr engen Einschlusskriterien und der notwendigen, möglichst schnellen Verarbeitung der Proben, resultiert die, gemessen an dem Studienzeitraum, doch relativ geringe Fallzahl von insgesamt 149 Teilnehmern. Eine weitere Erklärung stellt die schwierige Beschaffung des Untersuchungsmaterials dar. Ursachen hierfür waren die z.T. nicht vorhersehbaren und nur selten geplanten Geburtstermine der Frühgeborenen, die häufig mitten in der Nacht lagen und zu diesen Zeitpunkten für die Bearbeitung der Proben sehr schwierige Bedingungen vorlagen.

Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass für die Untersuchung des Blutes das Einverständnis der Eltern Voraussetzung war, die uns leider nicht immer erteilt wurde.

6.1.3. DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus dem Vollblut erfolgte mit einem Kit der Firma Applied Biosystems nach einem von der Herstellerfirma standardisierten Protokoll.

Zur Vermeidung von Verunreinigungen durch Kontakt mit Fremd-DNA wurden die Untersuchungen in speziell präparierten Gefäßen durchgeführt und die Arbeitsplätze vor und nach den einzelnen Arbeitsschritten jeweils gründlich gereinigt.

Weiterhin wurden von den verarbeitenden Personen grundsätzlich Handschuhe zum Kontaminationsschutz getragen und die einzelnen Pipettierschritte mit PCR-cleanen Pipettenspitzen mit Filtern sowie mit PCR-cleanen Reagenzgefäßen durchgeführt. Nach Beendigung der einzelnen Isolationsschritte wurde das Filtrat mit Hilfe einer photometrischen Messung auf seine Reinheit überprüft und die im Filtrat enthaltene DNA-Konzentration in ng/µl angegeben.

Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Adsorption, welche dem Adsorptionsmaximum der DNA entspricht, ist dabei der in der Probe enthaltenen DNA-Menge direkt proportional.

Durch die Adsorptionsmessung bei 280 nm, entsprechend dem Adsorptionsmaximum für Proteine, sowie der Berechnung des Quotienten der Adsorptionen A_{260}/A_{280} , konnte eine Aussage über eine eventuelle Verunreinigung des Filtrates mit Proteinen gemacht werden.

Reine DNA zeigt hierbei ein Adsorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 1,7-1,9.

Weiterhin wurde auch noch die Adsorption bei 230 nm und der Adsorptionsquotient A_{260}/A_{230} bestimmt, der ebenfalls eine Beurteilung des Reinheitsgehaltes erlaubt und möglichst gegen 0 tendieren sollte.

6.1.4. PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde angewandt, um die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und damit einer Mutationsanalyse zugänglich zu machen.

Zur Erlangung einer möglichst hohen Spezifität und Sensitivität wurden die Untersuchungen mit Hilfe der realtime PCR-Technik durchgeführt, da dieser Methode eine besonders hohe Zuverlässigkeit und Sensitivität bei der Detektion selbst kleinster DNA-Mengen zugeschrieben wird.

Im Vergleich zur konventionellen PCR bietet eine Analyse mittels realtime-PCR einige entscheidende Vorteile.

Der Hauptvorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass die gesamte Analyse und Auswertung voll automatisiert in einen Thermocycler nach dem sog. „one tube“-Prinzip abläuft.

Hieraus ergeben sich, neben einer enormen Zeitersparnis, noch einige weitere Vorteile.

So ist beispielsweise keine aufwendige Nachbearbeitung der Proben mittels Gelelektrophorese oder anderen Verfahren notwendig. Wodurch sich neben einer deutlichen Zeitersparnis ebenfalls eine Reduktion des Kontaminationsrisikos ergibt, da die Probengefäße vor der Auswertung nicht mehr geöffnet werden müssen. Weiterhin entfällt hierdurch auch der Umgang mit cancerogenen Substanzen, wie beispielsweise Ethidiumbromid, die zur Analyse mittels Gelelektrophorese notwendig sind.

Um eine eventuelle Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen, wurde bei jedem PCR-Experiment eine Negativkontrolle/Kontaminationskontrolle (No template control, NTC) mitgeführt, die alle Komponenten außer der Proben-DNA enthält.

Als zusätzlicher Sicherheitsfaktor gegenüber einer Kontamination der Proben mit Amplifikaten, enthalten die kommerziell gefertigten Reagenziengemische zur Durchführung einer TaqMan-PCR das Enzym Uracil-N-Glykosidase.

Anstelle des Nukleotidbausteins dTPP wird das Analogon dUTP verwendet, das von der Polymerase Uracil-N-Glykosidase in alle Amplifikate eingebaut wird.

Dieses im Mastermix enthaltene Enzym spaltet bei einer Temperatur von 50°C, d.h. vor der eigentlichen PCR-Reaktion, alle dUTP-haltigen Polynukleotide und verhindert so eine Reamplifikation von bereits entstandenen PCR-Produkten durch „carry-over“.

Die Template-DNA hingegen enthält dTPP und wird daher nicht zerstört.

Das Enzym selbst wird bei dem initialen Denaturierungsschritt der PCR dann inaktiviert.

Des Weiteren wird bei der Taqman-PCR eine „Hot-Start-Polymerase“ verwendet, die im nativen Zustand noch inaktiv ist und erst durch die ausgedehnten Denaturierungsschritte bei 95 °C eine ausreichende Aktivität erhält.

Eine Reduktion der Beeinflussung des Ergebnisses durch mögliche Fehlamplikate wird ebenfalls durch den Einsatz einer Sonde erreicht.

Durch die Verwendung dieses dritten Oligonukleotids liegt die Sensitivität der realtime PCR 100 bis 1000-fach höher als die der konventionellen PCR.

Für die Verwendung der Methode der realtime PCR spricht weiterhin die Tatsache, dass bei dieser Methode ein empfindlicherer Nachweis selbst geringer DNA-Konzentrationen möglich ist als mit der Ethidiumbromidfärbung, was vor allem bei Verwendung kleiner Probenmengen, wie beispielsweise pädiatrischen Patienten, von entscheidender Bedeutung ist.

So wird in einigen Studien von einer Senkung der Nachweisgrenze des Amplifikates von 2-4 Nanogramm bei der konventionellen PCR auf nur 2-20 Pikogramm bei der realtime-PCR ausgegangen.

Ein weiterer Benefit dieser Methode liegt in der Verwendung von Mikrotiter-Platten zur Durchführung der Reaktionen.

Hierdurch kann ein sehr großer Probenumsatz erreicht werden und gleichzeitig wird eine Bestimmung einer großen Anzahl von Proben unter den gleichen Reaktionsbedingungen ermöglicht.

Es resultiert neben einer sehr großen Zeitersparnis gleichzeitig eine Erhöhung der Sensitivität der Messergebnisse.

Zur weiteren Steigerung der Sensitivität führten wir jeweils Doppelbestimmungen der einzelnen Proben unter exakt gleichen Reaktionsbedingungen durch, so dass auf jeder Mikrotiter-Platte jede DNA-Probe doppelt enthalten war.

Neben den genannten Maßnahmen zum Kontaminationsschutz wurden die allgemeinen Kontamination-Schutzmaßnahmen zur Durchführung einer PCR beachtet. Hierzu gehörte das Arbeiten in Räumen mit speziellen Lüftungssystemen, sowie das gründliche Reinigen der Arbeitsplatten und Geräte, genauso wie das Tragen von Handschuhen und die Verwendung von PCR-cleanen Reaktionsgefäßen und Pippetenspitzen mit Aerosolfiltern.

Ein weiterer Vorteil der realtime-PCR-Technik liegt in der Möglichkeit zur exakten Quantifizierung der Messergebnisse ohne großen weiteren Arbeitsaufwand.

In unserer Studie wurde hiervon jedoch kein Gebrauch gemacht, da für unsere Erhebungen lediglich die qualitative Analyse der Proben auf das Vorliegen der untersuchten Mutationen von Interesse war.

Neben den erwähnten Vorteilen der realtime PCR gegenüber der konventionellen PCR gibt es allerdings auch einige Nachteile.

Der größte Nachteil dieses Verfahrens liegt wohl immer noch in den sehr hohen Anschaffungskosten für die entsprechenden Geräte und Sonden, die sich daher nur

in größeren Forschungslaboratorien mit zahlreichen Forschungsprojekten amortisieren dürften.

Zusätzlich bedarf es einer gründlichen Einarbeitung des Personals in den komplexen Verfahrensablauf um Fehlbestimmungen aufgrund von Anwendungsfehlern zu verhindern.

6.1.5. Bestimmung der Homocystein- und der Folsäurekonzentration

Die Bestimmung der Homocystein- und der Folsäurekonzentration erfolgte im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin-Zentrallabor der Universität des Saarlandes nach standardisierten und im Routinegebrauch eingesetzten Verfahren.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. Verteilung der MTHFR-Gen-Polymorphismen in unserem Kollektiv

Polymorphismen im MTHFR-Gen werden verdächtigt, durch eine Behinderung des Remethylierungsweges im Homocysteinstoffwechsel zu erhöhten Homocysteinkonzentrationen zu führen.

Einige Forschungsgruppen gehen weiterhin davon aus, dass solche Genveränderungen einen Einflussfaktor für die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung darstellen können.

Dies betrifft vor allem den C667T- aber auch den A1298C-Polymorphismus, die auch Gegenstand unserer Untersuchungen waren.

Dekker et al beschreiben beispielsweise einen Zusammenhang zwischen angeborenen Thrombophilien, wie einem Polymorphismus im MTHFR-Gen und Schwangerschaftskomplikationen, und hier im Besonderen die Entstehung einer IUGR. (41)

6.2.1.1. C677T-Polymorphismus

Bei Vorliegen des C677T-Polymorphismus kommt es zu einer Transition der Basen Cytosin gegen Thymin. Dies hat auf der Proteinebene eine Substitution der Aminosäure Alanin durch Valin an Position 222 des Polypeptids zur Folge, wodurch eine thermolabile Variante der MTHFR mit reduzierter Aktivität des Schlüsselenzyms im Homocysteinstoffwechsel entsteht. (97, 60, 103, 73, 94)

Insbesondere für homozygote Merkmalsträger wird eine reduzierte Enzymaktivität mit Konsequenzen auf den Homocysteinspiegel propagiert.

Kang et. al (1988) gehen von einer Reduktion der Aktivität des Enzyms bei einer Körpertemperatur von 37 °C bei homozygoten Trägern des Polymorphismus auf weniger als die Hälfte (35-50%) der normalen Aktivität aus, was wiederum zu moderat erhöhten Homocystein-Werten führt. (67, 94)

Analysen unserer Daten ergaben bei 19 Frühgeborenen mit einer IUGR (57,6%) und bei 49 (45,6%) der Frühgeborenen ohne IUGR eine Wildtyp-Konstellation (CC).

Die Anzahl an heterozygoten Merkmalsträgern (CT) lag für die erste Gruppe bei 12 Probanden (36,3%) und für die 2. Gruppe bei 49 (42,2%).

Frühgeborene, die für die untersuchte Mutation homozygot waren, fanden sich lediglich bei 2 (6,1%) Kindern mit einer IUGR, sowie bei 18 Neugeborenen (15,6%) ohne IUGR.

Für das Gesamtkollektiv ergaben sich damit 68 Kinder mit der Wildtyp-Variante, (45,6%) sowie 61 (40,9%) heterozygote und 20 (13,4 %)homozygote Merkmalsträger.

Statistische Analysen und Vergleiche zwischen den beiden Studienkollektiven konnten keinen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,197) in der Verteilung der verschiedenen Genotypen des C677T Polymorphismus im MTHFR-Gen zwischen den beiden Gruppen ermitteln.

Auf Grund des Fehlens eines signifikanten Unterschiedes in der Verteilung der einzelnen Genotypen zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und solchen ohne eine IUGR ist davon auszugehen, dass das Vorliegen einer C667T-Polymorphismus im MTHFR-Gen in unserer Studienpopulation keinen Einfluss auf die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung hat.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten anderer Forschungsgruppen.

So konnten Franchi et al in ihrer 2004 veröffentlichten Studie zum Zusammenhang zwischen genetischen Prädispositionen für Thrombophilien und der Entstehung von intrauterinen Wachstumsretardierungen, ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Polymorphismus und der Entstehung einer IUGR nachweisen. (58)

6.2.1.2. A1298C Polymorphismus

Bei dem A1298C-Polymorphismus kommt es analog zu einer Transition der Basen Adenin gegen Cytosin, die auf der Proteinebene zu einem Austausch der Aminosäure Glutamat gegen Alanin führt. (208)

In diesem Fall wird ebenfalls von einer Reduktion der Enzymaktivität auf ca. 60% des Normalwertes, bedingt durch eine Thermolabilität des Enzyms, ausgegangen. (24, 222,36)

Eine Assoziation mit erhöhten Homocystein-Spiegeln konnte jedoch in zahlreichen Studien nicht nachgewiesen werden.

Van der Put et al konnten zwar eine deutlich reduzierte Enzymaktivität bei homozygoten Merkmalsträgern im Vergleich zu Heterozygoten aufzeigen, eine erhöhte Homozysteinkonzentration der Homozygoten im Vergleich zu den Heterozygoten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. (208, 221)

In unseren Untersuchungen konnten wir auch für den zweiten Polymorphismus im MTHFR-Gen keinen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,075) in der Verteilung der einzelnen Genotypen zwischen den 2 Studiengruppen ermitteln.

Die Wildtyp-Variante (AA) konnte bei 8 Frühgeborenen (24,2%) mit einer IUGR sowie bei 46 (39,7%) Frühgeborenen ohne IUGR nachgewiesen werden.

Den heterozygoten Genotyp (AC) zeigten 23 Kinder (69,7%) aus der ersten und 55 Kinder (47,4%) aus der zweiten Gruppe.

Die Anzahl an homozygoten Merkmalsträgern liegt auch bei dem A1298C-Polymorphismus lediglich bei 2 Frühgeborenen (6,1%) aus der IUGR-Gruppe und bei 15 Neugeborenen (12,9%) aus der Non-IUGR-Gruppe.

Bei Betrachtung des Gesamtkollektives lag bei 54 Frühgeborenen (36,2%) die Wildtyp-Konstellation vor, wohingegen 78 Kinder (52,3 %) heterozygot und 17 (11,4%) homozygot für den A1298C-Polymorphismus waren.

Somit besteht in unserem Studienkollektiv kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen und der Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung.

Bei der Interpretation unserer Ergebnisse muss jedoch immer das relativ kleine Studienkollektiv bedacht werden, so dass unsere Prävalenzen nur sehr eingeschränkt auf die Gesamtbevölkerung übertragen werden können.

6.2.1.3. Vergleich der Verteilung in der Studienpopulation mit der Verteilung in der Normalbevölkerung

In zahlreichen Studien zur Eruiierung der Prävalenzen für das Auftreten einer der beiden von uns untersuchten Polymorphismen im MTHFR-Gen zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen.

Analysen an kaukasischen und asiatischen Kollektiven ergaben für den C677T-Polymorphismus Prävalenzen für den heterozygoten Genotyp > 50% und für die homozygoten Merkmalsträger von 6-12%. (20, 96)

Andere Autoren beschreiben ein Vorliegen der heterozygoten Variante bei 30-40 %, sowie eine Prävalenz der homozygoten Variante von 5-15% innerhalb der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung. (31)

Bei einem Vergleich der Prävalenzen zwischen den einzelnen Bevölkerungsgruppen wird innerhalb der europäischen und der nord-amerikanischen Bevölkerung ein Nord-Süd-Gefälle mit einem Anstieg der Prävalenzen für den homozygoten Genotyp sichtbar. (17)

Bei einigen Populationen, wie beispielsweise Afrikaner und Afro-Amerikaner, konnten die homozygote Variante hingegen nur sehr selten (< 2% homozygote Merkmalsträger) nachgewiesen werden. (17, 161)

Insgesamt zeigt sich also eine sehr heterogene Verteilung der einzelnen Genotypen innerhalb verschiedener Populationen, so dass Vergleiche nur zwischen Individuen mit der gleichen Ethnizität sinnvoll erscheinen.

Für unsere Analysen sind vor allem die Ergebnisse der Studien an kaukasischen Probanden von besonderem Interesse, da unsere Studienteilnehmer zum größten

Teil aus der kaukasischen Bevölkerungsgruppe (147 Probanden) stammen und lediglich bei 2 Kindern die Eltern asiatischer Abstammung waren.

Die bei unseren Erhebungen ermittelten Verteilungen der einzelnen Genotypen für die beiden Polymorphismen zeigte ein Vorliegen der homozygoten Variante für den C677T-Polymorphismus bei 13,4 % der Frühgeborenen und für den A1298C-Polymorphismus bei 11,4 % der Probanden entsprechend den Ergebnissen aus anderen Studien an kaukasischen Individuen.

Auch wenn unsere Daten im Vergleich zu anderen Studien nur anhand einer sehr kleinen Fallzahl ermittelt wurden, ist dennoch davon auszugehen, dass unsere Ergebnisse ebenfalls der Normalverteilung in der kaukasischen Bevölkerung entsprechen.

Für Untersuchungen an Frühgeborenen gibt es bisher keine eindeutigen Daten. Aufgrund der Übereinstimmung unserer Fallzahlen mit den Ergebnissen aus anderen Studien an der gleichen Bevölkerungsgruppe, muss man davon ausgehen, dass es keinen bedeutenden Unterschied zwischen Erwachsenen und Frühgeborenen, sowie zwischen hypotrophen und eutrophen Frühgeborenen bezüglich der Verteilung der Genotypen innerhalb einer ethnischen Gruppe gibt.

6.2.2. Homocystein-Spiegel

6.2.2.1. Beschreibung der Homocystein-Spiegel in den untersuchten Gruppen

Um eine Aussage über das eventuelle Vorliegen einer Hyperhomocysteinämie bei unseren Probanden machen zu können, mussten die durchschnittlichen Homocystein-Konzentrationen ermittelt werden.

Bei unseren Untersuchungen konnte ein Median von 5,75 $\mu\text{mol/l}$ [1,92-15,27] für die Konzentrationen im Gesamtkollektiv ermittelt werden.

Berücksichtigt wurden hierbei 148 Proben, von einem Probanden war leider nicht ausreichend Material zur Analyse vorhanden.

Bei einer Betrachtung der beiden Untergruppen unseres Kollektives ergab sich ein Median von 5,06 $\mu\text{mol/l}$ [3,11-10,70] für die Frühgeborenen mit einer IUGR, und ein Median von 5,93 $\mu\text{mol/l}$ [1,92-15,27] für die Frühgeborenen ohne eine IUGR. Nach statischen Berechnungen zeigte sich, dass zwischen unseren beiden Kollektiven kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,233) bezüglich der Verteilung der Homocystein-Konzentrationen vorliegt.

6.2.2.2. Vergleich mit aktuellen Referenzwerten

Von verschiedenen Autoren werden unterschiedliche Grenzwerte für die Definition erhöhter Homocysteinkonzentrationen bei Erwachsenen angegeben.

Die American Heart Association definiert eine Hyperhomocysteinämie beispielsweise ab Homocystein-Plasma-Konzentrationen von 16 bis 30 $\mu\text{mol/L}$ (moderate Hyperhomozysteinämie), 31 bis 100 $\mu\text{mol/L}$ (mittlere Hyperhomozysteinämie) beziehungsweise $> 100 \mu\text{mol/L}$ (schwere Hyperhomozysteinämie). (121)

Für Erwachsene sollte gemäß den aktuellen Richtlinien der DACH-Liga-Homocystein (D-A-CH, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung und Schweizerische Vereinigung für Ernährung) die Plasma-Homocysteinkonzentration bei Erwachsenen $< 10 \mu\text{M}$ ($< 10 \mu\text{mol/l}$) liegen.

Von einer moderaten Hyperhomocysteinämie wird bereits ab einer Plasmakonzentration von $12 \mu\text{M}$ ($12 \mu\text{mol/l}$) gesprochen. (36)

Bei einem Vergleich mit diesen Referenzwerten, würden die von uns ermittelten Homocysteinkonzentrationen mit einem Median von 5,75 $\mu\text{mol/l}$ [1,92-15,27] und einem Mittelwert von 6,27 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 2,36) im Bereich der normalen Plasma-Konzentrationen Erwachsener liegen.

Normwerte für die Höhe der Homocysteinkonzentrationen bei Kindern existieren nicht. Es gibt lediglich einige durch Studien ermittelte Referenzwerte zum Vergleich, wobei für Untersuchungen an Neu- oder Frühgeborenen bisher nur sehr wenige Daten vorhanden sind.

Untersuchungen von Refsum et. al an 5000 norwegischen Neugeborenen ergaben eine mittlere Homocysteinkonzentration von 7,5 µmol/l. Bei 43 Probanden konnten in dieser Studie Plasma-Spiegel > 15 µmol/l ermittelt werden. (166)

Die Forschungsgruppe um Infante-Rivard et al führte im Jahr 2002 ebenfalls Untersuchungen zur Ermittlung der Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut Neugeborener durch. Analysen an 438 Neugeborenen ergaben dabei eine mittlere Homocystein-Konzentration von 5,06 [4,92-5,21]. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten aus unserer Studie, auch wenn unser Kollektiv mit lediglich 148 Probanden deutlich kleiner war. (82)

6.2.2.3. Einflussfaktoren auf den Homocysteinspiegel

Wie zu Beginn bereits erwähnt, gibt es zahlreiche Einflussfaktoren auf die Homocystein-Konzentrationen, hierbei kann man vor allem zwischen genetischen und nutritiven Einflussfaktoren unterscheiden.

Einige Studien zur Analyse der Homocysteinkonzentrationen bei Kindern und Jugendlichen zeigten analog zu den Erwachsenen z.T. signifikante Differenzen bezüglich des Geschlechtes, der ethnischen Herkunft und dem Alter der Kinder, so dass diese Faktoren als Haupteinflussgrößen anzusehen sind. (146)

6.2.2.3.1. genetischen Einflussfaktoren auf den Homocystein-Spiegel

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass genetische Faktoren zu Hyperhomocysteinämie führen können.

Von uns wurden hierbei 2 Polymorphismen im MTHFR-Gen untersucht, die zu Defekten im Remethylierungsweg der Aminosäure Homocystein führen und damit zu erhöhten Homocysteinkonzentrationen beitragen können.

Ob das Vorliegen eines dieser beiden Polymorphismen tatsächlich zu erhöhten Plasma-Konzentrationen führt, wird in der Literatur bisher noch kontrovers diskutiert.

6.2.2.3.1.1. MTHFR-C677T-Polymorphismus

Durch eine Zuordnung der jeweils gemessenen Homocystein-Konzentrationen zu den jeweiligen Genotypen bezüglich des MTHFR-Polymorphismus C677T konnten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Homocystein-Spiegel für die einzelnen Gruppen nachgewiesen werden.

So zeigten beispielsweise Frühgeborene, die homozygot für den C667T-Polymorphismus waren, einen Median der Homocystein-Konzentrationen von 5,84 µmol/l [1,92-12,18].

Im Vergleich hierzu konnte bei Kindern, die bezüglich der untersuchten Genotyp-Konstellation ein Wildtyp-Muster zeigten, durchschnittliche Konzentrationen von 5,14 µmol/l [2,43-11,42] gemessen werden.

Bei den heterozygoten Merkmalsträgern lag der Median bei 6,17 µmol/l [3,11-15,27]. Der Median der homozygoten Merkmalsträger liegt zwar über dem Wert für die Wildtyp-Variante, jedoch deutlich unter dem Wert für die Heterozygoten.

Bei einer Betrachtung der Mittelwerte ließen sich daher keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen feststellen, so dass davon auszugehen ist, dass in unserem Studienkollektiv das Vorliegen des C667T-Polymorphismus im MTHFR-Gen keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Homocystein-Konzentrationen hat.

6.2.2.3.1.2. MTHFR A1298C-Polymorphismus

Analog zu dem C677T-Polymorphismus suchten wir auch bei dem 2.

Polymorphismus nach Zusammenhängen zwischen den einzelnen Genotypen und den Homocystein-Plasma-Spiegeln.

Bei Frühgeborenen, die homozygot für den A1298C-Polymorphismus waren, lag die durchschnittliche Homocystein-Konzentration bei 7,28 µmol/l [3,19-11,42].

Kinder mit der Wildtyp-Konstellation zeigten durchschnittliche Plasma-Konzentrationen von 5,78 µmol/l [1,92-12,18]. Der Median der Homocystein-Spiegel bei den heterozygoten Frühgeborenen lag bei 5,58 µmol/l [2,43-15,27].

In diesem Falle zeigten sich zwar die größten Werte bei den Homozygoten, nach statistischen Berechnungen lagen jedoch auch bei diesem Polymorphismus zwischen den einzelnen Genotypen keine signifikanten Unterschiede (p-Wert 0,109) in der Höhe der Homocystein-Konzentrationen vor.

Bei Betrachtung der Mittelwerte ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen.

6.2.2.3.1.3. Bedeutung der Polymorphismen für den Homocysteinspiegel

Gemäß unseren statistischen Berechnungen konnte eine signifikante Beeinflussung der Homocysteinkonzentration durch das Vorliegen einer der beiden Polymorphismen im MTHFR-Gen nicht nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte kein Unterschied in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen für die jeweiligen Ausprägungen des Polymorphismus gezeigt werden.

Homozygote Merkmalsträger zeigten in beiden Fällen keine signifikant höheren Homocystein-Plasma-Konzentrationen als Frühgeborene mit der Wildtyp-Konstellation.

Die von uns erhobenen Daten stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und der Höhe der Homocystein-Konzentrationen nachweisen konnten.

So lieferten Brattström et. al beispielsweise in ihrer aus 13 Studien bestehender Metaanalyse den Nachweis, dass die Träger des homozygoten Genotyps um durchschnittlich 25% höhere Homocysteinkonzentrationen aufwiesen als die Probanden mit der Wildtyp-Konstellation. (20)

Eine weitere Metaanalyse von Kerk et. al konnte ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem homozygoten TT-Genotyp und erhöhten Plasma-Homocystein-Werten aufzeigen. (101)

Auch Kang et al. (1991) zeigten in ihren Untersuchungen eine Assoziation zwischen der thermolabilen Variante der MTHFR und einer signifikanten Erhöhung des Homocysteinspiegels.

Jedoch stellte sich in ihren Untersuchungen auch heraus, dass nicht bei allen Trägern des Polymorphismus eine Hyperhomocysteinämie zu diagnostizieren war. Sie vermuteten daher, dass der C677T-Polymorphismus durch Interaktion mit verschiedenen anderen Faktoren, z.B. niedriger Serumfolatspiegel, Einfluss auf die Entstehung einer Hyperhomocysteinämie nehmen könnte. (95)

Vergleichbar mit den von uns gewonnenen Ergebnissen eines nicht signifikanten Zusammenhanges zwischen dem Vorliegen eines Polymorphismen im MTHFR-Gen und der Höhe der Homocystein-Konzentrationen sind die Schlussfolgerungen einiger anderer Forschungsgruppen. (119, 206, 200)

Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse und der kontroversen Datenlage bezüglich einer potentiellen Beeinflussung ist davon auszugehen, dass das Vorliegen eines Polymorphismus im MTHFR-Gen alleine nicht zu einer erhöhten Homocystein-Plasma-Konzentration führt, sondern erst das Zusammenwirken mehrerer Faktoren zu einer Erhöhung führen kann.

Einige hierfür in Frage kommende Einflussgrößen werden im Folgenden näher beschrieben.

6.2.2.3.2. Nutritive Einflussfaktoren auf den Homocysteinspiegel

Eine weitere Gruppe von Einflussfaktoren auf den Homocystein-Spiegel sind nutritive Faktoren.

Unter diesen kommt nach aktueller Studienlage der Folsäure die größte Bedeutung zu, weshalb wir bei unseren Untersuchungen neben der Homocystein- auch die Folsäurekonzentration im Nabelschnurblut der Frühgeborenen bestimmten. (18, 202)

6.2.2.3.2.1. Folsäure

Folsäurekonzentrationen im Kollektiv

Die von uns ermittelten durchschnittlichen Folsäure-Konzentrationen lagen im Gesamtkollektiv bei 13,08 ng/ml [4,74-39,65].

Eine Aufspaltung der gesamten Studienpopulation in die beiden Subpopulationen bestehend aus Frühgeborenen mit und Frühgeborene ohne IUGR ergab einen Median von 13,4 ng/ml [4,74-31,45] für die erste Gruppe und einen Median von 13,08 [5,64-39,65] für die zweite Gruppe.

Die Verteilung der Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten (p -Wert 0,355) Unterschied in der Höhe der Folsäurekonzentrationen zwischen wachstumsretardierten und eutrophen Frühgeborenen.

Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft

Im Rahmen der Erhebung der klinischen Daten wurde die mütterliche Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft erfragt.

Hierbei zeigte sich, dass 108 Mütter (72,5%) Folsäurepräparate eingenommen hatten, bei lediglich 40 Müttern (27,5%) war eine Einnahme nicht erfolgt.

Bezogen auf die beiden Untergruppen unseres Studienkollektivs zeigte sich, dass in der Gruppe der Kinder mit einer IUGR 22 Mütter (66,7%) Folsäure eingenommen hatten im Gegensatz zu 11 Müttern (33,3%), die auf eine Einnahme verzichtet hatten. In der zweiten Gruppe, der Frühgeborenen ohne IUGR, lag eine Folsäureeinnahme bei 86 der Mütter (74,1%) vor, während lediglich 29 Mütter (25%) keine Folsäurepräparate konsumiert hatten.

Die Daten einer Mutter bezüglich der Folsäureeinnahme konnten leider nicht eruiert werden.

Nach statischen Berechnungen ergab sich kein signifikanter Unterschied (p-Wert 0,355) in der mütterlichen Folsäureeinnahme zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen.

Es zeigten sich allerdings die erwarteten signifikanten Unterschiede (p-Wert 0,05) in den Folsäurekonzentrationen zwischen Frühgeborenen, deren Mütter Folsäure eingenommen hatten, und Frühgeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft keine Folsäure eingenommen hatten.

Bei erfolgter mütterlicher Folsäureeinnahme lag die durchschnittliche Folsäurekonzentration bei 14,2 ng/ml [5,64-39,65] im Vergleich zu 10,43 ng/ml [4,74-32,84] bei Frühgeborenen, deren Mütter keine Folsäure eingenommen hatten.

Bei Betrachtung der Homocysteinspiegel zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,217) zwischen der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft und der Höhe der Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen.

Zusammenfassend kann man für unser Studienkollektiv feststellen, dass Frühgeborene, deren Mütter während der Schwangerschaft Folsäurepräparate eingenommen haben, signifikant höhere Folsäure-Konzentrationen im Nabelschnurblut zeigen als Frühgeborene, deren Mütter keine Folsäurepräparate eingenommen haben.

Ein signifikanter Einfluss der mütterlichen Folsäureeinnahme auf die Höhe der kindlichen Plasma-Homocystein-Konzentrationen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Einfluss der Folsäurekonzentration auf die Homocysteinspiegel

Zu klären bleibt noch die Frage einer generellen Einflussnahme der Folsäurekonzentration auf die Höhe der Homocysteinspiegel in unserem Kollektiv. Aus zahlreichen anderen Studien gilt es als gesichert, dass ein Folsäure-Mangel zu erhöhten Homocysteinkonzentrationen führt. (197, 40, 3)

Weithin wurde von mehreren Autoren die Höhe der Folsäure-Plasma-Konzentration als ausschlaggebender Faktor für die Höhe der Homocystein-Konzentrationen beschrieben. (73, 15, 95, 94)

Manche Autoren gehen sogar soweit zu behaupten, dass bei ausreichender Folsäure-Zufuhr die Polymorphismen keinen Einfluss auf die Homocystein-Spiegel haben. (73)

Bei unseren Untersuchungen konnte zwar kein eindeutiger signifikanter Einfluss der Folsäure- auf die Homocystein-Spiegel nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch ein eindeutig negativer Trend (Korrelationskoeffizient -0,425) zwischen der Höhe des Homocystein-Spiegels und der Höhe der Folsäure-Plasma-Konzentrationen. Dies bedeutet, dass in unserem Kollektiv Neugeborene mit hohen Folsäure-Spiegeln tendenziell niedrigere Homocystein-Plasma-Konzentrationen zeigten, als Neugeborene mit niedrigeren Folat-Spiegeln.

Unsere Daten sind damit sehr gut vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, wie beispielsweise den Resultaten von Jacques et. al, die zeigten, dass sogar homozygote Träger der Mutation, die einen hohen Folsäureplasmaspiegel zeigen, trotz der verminderten Enzymaktivität, nahezu normale Homocystein-Konzentrationen aufweisen können. (88)

Es gilt daher auch für unser Kollektiv als gesichert, dass die Folsäure einen entscheidenden Einfluss auf die Homocystein-Konzentration hat, der sich bei Frühgeborenen analog zu den Ergebnissen bei Erwachsenen zu verhalten scheint. Aus diesem Grunde erscheint es besonders wichtig, für eine ausreichende Folsäurekonzentration der Kinder zu sorgen. Diese sollte am besten durch eine mütterliche Folsäure-Supplementation werden der Schwangerschaft begonnen werden.

6.2.2.3.2.2. weitere Einflussfaktoren auf den Homocysteinspiegel

In einigen Studien konnten weitere nutritive Einflussfaktoren auf die Homocystein-Konzentration, wie beispielsweise die Versorgung mit Vitamin B12, nachgewiesen werden, die bei unseren Untersuchungen jedoch nicht berücksichtigt wurde. (201)

Wie in der Einleitung bereits beschrieben existieren noch weitere Faktoren, die eine wichtige Rolle für die Höhe der Homocysteinspiegel spielen können.

Nikotinkonsum

Es gilt als gesichert, dass das Genussgift Nikotin einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung einer IUGR sowie zahlreicher weiterer Schwangerschaftskomplikationen wie z.B. Frühgeburtlichkeit, Entzugserscheinungen nach der Geburt, Entwicklungsverzögerungen, u.a. haben kann. (219)

In zahlreichen anderen Studien an Erwachsenen konnte jedoch auch eine Beeinflussung der Homocystein-Konzentrationen durch Nikotinkonsum nachgewiesen werden.

Piyathilake et al konnten in ihrer Studie aus dem Jahre 1994 deutlich höhere Homocysteinkonzentrationen bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern beobachten. (155)

In wieweit ein mütterlicher Nikotinkonsum einen Einfluss auf die Höhe der kindlichen Homocysteinkonzentrationen nehmen kann, wurde bisher nur unzureichend untersucht.

Im Rahmen unserer Datenerhebungen wurde daher der mütterliche Nikotinkonsum während der Schwangerschaft ebenfalls erfragt und dokumentiert wurde.

In unserem Gesamtkollektiv zeigte sich ein Nikotinkonsum während der Schwangerschaft bei 28 Frauen (18,8%) im Vergleich zu 121 Nichtraucherinnen (81,2%).

Bei einer Aufteilung in die beiden Untergruppen erhält man einen Anteil von 14 Raucherinnen (42,2 %) in der Gruppe der wachstumsretardierten Kinder im Vergleich zu 11 Nichtraucherinnen (33,3%) in dieser Gruppe.

In der Gruppe der eutrophen Frühgeborenen ergab sich eine Gesamtzahl von 14 Raucherinnen (12,1%) und 102 Nichtraucherinnen (87,9%).

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit den Resultaten vieler anderer Forschungsgruppen, die einen deutlich höheren Anteil an rauchenden Müttern unter der Gruppe der Kinder mit einer IUGR im Vergleich zu eutrophen Frühgeborenen zeigen. Ein mütterlicher Nikotinkonsum kann also auch in unserer Studie als eindeutiger Risikofaktor für die Entstehung einer IUGR angesehen werden. Chen et al beschreiben sogar in ihrer Veröffentlichung aus dem Jahre 2007 eine eigene Unterform der IUGR als „nicotine-induced IUGR“ im Zusammenhang mit mütterlichem Nikotinkonsum. (26)

Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss einer Nikotinexposition während der Schwangerschaft auf die Homocystein-Spiegel im Nabelschnurblut unserer Frühgeborenen.

Statistische Berechnungen hierzu ergaben einen knapp nicht signifikanten Zusammenhang (p-Wert 0,062), so dass davon auszugehen ist, dass auch in unserem Kollektiv die Nikotinexposition eine Rolle spielt, der Einfluss jedoch nicht signifikant ist.

Aus einigen vorhergehenden Studien ist bekannt, dass Nikotin einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Homocysteinkonzentrationen hat und dass die Homocystein-Serumkonzentrationen bei Rauchern häufig höher liegen als bei Nichtrauchern.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist der negative Effekt von Nikotin auf die Folsäurekonzentration, die mit zunehmendem Nikotinkonsum immer weiter abfällt. (123)

Diesen negativen Effekt konnten wir in unserem Kollektiv ebenfalls nachweisen. Die durchschnittlichen Folsäurekonzentrationen im Nabelschnurblut lagen bei Frühgeborenen, deren Mütter während der Schwangerschaft Nikotin konsumiert hatten, mit 10,28 ng/ml [4,74-21,98] deutlich unter den Plasma-Spiegel derer, die keiner Nikotinexposition ausgesetzt waren (13,93 ng/ml [5,75-39,65]).

Ein Vergleich der Mittelwerte dieser beiden Gruppen, erbrachte einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,001).

Weitere Ursachen für die niedrigeren Folsäurekonzentrationen bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern werden auch in der generell schlechteren Ernährungssituation von Rauchern, der geringeren Aufnahme von Vitaminen und Antioxidantien, sowie einer negativen Beeinflussung einiger Stoffwechselschritte und -enzyme durch Nikotin gesehen. (232, 195)

Geschlecht

Neben den genannten Einflussfaktoren auf den Homocysteinspiegel scheint auch das Geschlecht des Probanden eine entscheidende Rolle zu spielen.

Einige Autoren konnten deutliche Unterschiede in der Höhe der Homocysteinkonzentrationen zwischen gleichaltrigen Männern und Frauen nachweisen.

So gehen Lussier-Cacan et al. von einer um ca. 21% höheren Homocysteinkonzentration bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Individuen aus. (118, 113)

Die Ursachen für diese Differenzen konnten bisher nicht ausreichend geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass sowohl die bei Männern niedrigere Östrogen-Konzentrationen, als auch die gleichzeitig höheren Testosteron-Spiegel im Vergleich zu weiblichen Individuen eine Rolle spielen könnten.

Für Kinder bzw. Frühgeborene existieren hierzu bisher nur sehr wenige Daten.

Eine Untersuchung an 3524 US-amerikanischen Kindern des gleichen Alters aus dem Jahre 1999 ergab analog zu den Ergebnissen für Erwachsene für die Mädchen signifikant niedrigere Homocysteinkonzentrationen im Vergleich zu den Jungen. (146)

Eine Erklärung für die ebenfalls unterschiedlichen Konzentrationen bei Kindern analog zu Erwachsenen konnte bisher noch nicht gefunden werden.

Bei Betrachtung unseres Kollektives konnte ein Median der Homocysteinkonzentrationen von 5,58 $\mu\text{mol/l}$ [2,43-15,27] für die männlichen und ein Median von 5,86 $\mu\text{mol/ml}$ [1,92-11,29] für die weiblichen Frühgeborenen ermittelt werden.

Ein Vergleich der Mittelwerte ergab einen knapp statistisch nicht signifikanten Zusammenhang (p-Wert 0,053) zwischen der Höhe der Homocysteinkonzentrationen und dem Geschlecht der Kinder, wobei der Mittelwert der männlichen Probanden mit

6,29 $\mu\text{mol/l}$ etwas größer als der Mittelwert der weiblichen Teilnehmer mit 6,24 $\mu\text{mol/l}$ war.

Unsere Ergebnisse zeigen demnach, analog zu anderen Forschungsgruppen, tendenziell höhere Homocysteinkonzentrationen bei männlichen Probanden.

Eine Erklärung hierfür könnten ebenfalls die unterschiedlichen Hormoneinflüsse auf männliche oder weibliche Frühgeborene mit deutlich erhöhter Testosteronbelastung und niedrigerer Oestrogenexposition bei den männlichen Individuen sein. (212)

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass ein Absinken der Oestrogenspiegel bei Frauen nach der Menopause zu einem Anstieg der Homocysteinkonzentration im Serum führt. (157, 2, 170)

Gestationsalter

Von Interesse war ebenfalls die Fragestellung, ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter der Frühgeborenen und der Höhe der Homocysteinkonzentrationen gibt.

Statistische Berechnungen hierzu ergaben einen Korrelationskoeffizient von 0,036 und ein p-Wert von 0,661, so dass davon auszugehen ist, dass kein linearer, bzw. signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und den Homocystein-Plasma-Konzentrationen der Frühgeborenen besteht.

Ein möglicher Zusammenhang wäre analog zu den steigenden Homocysteinspiegeln mit zunehmendem Lebensalter anzunehmen gewesen.

Dieser Anstieg mit zunehmendem Lebensalter wird von zahlreichen Autoren beschrieben. (125, 92, 188)

Als Ursache hierfür sehen Herrmann et. al. beispielsweise einen bei älteren Menschen häufiger zu beobachtenden Vitaminmangel. Zu diesen essentiellen Vitaminen zählen auch die wichtigen Cofaktoren im Homocysteinstoffwechsel wie Folsäure oder Vitamin B12. Auf Grund des Fehlens dieser Stoffe kann die Verstoffwechslung von Homocystein nicht regelrecht ablaufen und es kommt zu einem Anstieg der Homocysteinkonzentrationen. (77, 184)

Eine mögliche Erklärung für die fehlenden Unterschiede in der Höhe der Serumkonzentrationen in Korrelation zu den Schwangerschaftswochen in unserem Kollektiv ist unter Umständen unsere relativ kleine Fallzahl, oder auch die sehr engen

Einschlußkriterien, auf Grund deren nur Frühgeborene zwischen der 32. und der 37. SSW in die Studie aufgenommen wurden.

Weiterhin ist eine Mangelversorgung an notwendigen Vitaminen während der Schwangerschaft bei unseren Probanden eher nicht anzunehmen.

Arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft

Eine arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft gilt als gesicherter Risikofaktor für zahlreiche Schwangerschaftskomplikationen, sowie thromboembolische Komplikationen bei Mutter und Kind. (163, 140, 231, 4)

In zahlreichen Studien wird weiterhin ein Zusammenhang zwischen erhöhten Blutdruckwerten der Mütter während der Schwangerschaft und der Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung beschrieben. (35, 141)

Als ursächlich hierfür wird die durch die arterielle Hypertonie bedingte Entstehung einer Placentainsuffizienz gesehen, die zu einer Mangelversorgung des Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen führt. Hieraus resultiert wiederum eine Wachstumsretardierung des Feten.

Im Zusammenhang mit der Entstehung von thromboembolischen Komplikationen werden auch immer wieder erhöhte Homocystein-Plasma-Konzentrationen als ursächlicher Faktor diskutiert.

Pabinger et. al beschreiben beispielsweise ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. eine Präeklampsie bei Müttern mit erhöhten Homocysteinkonzentrationen. (151)

Eine andere Forschungsgruppe um Napolitani et. al konnte signifikant höhere Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut von Kindern nachweisen, deren Mütter Zeichen einer Präeklampsie und damit erhöhte Blutdruckwerte aufwiesen. (140)

Eine arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft wird auch von einigen weiteren Autoren als Ursache für erhöhte Homocysteinkonzentrationen bei den Neugeborenen angesehen. (217, 19)

Aufgrund dieser Sachlage war es auch für uns von Interesse zu untersuchen, ob in unserem Studienkollektiv ebenfalls ein Zusammenhang zwischen den Homocystein-Konzentrationen der Frühgeborenen und dem Vorliegen einer arteriellen Hypertonie bei den Müttern besteht.

Statistische Berechnungen hierzu ergaben einen signifikanten Unterschied (p-Wert 0,002) in der Höhe der Homocystein-Konzentrationen der Frühgeborenen zwischen der Gruppe mit mütterlichem Hypertonus und der Gruppe ohne arterielle Hypertonie. In der ersten Gruppe lagen die durchschnittlichen Homocystein-Spiegel bei 7,74 $\mu\text{mol/ml}$ [2,97-15,27] im Vergleich zu 5,4 $\mu\text{mol/ml}$ [1,92-12,18] in der zweiten Gruppe. Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich auch in unserem Kollektiv ein signifikanter Unterschied in den Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen in Abhängigkeit vom Vorliegen einer arteriellen Hypertonie bei den Müttern feststellen, mit deutlich höheren Homocysteinkonzentrationen bei den Frühgeborenen, deren Mütter erhöhte Blutdruckwerte während der Schwangerschaft aufwiesen.

Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Tatsache, dass gemäß den Ergebnissen einiger Autoren die Homocysteinkonzentration im Nabelschnurblut der Neugeborenen auf Grund der Filterfunktion der Placenta unter der Konzentration im mütterlichen Blut liegen. (121, 140)

In anderen Studien konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es bei Vorliegen einer Placentainsuffizienz zu deutlich erhöhten Homocysteinspiegeln bei den Neugeborenen kommt. Ursächlich hierfür ist die bei einer Störung der Placentafunktion ganz oder zumindest teilweise ausfallende Filterwirkung der Placenta, so dass sich kindliche und mütterliche Konzentrationen weitestgehend angleichen können. (140)

Des Weiteren ist bekannt, dass erhöhte Homocysteinkonzentrationen zu einer Schädigung des Gefäßendothels, ähnlich den Mechanismen bei der Arterioskleroseentstehung, führen können.

Über diese Gefäßschädigung kann einerseits analog zur Atherosklerose eine arterielle Hypertonie mit verursacht werden, was wiederum auf direktem Wege über die arterielle Hypertonie, oder auf indirektem Wege über die Homocysteinämie zur Entstehung einer Placentainsuffizienz beitragen kann. (171)

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass sowohl erhöhte mütterliche Homocysteinkonzentrationen, als auch eine arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft über die Entstehung einer Placentainsuffizienz zum Auftreten von erhöhten Homocysteinkonzentrationen bei den Neugeborenen führen können.

Von Interesse war weiterhin die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen, sowie der Höhe der Homocysteinkonzentrationen jeweils bei Frühgeborenen, deren Mütter eine arteriellen Hypertonie während der Schwangerschaft hatten, im Vergleich zu Müttern ohne erhöhte Blutdruckwerte.

Mittels der bivarianten Korrelation wurde der Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht der Kinder und den Homocystein-Plasma-Spiegeln ermittelt.

Für die Gruppe mit arteriellem Hypertonus der Mutter ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $-0,124$ und ein P-Wert von $0,485$.

Betrachtungen der zweiten Gruppe hingegen ergaben einen Korrelationskoeffizienten von $0,136$ und einen p-Wert von $0,150$.

Aufgrund der ermittelten Daten ist in beiden Gruppen kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Homocysteinkonzentrationen und dem Geburtsgewicht der Kinder erkennbar.

In der Gruppe mit der arteriellen Hypertonie zeigt sich jedoch ein eindeutig negativer Trend (Korellationskoeffizient $-0,124$) im Sinne vom Auftreten von tendenziell höheren Homocysteinkonzentrationen bei Frühgeborenen mit niedrigerem Geburtsgewicht.

6.2.3. Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen

Das Geburtsgewicht hat einen entscheidenden Einfluss, sowohl auf die perinatale als auch auf die postnatale Mortalität und Morbidität der Neugeborenen. (132, 228, 34)

Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass Erkrankungen aus dem Formenkreis des Metabolischen Syndroms mit dem Geburtsgewicht assoziiert sind.

Neben einem sehr niedrigen Geburtsgewicht konnte jedoch auch für ein hohes Gewicht bei der Geburt ein Zusammenhang mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter nachgewiesen werden.

Ein weiteres Problem unmittelbar nach der Geburt stellen bei den hypotrophen Kindern häufig schwere Anpassungsstörungen dar, die einer stationären, häufig sogar einer intensivmedizinischen Behandlung bedürfen. Hiervon besonders betroffen sind Kinder mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht (<1500g).

(35, 127, 152, 14)

Zu den relevanten Anpassungsstörungen zählen vor allem Hyperbilirubinämie, Hypoglykämien, Hypothermie, Polyzythämie, Apnoeepisoden, intraventrikuläre Hämorrhagien, neonatale Sepsis, nekrotisierende Enterokolitis und Folgeerkrankungen des Atemnotsyndroms, wie z.B. die bronchopulmonale Dysplasie.

Des Weiteren werden bei diesen Kindern signifikant häufiger neurologische Auffälligkeiten, sowie kognitive Defekte beobachtet, die oft auch in der späteren Entwicklung noch nachweisbar sind. *(34, 168, 167, 14, 63, 132, 90, 98)*

Neben der Morbidität ist bei diesen Kindern jedoch auch eine erhöhte Mortalitätsrate zu beklagen. *(35, 127, 152, 228, 34)*

Crombach et al gehen beispielsweise von einer Mortalität von 2-4% in der Gruppe der Neugeborenen mit einer IUGR aus, die damit deutlich über der Mortalität eutropher Neugeborener liegt. *(35)*

Aber auch längerfristig gesehen ist, belegt durch zahlreiche Studien, davon auszugehen, dass das Geburtsgewicht einen starken Einfluss auf die spätere Entwicklung und Morbidität der Kinder hat.

Als Ursache hierfür wird eine intrauterine Adaptation des Feten in metabolischer, endokrinologischer und hämodynamischer Hinsicht an die Mangelversorgung während der Schwangerschaft angesehen. Alle diese Veränderungen sind darauf ausgelegt, dem Feten ein Überleben in einer suboptimalen Umgebung zu sichern.

Die genannten, bereits intrauterin stattfindenden Anpassungen des Feten in endokrinologischer, metabolischer und hämodynamischer Hinsicht, werden auch für das häufige Auftreten von postnatalen Anpassungsstörungen bei Kindern mit einer IUGR verantwortlich gemacht.

Vorreiter der Theorie der Beeinflussung der Morbidität im Erwachsenenalter durch eine IUGR war die Forschungsgruppe um Barker et al, die 1989 in einer retrospektiven, epidemiologischen Studie aus England erstmals einen Zusammenhang zwischen einer Wachstumsretardierung in der Fetalzeit und einer erhöhten Sterblichkeitsrate an kardiovaskulären Erkrankungen im Erwachsenenalter beschrieben. (7)

Es wird davon ausgegangen, dass ein gestörtes intrauterines Wachstum und ein niedriges Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Insulinresistenz mit nachfolgendem Diabetes, mit einem hohen Blutdruck, sowie mit pathologischen Werten der Blutfette und den daraus entstehenden kardiovaskulären und endokrin-metabolischen Erkrankungen assoziiert sind.

Als Ursache hierfür wird eine bereits intrauterin stattfindende metabolische und autonome Fehlprogrammierung von Hormon- und Stoffwechselfvorgängen angenommen, die zu einer Hormonresistenz mit den genannten Folgen führen kann. (230, 68, 9)

Dieser Zusammenhang wird als Barker-Hypothese bezeichnet und konnte seit seiner Erstbeschreibung durch die Forschergruppe um David Barker in zahlreichen Studien und Tiermodellen belegt werden. Der Pathomechanismus ist jedoch bisher weiterhin unklar. (8, 11, 10,9)

Die Barker-Hypothese ist als ein Teil der Theorie des „fetal programming“ anzusehen, die bereits in den 70iger und 80iger Jahren vor allem anhand von zahlreichen Tierversuchen aufgestellt wurde.

Nach dieser Theorie werden durch sehr früh in der intrauterinen Entwicklung einwirkende Faktoren entscheidende endokrine und metabolische Regelkreise verstellt, oder die Synthese von Proteinen und Zellen gestört und so die „Sollwerte“ für das spätere Leben „umprogrammiert“ .

Diese Sollwertverstellung führt in den meisten Fällen nicht unmittelbar zum Ausbruch einer Erkrankung, sondern erst im Laufe des weiteren Lebens durch die zusätzliche Einwirkung von zahlreichen Co-Faktoren. (8, 9, 10)

Interessant ist auch das Ergebnis einer Studie von Barker et al aus dem Jahre 1993. In dieser Studie analysierte die Forschungsgruppe die Daten von 1586 Männern, die zwischen 1907 und 1924 in Sheffield geboren wurden und von denen Angaben zum Geburtsgewicht, zur Körperlänge und zum Schwangerschaftsalter bei Geburt vorlagen. (10)

Als Resultat dieser Analysen zeigte sich ein deutlich höheres Risiko für eine koronare Herzkrankheit bei den Männern, die bei der Geburt eine IUGR aufwiesen. Bei dem Teil der Probanden, die bei der Geburt zwar ebenfalls ein zu niedriges Geburtsgewicht zeigten, das jedoch in Relation zu der Schwangerschaftswoche als durch die Frühgeburt bedingt einzustufen ist, zeigte sich hingegen kein erhöhtes Risiko. Auf Grund dieser Ergebnisse muss man davon ausgehen, dass nicht das Geburtsgewicht alleine, sondern vor allem die Situation in utero für die spätere Morbidität entscheidend ist. (10)

Neben dem erhöhten Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu versterben beschreiben einige Autoren weiterhin ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer arteriellen Hypertonie bei hypotrophen Neugeborenen im Vergleich zu eutrophen Neugeborenen. (81)

Huxley et al überprüften beispielsweise in einer Metaanalyse aus dem Jahre 2000 das Geburtsgewicht und die Blutdruckwerte zu verschiedenen Altersstufen bei über 440000 Menschen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich eine inverse Korrelation des Blutdrucks mit dem Geburtsgewicht. Eine Zunahme des Geburtsgewichts um 1 kg war mit einer Abnahme des Blutdrucks um 2 mmHg im Mittel verbunden. Auf Grund dieser Ergebnisse schlussfolgerten Huxley et al, dass sich unter Menschen, die mit einer IUGR geboren wurden in späterem Lebensalter deutlich häufiger eine arterielle Hypertonie entwickelt als bei eutrophen Neugeborenen. (81)

Zu klären bleibt in diesem Fall jedoch die Frage ob wirklich das intrauterine Milieu alleine ausschlaggebend für die Entstehung der arteriellen Hypertonie ist, oder ob auch in diesem Falle sozioökonomische Faktoren, Ernährungsgewohnheiten, genetische Veranlagungen und weitere Grunderkrankungen ebenso wie in der Normalbevölkerung hauptsächlich an der Entwicklung beteiligt sind und nur in der Studie nicht weiter analysiert wurden.

Neben dem gestörten intrauterinen Milieu wird von zahlreichen Autoren aber auch immer wieder die postnatale Situation als Einflussfaktor für die spätere Morbidität angeführt.

Ozanne et al konnten beispielsweise in einem Tierexperiment mit männlichen Mäusen insbesondere dann die Entstehung von kardiovaskulären Komplikationen bei den Jungtieren nachweisen, wenn auf eine Mangelernährung in utero durch eine Proteinrestriktion bei den Muttertieren, eine Überernährung in der Neonatalzeit folgte. (150)

Auch in zahlreichen weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass bei den Neugeborenen mit einer IUGR das Risiko an einer Erkrankung aus dem Formenkreis des Metabolischen Syndroms zu erkranken um so größer ist, wenn in den ersten Lebensmonaten und -jahren ein überproportionales Aufholwachstum stattfindet. (193)

Auf Grund dieser Ergebnisse muss man davon ausgehen, dass neben der intrauterinen Situation die postnatale Ernährung ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Morbidität von Neugeborenen mit einer IUGR hat und daher ein wichtiger Ansatzpunkt für präventive Maßnahmen darstellt.

Eine zu rasche Gewichtszunahme nach der Geburt („rapid early weight gain“) wurde von zahlreichen weiteren Forschungsgruppen weiterhin als Risikofaktor für die Entstehung von Übergewicht im Erwachsenenalter sowie den bekannten metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen identifiziert. (156)

Ein möglicher Erklärungsansatz für die hohe Morbidität im Erwachsenenalter bei ehemaligen Neugeborenen mit einer IUGR besteht in einer bereits im Kindesalter nachweisbaren erhöhten Insulinresistenz, die zur Entwicklung eines späteren Diabetes mellitus Typ 2 führen kann.

Weiterhin wird vermutet, dass es durch die intrauterine Fehlprogrammierung zu einer Veränderung von zentralen Regulationsprozessen und der Ausbildung von weiteren Resistenzen z.B. gegenüber Sättigungssignalen (Leptin, Insulin) kommt.

Abgesehen davon geht man davon aus, dass es auf der endokrinologischen Ebene ebenfalls zu Veränderungen z.B. in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse kommt, die zu erhöhten basalen Cortisolwerten und

einer erhöhten Empfindlichkeit der Kinder gegenüber ACTH führen können. (193)

Abgesehen von den metabolischen und kardiovaskulären Folgen sind mittlerweile auch weitere mögliche Folgeerkrankungen Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte gewesen.

So konnte in großen epidemiologischen Studien beispielsweise gezeigt werden, dass Kinder mit einem gestörten intrauterinen Milieu ebenfalls ein signifikant höheres Erkrankungsrisiko für Mammacarcinome, sowie die Entwicklung einer Schizophrenie oder Depression haben. (84, 198)

Neben den genannten Erkrankungen wird von einigen Autoren weiterhin ein gehäuftes Auftreten von renalen Erkrankungen in der Folge einer IUGR beschrieben. (193)

So konnte bei jungen Erwachsenen mit ehemaliger IUGR gehäuft eine Mikroalbuminurie sowie eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im Anschluss an eine im Kindesalter relativ häufige IgA-Nephritis bei ehemals hypotrophen Neugeborenen gehäuft zu chronischen Verläufen mit Ausbildung einer chronischen Niereninsuffizienz kommt. In Tierexperimenten konnte eine verminderte Anzahl an Glomeruli mit kompensatorisch erhöhter glomerulärer Filtrationsrate pro Nephron bei Mäusenachkommen nachgewiesen werden, die einer intrauterinen Mangelsituation ausgesetzt waren. (193)

Neben den renalen Erkrankungen wird auch von einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von pulmonalen Erkrankungen in der Folge einer IUGR ausgegangen.

Alcazar et al vertreten beispielsweise die Theorie, dass es im Rahmen einer intrauterinen Wachstumsretardierung ebenfalls zu einer gestörten Lungenentwicklung kommt, die die Lungenstruktur nachhaltig schädigt. (1)

Folgen hiervon sind unmittelbar postpartal die Ausbildung eines Atemnotsyndroms mit häufiger Notwendigkeit einer interventionellen Beatmung sowie in der Folge die Ausbildung einer bronchopulmonalen Dysplasie.

Im Erwachsenenalter kommt es dann gehäuft zur Entstehung von obstruktiven sowie fibrotischen und inflammatorischen Atemwegserkrankungen. (1)

Ein direkter Beweis dieser Theorien am Menschen ist nach wie vor äußerst schwierig, da vor allem die Überprüfung des intrauterinen Milieus am Menschen kaum zu verwirklichen ist. Daher stammen ein Großteil der Daten aus Tierexperimenten und retrospektiven Studien und sind daher sicherlich nicht uneingeschränkt auf alle Neugeborenen oder sogar Frühgeborenen mit einer IUGR übertragbar. Auf Grund der aktuellen Studienlage besteht daher die dringende Notwendigkeit zur Durchführung weiterer Forschungsprojekte zu diesem Thema, um die Pathophysiologie weiter aufzuklären und eventuell präventive Maßnahmen abzuleiten zu können.

Ausgehend vom Geburtsgewicht und unter Beachtung des jeweiligen Gestationsalters erfolgt in der Literatur und der Praxis üblicherweise eine Einteilung der Neugeborenen in small for gestational age (SGA, Geburtsgewicht < 10. - 90. Percentile, appropriate for gestational age (AGA, Geburtsgewicht zwischen der 10. - 90. Percentile) und large for gestational age (LGA, Geburtsgewicht > 90. Percentile). Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde, gibt es zahlreiche Faktoren, die einen Einfluss auf die Höhe des Geburtsgewichtes und damit die Einteilung in die verschiedenen Gruppen nehmen können.

Insbesondere bei den zwei von uns untersuchten Gruppen von erstens Frühgeborenen mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung und zweitens eutrophen Frühgeborenen erscheint es daher von besonderem Interesse zu analysieren, welche Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf das Geburtsgewicht in unserem Kollektiv hatten und welches Merkmal in unserer Studie die größte Rolle spielte.

6.2.3.1. MTHFR-Polymorphismen

Ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im MTHFR-Gen und einer erhöhten Morbidität für kardiovaskuläre, sowie zahlreiche weitere Erkrankungen, wurde in zahlreichen Studien bereits beschrieben.

Von einigen Forschungsgruppen wurde aber auch eine Assoziation von genetisch bedingten Thrombophilien, wie z.B. Polymorphismen im MTHFR-Gen und Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise die Entstehung einer IUGR und

damit definitionsgemäß ein für das Gestationsalter zu niedriges Geburtsgewicht der Neugeborenen, diskutiert.

De Vries et. al berichten beispielsweise von einem signifikant gehäuften Auftreten von erhöhten Homocysteinkonzentrationen bei Frauen mit vorzeitiger Placentalösung, Totgeburten und intrauterinen Wachstumsretardierung verglichen zu der Normalbevölkerung. (42)

Andere Autoren sahen weiterhin Zusammenhänge zwischen Polymorphismen im MTHFR-Gen und der Entstehung von Aborten, Frühgeburtlichkeit, Präeklampsien und postpartalen Anpassungsstörungen (207, 66)

Diese Zusammenhänge werden in der Literatur jedoch insgesamt sehr kontrovers diskutiert und konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen zu diesem Thema stand die Fragestellung, ob der C667T oder der A1298C Polymorphismus im MTHFR-Gen einen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht unserer Studienteilnehmer hat.

6.2.3.1.1. C677T-Polymorphismus

Bei dem von uns untersuchten Kollektiv besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen.

Auch bei Betrachtung der beiden Subgruppen konnte weder eine signifikante Einflussnahme des Genotyps auf das Geburtsgewicht der eutrophen Frühgeborenen noch auf das Geburtsgewicht der hypotrophen Frühgeborenen nachgewiesen werden (IUGR: p-Wert 0,655; Non-IUGR: p-Wert 0,372).

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der bislang sehr kontroversen Datenlage aus anderen Studien, in denen z.T. eine Einflussnahme nachweisbar war, z.T jedoch auch kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnten.

So konnten Vulcic et al beispielsweise in ihrer Studie aus dem Jahre 2009 einen eindeutigen Zusammenhang zwischen homozygoten Trägern des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen und Schwangerschaftskomplikationen, sowie der Entstehung einer IUGR, aufzeigen. (214)

Während Claire Infante-Rivard et al in ihren Untersuchungen aus dem Jahre 2005 keine Assoziation zwischen genetischen Veränderungen in Thrombophiliegenen und dem Auftreten einer IUGR nachweisen konnten. (83)

Auf Grund der Ergebnisse unserer Analysen, sowie der aktuellen Datenlage, ist daher unwahrscheinlich, dass der C677T-Polymorphismus alleine eine entscheidende Rolle für die Entstehung einer IUGR spielt.

Denkbar erscheint jedoch, dass der Polymorphismus in Kombination mit weiteren Faktoren an der Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung maßgeblich beteiligt sein kann.

6.2.3.1.2. A1298C-Polymorphismus

Auch für den zweiten untersuchten Polymorphismus konnten wir keine signifikante Beziehung (p-Wert 0,957) zwischen dem Vorliegen des Polymorphismus und dem Geburtsgewicht der Probanden aufzeigen.

Auch bei einer Aufteilung unseres Kollektivs in Frühgeborene mit einer IUGR und eutrophe Frühgeborene konnte kein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden. (IUGR: p-Wert 0,094, Non-IUGR: p-Wert 0,881).

Diese Daten sind analog der Überlegungen zum C677T-Polymorphismus zu bewerten, zumal von den meisten Forschungsgruppen sowohl der C667T-Polymorphismus, als auch der A1298C-Polymorphismus untersucht wurden.

6.2.3.1.3. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorliegen einer der beiden Polymorphismen im MTHFR alleine in unserem Kollektiv keinen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen hat, folglich muss es andere Faktoren geben, die das Gewicht in unserer Studienpopulation stärker determinieren.

Als Einschränkung bei der Bewertung unserer Daten muss jedoch wiederum die geringe Fallzahl, sowie die hohe Rate an Mehrlingsschwangerschaften bedacht werden, auf Grund derer unsere Ergebnisse nicht uneingeschränkt übertragen werden können.

6.2.3.2. Homocystein-Spiegel

Neben den Polymorphismen im MTHFR-Gen wäre auch eine Einflussnahme der Homocystein-Spiegel auf das Geburtsgewicht der Kinder anzunehmen.

Vor allem durch die atherogen und thrombogene Potenz erhöhter Homocystein-Spiegel und die dadurch bestehende Möglichkeit der Ausbildung einer Placentainsuffizienz, ist eine Assoziation mit der Höhe des Geburtsgewichtes vor allem bei Frühgeborenen sehr gut vorstellbar.

Statistische Analysen unserer Daten ergaben für unser Kollektiv jedoch keine eindeutige Korrelation (Korrelationskoeffizient: 0,31) zwischen der Höhe der Homocysteinspiegel und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Forschungsgruppe um Claire Infante-Rivard. Diese gingen bei Ihren Untersuchungen aus dem Jahre 2003 davon aus, dass erhöhte mütterliche und kindliche Homocysteinkonzentrationen über eine Schädigung der Placenta zur Ausbildung einer intrauterinen Wachstumsretardierung beitragen können.

Aber auch diesem Team gelang es nicht ihre Vermutung durch signifikante Ergebnisse zu untermauern.

Auch wenn wir auf Grund unserer statistischen Berechnungen keinen Zusammenhang zwischen den Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen und der Entstehung einer IUGR nachweisen konnten, so würde ich dennoch nicht ausschließen, dass die Höhe der Homocystein-Plasmaspiegel entscheidend zur Entstehung einer IUGR beitragen kann.

Bei der Betrachtung unserer Ergebnisse sollte man weiterhin beachten, dass wir lediglich die kindlichen Homocysteinkonzentrationen bestimmt haben und diese normalerweise deutlich unter dem Wert der mütterlichen Spiegel liegen.

Um also eine genaue Analyse eines potentiellen Zusammenhanges zwischen diesen zwei Merkmalen korrekt durchführen zu können, bedarf es meiner Meinung nach der Bestimmung der mütterlichen und der kindlichen Konzentrationen, sowie einer exakten Beurteilung der Placentafunktion.

6.2.3.3. Verschiedene Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht

Wie aus der Literatur hinreichend bekannt ist, gibt es neben den bereits genannten Einflußgrößen weitere zahlreiche Faktoren, die das Geburtsgewicht von Neugeborenen beeinflussen können.

Am wichtigsten sind hierbei, neben der genetischen Veranlagung, die Frage nach dem Vorliegen von Mehrlingsschwangerschaften, dem Vorhandensein einer Placentafunktionsstörung, sowie kindlichen oder mütterlichen Erkrankungen.

Im Rahmen unserer Analysen waren dabei die Merkmale: Gestationsalter, Mehrlingsschwangerschaft, sowie mütterlicher Nikotinkonsum, mütterliche Folsäureeinnahme und arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft von besonderem Interesse.

Nach statistischen Berechnungen mittels der linearen Regressionsanalyse ergaben sich für unser Kollektiv lediglich signifikante Einflüsse bei folgenden Merkmalen: Gestationsalter der Frühgeborenen, Mehrlinge, Nikotinkonsum, sowie arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft.

Für die übrigen Parameter konnte bei unseren Studienteilnehmern keine signifikante Einflussnahme nachgewiesen werden.

Bei den Parametern, für die ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um die üblichen, aus zahlreichen Studien belegten Determinanten des Geburtsgewichtes von Früh- wie auch normalen Neugeborenen. Die signifikanten Einflussgrößen werden im Folgenden näher charakterisiert.

Gestationsalter:

Als wichtigste Einflussgröße auf das Geburtsgewicht eines Neugeborenen ist das Gestationsalter anzusehen. Dies wird unter anderem deutlich, wenn man sich die Definition einer IUGR nochmals vor Augen führt, die eine intrauterine Wachstumsrestriktion als ein für das jeweilige Gestationsalter zu niedriges Geburtsgewicht beschreibt.

Bei unseren statistischen Berechnungen ergab sich für das Gestationsalter in Schwangerschaftswochen ein p-Wert von 0,000 sowie einen Regressionskoeffizient Beta von 0,578.

Wie erwartet, stellt das Gestationsalter damit das Merkmal mit dem größten Einfluss auf das Geburtsgewicht unserer Frühgeborenen dar.

Diese Beziehung musste sich als signifikant herausstellen, da das Wachstum in utero proportional mit dem Gestationsalter erfolgt, und es somit in Abhängigkeit von dem jeweiligen Gestationsalter unter normalen Voraussetzungen zu einem bestimmten Geburtsgewicht kommt. Zur besseren Abschätzung existieren hierfür sogar Percentilenkurven, in denen das zu erwartende Geburtsgewicht in der jeweiligen Schwangerschaftswoche graphisch aufgezeichnet ist.

Mehrlingsschwangerschaft

Ebenfalls eine bekannte und häufig sehr große Wirkung auf das Geburtsgewicht der einzelnen Kinder entsteht im Falle des Vorliegens einer Mehrlingsschwangerschaft. Insbesondere bei Schwangerschaften mit mehr als 2 Feten wird der Einfluss immer größer und deutlicher.

Dies erklärt sich einerseits durch die engen Platzverhältnisse in utero und die damit nur geringeren Möglichkeiten zur körperlichen Entwicklung jedes einzelnen Feten im Vergleich zu einer Einlingsschwangerschaft.

Auf der anderen Seite werden Mehrlingsschwangerschaften aber auch häufiger zu einem früheren Zeitpunkt entbunden als Einlinge, so dass das Geburtsgewicht, das ja proportional mit dem Gestationsalter ansteigt, sich meistens physiologischer Weise noch auf einem niedrigeren Level befindet.

Ein weiterer Grund für das niedrigere Gewicht bei Mehrlingen können aber auch spezifische Komplikationen bei Mehrlingsschwangerschaften, wie beispielsweise das feto-fetale Transfusionssyndrom sein, das durch eine Überversorgung des einen und gleichzeitig Unterversorgung des anderen Feten zu sehr unterschiedlichen Geburtsgewichten der jeweiligen Kinder führen kann.

Im Falle unserer Analysen ergab sich für das Merkmal Vorliegen einer Mehrlingsschwangerschaft ein deutlich signifikanter Einfluss auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen (p-Wert 0,002).

Eine Regressionsanalyse zeigte weiterhin einen deutlich zu erkennenden Zusammenhang zwischen dem untersuchten Merkmal Mehrlingsschwangerschaft und dem Gewicht der Kinder (Beta 0,230).

Nikotinkonsum der Mutter während der Schwangerschaft:

Anhand der aktuellen Studienlage gilt es weiterhin als gesichert, dass ein mütterlicher Nikotinkonsum während der Schwangerschaft einen entscheidenden Einfluss auf das Geburtsgewicht der Kinder hat.

Neben der Beeinflussung des Geburtsgewichtes kann Rauchen zu einer ganzen Reihe von weiteren Schwangerschaftskomplikationen, wie beispielsweise vorzeitigem Blasensprung, vorzeitiger Plazentalösung, Placenta praevia oder Frühgeburt, führen. (78)

Windham et al beschreiben, sowohl für aktiven als auch für passiven Nikotinkonsum während der Schwangerschaft, einen signifikanten Einfluss auf ein niedriges Geburtsgewicht der Neugeborenen, auch auf die Entstehung zahlreicher weiterer damit assoziierter Komplikationen wird hingewiesen. (225)

Bei unseren statistischen Berechnungen ergab sich ein p-Wert von 0,009. Hiermit zeigte sich ein eindeutig signifikanter Zusammenhang zwischen dem mütterlichen Nikotinkonsum während der Schwangerschaft und der Höhe des Geburtsgewichtes unserer Frühgeborenen.

Diese Einflussnahme wird auch durch den Regressionkoeffizient Beta, der in diesem Fall bei 0,195 lag, bestätigt.

Einige Autoren gehen sogar soweit zu behaupteten, dass das Risiko für die Geburt eines IUGR-Kindes mit jeder Zigarette kontinuierlich ansteige.

Voigt et al beschreiben beispielsweise eine Zunahme an SGA-Kindern von 9,8 % bei Nichtraucherin, zu 15,9 % bei Frauen, die 1-5 Zigaretten pro Tag rauchen, bis hin zu 26,5% bei den Frauen, die mehr als 21 Zigaretten pro Tag konsumieren. (212)

Als ursächlich für die Entstehung einer IUGR unter Nikotinexposition in utero wird die Einwirkung von embryo- und fetotoxischen Substanzen auf das heranwachsende Kind gesehen.

Hösli et al berichten sogar von höheren Konzentrationen an Nikotin und an anderen mit dem Tabakrauch assoziierten toxischen Substanzen im Fruchtwasser, sowie im fetalen Kreislauf als im mütterlichen Serum. (78)

Eine weitere Erklärung für den Zusammenhang von Nikotinkonsum und einem niedrigen Geburtsgewicht liegt auch in der durch die giftigen Substanzen verursachten Placentaschädigung, die zu einer langfristigen Unterversorgung des Feten führt.

Arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft:

Eine arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft gilt mittlerweile als ein sicherer und bekannter Einflussfaktor auf das Geburtsgewicht der Neugeborenen. (163, 140, 231, 213, 4)

Als ursächlich hierfür wird die durch die arterielle Hypertonie bedingte Entstehung einer Placentainsuffizienz gesehen, die zu einer Mangelversorgung des Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen führt. Hieraus resultiert eine Wachstumsretardierung des Feten.

Aus diesem Grund war es für uns von großem Interesse zu untersuchen, ob in unserem Kollektiv, das im Gegensatz zu anderen Studienansätzen nur aus Frühgeborenen bestand, eine signifikante Beeinflussung des Geburtsgewichtes unserer Probanden durch eine vorhandene mütterliche Hypertonie ebenfalls nachzuweisen war.

Statistische Berechnungen hierzu ergaben für dieses Merkmal einen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen (p-Wert 0,048, Regressionskoeffizient Beta 0,143).

Dieses Ergebnis war trotz der Spezialisierung unseres Kollektivs auf Frühgeborene zu erwarten, da vor allem Kinder, die vor der 37. SSW geboren werden, auf Grund ihrer altersbedingten Unreife stärker von den Komplikationen betroffen sind, die mit einer Wachstumsretardierung einhergehenden.

6.2.3.4. Zusammenfassung:

Zusammenfassend muss man also feststellen, dass in unserem Kollektiv nicht die vermuteten Merkmale den größten Einfluss auf das Geburtsgewicht unserer Probanden haben, sondern dass es vor allem das bekannte Merkmal Gestationsalter war, das den entscheidenden Einflussfaktor darstellt.

Ursächlich hierfür ist in meinen Augen die Tatsache, dass in unserem Kollektiv nur Frühgeborene eingeschlossen wurden, die per se ein niedriges Gestationsalter haben.

Da die Entwicklung der Kinder in utero und insbesondere deren Gewichtszunahme sich proportional zum Gestationsalter verhält, erscheint es logisch, dass Kinder mit einer niedrigeren Anzahl an Schwangerschaftswochen auch das niedrigere Geburtsgewicht aufweisen.

Vermutlich spielen in unserem Kollektiv, und vor allem in der von uns untersuchten Entwicklungsphase, andere Faktoren nur eine untergeordnete Rolle, die durch den signifikanten Einfluss des Geburtsgewichtes fast vollständig überlagert werden.

Bei Betrachtung der einzelnen Einflussgrößen auf das Geburtsgewicht der Studienteilnehmer muss man feststellen, dass einige dieser Faktoren eindeutig vermeidbar wären und ein Teil der anderen Faktoren sich durch präventive Maßnahmen sicher positiv beeinflussen lassen würde.

Das Hauptaugenmerk zur Minimierung der Anzahl von Neugeborenen mit zu niedrigem Geburtsgewicht sollte daher auf präventiven Strategien zur Reduktion von eindeutigen Risikofaktoren wie Rauchen, Alkohol oder psychischen Stress liegen. Weiterhin sollte eine optimale Überwachung der Schwangeren erfolgen, um entsprechende Risikoschwangerschaften und Risikofaktoren frühzeitig zu erkennen und die Entwicklung einer fetalen Schädigung damit verhindern zu können.

6.2.4. Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR in unserem Kollektiv

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass unter Frühgeborenen ein erhöhter Anteil an Kinder mit einer IUGR zu finden ist. (35, 61)

Lackmann et.al. gehen in ihrer Publikation aus dem Jahre 2001 beispielsweise von einem um das 2- 3 fach erhöhten Risiko für das Auftreten einer IUGR bei Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen aus. (107)

Es gibt zahlreiche Faktoren, die zur Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung beitragen können.

Hierbei kann zwischen mütterlichen und kindlichen Einflussfaktoren unterschieden werden.

Von besonderem Interesse für unsere Untersuchungen waren, wie schon bei den Analysen zu den Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht der Frühgeborenen, die zwei Polymorphismen im MTHFR-Gen, die kindliche Homocysteinkonzentration im Nabelschnurblut, sowie das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie der Mutter und eines mütterlichen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft.

6.2.4.1. MTHFR-Polymorphismen

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten bisher einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen verschiedener Thrombophilien und der Entstehung einer Placentainsuffizienz mit nachfolgender IUGR nachweisen. (42, 207, 66)

In der Literatur wird bisher jedoch kontrovers diskutiert, in wieweit die einzelnen Thrombophilien zu dieser Entwicklung beitragen.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch eine Studie von Kupferminc et al aus dem Jahre 1999. In dieser Untersuchung wurden 110 Frauen mit schwerwiegenden Schwangerschaftskomplikationen, wie Präeklampsie, intrauteriner Fruchttod, vorzeitige Placentallösung und IUGR, auf das Vorliegen einer Thrombophilie untersucht. Es gelang dabei bei 50 % der Frauen, deren Kinder eine IUGR (n=54) zeigten, eine genetische Mutation für eine Thrombophilie nachzuweisen. (106)

Thema der mannigfachen Diskussionen sind unter anderem auch mehrere Polymorphismen im MTHFR-Gen, von denen wir in unseren Analysen die 2 häufigsten, den C677T und den A1298C, Polymorphismen untersuchten.

6.2.4.1.1. MTHFR-Polymorphismus C677T

Wie bereits bei den Analysen zum Geburtsgewicht der Frühgeborenen deutlich wurde, ist die Datenlage zum Einfluss der MTHFR-Polymorphismen auf das intrauterine Wachstum und damit das Geburtsgewicht sehr kontrovers.

Für den C677T-Polymorphismus konnten daher einige Autoren eine Assoziation mit der Entstehung einer IUGR nachweisen. (207, 66, 214)

Andere Forschungsgruppen gehen jedoch davon aus, dass homozygote Merkmalsträger kein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung zeigen. (83)

Statistische Analysen an unserem Studienkollektiv konnten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang (p -Wert 0,197) zwischen dem Auftreten des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen und dem Vorliegen einer IUGR unter unseren Frühgeborenen nachweisen.

Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Genotypen (Wildtyp, homo- und heterozygote Merkmalsträger) zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen festgestellt werden.

6.2.4.1.2. A1298C Polymorphismus

Auch für den zweiten von uns untersuchten Polymorphismus ist die Datenlage in der Literatur, analog zu den Analysen bezüglich des Geburtsgewichtes, bisher sehr kontrovers.

Während einige Autoren von einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer IUGR bei Vorliegen des Polymorphismus ausgehen, sehen andere Forschungsgruppen keine eindeutigen Zusammenhänge.

Vergleichbar mit den zuletzt genannten Gruppen sind auch unsere aktuellen Ergebnisse.

Die statistische Analyse der Daten unserer Studienteilnehmer zeigen ebenfalls keine signifikante Einflussnahme des A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen auf die Entstehung einer IUGR in unserem Kollektiv.

Weiterhin konnte auch für diesen Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Genotypen (Wildtyp, homo- oder heterozygoter Merkmalsträger) zwischen Frühgeborenen mit einer IUGR und eutrophen Frühgeborenen nachgewiesen werden.

6.2.4.1.3. Beurteilung

Unter Beachtung der gesamten Ergebnisse und der aktuellen Studienlage ist davon auszugehen, dass genetische Faktoren, wie beispielsweise die untersuchten

Polymorphismen im MTHFR-Gen, alleine nicht zur Entstehung einer IUGR ausreichen.

Vielmehr scheint es sich bei unseren Probanden um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln, das schließlich zur Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung geführt hat.

Einige Autoren vertreten jedoch auch die Ansicht, dass die Veränderungen des Gens alleine nicht ausreichend sind, um zur Entstehung einer IUGR beizutragen, sollte es jedoch bedingt dadurch zu einer Erhöhung der Homocysteinkonzentration kommen, so kann die Kombination durchaus die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung fördern. (13, 106)

6.2.4.2. Weitere Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR in unserem Kollektiv

Zur Unterstützung unserer Theorie vom multifaktoriellen Geschehen der Entstehung einer IUGR untersuchten wir einige weitere Faktoren, die gemäß der aktuellen Studienlage verdächtigt werden, zur Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung beitragen zu können.

Die von uns untersuchten Merkmale waren hierbei das Geschlecht der Frühgeborenen, das Gestationsalter, das Vorliegen einer Mehrlingsschwangerschaft, sowie mütterlicher Nikotinkonsum während der Schwangerschaft, eine mütterliche Folsäureeinnahme und ein arterieller Hypertonus der Mutter während der Schwangerschaft.

Weiterhin wurde die Höhe der kindlichen Homocystein- und Folsäure-Plasma-Spiegel auf ihren Beitrag zur Entstehung einer IUGR untersucht.

Ein signifikanter Einfluss auf die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung ließ sich hierbei jedoch nur für die Merkmale mütterlicher Nikotinkonsum während der Schwangerschaft, arterielle Hypertonie der Mütter während der Schwangerschaft, sowie die Homocysteinkonzentration im Nabelschnurblut der Frühgeborenen ermitteln.

Auf diese Einflussfaktoren wird daher im Folgenden näher eingegangen.

Nikotinkonsum während der Schwangerschaft

Ein signifikanter Einfluss (p-Wert 0,01) auf die Entstehung einer IUGR zeigte sich, wie zu erwarten war, für den mütterlichen Nikotinkonsum während der Schwangerschaft.

Gemäß unseren statistischen Analysen ist das Risiko für die Entstehung einer IUGR in unserem Kollektiv bei Raucherinnen um 20% größer als bei Nichtraucherinnen (OR 0,204).

Diese Assoziation war angesichts der aktuellen Studienlage zu erwarten. Eine Nikotinexposition während der Schwangerschaft gilt mittlerweile als einer der Haupteinflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR in den zivilisierten Ländern. (78) Ursächlich hierfür dürfte wie bei der Beeinflussung des Geburtsgewichtes durch Rauchen ebenfalls die Schädigung des Feten durch toxische Stoffe sowie die Förderung der Entstehung einer Placentainsuffizienz durch Zigarettenrauchen und damit eine Mangelversorgung des Feten sein. (212, 225, 78)

Arterielle Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft

Ein weiterer, durch zahlreiche Studien belegter Risikofaktor für eine erhöhte Rate an kindlichen Wachstumsretardierungen, stellt das Vorliegen eines mütterlichen Hypertonus während der Schwangerschaft dar. (35, 141)

Der Pathomechanismus in diesem Falle läuft über eine Schädigung der PlacentaerfäÙe, bedingt durch die arterielle Hypertonie, bis zur Entstehung einer Placentainsuffizienz, die schließlich in einer Minderversorgung des Fötus endet und damit die Entstehung einer IUGR fördert. (163,140, 4, 231)

Für unser Kollektiv zeigte sich in der logistischen Regressionsanalyse ein signifikanter Zusammenhang (p-Wert 0,009) zwischen dem Vorliegen einer mütterlichen arteriellen Hypertonie während der Schwangerschaft und der Entstehung einer IUGR.

Weiterhin ergab sich für Kinder, deren Mütter einen arteriellen Hypertonus zeigten, ein um 20% höheres Risiko eine IUGR zu entwickeln im Vergleich zu Frühgeborenen, deren Mütter normale Blutdruckwerte zeigten (OR 0,208).

Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut der Frühgeborenen

Erhöhte Homocysteinkonzentrationen gelten als gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankung sowie thromboembolischen Komplikationen.

Durch zahlreiche Forschungsgruppen konnte mittlerweile auch ein Zusammenhang zwischen erhöhten mütterlichen Homocysteinkonzentrationen und der Entstehung einer Präeklampsie belegt werden. (38)

Als Ursache hierfür werden meistens eine Kombination aus endothelialer Dysfunktion und Ausbildung einer Placentainsuffizienz angeführt.

Die Datenlage bezüglich einer Assoziation zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen und der Ausbildung einer IUGR ist bisher sehr uneinheitlich. Ein Problem bei der Interpretation dieser Ergebnisse stellt zusätzlich die Tatsache dar, dass in den vorliegenden Studien meistens eine Analyse der mütterlichen Homocysteinkonzentrationen stattgefunden hat und diese im Verlauf einer Schwangerschaft physiologischerweise abfallen.

Weiterhin existieren für Schwangere keine Normwerte bezüglich der Plasmakonzentration, so dass eine Hyperhomocysteinämie in der Schwangerschaft nur sehr ungenau zu definieren ist. (64)

Einige andere Autoren wie Bo Lindblad et al gehen davon aus, dass eine erhöhte Homocysteinkonzentration erst bei gleichzeitig erniedrigter Folatkonzentration zur Ausbildung einer IUGR beitragen kann. (115)

Einen anderen Aspekt beschreibt die Forschungsgruppe um Claire Infante-Rivard in einer Arbeit aus dem Jahre 2003, in der gezeigt werden konnte, dass die Kinder der Mütter mit den höheren Homocysteinkonzentrationen tendenziell höhere Geburtsgewichte aufwiesen. Diese Feststellung würde einen Zusammenhang zwischen einer Hyperhomocysteinämie der Mutter und der Entstehung einer IUGR widerlegen. (83)

Regressionsanalysen zur Ermittlung der signifikanten Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR an unserem Kollektiv ergab den Nachweis eines signifikanten Einflusses (p-Wert 0,028) der Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut der Frühgeborenen auf die Entstehung einer IUGR.

Das Odds Ratio lag in diesem Falle bei 1,336, d.h. eine Erhöhung der Homocysteinkonzentration um 1 $\mu\text{mol/ml}$ erhöht das Risiko für die Entstehung einer IUGR um 33,6 % bei unseren Probanden.

6.2.4.3. Zusammenfassung:

Überraschenderweise zeigte sich in unserem Kollektiv, dass die Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung bei unseren Frühgeborenen vor allem durch die Höhe der Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut der Kinder bestimmt wird. Mittels Regressionsanalysen konnte sogar gezeigt werden, dass bei unseren Probanden die Höhe der Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut den größten Einflussfaktor für die Entstehung einer IUGR darstellt.

Diese Ergebnisse sollten meiner Meinung nach nur mit Vorsicht betrachtet werden und können nicht auf alle Kollektive übertragen werden. Für unser Kollektiv sind sie jedoch als Norm anzusehen.

Weiterhin muss bedacht werden, dass es sich bei den von uns erhobenen Daten im Gegensatz zu den Ergebnissen der meisten anderen Forschungsgruppen um Homocysteinkonzentrationen im Nabelschnurblut von Frühgeborenen und nicht um mütterliche Konzentrationen handelt, so dass die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar sind.

Auf der anderen Seite muss jedoch auch wiederum unser relativ kleines Studienkollektiv mit lediglich 33 wachstumsretardierten Kindern bedacht werden, auf Grund dessen zwangsläufig eine nur sehr eingeschränkte Vergleichbarkeit mit anderen Studien mit deutlich mehr Teilnehmern entsteht.

Eine Erklärung für die Ergebnisse unserer Untersuchungen stellt meiner Meinung nach die Beschränkung unserer Probanden auf Frühgeborene dar.

Wie aus zahlreichen anderen Studien bereits bekannt ist, kommt es während der Schwangerschaft physiologischerweise zu einem Abfall der mütterlichen Homocysteinkonzentrationen antiproportional zur Anzahl der Schwangerschaftswochen. Weiterhin ist bekannt, dass sich die kindlichen Homocysteinkonzentrationen häufig an die Konzentrationen im mütterlichen Blut angleichen. (121, 140)

In Kenntnis dieser Sachverhalte erscheint es daher auch logisch, dass sich bei Betrachtung von Probanden mit einem niedrigeren Gestationsalter höhere

Homocysteinkonzentrationen ergeben, als eine Analyse der Homocysteinspiegel gegen Ende der Schwangerschaft oder bei Neugeborenen ergebenen würde. Die Beschränkung unseres Kollektiv auf Kinder mit einem Gestationsalter kleiner der 37. Schwangerschaftswoche ist also mit Sicherheit einer der Hauptgründe für die hohen Homocysteinkonzentrationen dieser Kinder.

Wie bereits erwähnt, kann es im Rahmen einer Hyperhomocysteinämie zu einer Störung der Placentafunktion bis hin zu einer Placentainsuffizienz kommen, die letztendlich entscheidend zur Entwicklung einer Wachstumsretardierung beitragen können. Dieser Sachverhalt stellt eine mögliche Erklärung des eindeutigen Zusammenhangs zwischen hohen Homocysteinkonzentrationen und dem Vorliegen einer IUGR in unserem Kollektiv dar.

An dieser Stelle muss jedoch erneut darauf hingewiesen werden, dass unsere Analysen nur an einer sehr kleinen Fallzahl und zusätzlich an einem gezielt ausgesuchten Kollektiv aus Frühgeborenen durchgeführt wurden, so dass unsere Ergebnisse mit Sicherheit nicht als allgemeingültig angesehen werden können.

Trotz den von uns gewonnenen Ergebnissen, sollte das Hauptaugenmerk zur Prävention der Entstehung einer intrauterinen Wachstumsretardierung auf den vielfach erforschten und gut bekannten Risikofaktoren, wie beispielsweise einem mütterlichen Nikotinkonsum während der Schwangerschaft oder mütterlichen Erkrankungen, z.B. dem Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, liegen.

In Bezug auf diese Einflussfaktoren sollte bereits relativ früh in der Schwangerschaft, idealerweise schon vor Entstehung der Schwangerschaft, durch breite Aufklärung sowie präventive Maßnahmen, einer Beeinflussung der Entwicklung des Kindes durch diese Faktoren entgegengewirkt werden.

Da eine vollständige und vor allem rechtzeitige Aufklärung aller Mütter nur sehr schwierig zu verwirklichen ist, sollte regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen während der Schwangerschaft ebenfalls sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Denn nur so ist es möglich, potentiell gefährdete Kinder möglichst frühzeitig zu identifizieren und durch rechtzeitiges Handeln und eine intensive Überwachung mögliche Schäden abzuwenden.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Alcazar A, Lendzian L, Dobner J, Schmiedl A, v.Hörsten S, Plank C, Dötsch J (2009) IUGR und Lunge: Risiko für eine gestörte Lungenentwicklung und Prädisposition für inflammatorische und profibrotische Erkrankungen. 7. interdisziplinärer SGA-Workshop 26.-27.6.2009 Kloster Schöntal
- (2) Anderson JL, King GJ, Thomson MJ, Todd M, Bair TL, Muhlestein JB, Carlquist JF (1997) A mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with increased risk for coronary artery disease or myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 30: 1206-1211
- (3) Ashfield-Watt PA, Pullin CH, Whiting JM, Clark ZE, Moat SJ, Newcombe RG, Burr ML, Lewis MJ, Powers HJ, McDowell IF (2002) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype modulates homocysteine responses to a folate-rich diet or a low-dose folic acid supplement: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 180-186
- (4) Austgulen R (2004) Pre-eclampsia: associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age. *Journal of Reproductive Immunology* 61: 39-50
- (5) Bailey SM, Sarmandal P, Grant JM (1989) A comparison of three methods of assessing inter-observer variation applied to measurement of the symphysisfundal height. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 96: 1266-1271
- (6) Bangsow T, Huch R, Male D, Müller S (2002): Polymerase-Kettenreaktion In: SCHIMPF (Hrsg.): *Gentechnische Methoden Spektrum Akadem. Verlag Berlin Heidelberg*, S. 147-167
- (7) Barker DJ (1989) Weight in Infancy and Death from Ischämie Heart Disease. *The Lancet* 9: 577-580
- (8) Barker DJ, Godfrey KM (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938-941
- (9) Barker DJ, Hales Cn, Fall CHD, Osmond C, Phipps K (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67
- (10) Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA (1993) The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *British Medical Journal* 306: 422-426
- (11) Barker DJ (1997) The long-term outcome of retarded fetal growth. *Clinical Obstetrics & Gynecology* 40: 853-863
- (12) Baschat AA, Weiner CP (2000) Umbilical artery doppler screening for detection of the small fetus in need of antepartum surveillance. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 182: 154-158
- (13) Becker WH (2009) Frühe intrauterine Wachstumsretardierung bei maternalen Thrombophilie. *Metropole* 16: 626-627
- (14) Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlson A, Golan A (2000) Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182: 198-206
- (15) Blom HJ (1998) Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia. *European Journal of Pediatrics* 157: 131-134

- (16) Bostom AG, Lathrop L (1997) Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney International* 52: 10-20
- (17) Botto LD, Yang Q (2000) 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology* 151: 862-877
- (18) Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG (1995) A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *The Journal of the American Medical Association* 274:1049-1075
- (19) Braekke K, Ueland PM, Harsem NK, Karlsen A, Blomhoff R, Staff AC (2007) Homocysteine, cysteine, and related metabolites in maternal and fetal plasma in preeclampsia. *Pediatric Research* 62: 319–324
- (20) Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98: 2520-2526
- (21) Brock TD, Freeze H (1969): *Thermus aquaticus* gen.n. and sp.n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology* 98: 289-297
- (22) Calvert JP, Crean EE, Newcombe RG, Pearson JF (1982) Antenatal screening by measurement of symphysis-fundus height. *British Medical Journal* 285: 846-849
- (23) Carey MC, Donovan DE, FitzGerald O, McAuley FD (1968) Homocystinuria. I. A clinical and pathological study of nine subjects in six families. *The American Journal of Medicine* 45:7-25
- (24) Carson NA, Neill DW (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Archives of Disease in Childhood* 37: 505-513
- (25) Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B (1997) Human methionine synthase, cDNA cloning, gene localization, and expression. *Journal of Biological Chemistry* 272: 3628-3634
- (26) Chen M, Wang T, Liao Z, Pan X, Feng Y, Wang H (2007) Nicotine-induced prenatal overexposure to maternal glucocorticoid and intrauterine growth retardation. *Journal of Experimental and Toxicologic Pathology* 59: 245-251
- (27) Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996) S-Adenosylmethionine and methylation. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10: 471–480
- (28) Chien PF, Arnott N, Gordon A, Owen P, Khan KS; (2000) How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 107: 196-208
- (29) Cnattingius S, Haglund B, Kramer MS (1998) Differences in late fetal death rates in association with determinants of small for gestational age fetuses: population based cohort study. *British Medical Journal* 316: 1483-1487
- (30) Cook RJ, Wagner C (1984) Glycine N-methyltransferase is a folate binding protein of rat liver cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 3631–3634
- (31) Cortese C, Motti C (2001) MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition* 4: 493–497

- (32) Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F, de Garmo P (1990) Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. *Stroke* 21: 572-576
- (33) Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira FC (1996) Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63: 220-224
- (34) Crombach G, Tandu-Umbra B (2001) Intrauterine Wachstumsretardierung: Diagnostik und Management *Der Gynäkologe* 34: 42-54
- (35) Crombach G (2007) Intrauterine Wachstumsretardierung. *Der Gynäkologe* 40: 891-902
- (36) D.A.CH.-Liga Homocystein (2003): Consensus paper on the rational use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. Guidelines and recommendations. www.dach-liga-homocystein.org/Konsensus.htm
- (37) D'Angelo A, Selhub J (1997) Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 90: 1-11
- (38) D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Ientile R, Granese D, Narciso CS (2004) Plasma homocysteine in early and late pregnancies complicated with preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Acta Obstetrica et Gynaecologica Scandinavica* 83:155-158
- (39) De Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen R-P (1997) Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *European Journal of Clinical Nutrition* 51: 643-660
- (40) De Bree A, Verschuren WM, Bjorke-Monsen AL, van der Put NM, Heil SG, Trijbels FJ, Blom HJ (2003) Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *The American Journal of Clinical Nutrition* 77: 687-693
- (41) Dekker G (2007) Fetal prothrombotic genetic risk factors and fetal acquired risk factors for adverse perinatal outcome. *Thrombosis Research* 119: 1-96
- (42) De Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC (1997) Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *The British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 104:1248-1254
- (43) DorakMT (2006): Real-Time PCR. Veröffentlichung aus dem Internet: www.dorak.info/genetics/realtime.html
- (44) Duell PB, Malinow MR (2000) Homocysteine as a risk factor for coronary artery disease. In: Robinson K (ed) *Homocysteine and vascular disease* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 230: 173-202
- (45) Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D (2001) Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Laboratory Investigation* 81: 645-672
- (46) Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S (1999) Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Annals of Internal Medicine* 131: 363-375
- (47) Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels FJM, Blom HJ (1995) Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a

- cause of mild hyperhomocysteinemia. *American Journal of Human Genetics* 56:142-150
- (48) Fenollar F, Raoult D (2004): Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 112: 785–807
- (49) Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ (1990) Methionine metabolism in mammals. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 1: 228–237
- (50) Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *European Journal of Pediatrics* 157: 40–44
- (51) Födinger M, Buchmayer H, Heinz G, Papagiannopoulos M, Kletzmayer J, Rasoul-Rockenschaub S, Hörl WH, Sunder-Plassmann G (2000) Effect of MTHFR A1298C and MTHFR C677T genotypes on total homocysteine, folate and vitamin B(12) plasma concentrations in kidney graft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology* 11: 1918-1925
- (52) Födinger M, Buchmayer H, Heinz G, Papagiannopoulos M, Kletzmayer J, Perschl A, Vychytil A, Horl WH, Sunder-Plassmann G(2001) Association of two MTHFR polymorphisms with total homocysteine plasma levels in dialysis patients. *American journal of kidney diseases* 38: 77-84
- (53) Förster VT (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 2: 55-75
- (54) Fonseca V, Guba SC, Fink LM(1999) Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocrine Reviews* 20: 738-75
- (55) Foreman JW, Wald H, Blumberg G, Pepe LM, Segal S (1982) Homocysteine uptake in isolated rat renal cortical tubules. *Metabolism* 31: 613-619
- (56) Fortin LJ, Genest J (1995) Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clinical Biochemistry* 28: 155-162
- (57) Fowler B (1998) Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *European Journal of Pediatrics* 157: 60–66
- (58) Franchi F, Cetin I, Todros T, Antonazzo P, Nobile de Santis MS, Cardaropolo S, Bucciarelli P, Biguzzi E (2004) Intrauterine growth restriction and genetic predisposition to thrombophilia. *Haematologica* 89:444-449
- (59) Friedmann AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg ICH (2001) The kidney and homocysteine metabolism. *Journal of the American Society of Nephrology* 12: 2181-2189
- (60) Frosst P, Bloom H, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10: 111-113
- (61) Gagnon R (2003) Placental insufficiency and its consequences. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 110: 99-107
- (62) Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, Symonds EM (1992) Customised antenatal growth charts. *Lancet* 339: 283-287
- (63) Garite TJ, Clark R, Thorp JA (2004) Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191: 481-487
- (64) Geisel J (2009) Einfluss von Homocystein auf das intrauterine Wachstum. 7. interdisziplinärer SGA-Workshop 26.-27.6.2009 Kloster Schöntal

- (65) George N, Welch GN, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *The New England Journal of Medicine* 338: 1042-1050
- (66) Goddijn-Wessel TA, Wouters MG, van de Molen EF (1996) Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 66: 23-29
- (67) Goldenberg RL, Cliver SP (1997) Small for gestational age and intrauterine growth restriction: definitions and standards. *Clinical Obstetrics & Gynaecology* 40: 704-714
- (68) Gortner L, van Husen M, Landmann E (2001) Die Entwicklung des im Wachstum retardierten Neugeborenen. *Der Gynäkologe* 34: 1153-1115
- (69) Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1994) Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome* 9: 652-656
- (70) Graham I, Daly L, Refsum H, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Roulan FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andriai G (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *The Journal of the American Medical Association* 277: 1775-1781
- (71) Gregory JF 3rd. (2001) Case Study: folate bioavailability. *The Journal of Nutrition* 131: 1376-1382
- (72) Haram K, Sofland E, Bukowski R (2006) Intrauterine growth restriction. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 93: 5-12
- (73) Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW, McMaster D, Young IS, McCrum EE, Gey KF, Whitehead AS, Evans A (1996) The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 89: 571-577
- (74) Haviv YS, Shpichinetsky V, Goldschmidt N, Atta IA, Ben-Yehuda A, Friedman G (2002) The common mutations C677T and A1298C in the human methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Nephron Journals* 92: 120-126
- (75) Heid AC, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994
- (76) Heijer den M (2000) Homocysteine and venous thrombosis. In: Robinson K (ed) *Homocysteine and vascular disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 230: 239-252
- (77) Herrmann W, Schorr H, Bodis M, Knapp JP, Muller A, Stein G, Geisel J (2000) Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. *European Journal of Clinical Investigation* 30: 1083-1089
- (78) Hösl I, Zanetti-Daellenbach R, Holzgreve, Lapaire WO (2008) Rauchen in der Schwangerschaft. *Deutsche Zeitschrift für Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 68: 141-146
- (79) Hofbrand AV, Weir DG (2001) Historical Review: the history of folic acid. *British Journal of Haematology* 113: 579-589
- (80) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease

- activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 7276-7280
- (81) Huxley RR, Shiell AW, Law CM (2000) The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *The Journal of Hypertensive Disease* 18: 815–831
- (82) Infante-Rivard C, Rivard G-E, Wagner VY, Théoret Y (2002) Perinatal Reference Intervals for Plasma Homocysteine and Factors Influencing Its Concentration. *Clinical Chemistry* 48: 1100-1102
- (83) Infante-Rivard C, Rivard GE, Guiguet M, Gauthier R (2005) Thrombophilic Polymorphisms and Intrauterine Growth Restriction. *Epidemiology* 16: 281-287
- (84) Innes K, Byers T, Schymura M(2000) Birth characteristics and subsequent risk for breast cancer in very young women. *The American Journal of Epidemiology* 152: 1121–1128
- (85) Innis MA, Gelfand DH (1990): Optimization of PCRs In: Innis, Gelfand, Sninsky, White (Hrsg.): PCR Protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego: 1-11
- (86) Jacobsen DW (1993) Cardiovascular disorders (risk assessment). *Analytical Chemistry* 65: 367-373
- (87) Jacobsen DW (1998) Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry* 44: 1833–1843
- (88) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg ICH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in MTHFR and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93:7-9
- (89) Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg ICH (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *The New England Journal of Medicine* 340: 1449-1454
- (90) Jahn A, Razum O, Berle P (1998) Routine screening for intrauterine growth retardation in Germany: low sensitivity and questionable benefit for diagnosed cases. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 77: 643–648
- (91) Jones RA, Robertson NR (1986) Small for dates babies: are they really a problem? *Archives of Disease in Childhood* 61: 877-880
- (92) Joosten E, van den Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH (1993) Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *The American Journal of Clinical Nutrition* 58: 468–476
- (93) Kainz P (2000): The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1494: 23-27
- (94) Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalysyn J, Strokosch G (1988) Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *American Journal of Human Genetics* 43: 414–421
- (95) Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N (1991) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. *American Journal of Human Genetics* 48: 536-545
- (96) Kang SS, Wong PW, Malinow MR (1992) Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for occlusive vascular disease. *Annual Review of Nutrition* 12: 279-298

- (97) Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H (1993) Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 88: 1463-1469
- (98) Kean LH, Liu DT (1996) Antenatal care as a screening tool for the detection of small for gestational age babies in the low risk population. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 16: 77-82
- (99) Khoury MJ, Erickson JD, Cordero JF, McCarthy BJ (1988) Congenital Malformations and Intrauterine Growth Retardation: A Population Study. *Pediatrics* 82: 83-90
- (100) Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DC, Scott JM (1993) Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Oxford Journals of Medicine* 86: 703-708
- (101) Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG (2002) MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 288: 2023-2031
- (102) Kluijtmans LA, Blom HJ, Boers GH, van Oost BA, Trijbels, FJ, van den Heuvel LP (1995) Two novel missense mutations in the cystathionine beta synthase gene in homocystinuric patients. *Human Genetics* 96: 249-250
- (103) Kluijtmans LA, van den Heuvel LPWJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB, Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJM, Rozen R, Blom HJ (1996) Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular. *American Journal of Human Genetics* 58: 35-41
- (104) Kok JH, Lya den Ouden A, Verloove-Vanhorick SP, Brand R (1998) Outcome of very preterm small for gestational age infants: the first nine years of life. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 105: 162-168
- (105) Kramer MS, McLean FH, Olivier M, Willis DM, Usher RH (1989) Body proportionality and head and length 'sparing' in growth-retarded neonates: a critical reappraisal. *Pediatrics* 84: 717-723
- (106) Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB (1999) Increased frequency of the genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *The New England Journal of Medicine* 340: 9-13
- (107) Lackmann F, Capewell V, Richardson B, da Silva O, Gangnon R (2001) The risks of spontaneous preterm delivery and perinatal mortality in relation to size at birth according to fetal versus neonatal growth standards. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 184: 946-953
- (108) Lantz PG, Abu Al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Radstrom P (2000): Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnology Annual Review* 5: 87-130
- (109) Larasse C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankene F, Binoux M (1991) Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterin growth retardation. *Pediatric Research* 29: 219-225
- (110) Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H (1981) Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *British Medical Journal* 282: 1509-1511

- (111) Leblhuber F, Walli J, Widner B, Artner-Dworzak E, Fuchs D, Vrecko K (2001) Homocysteine and B vitamins in dementia. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 127-128
- (112) Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P (2003) International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age. *Pediatrics* 111: 1253-1261
- (113) Lien EA, Anker G, Looning PE, Refsum H, Ueland PM (1997) Effects of hormones on the plasma levels of the atherogenic amino acid homocysteine. *Biochemical Society Transactions* 25: 33-35
- (114) Lin CC, Su SJ, River LP (1991) Comparison of associated high-risk factors and perinatal outcome between symmetric and asymmetric fetal intrauterine growth retardation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 164:1535-1542
- (115) Lindblad B, Zaman S, Malik A, Martin H, Ekström AM, Amu S, Holmgren A, Norman M (2005) Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growthretarded fetuses. *Acta Obstetrica et Gynaekologica Scandinavica* 84: 1055-1056
- (116) Lindhard A, Nielsen PV, Mouritsen LA, Zachariassen A, Sørensen HU, Rosenö H (1990) The implications of introducing the symphyseal-fundal height-measurement. A perspective randomized controlled trial. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 97: 675-680
- (117) Linnebank M (2002) Molekulargenetische Untersuchungen zur Prävalenz und zum genetischen Hintergrund der klassischen Homocystinurie. Diss. med. Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- (118) Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J Jr. (1996) Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *The American Journal of Clinical Nutrition* 64: 587-593
- (119) Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R (1996) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 94: 2410-2416
- (120) Malinow MR, Rajkovic A, Duell PB, Hess DL, Upson BM (1998) The relationship between maternal and neonatal umbilical cord plasma homocysteine suggests a potential role for maternal homocysteine in fetal metabolism. *The American Journal of Obstetrics and Gynecology* 178: 228–233
- (121) Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM (1999) Homocysteine, diet, and cardiovascular disease. Statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 99: 178–182
- (122) Mangoni AA, Jackson SH (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *The American Journal of Medicine* 112: 556-565
- (123) Marszall M, Czarnowski W (2007) Smoking influence on the level of homocysteine and 5-methyltetrahydrofolic acid in active and non smokers *Przegląd Lekarski* 64: 685-688
- (124) Maulik D (2006) Fetal growth compromise: Definitions, standards, and classification. *Clinical Obstetrics & Gynecology* 49: 214–218

- (125) Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K (1996) Homocysteine and coronary atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 27: 517-527
- (126) McCaddon A, Hudson P, Davies G, Hughes A, Williams JH, Wilkinson C (2001) Homocysteine and cognitive decline in healthy elderly. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 12: 309-313
- (127) McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ (1999) Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *New England Journal of Medicine* 340: 1234-1238
- (128) McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM (1991) Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clinical Science* 81: 551-556
- (129) Mc Killip JL, Drake M (2004): Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *Journal of Food Protection* 67: 823-832
- (130) McKully KS (1993) Chemical pathology of homocysteine in Atherogenesis. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 23: 477-493
- (131) McKully KS (1996) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American Journal of Pathology* 56: 111-128
- (132) Meyberg R, Boos R, Babajan A, Ertan AK, Schmidt W (2000) Intrauterine growth retardation--perinatal mortality and postnatal morbidity in a perinatal center. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 204: 218-223
- (133) Miller HC, Hassanein K (1971) Diagnosis of impaired fetal growth in newborn infants. *Pediatrics* 48: 511-522
- (134) Mills JL, McPartlin JM, Kirke PD, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1995) Homocysteine Metabolism in Pregnancies Complicated by Neural-Tube Defects. *Obstetrical & Gynecological Survey* 50:576-577
- (135) Mongelli M, Wilcox M, Gardosi J (1996) Estimating the date of confinement: ultrasonographic biometry versus certain menstrual dates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 174: 278-281
- (136) Monsen ALB, Ueland PM (2003) Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *American Journal of Clinical Nutrition* 78:7-21
- (137) Mudd SH, Levy HL, Skovby F (1995) Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The metabolic and molecular basis of inherited Disease*, 7th. ed. Vol 1. New York: McGraw-Hill; 1279-1327
- (138) Müller H (1993) Determination of the folic acid content of grain, cereal products, baked goods and legumes using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 197: 573-577
- (139) Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51: 263-273
- (140) Napolitano PG, Wakefield CL, Elliott DE, Doherty DA, Magann EF (2008) Umbilical cord plasma homocysteine concentrations at delivery in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 48: 261-265
- (141) Neerhof MG (1997) Pregnancy in the chronically hypertensive patient. *Clinics in perinatology* 24: 391-406

- (142) Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK (2000) Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy Loss. *Obstetrics and Gynecology* 95: 519–524
- (143) Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK (2000) Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Human Reproduction* 15: 954–960
- (144) Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE (1997) Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine* 337: 230–236
- (145) Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE (1997) Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 65: 136-143
- (146) Osganian SK, Stampfer MJ, Spiegelman D, Rimm E, Cutler JA, Feldman HA, Montgomery DH, Webber LS, Lytle LA, Bausserman L, Nader PR (1999) Distribution of and Factors Associated With Serum Homocysteine Levels in Children. *The Journal of the American Medical Association* 281:1189-1196
- (147) Ott WJ (1988) The diagnosis of altered fetal growth. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 15: 237-63
- (148) Ounsted M, Moar V, Scott WA (1981) Perinatal morbidity and mortality in small-for-dates babies: the relative importance of some maternal factors. *Early Human Development* 5: 367-375
- (149) Owen P, Khan KS, Howie P (1999) Single and serial estimates of amniotic fluid volume and umbilical artery resistance in the prediction of intrauterine growth restriction. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 13: 415-419
- (150) Ozanne SE, Hales CN (2004) Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427: 411–412
- (151) Pabinger I (2008) Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Hamostaseologie* 28:130-134
- (152) Pallotto EK, Kilbride HW (2006) Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction. *Clinical Obstetrics & Gynecology* 49: 257–269
- (153) Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG (1995) Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet* 346: 1395-1398
- (154) Persson B, Stangenberg M, Lunell NO, Brodin U, Holmberg NG, Vaclavinkova V (2005) Prediction of size of infants at birth by measurement of symphysis fundus height. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 93: 206-211
- (155) Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL (1994) Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *The American Journal of Clinical Nutrition* 60: 559-566
- (156) Plagemann A, Harder T (2005) Premature birth and insulin resistance. *The New England Journal of Medicine* 352: 939–940
- (157) Podczeck-Schweighofer A (2005) Koronare Herzerkrankung bei Frauen. *Journal für Kardiologie* 12: 52-56
- (158) Pollack RN, Divon MY (1992) Intrauterine growth retardation: definition, classification and etiology. *Clinical Obstetrics & Gynaecology* 35: 99-107
- (159) Powers RW, Evans RW, Majors AK, Ojimba JI, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM (1998) Plasma homocysteine concentration is

- increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 179: 1605–1611
- (160) Prengler M, Sturt N, Krywawych S, Surtees R, Liesner R, Kirkham F (2001) Homozygous thermolabile variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a potential risk factor for hyperhomocysteinaemia, CVD and stroke in childhood. *Developmental medicine and child neurology* 43:220-225
- (161) Rajkovic A, Mahomed K, Rozen R, Malinow MR, King IB, Williams MA (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C T polymorphism, plasma folate, vitamin B12 concentrations, and risk of preeclampsia among black African women from Zimbabwe. *Journal of Molecular Genetic and Metabolism* 69: 33-39
- (162) Rappolee DA (1990) Optimizing the sensitivity of RT-PCR Amplifications. *A forum for PCR Users* 4: 5-7
- (163) Rath W (2009) Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Eine bedrohliche Erkrankung für Mutter und Kind von interdisziplinärer Bedeutung *Deutsche medizinische Wochenschrift* 134: 201-203
- (164) Reddy MN (1997) Reference ranges for total homocysteine in children. *Clinica Chimica Acta* 262: 153-155
- (165) Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM (1997) Assessment of homocysteine status. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 20: 286-294
- (166) Refsum H (2001) Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *British Journal of Nutrition* 85: 109-113
- (167) Regev RH (2003) Excess mortality and morbidity among small-for-gestational-age premature infants: a population-based study. *The Journal of Pediatrics* 143: 186-191
- (168) Reiss I, Landmann E, Heckmann M, Misselwitz B, Gortner L (2003) Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 269: 40-44
- (169) Resnik R (2002) Intrauterine growth restriction. *Clinical Obstetrics & Gynaecology* 99: 490-496
- (170) Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C, Stampfer MJ (1998) Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *The Journal of the American Medical Association* 279: 359-364
- (171) Robertson WB, Khong TY, Bronsens I (1986). The placental bed biopsy: Review from three European centers. *The American Journal of Obstetrics and Gynecology* 155: 401–412
- (172) Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I (1992) PCR: Clinical diagnostics and research. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York S. 1-10 und 53-57
- (173) Rosenberg K, Grant JM, Hepburn M (1982) Antenatal detection of growth retardation: actual practice in a large maternity hospital. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 89: 12-15
- (174) Rosenblatt DS (2000) Disorders of cobalamin and folate transport and metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G (eds) *Inborn metabolic diseases*, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York
- (175) Roth S, Chang TC, Robson S, Spencer JA, Wyatt JS, Stewart AL (1999) The neurodevelopmental outcome of term infants with different intrauterine growth characteristics. *Early Human Development* 55: 39-50

- (176) Rozen R (1996) Molecular genetic aspects of hyperhomocysteinemia and its relation to folic acid. *Clinical and Investigative Medicine* 19: 171–178
- (177) Sarmandal P, Grant JM (1989) Effectiveness of ultrasound determination of fetal abdominal circumference and fetal ponderal index in the diagnosis of asymmetrical growth retardation. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 97: 118-123
- (178) Schild TA (2002) 7700 SDS Workshop Manual , Version 2.1. Applied Biosystems GmbH Weiterstadt
- (179) Schneider JA, Rees DC, Liu YT, Clegg JB (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *American Journal of Human Genetics* 62: 1258-1260
- (180) Schneider H, Schneider KTM (1999) Intrauterine Wachstumsretardierung. In: Schneider H, Husslein P, Schneider KTM (Hrsg) *Geburtshilfe*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio 27: 511-553
- (181) Schneider KTM (1993) IUGR-Probleme der Diagnostik. In: Schmidt W (Hrsg) *Jahrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe 1992/93*. Biermann, Zülpich 113-123
- (182) Schneider KTM, Intrauterine Wachstumsretardierung, in Frühgeburt, Künzel and Wulf, Editors. 1997: München, Wien, Baltimore. 143-155
- (183) Secher NJ, Lundbye-Christensen S, Qvist I, Bagger P (1991) An evaluation of clinical estimation of fetal weight and symphysis fundal distance for detection of SGA infants. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 38: 91-96
- (184) Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg ICH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *The Journal of the American Medical Association* 270:2693-2698
- (185) Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annual Review of Nutrition* 19: 217–246
- (186) Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 346: 476-483
- (187) Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH (1987) Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 162: 185-196
- (188) Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH (1997) Vitamin B-12 deficiency in the elderly: current dilemmas. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66: 741–749
- (189) Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens Ch (1992) A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US Physicians. *The Journal of the American Medical Association* 268: 877-881
- (190) Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK (1994) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 43: 1475–1480
- (191) Stein Z, Susser M (1975) The Dutch famine, 1944-45 and the reproductive process: I. Effects on six indices at birth. *Pediatric Research* 9: 70-76

- (192) Stein Z, Susser M (1975) The Dutch Famine, 1944-1945, and the Reproductive Process. II. Interrelations of Caloric Rations and Six Indices at Birth. *Pediatric Research* 9: 76-83
- (193) Struwe E (2009) Folgen der Energiesparschaltung nach intrauteriner Wachstumsrestriktion für das spätere Leben. 7. interdisziplinärer SGA-Workshop 26.-27.6.2009 Kloster Schöntal
- (194) Stryer L, Haugland RP (1967): Energy transfer: a spectroscopic ruler. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58: 719-726
- (195) Subar AF, Harlan LC, Mattson ME (1990) Food and nutrient differences between smokers and non-smokers in the US. *American Journal of Public Health* 80: 1323-1329
- (196) Taylor DJ, Howie PW (1989) Fetal growth achievement and neurodevelopmental disability. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 96: 789-794
- (197) Thambyrajah J, Landray MJ, Jones HJ, McGlynn FJ, Wheeler DC, Townend JN (2001) A randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid on endothelial function in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 37: 1858-1863
- (198) Thompson C, Syddall H, Rodin I, Osmond C, Barker DJ (2001) Birth weight and the risk of depressive disorder in late life. *The British Journal of Psychiatry* 179: 450-455
- (199) Tindall KR, Kunkel TA (1988): Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27: 6008-6013
- (200) Tokgozogl SL, Alikasifoglu M, Unsal T, Atala E, Aytemir K, Ozer N, Ovunc K, Usal O, Kes S, Tuncbilek E (1999) Methylene tetrahydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate. *Heart* 81: 518-522
- (201) Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe A, Becker PJ (1993) Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. *American Journal of Clinical Nutrition* 57: 47-53
- (202) Ubbink JB, Vermaark WJH, Van der Merw A, Becker PJ, Delport R, Potgieter HC (1994) Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *The Journal of Nutrition* 124:1927-1933
- (203) Ubbink JB (1997) The role of vitamins in the pathogenesis and treatment of hyperhomocyst(e)inemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 20: 316-325
- (204) Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clinical Chemistry* 39: 1764-1779
- (205) Ueland PM (1995) Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clinical Chemistry* 41:340-342
- (206) Van Bockxmeer FM, Mamotte CD, Vasikaran SD, Taylor R (1997) Methylene tetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation* 95: 21-23
- (207) Van der Molen EF, Arends GE, Nelen WL (2000) A common mutation in the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene as a new risk factor for placental vasculopathy. *The American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182: 1258-1263

- (208) Van der Put N, Gabreels E, Smeitink J (1998) A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics* 62:1044-1051
- (209) Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ (2002) Folates and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22: 6-13
- (210) Verhoef P (2000) Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in women. In: Robinson K (ed). *Homocysteine and vascular disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 230: 217–238
- (211) Voigt M, Schneider KTM, Jährig K (1997) Analyse des Geburtsgutes des Jahrgangs 1992 der Bundesrepublik Deutschland Teil 2: Mehrdimensionale Zusammenhänge zwischen Alter, Körpergewicht und Körperhöhe der Mutter und dem Geburtsgewicht. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 57: 246-255
- (212) Voigt M, Fusch C, Olbertz D, Carstensen NM, Brüning A, Hartmann K, Hesse V (2006) Increase of SGA rates in neonates due to smoking during pregnancy and risk patterns of heavy smokers (analysis of perinatal data in Germany 1995-1997). *Deutsche Zeitschrift für Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 66:270-276
- (213) Vorherr H (1982) Factors influencing fetal growth. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 142: 577-588
- (214) Vuvic N, Frleta M, Petrovic D, Ostojic V (2009) Thrombophilia, preeclampsia and other pregnancy complications. *Acta Medica Craoatica* 63: 297-305
- (215) Wald DS, Bishop L, Wald NJ, Law M, Hennessy E, Weir D, McPartlin J, Scott J (2001) Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Archives of International Medicine* 161: 695-700
- (216) Walker NJ (2002): A technique whose time has come. *Science* 296, 557-559
- (217) Wang J, Trudinger BJ, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL(2000) Elevated circulating homocyst(e)ine levels in placental vascular disease and associated preeclampsia. *The British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 107: 935–938
- (218) Ward M, McNulty H, McPartlin J, Sreain JJ, Weir DG, Scott JM (1997) Plasma homocysteine, a risk factor for cardiovascular disease, is lowered by physiological doses of folic acid. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* 90: 519-524
- (219) Warkentin B (1994) Die fetale Entwicklung bei Spätgestose und Nikotinkonsum. *Deutsche Zeitschrift für Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 54: 262-267
- (220) Watkins D, Rosenblatt DS (1989) Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *American Journal of Medical Genetics* 34: 427-434
- (221) Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S and Rozen R (1998) A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Molecular Genetics And Metabolism* 64: 169–172
- (222) Weisberg I, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis ER, Eckfeldt JH, Rozen R (2001) The A1298C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156: 409-415

- (223) Wen SW, Goldenberg RL, Cutter GR, Hoffmann HJ, Cliver SP (1990) Intrauterin growth retardation and preterm delivery: prenatal risk factors in an indigent population. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 162: 213-218
- (224) Wilcox AJ (1983) Intrauterine growth retardation: beyond birthweight criteria. *Early Human Development* 8: 189-93
- (225) Windham GC, Hopkins B, Fenster L, Swan SH (2000) Prenatal active or passive tobacco smoke exposure and the risk of preterm delivery *Epidemiology* 11: 427-433
- (226) Winick M (1971) Cellular changes during placental and fetal growth. *American journal of obstetrics and gynecology* 109: 166-176
- (227) Wladimiroff JW (1991) A review of the etiology, diagnostic techniques and management of IUGR and the clinical application of doppler in the assessment of placental blood flow. *Journal of perinatal medicine* 19: 11-13
- (228) Wollmann HA (1998) Intrauterine Wachstumsretardierung *Monatszeitsschrift Kinderheilkunde* 146: 714-726
- (229) Wollmann HA (1998) Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Hormone Research* 49: 1-6
- (230) Wollmann HA (2004) Zu Klein bei Geburt (SGA). *Monatsschrift Kinderheilkunde* 152:528-535
- (231) Xiao R, Sorensen TK, Williams WA, Luthy DA (2003) Influence of pre-eclampsia on fetal growth. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 13: 157-162
- (232) Zondervan KT, Seidell JC, Smit HA, Ocke MC (1996) Do dietary and supplementary intakes of antioxidants differ with smoking status? *The International Journal of Epidemiology* 25: 70-79

8. Abkürzungsverzeichnis:

ACTH:	Adrenocorticotropes Hormon
AFI :	Amniotic Fluid Index
AGA:	appropriate for gestational age
ANS:	Atemnotsyndrom
ATP:	Adenosyltriphosphat
APGAR:	Score zur Beurteilung des klinischen Zustandes Neugeborener, nach der Anästhesistin V. Apgar benannt
BHMT :	Betain-Homocystein-Methyltransferase
BWR:	birth weight ratio
CBS:	Cystathion- β -Synthase
CLIA:	Chemilumineszenz-Immunoassays
CPAP:	Continuous Positive Airway Pressure
CRP:	C-reaktives Protein
d.h. :	das heißt
DMG:	Dimethylglycin
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DTT:	Dithiothreitol
dTTP:	Desoxythymidintriphosphat
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD:	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGR:	fetal growth restriction
FPIA:	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays

FRET: fluorescent resonance energy transfer

ICSI : intracytoplasmatische Spermieinjektion

IVF: invitro Fertilisation

IGF: insuline liek growthfactors

IVH: intraventriculären Hämorrhagie

Kbp: kilo Basenpaare

kDa: kilo Dalton

LGA: large for gestational age

MTHFR: Methylentetrahydrofolatreduktase

5-MTHF: 5-Methyltetrahydrofolat

NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NTC: non template controls

OR: Odds Ratio

PCR: Polymerasekettenreaktion

PIH: Pregnancy induced hypertension

SAH: S-Adenosyl-Homocystein

SAM: S-Adenosyl-Methionin

SGA: small for gestational age

SSW: Schwangerschaftswochen

IUGR: intrauterine Wachstumeretardierung

z.B. : zum Beispiel

9. Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ätiologie einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR)

Tabelle 2: Labortechnische Geräte

Tabelle 3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Kits

Tabelle 5: Master- und Assay-Mixe für die TaqMan-PCR

Tabelle 6: Einwegmaterialien

Tabelle 7: Primerdesign

Tabelle 8: Reaktionsablauf der TaqMan-PCR

Tabelle 9: Absolute Häufigkeiten in Bezug auf das Geschlecht, das Vorliegen von Mehrlingen und den Geburtsmodus

Tabelle 10: Darstellung von Median und Range für das Gestationsalter, das Geburtsgewicht, die Geburtslänge und den Kopfumfang der Frühgeborenen

Tabelle 11: Verteilung des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

Tabelle 12: Verteilung des A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

Tabelle 13: Median und Range der Homocysteinkonzentrationen in den beiden Subgruppen

Tabelle 14: Median und Range der Folsäurekonzentrationen in den beiden Subgruppen

Tabelle 15: Häufigkeit des mütterlichen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft in den beiden Subgruppen

Tabelle 16: Häufigkeit des Vorliegens einer arteriellen Hypertonie der Mutter während der Schwangerschaft bezogen auf die beiden Subgruppen

- Tabelle 17: Häufigkeit der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft in den beiden Subgruppen
- Tabelle 18: Verteilung des C677T-Polymorphismus im Studienkollektiv
- Tabelle 19: Verteilung des A1298C-Polymorphismus im Studienkollektiv
- Tabelle 20: Mittelwert, Median, Range und Standardabweichung der Homocysteinkonzentrationen in Bezug auf die einzelnen Genotypen des C677T-Polymorphismus
- Tabelle 21: Mittelwert, Median, Range und Standardabweichung der Homocysteinkonzentrationen in Bezug auf die einzelnen Genotypen des A1298C-Polymorphismus
- Tabelle 22: Mittelwert, Median, Standardabweichung und Range der Folsäurekonzentrationen der Frühgeborenen in Relation zu der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft
- Tabelle 23: Mittelwert, Median, Standardabweichung und Range der Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen in Relation zu der mütterlichen Folsäureeinnahme während der Schwangerschaft
- Tabelle 24: Einfluss des mütterlichen Nikotinkonsums während der Schwangerschaft auf die Höhe der Homocysteinkonzentrationen der Frühgeborenen
- Tabelle 25: Unterschiede in den Homocysteinkonzentrationen zwischen männlichen und weiblichen Frühgeborenen
- Tabelle 26: Einfluss einer mütterlichen arteriellen Hypertonie während der Schwangerschaft auf die Höhe der Homocystein-Spiegel der Frühgeborenen
- Tabelle 27: Signifikanzniveau der einzelnen Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht

der Frühgeborenen

Tabelle 28: Signifikanzniveau der einzelnen Einflussfaktoren auf die Entstehung einer IUGR bei den Frühgeborenen

10. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Struktur des MTHR-Gens

Abbildung 2: Strukturformel der Aminosäure Homocystein

Abbildung 3 : Strukturformeln der verschiedenen Homocystein-Formen

Abbildung 4: Homocysteinstoffwechsel

Abbildung 5 : Struktur des MTHFR-Gens

Abbildung 6: Strukturformel der Folsäure

Abbildung 7: Protokoll der Spin-Variante des QIAamp DNA Blood Mini Verfahrens

Abbildung 8: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Abbildung 9: Einfluß der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase auf eine Fluorogene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan PCR

Abbildung 10: Prinzip der TaqMan-PCR

Abbildung 11: Häufigkeit des Auftretens einer intrauterinen Wachstumsretardierung

Abbildung 12: Graphische Darstellung der Verteilung des C677T-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verteilung des A1298C-Polymorphismus im MTHFR-Gen innerhalb der Studienpopulation

Abbildung 14: Korrelation zwischen den Homocystein- und den Folsäure-Spiegeln der Frühgeborenen

Abbildung 15: Streudiagramm der Korrelation zwischen den Homocystein-Spiegeln und dem Geburtsgewicht der Frühgeborenen

11. **Publikationen:**

Lindner U, Gomes T, Woerner J, Tutdibi, Monz E, Gortner L (2007):
Homocysteinspiegel und MTHFR-Polymorphismen bei Frühgeborenen in zwei
ethnischen Gruppen. Zeitschrift für Geburtshilfe und Perinatologie 211: 1

12. Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die in den letzten Jahren durch Ihre Mitarbeit und Motivation zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, meinem Lebensgefährten Johannes, sowie unseren Familien, die mich stets unterstützt und in schwierigen Phasen immer wieder motiviert haben.

Für die tatkräftige Unterstützung in der Endphase möchte ich mich insbesondere bei Eva Höhn von ganzem Herzen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. L. Gortner sowie meiner Betreuerin Frau Dr. U. Lindner für die Bereitstellung des Themas sowie Ihre Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau S. Ströhlein, der leitenden MTA unseres Forschungslabors, für Ihre Hilfe bei der Sammlung und Aufbereitung der Proben.

Abgesehen davon möchte ich mich auch bei dem Hebammenteam der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der Abnahme der Nabelschnurblutproben bedanken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. Gräber, dem Leiter des Institutes für Biometrie des Universitätsklinikums des Saarlandes für seine freundliche Unterstützung und Kontrolle bei der Durchführung meiner statistischen Analysen.

13. Erklärung zur Verfassung der Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte und fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Universität des Saarlandes zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

14. Anhang: Patientenfragebögen

Probennummer:

Archivnummer und Aufbewahrungsort:

Probe zentrifugiert am:

Bemerkung:

1. Patientendaten:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Uhrzeit:

Geschlecht des Kindes: weiblich

männlich

Mehrling:

Ja

Nein

Besonderheiten während der Schwangerschaft: Ja

Nein

Wenn ja, welche:

Geburtsmodus:

Gestationsalter:

Geburtsgewicht:

Geburtslänge:

Kopfumfang:

APGAR:	nach 1 min:	nach 5 min:	nach 10 min:
Nabelschnur-pH:			
Auffälligkeiten, Fehlbildungen:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Wenn ja, welche:			
Postnatale Komplikationen:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Wenn ja, welche:			
Beatmung:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Beatmungsdauer:			
CPAP:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Sauerstoffbedarf:			
Sauerstoffdauer:			
ANS:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
ANS-Grad:			
IVH:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
IVH-Grad:			
ROP:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
ROP-Stadium:			
Koninatale Sepsis:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Max. CRP:			
Max. IT-Ratio:			
Keimnachweis in Blutkultur:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>	
Wenn ja, welche:			

Kon natale Pneumonie:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Name, Anschrift und Telefonnummer der Eltern:		
Surfactant:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Sonstige Therapie:		
Dauer des stationären Aufenthalts:		
Dauer der Intensivtherapie:		

<u>Laborwerte:</u>
Datum der Blutentnahme:
Hb:
Hkt:
Leukozyten:
Retikulozyten:
Normoblasten:
Bilirubin:
Sauerstoffsättigung:
Sonstiges:

Ergebnisse:

MTHFR C677T:

MTHFR A1298C:

Homozystein:

2. Daten der Mutter

Name:	Vorname:
Geburtsdatum:	
Ethnizität:	
Nationalität:	
Schulabschluss:	Beruf:
Größe:	
Gewicht vor der Schwangerschaft:	
Gewicht vor der Geburt:	
Anzahl der Schwangerschaften mit dieser:	
Geburtsmodus:	Spontangeburt: Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
	Sectio: Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
	Andere:
ICSI:	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
IVF:	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>
AIS:	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/>

Vorzeitiger Blasensprung:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Lungenreife:		
Raucherin:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, wie viele Zigaretten pro Tag:		
Nikotinkonsum während der Schwangerschaft:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, wie viele Zigaretten pro Tag:		
OGTT während der Schwangerschaft:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Pathologischer Befund:	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
<u>Erkrankungen:</u>		
<u>1. Diabetes mellitus:</u>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
	Typ1 <input type="checkbox"/>	Typ2 <input type="checkbox"/>
Therapie	Nein <input type="checkbox"/>	Ja, folgende:
<u>2. Arterielle Hypertonie:</u>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Therapie	Nein <input type="checkbox"/>	Ja folgende:
<u>3. Allergien:</u>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, welche:		
<u>4. Andere Erkrankungen:</u>	Ja <input type="checkbox"/>	Nein <input type="checkbox"/>
Wenn ja, welche:		

Einnahme von Medikamenten während der Schwangerschaft:

Ja

Nein

Wenn ja, welche:

Sonstiges:

3. Daten des Vaters:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Ethnizität:

Nationalität:

Schulabschluss:

Beruf:

Größe:

Gewicht:

Erkrankungen:

Ja

Nein

Wenn ja, welche:

Sonstiges: