

**Aus der Universitätsfrauenklinik**  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. E.-F. Solomayer

---

**Einfluss der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-  
Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit bei  
Patientinnen mit kontrollierter ovarieller  
Hyperstimulation auf das ICSI-Ergebnis**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

Vorgelegt von Malalei Hoqouq  
geb. am: 04.05.1986 in Kabul, Afghanistan

**Meiner Mutter gewidmet**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....</b>	<b>9</b>
1.1 Zusammenfassung.....	9
1.2 Summary.....	12
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>15</b>
2.1 Allgemeine Aspekte.....	15
2.2 Die Studienparameter.....	20
2.2.1 Homocystein.....	20
2.2.2 Folsäure.....	27
2.2.3 Vitamin B12.....	32
2.3 Faktoren, die negativen Einfluss auf die Schwangerschaftsrate haben.....	37
2.4 Eigene Fragestellung.....	40
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>41</b>
3.1 Probanden.....	41
3.1.1 Gruppeneinteilung.....	41
3.2 Behandlungsablauf.....	42
3.2.1 Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation.....	42
3.2.2 In-Vitro-Fertilisation (IVF).....	44
3.2.3 Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI).....	47
3.3 Materialgewinnung.....	49
3.4 Methoden.....	50
3.4.1 Bestimmung der Homocystein-Konzentration.....	50
3.4.2 Bestimmung der Folsäure-Konzentration.....	54
3.4.3 Bestimmung der Vitamin B12-Konzentration.....	54
3.5 Statistische Auswertung.....	55

<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
4.1 Homocystein, Folsäure und Vitamin B 12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Gesamtkollektiv.....	56
4.1.1 Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen den Altersgruppen G1 und G2.....	60
4.1.2 Zusammenhang zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12- Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme.....	62
4.2. Zusammenhang zwischen den klinische Parametern im Gesamtkollektiv und in den Altergruppen G1 und G2.....	64
4.2.1 Zusammenhang zwischen den klinische Parametern und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme.....	67
4.3 Vergleich zwischen dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme und den klinischen Parametern in den Altersgruppen G1 und G2.....	70
4.4 Korrelation zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und der Follikelflüssigkeit im Gesamtkollektiv.....	72
4.4.1 Korrelation zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und der Follikelflüssigkeit in den Altersgruppen G1 und G2.....	78
4.5 Korrelation zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und der Follikelflüssigkeit und den klinischen Parametern im Gesamtkollektiv.....	81
4.5.1 Korrelation zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und der Follikelflüssigkeit und den klinischen Parametern in den Altersgruppen G1 und G2.....	84
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>88</b>
5.1 Konzentration Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12 im Serum und in der Follikelflüssigkeit.....	88
5.2 Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration untereinander.....	89
5.3 Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis.....	90
5.4 Korrelation zwischen der Folsäure-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis.....	92
5.5 Korrelation zwischen der Vitamin B12-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis.....	94

5.6 Schlussfolgerung.....	96
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>98</b>
<b>7. DANKSAGUNG/PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>109</b>
<b>8. LEBENSLAUF.....</b>	<b>111</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADVIA	Automated random-access immunoassay system
alpha-KBT	alpha-Ketobutyrat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
°C	Grad Celsius
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CGL	Cystathionin-γ-Lyase
CoA	Coenzym A
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CYS	Cysthationin
D.A.C.H.	German, Austrian and Swiss Homocystein Society
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
d.h.	das heißt
DHF	Dihydrofolsäure
DIR	Deutsches IVF Register
D-MM-CoA	D-Methylmalonyl-Coenzym A
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Desoxythimidin-5'-monophosphat
dUMP	Desoxyuridin-5'-monophosphat
E2	17β-Estradiol
et al.	und andere
FF	Follikelflüssigkeit
FS	Fettsäuren
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
G1	Altersgruppe 1 (25-34 Jahre)
G2	Altersgruppe 2 (35-43 Jahre)
GnRH	Gonadotropine Releasing Hormone
Ham's F10	F-10 Nutrient Medium
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCG	human chorionic gonadotropin
Hcy	Homocystein
HELPP-Syndrom	H= haemolysis, EL= elevated liver function test, LP= low platelet counts
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Holo-Tc	Holotranscobalamin
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion Intracytoplasmic Sperm Injection
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
INF	Interferon
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
I.U.	International Units
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In-vitro-Fertilisation
kDa	kiloDalton

KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LDL	Low density lipoproteins
LH	luteinisierendes Hormon
LIF	Leukaemia Inhibiting Factor
L-MM-CoA	L-Methylmalonyl-Coenzym A
LP	Long Protocol („conventional ovarian stimulation“)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	Mittelwert
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
MMA	Methylmalonsäure
mRNA	messenger Ribonucleic Acid, messenger-Ribonukleinsäure
MS	Methioninsynthase
MTHF	Methyltetrahydrofolat
MTHFR	Methyltetrahydrofolat-Reduktase
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NTD	Neuralrohrdefekt
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Signifikanz
PABA	p-Aminobenzoesäure
PCO-Syndrom	Polycystic Ovary Syndrom, Polyzystisches Ovarialsyndrom
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S	Serum
S1	schwanger
S2	nicht schwanger
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAHH	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SP	Short Protocol („mild ovarian stimulation“)
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences
SS	Schwangerschaft
TC	Transcobalamin
TGF	Transforming-Growth-Faktor

THF	Tetrahydrofolsäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor
vs.	versus (gegenüber)
WHO	World Health Organization

## **1. Zusammenfassung/Summary**

## 1.1 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum (S) und in der Follikelflüssigkeit (FF) bei Patientinnen mit kontrollierter ovarieller Hyperstimulation zu bestimmen und ihren Einfluss auf das ICSI-Ergebnis zu untersuchen. Es wurden die entnommenen Serum- und Follikelflüssigkeitsproben von 86 Patientinnen, die sich an der Universitätsfrauenklinik Homburg/ Saar zwischen Ende 2008 und Anfang 2009 einer Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) unterzogen hatten, untersucht. Die Proben wurden zentrifugiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, bis sie im Hinblick auf ihre Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration untersucht wurden.

Das Homocystein im Serum und in der Follikelflüssigkeit wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Die Folsäure und das Vitamin B12 in beiden Flüssigkeitsmedien wurden mit Hilfe des ADVIA Centaur XP-Systems (Automated random-access immunoassay system) gemessen.

Die Ergebnisse wurden mit den klinischen Daten, wie Alter der Patienten, Anzahl der gewonnenen und befruchteten Eizellen, der Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate, auf eventuelle Korrelationen untersucht.

Das Patientenkollektiv wurde einerseits nach dem Alter in eine G1- (25-34 Jahre;  $n= 42$ ) und eine G2-Gruppe (35-43 Jahre;  $n= 44$ ), andererseits nach dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme in eine S1- (schwanger;  $n= 23$ ) und eine S2-Gruppe (nicht schwanger;  $n= 63$ ) aufgeteilt. Von den dabei gewonnenen Ergebnissen erfolgte anschließend jeweils die Betrachtung im Gesamtkollektiv ( $n= 86$ ), ein Vergleich zwischen den gebildeten Altersgruppen sowie den Schwangerschaftsgruppen.

Die Konzentrationen von Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 betragen im Serum  $7,75 \pm 1,77\text{ }\mu\text{mol/l}$ ;  $17,17 \pm 10,33\text{ ng/ml}$  und  $387,76 \pm 144,31\text{ pg/ml}$  und die entsprechenden Werte in der Follikelflüssigkeit waren  $6,62 \pm 1,95\text{ }\mu\text{mol/l}$ ;  $23,86 \pm 12,27\text{ ng/ml}$  und  $783,81 \pm 1087,50\text{ pg/ml}$ . **Die Homocystein-Konzentration im Serum war signifikant höher als in der Follikelflüssigkeit ( $p= 0,001$ ), wohingegen die Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit signifikant höhere Werte aufwiesen ( $p= 0,001$ ).** Die Konzentrationen der untersuchten Parameter sowohl in der G1- als auch in der G2-Altersgruppe im Serum und in der Follikelflüssigkeit haben sich nicht signifikant voneinander

unterschieden ( $p > 0,05$ ). Die Anzahl der gewonnenen und befruchteten Eizellen sowie die Schwangerschaftsrate zeigten in der G1-Gruppe ( $8,83 \pm 5,25$ ;  $3,76 \pm 3,00$ ;  $35,71 \%$ ) und in der G2-Gruppe ( $7,30 \pm 5,13$ ;  $3,88 \pm 2,88$ ;  $18,18 \%$ ) keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ). **Die Befruchtungsraten jedoch war in der G2-Gruppe ( $59,33 \pm 30,91 \%$ ) signifikant höher als in der G1-Gruppe ( $43,11 \pm 24,91 \%$ ) ( $p = 0,009$ ).** Ein Vergleich der Homocystein- und Folsäure-Konzentration im Serum der S1-Gruppe ( $7,92 \pm 1,26 \mu\text{mol/l}$ ;  $17,97 \pm 6,56 \text{ ng/ml}$ ) zeigte keinen wesentlichen Unterschied zu den entsprechenden Werten in der S2-Gruppe ( $7,73 \pm 1,96 \mu\text{mol/l}$ ;  $16,69 \pm 11,55 \text{ ng/ml}$ ) ( $p > 0,05$ ). **Lediglich bezüglich der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen der S1 ( $416,33 \pm 167,28 \text{ pg/ml}$ ) und S2 ( $930,16 \pm 1252,26 \text{ pg/ml}$ ) gab es einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,037$ ).**

**Das Homocystein im Serum und in der Follikelflüssigkeit korrelierte negativ sowohl mit der Folsäure, als auch mit dem Vitamin B12 und zwar im Gesamtkollektiv, in der G1 und in der G2. Die Folsäure im Serum und das Vitamin B12 in der Follikelflüssigkeit zeigten nur in der G1 eine positive Korrelation ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,054$ ).**

Im Serum korrelierte in der G2 das Homocystein negativ mit der Anzahl der befruchteten Eizellen ( $r = -0,41$ ;  $p = 0,006$ ) und in der Follikelflüssigkeit mit dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $r = -0,32$ ;  $p = 0,043$ ).

Weitere negative Korrelationen fielen in der G1 zwischen der Folsäure im Serum ( $r = -0,30$ ;  $p = 0,051$ ) und in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,022$ ) und der Anzahl der gewonnenen Eizellen auf. Auch die Folsäure-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und die Anzahl der befruchteten Eizellen ( $r = -0,34$ ;  $p = 0,031$ ) wiesen eine negative Korrelation auf. Eine positive Korrelation zeigte sich in der G2 zwischen der Folsäure in der Follikelflüssigkeit und der Schwangerschaftsrate ( $r = 0,39$ ;  $p = 0,011$ ).

Statistisch signifikant war ebenfalls der Zusammenhang zwischen der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und dem Auftreten einer Schwangerschaft und der Geburt sowohl im Gesamtkollektiv (Schwangerschaft:  $r = 0,23$ ;  $p = 0,037$ ; Geburt:  $r = 0,21$ ;  $p = 0,045$ ), als auch in der G2 (Schwangerschaft:  $r = 0,39$ ;  $p = 0,009$ ; Geburt:  $r = 0,34$ ;  $p = 0,021$ ).

Die in der Arbeit untersuchten Parameter zeigen im Bezug auf die Schwangerschafts- und Befruchtungsergebnisse der Patientinnen im Gesamtkollektiv, im G1- und im G2-Kollektiv sowie im S1- und S2-Kollektiv sowohl positive, als auch negative Zusammenhänge. Deswegen kann man annehmen, dass eine optimale Homocystein-, Folsäure- und Vitamin

B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit das Ergebnis der ICSI-Therapie positiv beeinflussen kann. Zur Bestimmung dieser optimalen Konzentration müssen noch weitere Untersuchungen folgen.

## 1.2 Summary

### **Correlation between homocysteine, folic acid and vitamin B12 concentration in serum and follicular fluid and their effect on ICSI outcome**

The purpose of this study was to determine the effect of the concentrations of homocysteine (HCY), folic acid and vitamin B12 concentration in serum (S) and follicular fluid (FF) of patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) therapy on ICSI outcome.

Serum and follicular fluid were obtained from 86 patients undergoing oocyte retrieval for ICSI therapy at the department of Obstetrics and Gynaecology, of the University of Saarland, between the end of 2008 and the beginning of 2009. The serum and the follicular fluid were centrifuged and stored at -80 °C until they were tested at the Central Laboratory of the institute for clinical chemistry of the University of Saarland. Homocysteine in serum and follicular fluid was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) system whereas, folic acid and vitamin B12 in serum and in the follicular fluid were analysed using ADVIA Centaur XP–System.

The results were correlated with clinical data of the patients such as age, the mean number of collected and fertilized oocytes, and fertilization and pregnancy rate in all investigated patients.

The patients were divided into two groups (G1 n= 42; G2 n= 44) according to the age (G1= 25-34 years old) and G 2 (35-43 years old). The results were also analysed based on whether the patients became pregnant (S1 n= 23) or not (S2 n= 63). The results were analysed and comparison of the concentrations of investigated parameters between G1 and G2 as well as between S1 and S2 was carried out. Correlation coefficients were measured between the investigated biochemical and clinical parameters in all patients and after division into groups.

The mean concentrations of homocysteine, folic acid and vitamin B12 in serum were  $7.75 \pm 1.77 \mu\text{mol/l}$ ;  $17.17 \pm 10.33 \text{ ng/ml}$  and  $387.76 \pm 144.31 \text{ pg/ml}$  and the corresponding values in the follicular fluid were  $6.62 \pm 1.95 \mu\text{mol/l}$ ;  $23.86 \pm 12.27 \text{ ng/ml}$  and  $783.81 \pm 1087.50 \text{ pg/ml}$  respectively. **The homocysteine concentration in serum was significantly higher ( $p= 0.001$ ) than the value in the follicular fluid whereas the folic acid and vitamin B12 concentration in the follicular fluid were significantly higher ( $p= 0.001$ ) than in the serum.** Homocysteine, folic acid and vitamin B12 concentrations were similar in G1 and G2

in serum, as well as in the follicular fluid. Though there was no statistical difference in these values between G1 and G2 ( $p>0.05$ ).

In G1 the mean number of retrieved and fertilized oocytes was  $8.83 \pm 5.25$  and  $3.76 \pm 3.00$  respectively, and the pregnancy rate was 35.71 %. In the G2 the mean number of retrieved and fertilized oocytes was  $7.30 \pm 5.13$  and  $3.88 \pm 2.88$  respectively and the pregnancy rate was 18.18 %. Though there was no statistical difference in these values between G1 and G2 ( $p>0.05$ ). **The fertilization rate was significantly higher in G2 ( $59.33 \pm 30.91$  %) in comparison to G1 ( $43.11 \pm 24.91$  %,  $p= 0.009$ ).**

Moreover, the homocysteine, and folic acid in the serum of patients who became pregnant ( $7.92 \pm 1.26$   $\mu\text{mol/l}$ ;  $17.97 \pm 6.56$   $\text{ng/ml}$ ;) did not differ significantly from of the values observed in patients who did not become pregnant ( $7.73 \pm 1.96$   $\mu\text{mol/l}$ ;  $16.69 \pm 11.55$   $\text{ng/ml}$ ;) ( $p>0.05$ ). **Only the vitamin B12 concentration showed a statistical difference between S1 ( $416.33 \pm 167.28$   $\text{pg/ml}$ ) and S2 ( $930.16 \pm 1252.26$   $\text{pg/ml}$ ) ( $p= 0.037$ ).**

**The homocysteine concentration in serum showed a negative correlation with folic acid and vitamin B12 in the total group, in G1 and G2. Folic acid correlated positively with vitamin B12 in the follicular fluid only in G1 ( $r= 0.29$ ;  $p= 0.054$ ).**

The homocysteine concentration in serum showed a negative correlation with the number of fertilized oocytes ( $r= -0.41$ ;  $p= 0.006$ ) and in follicular fluid with pregnancy ( $r= -0.32$ ;  $p= 0.043$ ) in G2.

In G1 a further negative correlation can be seen between folic acid in serum ( $r= -0.30$ ;  $p= 0.051$ ) and in follicular fluid ( $r= -0.37$ ;  $p= 0.022$ ) and the number of retrieved oocytes. Moreover there was a negative correlation between folic acid in follicular fluid and the number of fertilized oocytes ( $r= -0.34$ ;  $p= 0.031$ ). Finally in G2 there existed a positive correlation between folic acid in follicular fluid and the pregnancy rate ( $r= 0.39$ ;  $p= 0.011$ ).

The vitamin B12 concentration exhibited a statistically significant positive correlation with pregnancy and birth in the total group (Pregnancy:  $r= 0.23$ ;  $p= 0.037$ ; Birth:  $r= 0.21$ ;  $p= 0.045$ ) and in G1 (Pregnancy:  $r= 0.39$ ;  $p= 0.009$ ; Birth:  $r= 0.34$ ;  $p= 0.021$ ).

The results of the present study show a relationship between the homocysteine, folic acid and vitamin B12 in the serum and the follicular fluid, and the fertilization and pregnancy rates following ICSI. Therefore, it is likely that an optimal concentration of homocysteine, folic acid and vitamin B12 in serum and the follicular fluid will positively influence the outcome of

patients undergoing ovarian hyperstimulation for ICSI therapy. Further studies have to be conducted to clarify this optimal concentration of the investigated parameters.

## **2. Einleitung**

## 2.1 Allgemeine Aspekte

„Deutschland ist eines der kinderärmsten Länder der Welt“ (*Berlin-Institut, 2007*). Während noch 1871 die Deutschen im Mittel etwa fünf Kinder bekamen, wollen heutzutage Frauen durchschnittlich 1,8 und Männer sogar nur 1,6 Kinder. Die Gründe für die drastische Abnahme der Geburtenzahl sind vielfältig. Zum einen hat man gesehen, dass Kinder kein Produktionsfaktor sind, wie sie in der vorindustriellen Zeit angesehen wurden. Zum anderen veränderte sich im Verlauf der Zeit auch die Einstellung der Menschen. Sie legten mehr Wert auf Bildung und hatten andere Ziele in ihrem Leben: erst die Karriere sichern, dann eine Familie gründen. Als Folge litt die Geburtenzahl darunter. Nicht nur der Zeitpunkt für eine Schwangerschaft wurde verschoben, sondern damit auch das Alter der Eltern, nämlich von ursprünglich 25 Jahren in den 60er Jahren auf circa 30 Jahre und mehr heutzutage. Auch die Partnerwahl ist heutzutage schwieriger geworden, denn immer mehr Frauen geben als Grund für das Hinausschieben der Familienplanung an, dass sie nicht den richtigen Partner finden (*Berlin-Institut, 2007*).

Dabei muss man jedoch beachten, dass diese gewollte Kinderlosigkeit sich in eine ungewollte verwandeln kann. Laut der Umfrage, die das Institut für Demoskopie Allensbach (2006) durchgeführt hat, hat sich ergeben, dass circa 36 % der Bevölkerung im Alter zwischen 25 und 59 Jahren, das entspricht etwa 12,8 Millionen Menschen, ungewollt kinderlos sind. Lediglich 8 % davon haben sich bewusst gegen Kinder entschieden. Bei der Gruppe der ungewollt kinderlosen Paare handelt es sich um Menschen, die noch nie ein Kind bekommen haben (primäre Sterilität), und um solche, die schon mindestens ein Kind haben, aber keine weiteren Kinder bekommen können (sekundäre Sterilität). Laut der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird von einer Sterilität gesprochen, wenn nach zweijährigem ungeschütztem Geschlechtsverkehr eine Schwangerschaft ausbleibt. Zwischen Sterilität und Infertilität muss man jedoch unterscheiden, denn Sterilität ist die Unfähigkeit, schwanger zu werden, und Infertilität ist die Unfähigkeit, eine Schwangerschaft bis zur Geburt eines Kindes auszutragen (*Runnebaum, 1994; Lübke, 2004; ASRM, 2006; Berlin-Institut, 2007*).

Männliche Subfertilität beruht meist auf andrologischen Ursachen. Diese führen zu einem eingeschränkten Spermogramm und zur eingeschränkten oder fehlenden Befruchtungsfähigkeit der Spermien. Zu den andrologischen Ursachen gehören zum Beispiel Hormonstörungen (etwa Schilddrüsenerkrankungen), Kryptochismus, bakterielle oder virale Infektionen und immunologische Erkrankungen (*Würfel, 2007; Esterbauer, 2009*).

Die Gründe für die Sterilität sind bei der Frau hauptsächlich endokrine Ursachen, zum Beispiel die Störung der Follikulogenese, hypothalamisch-hypophysär bedingte ovarielle Dysfunktionen und das Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCO-Syndrom). Die Tubenpathologie (Durchgängigkeits-, Bewegungsstörungen z.B. durch Chlamydieninfektion, Genitaltuberkulose, Endometriose) und uterine, zervikale und vaginale Ursachen führen ebenfalls zur Sterilität (*Runnebaum, 1994*).

Weitere Ursachen sind Stoffwechselstörungen, genetische Mutationen und der Lebensstil des Paares (*Ludwig et al., 2004; Ebisch et al., 2006*). So können zum Beispiel Unter- oder Übergewicht, eine einseitige vitaminarme Ernährung sowie ein hoher Nikotin- und Kaffeekonsum, verbunden mit körperlichem und emotionalem Stress, zur Sterilität führen. Schreiber (1996) beschrieb, dass der Konsum von Alkohol und Nikotin, aber auch Belastung mit Schwermetallen und Pestiziden die Zeugungsfähigkeit des Mannes beeinträchtigen können. Das Alter des Paares spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Bei Frauen nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft mit dem Alter ab und bei Männern sinkt die Qualität der Spermien mit zunehmendem Alter (*Van Voorhis, 2007*).

Eine Methode, mit dessen Hilfe kinderlosen Paaren geholfen werden kann, ist die „In-vitro-Fertilisation“ (IVF). Die IVF ist ein Verfahren der modernen Reproduktionsmedizin, bei der es zur Befruchtung der Eizelle durch die Samenzelle und somit zum Entstehen eines Embryos außerhalb des Körpers kommt.

1978 wurde in Großbritannien das erste Kind mit Hilfe der extrakorporalen Befruchtung geboren. In Deutschland wurde die Methode der assistierten Reproduktion erst 1982 in die Wege geleitet. Das Deutsche IVF-Register bestätigt, dass von 1997 bis 2004 in Deutschland über eine halbe Million Behandlungszyklen durchgeführt wurden, bei denen es in circa 90.000 Fällen zu einer Schwangerschaft gekommen ist und von denen etwa 60.000 Fälle mit einer Geburt endeten (*Berlin-Institut, 2007*).

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) wurde 1992 eingeführt (Palermo et al., 1992). Mit Hilfe der ICSI kann Paaren geholfen werden, bei denen aufgrund schwerer männlicher Subfertilität eine IVF-Behandlung keinen Erfolg bringt, denn bei der ICSI wird ein einziges Spermium in die Eizelle gebracht (Palermo et al., 1992; Würfel, 2007).

Im Rahmen der assistierten Reproduktionsmedizin müssen die behandelten Paare einige Voraussetzungen erfüllen. Sie müssen verheiratet sein und seit mindestens einem Jahr ungeschützten Geschlechtsverkehr haben. Je nach Ursache und Ausprägung der Sterilität wird entschieden, ob die alleinige Gabe von Hormonen zur Reifung und zum Wachstum einer Eizelle beziehungsweise zur Auslösung des Eisprungs genügt oder ob das IVF/ICSI angewendet wird. Bei Sterilitätsursachen, wie etwa der Tubenundurchlässigkeit, Endometriose oder bei leichter andrologisch bedingter männlicher Infertilität erfolgt die IVF. Das bedeutet, die gewonnenen Eizellen werden in einer mit Nährmedium gefüllten Kunststoffschale mit einer frisch gewonnenen Samenprobe des Partners in Kontakt gebracht. Die motilen Spermien „durchdringen“ die Eizellen und die Zellkerne verschmelzen im Idealfall miteinander. Bei einem eingeschränkten Spermogramm, zum Beispiel bei verringerter Motilität der Spermien, ist das ICSI das Verfahren der Wahl, da hier jeweils eine gewonnene Eizelle mit einem Spermium befruchtet wird. Anschließend werden die befruchteten Eizellen direkt in die Gebärmutter transferiert, wo sie sich, wie auch bei einer natürlichen Schwangerschaft, in die Gebärmutterschleimhaut einnisten können (Palermo et al. 1992; Würfel 2007; Berlin-Institut, 2007).

In der IVF/ICSI-Behandlung kommt es pro Zyklus bei etwa 27 % zur Schwangerschaft, diese wiederum endet bei 18 % mit einer Geburt (Felberbaum., 2007).

Es stellt sich nun die Frage, warum die Erfolgsquote einer IVF/ICSI-Behandlung so gering ist und wie sich diese beeinflussen lässt.

Wie bereits erwähnt sind die Gründe der Sterilität bei Frauen und Männern vielfältig. Neben organisch und genetisch bedingten Störungen spielen der Lebensstil und Ernährungsfaktoren eine wesentliche Rolle. In den vergangenen Jahren hat man sich immer mehr mit dem Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Infertilität beziehungsweise Sterilität beschäftigt.

Paszkowski et al. (2002) untersuchten, ob und wie das Rauchen das Ergebnis einer IVF-Behandlung beeinflusst, und schlussfolgerten, dass das Nikotin einen schädlichen Einfluss auf die Follikel und die heranreifende Eizelle hat. Ein Nikotinabusus führt zur vermehrten

Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Die Folge daraus ist, dass durch den erhöhten oxidativen Stress es zu vermehrter Zellschädigung sowie zur Funktionsstörung von DNA, Proteinen und Lipiden sowie zur Störung der Follikulogenese kommen kann. Des Weiteren fanden Zenses et al. (1995) in ihrer Arbeit, dass Eizellen von Raucherinnen vermehrt eine Diploidie aufweisen, sodass postuliert wurde, dass sich das Rauchen schädlich auf die Meiose auswirkt.

Vujkovic et al. (2010) fanden in ihrer Untersuchung heraus, dass Frauen, die sich „mediterran“ ernähren, das heißt viel Fisch, Gemüse und Pflanzenöl zu sich nehmen, eine um etwa 40 % höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Schwangerschaft nach einer IVF-/ICSI-Behandlung haben. Des Weiteren sahen sie eine positive Korrelation zwischen dieser „mediterranen Ernährung“ und der Konzentration von Folsäure und Vitamin B6 im Blut und in der Follikelflüssigkeit ihrer Patientinnen, sodass angenommen werden kann, dass eine erhöhte Folsäure- und Vitamin B6-Konzentration die Wahrscheinlichkeit einer Schwangerschaft erhöht.

Folsäure und Vitamin B12 sind essentiell für den Synthese- und Methylierungsstatus der DNA-Bausteine. Aus einem Mangel dieser Vitamine können Veränderungen in der Genexpression und chromosomale Instabilitäten resultieren (*James et al., 2002*). Bedingt durch einen Mangel an Folsäure in der Schwangerschaft kann es zu fehlerhaften zellulären Replikationen sowie zu Störungen im Wachstum des Feten oder der Plazenta führen (*Scholl, 2000*).

Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen einem Folsäuremangel und dem Entstehen von Neuralrohrdefekten (NTD), wie zum Beispiel der Spina bifida. Zur Prävention dieser kindlichen Fehlbildung wird eine ausreichende Folsäureeinnahme vor und während der Schwangerschaft, es wird sogar eine Anreicherung von Getreideprodukten mit Folsäure empfohlen (*Czeizel, 1992; Honein et al., 2001*).

Folsäure, Vitamin B12 und B6 spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Homocystein-Stoffwechsel, da sie als Coenzyme bei der Remythelierung von Homocystein zu Methionin benötigt werden. Daraus folgt, dass ein Mangel dieser Vitamine zur Hyperhomocysteinämie führt (siehe Kapitel 2.2.1).

Bei einer Hyperhomocysteinämie führt das Homocystein als eine atherogen wirkende Aminosäure zu einer vermehrten Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Diese wiederum führen über oxidativen Stress und über eine Vasokonstriktion in Gefäßen, so auch in Gefäßen von Uterus, Ovar und Plazenta, zur vermehrten Thrombenbildung und zu gestörten Durchblutungsverhältnissen. Durch Gefäßverschlüsse in der Plazenta kann das Wachstum des Fetus gestört sein und zum Abort oder zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung führen. Rosenquist et al. (1996) beschrieben, dass durch eine Hyperhomocysteinämie die Dezidualgefäße geschädigt werden und auf diese Weise die Implantation des Embryos gestört wird. Als Folge steigen das Infertilitäts- und Sterilitätsrisiko, die Frühgeburts- und Abortrate sowie die Gefahr von Embryopathien (*Stegers-Theunissen et al., 1992; Heinecke et al., 1993; Agarwal et al., 2005*).

In Anlehnung an früheren Studien über diesen Themenkomplex bestand die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation in der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 und den Therapieresultaten einer ICSI-Behandlung (vgl. „Eigene Fragestellung“ in Kapitel 2.4).

Im folgenden Kapitel werden zunächst die untersuchten Parameter allgemein in Bezug auf ihre Struktur, ihren Stoffwechsel sowie ihre Aufgaben im Organismus beschrieben.

Am Ende wird auf einige weitere Faktoren eingegangen, die ebenfalls positiven oder negativen Einfluss auf das Therapieresultat einer IVF-/ICSI-Behandlung haben.

## 2.2 Die Studienparameter

### 2.2.1 Homocystein

Homocystein ist eine nichtproteinogene Aminosäure mit einer Schwefelgruppe. Es entsteht als Zwischenprodukt im Stoffwechsel des Methionins, die wiederum als essentielle Aminosäure mit der Nahrung aufgenommen werden muss.

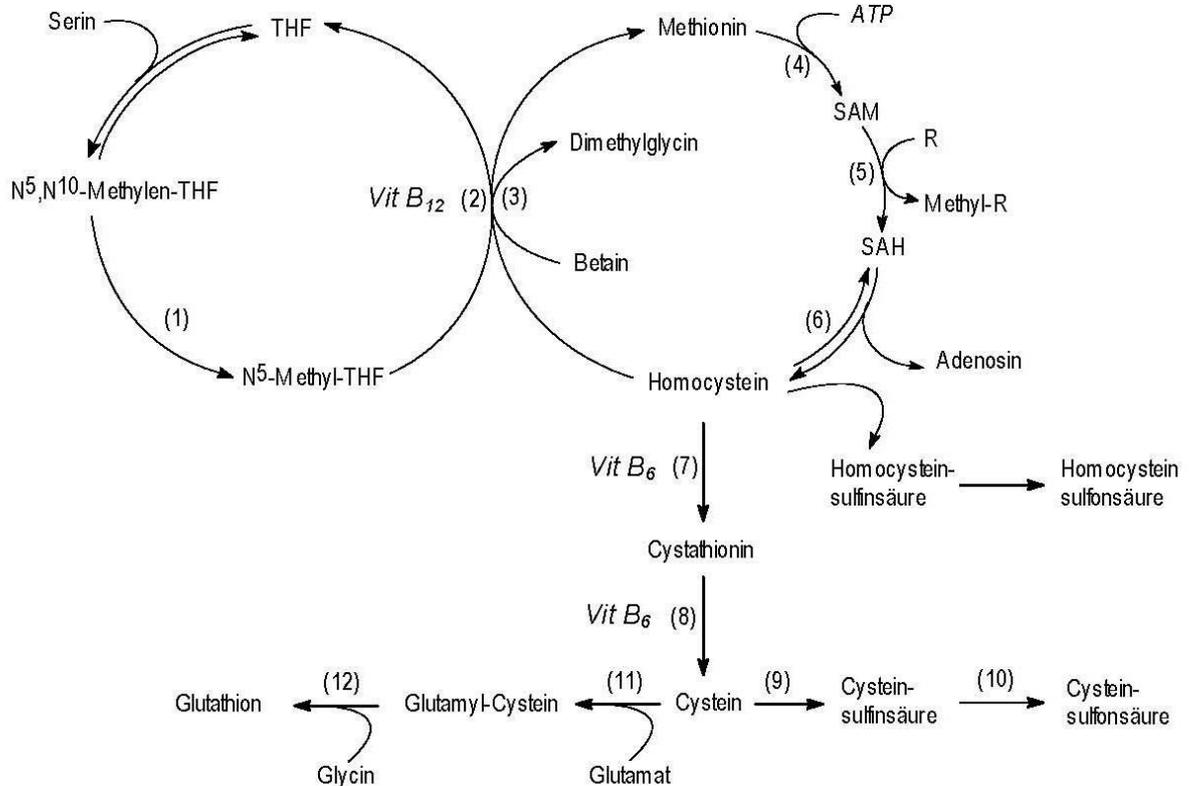
Im Plasma liegt Homocystein zu 98 % proteingebunden vor, nämlich oxidiert an Albumin, oder als Disulfid. Lediglich ein geringer Anteil ist in der reduzierten, freien Form vorhanden (*Mansoor et al., 1995; Stanger et al., 2003*).



**Abbildung 1:** Strukturformel des Homocysteins

Normale Homocystein-Plasmakonzentrationen liegen zwischen 5 und 12 µmol/l. Die Hyperhomocysteinämie wird in eine moderate (12-30 µmol/l), bedingt durch einen Vitaminmangel, eine intermediäre (31-100 µmol/l), hervorgerufen zum Beispiel durch homozygote Enzymdefekte, und eine schwere Hyperhomocysteinämie (>100 µmol/l) eingeteilt (*Jacobsen, 1998*). Im Verlauf der Jahre haben sich jedoch die Normwerte für das Homocystein geändert, da schon Konzentrationen von 10 µmol/l mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, zum Beispiel Arteriosklerose, einhergingen. Die „D.A.C.H-Liga-Homocystein“, (2003) empfiehlt eine Homocysteinkonzentration < 10 µmol/l, denn laut der Liga besteht eine moderate Hyperhomocysteinämie bereits bei 12 µmol/l und somit ein Behandlungsbedarf. Die Homocysteinwerte sind abhängig von Alter und Geschlecht. Die physiologische Abnahme der Nierenfunktion im Alter erklärt den altersabhängigen Anstieg der Homocystein-Konzentration. Während der Schwangerschaft nimmt die Konzentration an Homocystein ab und erreicht nach der Geburt wieder seinen Ausgangswert. Weiterhin werden bei prämenopausalen gegenüber postmenopausalen Frauen ebenfalls erhöhte Werte beobachtet. Zusätzlich haben Männer höhere Werte als Frauen (*Andersson et al., 1992; Durand et al., 2001; De Bree et al., 2002*).

## Der Homocysteinestoffwechsel



**Abbildung 2:** Der (Methionin-)Homocystein-Stoffwechsel (McKeecer et al., 1991)

*Abkürzungen:* ATP: Adenosintriphosphat, N<sup>5</sup>-Methyl-THF: N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat, N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen- THF: N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup> Methyltetrahydrofolat, SAH: S-Adenosylhomocystein; SAM: SAdenosylmethionin, THF: Tetrahydrofolat. *Enzyme:* (1): N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methyltetrahydrofolat- Reduktase (MTHFR), (2): Methioninsynthase (MS), (3): Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT), (4): Methionin-Adenosyltransferase (MAT), (5): R-Methyltransferase (6): S-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAHH), (7): Cystathionin-β-Synthase (CBS), (8): Cystathionin-γ-Lyase (CGL), (9): Cystein- Dioxygenase, (10): Cysteinsulfinsäure-Dehydrogenase, (11): γ-Glutamyl-Cystein- Synthetase, (12): Glutathion-Synthetase.

Die essentielle Aminosäure Methionin wird dem Körper mit der Nahrung zugeführt. Sie reagiert mit ATP zu S-Adenosyl-Methionin (SAM), welches eine wichtige Aufgabe der Übertragung von Methylgruppen bei vielen biologischen Reaktionen (zum Beispiel in der Synthese von DNA, Proteinen, Hormonen) auf einen entsprechenden Akzeptor übernimmt.

Das SAM wird hierbei zu S-Adenosyl-Homocystein (SAH) demethyliert. Durch Hydrolyse von SAH entstehen Adenosin und Homocystein.

Das toxisch wirkende Homocystein wird entweder durch Remethylierung zu Methionin regeneriert oder es kann über Transsulfurierung irreversibel zu Cystein abgebaut werden. Ein relativ geringer Anteil des Homocysteins wird über die Nieren ausgeschieden und lässt sich somit im Harn nachweisen.

Die Methioninsynthase (MS) ist das Schlüsselenzym für die Remethylierung des Homocysteins zu Methionin. Als Kofaktor wird das Vitamin B12 und als Methylgruppendonator Folsäure beziehungsweise das N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat (N<sup>5</sup>-Methyl-THF) benötigt. Das N<sup>5</sup>-Methyl-THF wird durch die N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methylen-tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) aus N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methylen-tetrahydrofolat (N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-Methylen-THF) synthetisiert, wobei eine Methylgruppe frei wird. Das Vitamin B12 übernimmt die Methylgruppe von Methyl-THF und überträgt diese auf das Homocystein. Methionin und THF entstehen dabei als Endprodukte.

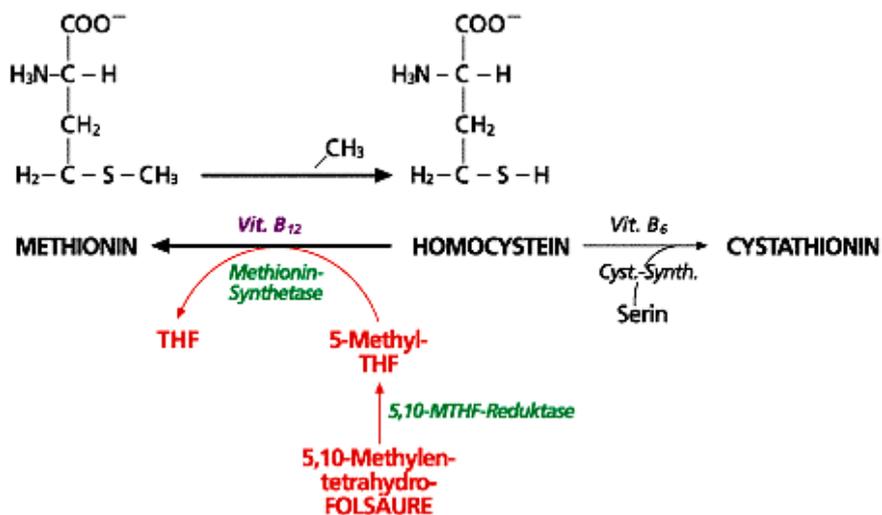


Abbildung 3: Homocystein-Methionin-Stoffwechsel (mod. nach Tönz, 2002)

Eine weitere Möglichkeit, Methionin aus Homocystein zu regenerieren, ist der Betainweg mit Hilfe des Enzyms Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT). Hierbei überträgt das Betain die Methylgruppe auf das Homocystein. Obwohl dieser zweite Remethylierungsweg über die BHMT wenig untersucht ist, beschränkt sich dieser hauptsächlich auf die Leber und die Nieren, wobei sich die Remethylierung über die MS in den meisten anderen Geweben abspielt (McKeecer et al., 1991).

Eine irreversible Transsulfurierung von Homocystien zu Cystein erfolgt über die Cystathionin- $\beta$ -Synthase (CBS). Zuerst katalysiert die CBS die Vitamin B6 (Pyridoxalphosphat) abhängige Reaktion, wobei Cystationin entsteht. Im nächsten Schritt wird das Cystathionin durch die Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (CGL) zu Cystein und  $\alpha$ -Ketobutyrat gespalten, wobei hier das Vitamin B6 als Koenzym verwendet wird. Aus dem entstandenen Cystein kann der Radikalfänger Glutathion synthetisiert werden.

Des Weiteren sei noch erwähnt, dass die Remethylierung und die Transsulfurierung des Homocysteins im Gleichgewicht stehen, wobei der Abbaumechanismus des Homocysteins im Wesentlichen von der SAM-Konzentration beeinflusst wird. Das Enzym hat die Eigenschaft, den Remethylierungsweg über die MS und BHMT zu hemmen und die CBS zu aktivieren. Daher erfolgt bei hohen SAM-Konzentrationen die Transsulfurierung und bei niedrigen Konzentrationen vermehrt die Remethylierung des Homocysteins (*McKeeceer et al., 1991; Finkelstein, 1998*).

### **Ursachen und Symptomatik einer Hyperhomocysteinämie**

Die Ursachen für eine Hyperhomocysteinämie sind vielfältig: Genmutationen, Vitaminmangel (Folsäure, Vitamin B12, Vitamin B6), Funktionsstörung der Nieren und Schilddrüse sowie einige Medikamente (Diuretika, Antiepileptika, Methotrexat), aber auch ein vermehrter Nikotin-, Alkohol- und Kaffeekonsum.

Ein Beispiel für genetische Störungen sind Punktmutationen der N<sup>10</sup>-Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), die für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin benötigt wird. Die häufigste Mutationsvariante bei diesem Enzym ist die autosomal-rezessive vererbte Punktmutation in Position 677 (MTHFR 677C→T). Bei homozygoten Trägern entsteht eine thermolabile Variante der MTHFR mit etwa 50%igem Aktivitätsverlust. Bei dieser Mutation wird Alanin durch Valin an Position 677 (MTHFR 677C→T) ausgetauscht. Etwa 5 bis 15 % der Bevölkerung in den D.A.C.H.-Ländern sind homozygote Träger dieser Mutation. Sie weisen vor allem bei einem Folsäuremangel eine Homocystienerhöhung von etwa 25 % auf mit folgender schwerer Hyperhomocysteinämie und Homocystinurie. Die heterozygote Mutation ist mit einer Prävalenz von bis zu 40% der Bevölkerung sehr häufig, Betroffene

zeigen nur eine geringe Homocystienerhöhung (*Jacques, 1991; Frosst et al., 1995; Tamura, 2006*).

Weiterhin kann auch ein Defekt oder ein Mangel der Methioninsynthase oder der Cystathionin- $\beta$ -synthase (CBS) zu einer Hyperhomocysteinämie führen. Diese Defekte sind jedoch von geringerer Bedeutung, da sie selten vorkommen (*Watkins, 1989*).

Vitamin B12, Vitamin B6 und Folsäure sind wichtige Kofaktoren im Homocysteinestoffwechsel. Ein Mangel dieser Vitamine durch Fehl- oder Mangelernährung verursacht eine Erhöhung der Homocystein-Konzentration. Eine der häufigsten Ursachen für einen Folsäuremangel ist zum Beispiel der unzureichende Verzehr von Obst und Gemüse. Die tägliche Folsäure-Aufnahme (197-235 $\mu$ g für Männer, 168-214 $\mu$ g für Frauen) liegt unterhalb der empfohlenen Tageszufuhr von etwa 400 $\mu$ g (*Stabler et al., 1988; DeBree et al., 1997*).

Einen Vitamin B12-Mangel beobachtet man hauptsächlich bei älteren Menschen, bedingt durch eine verminderte Magensäuresekretion oder ein Defizit an Intrinsic-Faktor. Die Folge ist eine unzureichende Resorption von Vitamin B12 (*Selhub et al., 1993; Stabler et al., 1993*).

Weitere Ursachen für erhöhte Homocysteinspiegel sind Erkrankungen wie chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus oder eine perniziöse Anämie. Bestimmte Medikamente (Antiepileptika, Fibrate, Diuretika, Lachgas), ein starker Kaffeeconsum sowie ein Nikotinabusus führen zur Beeinflussung der Homocysteinkonzentration durch Antagonisieren von Kofaktoren und Enzymen (*Piyathilake et al., 1994; Nygard et al., 1997*).

In Herrmann et al. (2001) wurde ebenfalls gezeigt, dass Vegetarier, bedingt durch den Vitamin B12-Mangel, erhöhte Homocystein-Konzentrationen aufweisen.

Wie oben erwähnt empfiehlt die „D.A.C.H.-Liga“ einen Homocysteinwert von  $< 10\mu\text{mol/l}$ , denn eine Hyperhomocysteinämie gilt als Risikofaktor für viele Erkrankungen, wie zum Beispiel Arteriosklerose, Osteoporose, neurotoxische Schäden (Alzheimer, Depression) sowie Schwangerschaftskomplikationen (Abort, Präeklampsie, HELLP-Syndrom, Plazentainsuffizienz und Fehlbildungen wie dem Neuralrohrdefekt).

Ein direkter Zusammenhang zwischen einer erhöhten Homocystein-Konzentration und der kardiovaskulären Schädigung, wie zum Beispiel der Arteriosklerose, wurde in Mayer et al. (1996), Robinson et al. (1996) und Pels et al. (1997) belegt.

Besonders gefährlich ist die Gefäßschädigung durch Homocystein in kardiovaskulären Zellen, da in den Endothelzellen lediglich die Folat- und Vitamin B12-abhängige Remethylierung von Homocystein zu Methionin stattfindet. In Folge dessen „kann die Homocysteinsynthese

den Zelltransport rasch übersteigen und eine spezifische Zellschädigung bis hin zum Zelluntergang verursachen“ (*Chen et al., 1999*).

Die atherogenen Mechanismen entstehen hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), zum Beispiel Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxyradikale (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>). Diese entstehen durch die bei Hyperhomocysteinämie vermehrt ablaufende Oxidation von Homocystein zu Homocystin. Die toxischen Wirkungen auf das Endothel lassen sich dadurch erklären, dass die ROS das Stickstoffmonoxid (NO) inaktivieren; dadurch kommt es zur verminderten Vasodilatation. Weiterhin wird eine erhöhte Thrombozytenaggregation durch eine vermehrte Thromboxanbildung ausgelöst. Der oxidative Stress und seine Folgen bestimmen auf diese Weise das klinische Bild der Hyperhomocysteinämie. Des Weiteren fördern ROS die Oxidation von LDL-Partikeln (Low density lipoproteins) und somit werden vermehrt Schaumzellen gebildet. Die Arteriosklerose wird dadurch „angekurbelt“ (*Heinecke et al., 1993; Resch et al., 1995*).

Weiterhin wird ein Gefäßschaden durch ein Defizit an der SAM-Konzentration sowie durch eine erhöhte SAH-Konzentration hervorgerufen. Die Methylierungsreaktion ist auf diese Weise gestört. Man nimmt an, dass dadurch auch eine verringerte Methylierung der DNA von Muskelzellen der Intima stattfindet. Folglich ergibt sich eine Vermehrung von glatten Muskelzellen, die zu einer Gefäßeinengung führt (*Surtees et al., 1997; Loehrer et al., 1998; Newman, 1999*).

Eine Hyperhomocysteinämie wirkt sich im Gehirn ebenfalls sehr schädlich aus. Das Homocystein kann hier nur über die Vitamin B12-abhängige Methioninsynthese abgebaut werden, da im Gehirn die Betain-abhängige Remethylierung nicht möglich ist. Das bedeutet, dass der Homocysteinabbau durch einen Folsäure- oder Vitamin B12-Mangel sich ebenfalls im Gehirn negativ auswirkt. Der neurotoxische Effekt äußert sich dadurch, dass das Homocystein wie das exzitatorisch wirkende Glutamat sich an *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren bindet und zu einem vermehrten Kalziumeinstrom führt, was letztlich in der Apoptose der Nervenzelle endet (*Resch et al., 1995; Wolters et al., 2004*).

Schließlich sollte auch auf die Auswirkungen der Hyperhomocysteinämie auf die Reproduktionsfähigkeit eingegangen werden. In vielen Studien wurde der Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinwerten und Schwangerschaftskomplikationen, wie zum Beispiel erhöhter Abortneigung, Neuralrohrdefekten, Embryopathien, Präeklampsiegefahr sowie einer erhöhten Infertilitäts- und Sterilitätsgefahr, bestätigt (*Stegers-Theunissen et al., 1992; Eskes, 2000; Hague, 2003; Steegers-Theunissen et al., 2004; Tamura, 2006*).

Pathophysiologisch spielen hier wiederum die oben erwähnten ROS eine entscheidende Rolle, denn ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies führt über NO-Inaktivierung zu Endothelschäden in den Gefäßen von Ovar und Uterus. Folglich können sich Mikrothromben in diesen Organen bilden und somit für gestörte Durchblutungsverhältnisse sorgen. Sowohl die Ovulation als auch die Nidation können demzufolge nicht ungestört ablaufen, da sie auf optimale Durchblutungsverhältnisse angewiesen sind. Durch Gefäßverschlüsse in der Plazenta kann das Wachstum des Fetus gestört sein und zum Abort oder zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung führen.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine gewisse Konzentration an ROS benötigt wird für eine „normale“ Spermienfunktion und für die Befruchtung von Samen- und Eizelle, denn Spermatozoen produzieren selbst Oxidantien (ROS). Diese sind für die Akrosomenreaktion und die Sperma-Zona-Pellucida-Interaktion von Bedeutung. Wird jedoch die physiologische Konzentration an ROS überschritten, so kann sich dies schädlich auf die Spermatozoen auswirken, indem es zu vermehrten Membranschäden sowie zu Veränderungen in der Spermien-DNA kommt (*Aitken et al., 1989; Hammadah et al., 2008; Tremellen, 2008; Agarwal et al., 2006*).

Weiterhin spielt die MTHFR-Mutation eine wichtige Rolle, denn sie führt ebenfalls über eine Hyperhomocysteinämie zur erhöhten Bildung von ROS und letztlich zum oxidativen Stress. Azem et al. (2004) sahen bei Frauen mit der homozygoten Mutation im MTHFR-Gen (MTHFR 677 C→T) ein erhöhtes Risiko von Implantationsmisserfolge nach einer IVF-Behandlung. Nicht nur die Implantationsmisserfolge werden durch die Mutation im MTHFR-Gen erhöht, sondern auch die Abortrate (*Nelen et al., 1997; Bae et al., 2007*).

Nelen et al. (2000) berichteten ebenfalls von einer erhöhten Abortneigung bei Frauen mit einer Hyperhomocysteinämie, die durch eine verringerte Vaskularisation im Chorion erklärt wurde.

## 2.2.2 Folsäure

Folsäure, Pteroylmonoglutaminsäure, ist ein wasserlösliches, essentielles Vitamin aus der B-Vitamingruppe. Sie wird jedoch im menschlichen Organismus nicht selbst synthetisiert und muss daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Zwischen Folsäure und den Folaten muss differenziert werden, denn hinter dem Begriff Folat verbergen sich alle folat-wirksamen Verbindungen, wohingegen Folsäure lediglich die synthetisierte Form des B-Vitamins, die Pteroylmonoglutaminsäure, darstellt.



**Abbildung 4:** Struktur der Folsäure (*D.A.C.H.-Liga-Homocystein, 2003*)

Die Folsäure besteht aus einem Pteridinring (2-Amino-4-hydroxy-pteridin) sowie der p-Aminobenzoesäure, die an der C6-Position verknüpft ist. Weiterhin ist an der Carboxylgruppe die L-Glutaminsäure gebunden. Folate weisen dieselbe Grundstruktur auf, wobei an der Carboxylgruppe der Glutaminsäure auch noch weitere Glutamatreste konjugiert sein können. Das bedeutet, dass Folate an dem eigentlichen Folsäure-Molekül mehrere Glutamatreste aufweisen und somit die Pteroylpolyglutaminsäure bilden (*Bässler et al., 2002; Stanger et al., 2003; Stanger, 2004*).

Wie bereits oben erwähnt muss der Mensch seinen Folsäurebedarf aus der Nahrung decken. Hauptsächlich kommen hohe Folsäuremengen im grünen Blattgemüse (Spinat, Salat), in Tomaten, Getreide und Leber (von verschiedenen Säugetieren) vor. Der Plasmareferenzbereich liegt zwischen 5-25 ng/ml. Der tägliche Bedarf erstreckt sich von 60 µg/Tag beim Säugling über 300 µg/Tag beim 4-10-Jährigen und 400 µg/Tag bei einem jungen Erwachsenen bis hin zu 600 µg/Tag bei einer Schwangeren (*DGE, 2000; Bailey, 2000; Gregory, 2001; Bässler et al., 2002; „D.A.C.H.-Liga-Homocystein“, 2003*).



Die biologisch aktive Form der Folsäure ist die 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF). Sie entsteht über die Dihydrofolsäure (DHF) mit Hilfe der Folat- und der Dihydrofolat-Reduktase durch Reduktion aus der Folsäure.

THF und seine Derivate sind Coenzyme für die Übertragung von C1-Gruppen (Methyl-, Methylen- und Formyl-Gruppen), die zum Beispiel an der Synthese von DNA Bausteinen, wie den Purinen Adenin und Guanin sowie dem Pyrimidin Thymin, beteiligt sind. Die Bildung von Desoxythimidin-5'-monophosphat (dTMP) aus Desoxyuridin-5'-monophosphat (dUMP) wird katalysiert durch die Thymidilsynthase. Hier überträgt 5,10-Methylen-THF seine Methylgruppe auf dUMP und es entstehen dTMP und Dihydrofolat (DHF). Ein Mangel an Thymin führt zum Einbau von Uracil in die DNA, was zu Doppelstrangbrüchen und Punktmutationen führt (*Blount et al., 1997; Duthie, 1998*).

Folsäuren sind somit an der DNA-Replikation beteiligt. Daher ist eine ausreichende Folsäuremenge insbesondere während der Schwangerschaft, aber auch bei sich häufig teilenden Zellen, zum Beispiel im Wachstumsalter, notwendig. Weiterhin wird die Folsäure als Akzeptor und Überträger von Hydroxymethylgruppen und Formylgruppen bei der Umwandlung von Glycin zu Serin, im Histidinstoffwechsel, bei der Cholinbiosynthese und für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin gebraucht. Bei der Remethylierung von Homocystein zu Methionin entsteht SAM, ein wichtiger Methylgruppendonator für DNA, RNA und Proteine. Ein Folatmangel führt über verringerte Methioninproduktion zu einem Mangel an SAM, das zu Hypomethylierung führt (*Biesalski et al., 2002*).

Katalysiert wird dieser Schritt durch die N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-Methylen-tetrahydrofolatreduktase (MTHFR). Unter Freisetzung einer Methylgruppe reduziert die MTHFR das N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-Methylen-THF zu 5-Methyl-THF. In diesem Reaktionsschritt entsteht ebenfalls aus 5-Methyl-THF die Tetrahydrofolsäure (*Stanger et al., 2003; Stanger, 2004; Graw, 2006; Fox, 2008; Thomas, 2008*).

## Ursachen und klinische Symptomatik eines Folsäuremangels

Die Ursachen des Folsäuremangels können zum einen bedingt sein durch ungenügende Zufuhr über die Nahrung. Zum anderen führen auch eine verringerte Aufnahme der Folsäure im Magen-Darm-Trakt durch Resorptionsstörungen (zum Beispiel Malabsorptionssyndrome wie die Zöliakie), ein erhöhter Bedarf (zum Beispiel während der Schwangerschaft), bestimmte Medikamente (Methotrexat, Sulfonamide, Phenobarbital) und angeborene Enzymdefekte im Folsäuremetabolismus zu Mangelerscheinungen. Die ersten Zeichen eines Folsäuremangels sind Blutbildveränderungen. Da die blutbildenden Zellen des Knochenmarks eine hohe Teilungsrate aufweisen, macht sich ein Folsäure-Mangel dort als erstes bemerkbar. Über einen Zeitraum von einigen Monaten kommt es zur Übersegmentierung von neutrophilen Granulozyten, zu einer mangelhaften Erythropoese. Letztlich resultiert hieraus eine megaloblastische Anämie, hervorgerufen durch eine gestörte Zellteilung und eine Störung in der Synthese von DNA Vorstufen (*Scott, 1981; Bässler et al., 2002*).

Weiterhin gibt es auch Wechselwirkungen zwischen Folsäure und bestimmten Medikamenten. Sulfonamide zum Beispiel können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der p-Aminobenzoessäure(PABA) diese kompetitiv hemmen. Das heißt, die PABA wird verdrängt und das Sulfonamid wird anstelle von PABA eingebaut. Es gibt aber auch Antagonisten, wie zum Beispiel Methotrexat, Phenobarbital oder Trimethoprim, die die Bildung von Folsäure durch Hemmung der DHF-Reduktase stören.

Des Weiteren konnte durch verschiedene Studien (*Woo et al., 1999; Doshi et al., 2002*) herausgestellt werden, dass sich eine Folsäuresubstitution präventiv auf verschiedene Erkrankungen, wie zum Beispiel kardiovaskuläre Erkrankungen, auswirkt. Ausreichende Folsäuremengen senken ebenfalls die Homocystein-Konzentration.

Da ein Mangel an Folsäure die DNA-Synthese stört und somit zu Defekten in der DNA-Struktur und zu Strangbrüchen führt, ist es ersichtlich, dass eine verringerte Folsäurekonzentration die Krebsentstehung fördert. Insbesondere steigt die Gefahr der Entstehung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen, wobei der genaue Mechanismus der Krebsentstehung bei Folatmangel noch ungeklärt ist. Letztlich gibt es auch eine Korrelation zwischen der Folsäurekonzentration und der Alzheimerkrankheit, dem Down-Syndrom und dem Risiko, an Depression zu erkranken (*Ferraroni et al., 1994; James et al., 1999; Choi, 2000; Wang et al., 2001; Eichholzer et al., 2001; Rampersaud et al., 2002*).

Zu den Enzymdefekten zählt die Mutation im MTHFR-Gen (MTHFR 677C→T). Ein defektes MTHFR hat eine Erhöhung der Homocystein-Konzentration zur Folge.

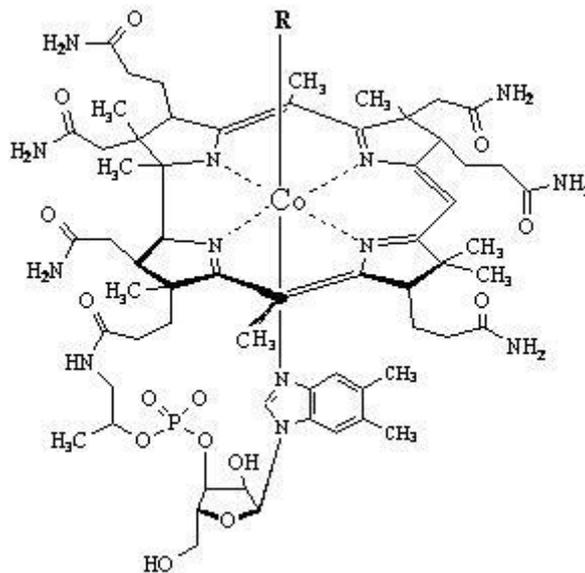
Schwangere, stillende Frauen und Kinder in der Wachstumsphase benötigen besonders viel Folsäure (etwa 400-600 µg/d). Wie oben erläutert, spielen Folsäuren eine bedeutende Rolle bei der Nukleotidsynthese und somit bei der Zellteilung und Zelldifferenzierung. Folglich sind Folsäuren bei der Entwicklung des Feten und des Embryos bedeutend. So kann zum Beispiel bereits ein geringer Mangel zu einer Störung der zellulären Replikation und des Wachstums des Feten oder in der Plazenta führen.

Aufgrund der Gefahr des Neuralrohrdefektes (Spina bifida beziehungsweise Anenzephalie) benötigen Schwangere eine Folsäuresubstitution während der gesamten Schwangerschaft, aber hauptsächlich vor und während den ersten Wochen, denn der Neuralrohrschluss des Embryos erfolgt zwischen dem 21. und dem 28. Tag der Schwangerschaft. Bleibt dieser aus, so resultiert in den meisten Fällen ein Abort oder führt zu schwerwiegenden geistigen Behinderungen des lebend geborenen Embryos. Der exakte Entstehungsmechanismus von Neuralrohrdefekten (NTD) bei erniedrigten Folsäure-Konzentrationen ist noch nicht bekannt. In Van der Put et al. (2001) wurde gezeigt, dass Frauen mit Mutation im MTHFR-Gen erhöhte Homocystein- sowie erniedrigte Folsäurewerte nachzuweisen und ein erhöhtes Risiko haben, ein Kind mit Neuralrohrdefekten zu bekommen. Dieses Risiko kann bei ausreichender Folsäurezufuhr (etwa 0,4-4,0 mg/d) um circa 70 % gesenkt werden (*Steegers-Theunissen et al., 1993; Scott, 1981; Van der Put et al., 2001; Bässler et al., 2002*).

Störungen im Folsäurestoffwechsel führen auch zu anderen Fetopathien wie Herzfehler, Fehlbildungen der Harnwege sowie der Entstehung der Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalte (*Czeizel, 1992; Shaw et al., 1995; Li et al., 1995*).

### 2.2.3 Vitamin B12

Das Vitamin B12, Cobalamin, ist ein wasserlöslicher Kobaltkomplex mit einem zentralen positiv geladenen Kobalt-Ion. Dieser ist von fünf Stickstoffatomen und einem austauschbaren Liganden umgeben. Vier dieser Stickstoffatome gehören zu einem Corrin-Ringsystem. Das fünfte Stickstoffatom, das nukleotidartig an das Corrinringsystem gebunden ist, gehört zum 5,6-Dimethyl-benzimidazol-Ring. An dem austauschbaren Liganden können verschiedene Gruppen angehängt werden, wie zum Beispiel eine Hydroxyl-(Hydroxycobalamin), eine Cyanogruppe (Cyanocobalamin= Vitamin B12), eine Methyl-(Methylcobalamin) oder eine Glutathionylgruppe. Handelt es sich bei dem Liganden um das 5'-Desoxyadenosylligand, so bezeichnet man diese Verbindung als 5'-Desoxyadenosylcobalamin oder auch als Coenzym B12 (Roth et al., 1996; Rondon et al., 1997; Banerjee, 2003; Krautler, 2005).



**Abbildung 6:** Struktur des Vitamin B12 („D.A.C.H. Liga-Homocystein“, 2003)

Das Vitamin B12 kann nicht vom Menschen selbst synthetisiert werden, sondern wird nur von Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilzen, gebildet. Daher müssen Menschen ihren Vitamin B12-Bedarf über die Nahrung decken. Hauptsächlich enthalten tierische Nahrungsmittel wie Fleisch, Fisch Muscheln, Eier und Milch einen hohen Anteil an Vitamin B12 (Watanabe, 2007).

Der Referenzwert für den Plasmaspiegel von Vitamin B12 liegt bei 211-900 pg/ml. Laut DGE wird für einen Erwachsenen eine tägliche Zufuhr von etwa 3,0µg Vitamin B12 empfohlen. Schwangere sowie stillende Frauen sollten bis zu 4µg zu sich nehmen (*DGE, 2000*).

Das über die Nahrung aufgenommene proteingebundene Vitamin B12 wird im Magen durch Salzsäure und Pepsin von den Proteinen gelöst. An Haptocorrin angelagert gelangt es ins Doudenum und bildet dort mit dem Intrinsic-Faktor einen Komplex (Vitamin B12-Intrinsic-Faktor-Komplex). Im proximalen Ileum wird das Vitamin B12 aus dem Komplex durch einen Endozytoseprozess in die Enterozyten aufgenommen, wo es bis zu einem Drittel an das Cobalaminbindeprotein, Transcobalamin 2 (TC), gebunden ist. Mit dem Transcobalamin 2 bildet das Vitamin B12 einen Komplex (Holotranscobalamin, Holo-TC), gelangt in die Blutbahn und wird zu den DNA- und blutbildenden Zellen befördert. Lediglich 30 % des Vitamin B12 im Serum sind an Transcobalamin 2 (TC) gebunden. Sie stellt das aktive Vitamin B12 dar. Etwa 70 % des Vitamin B12 ist an Haptocorrin gebunden und dient hauptsächlich dem Rücktransport von überschüssigem Vitamin B12 zur Leber (*Herrmann et al., 2008*).

Gespeichert wird das Vitamin B12 in Nieren, Herz, Skelettmuskulatur und auch im Gehirn. Der größte Anteil des Cobalamin wird jedoch in der Leber gespeichert. Über die Gallensäure wird das gespeicherte Vitamin B12 in den Dünndarm abgegeben und mehr als die Hälfte wird im Ileum wieder rückresorbiert (enterohepatischer Kreislauf) (siehe oben). Diese Vitamin B12-Reserven können den Bedarf des Menschen für drei bis fünf Jahre decken (*Leischker, 2002; Fyfe et al., 2004*).

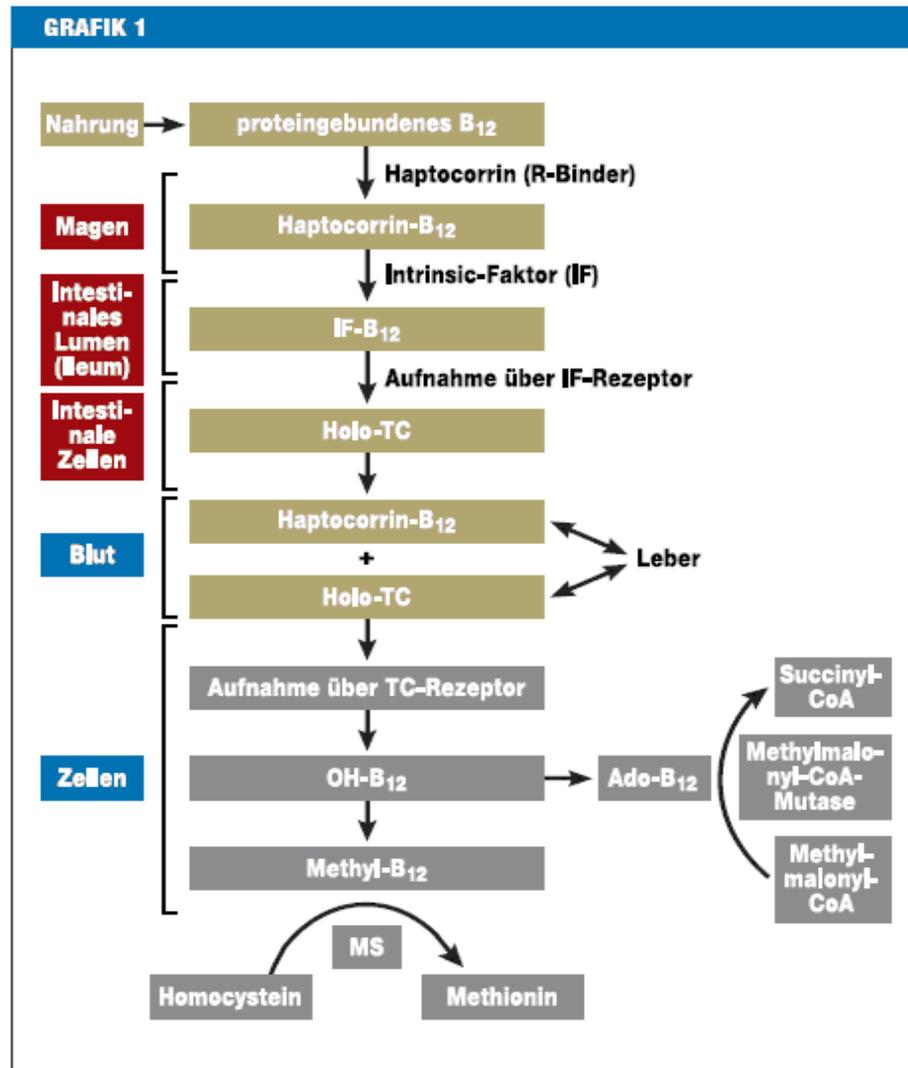
### **Funktionen des Vitamin B12 im Stoffwechsel**

Das Vitamin B12 hat bedeutende Funktionen im Eiweißstoffwechsel, im Nervensystem, beim Zellwachstum, bei der Zellteilung sowie bei der Blutbildung. Hauptsächlich ist das Vitamin B12 als Kofaktor an zwei enzymatischen Reaktionen beteiligt.

Zum einen katalysiert es als Desoxyadenosylcobalamin die mitochondriale L-Methylmalonyl-CoA-Mutase. Sie ist somit an der Isomerisation L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA

beteiligt. Bei einem Mangel an Vitamin B12 wird L-Methylmalonyl-CoA zu Methylmalonsäure (MMA) hydrolysiert.

Im Zytosol dient Vitamin B12 in Form des Methylcobalamins als Kofaktor der Methionin-Synthese bei der Remethylierung von Homocystein zu Methionin beziehungsweise der Bildung des SAM (Rosenblatt, 2001; Wolters et al., 2004).



Transport und zelluläre Aufnahme von Vitamin B<sub>12</sub>;  
 B<sub>12</sub>, Vitamin B<sub>12</sub>; TC, Transcobalamin II; MS, Methioninsynthase; Ado, Desoxyadenosyl

**Abbildung 7:**Transport und zelluläre Aufnahme von Vitamin B12 (Herrmann et al., 2008)

## Ursachen und klinische Symptomatik eines Vitamin B12-Mangels

Da das Vitamin B12 sehr lange in der Leber gespeichert wird, treten Mangelsymptome erst nach mehreren Jahren auf. Hauptsächlich Veganer stellen die Hauptrisikogruppe dar, da wie oben schon erwähnt nur über tierische Nahrungsmittel der Mensch seinen Vitamin B12-Bedarf decken kann.

Es gibt generell drei Ursachen für einen Vitamin B12-Mangel. Zum einen kann ein Mangel durch Fehlernährung verursacht werden. Dies kommt häufig bei Veganern, bei chronischen Alkoholikern und bei älteren Menschen vor (*Leischker, 2002; Wolters et al., 2004; Herold Innere Medizin, 2007*).

Zum anderen kann auch ein Mangel an Intrinsic-Factor eine verminderte Aufnahme- und Transportfähigkeit des Vitamins B12 im Magen-Darm-Trakt verursachen. Ein Mangel an Intrinsic-Faktor kann zum Beispiel bei der perniziösen Anämie, Achlorhydrie bei Autoimmungastritis oder bei Zustand nach Gastrektomie oder Vagotomie entstehen. Weiterhin können auch eine Pankreasinsuffizienz, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis Ulzerosa, Morbus Crohn) mit Malabsorptionssymptomen zu einem Vitamin B12-Mangel führen.

Schließlich können auch genetische Defekte zu einem gestörten Cobalamin-Metabolismus mit den daraus folgenden Mangelsymptomen führen (*Rosenblatt, 2001; Coelho et al., 2008*).

Die klinischen Symptome eines Vitamin B12-Mangels lassen sich in hämatologische, neurologische und gastrointestinale Störungen unterteilen.

Die perniziöse Anämie, bei der Antikörper gegen Parietalzellen des Magens und den Intrinsic-Faktor gebildet werden, zeichnet sich durch eine Panzytopenie (Leukopenie und Thrombopenie) mit makrozytärer Anämie sowie übersegmentierten Leukozyten aus. Allgemeine Anämiesymptome wie Müdigkeit, verminderte Leistungsfähigkeit und Blässe sind ebenfalls zu erkennen. Im Knochenmark findet eine ineffektive Erythro-, Granulo- und Thrombopoese statt (*Herold Innere Medizin, 2007*).

Zu den neurologischen Veränderungen gehören die Polyneuropathie, Störungen der Tiefensensibilität und des Vibrationsempfindens sowie die funikuläre Myelose. Hierbei kommt es zur Störung der Synthese des Myelins im Bereich der Hinter- und Seitenstränge des

Rückenmarks. Klinisch äußert sich dies in einer Gangunsicherheit (spinale Ataxie), Paresen und schmerzhaften Parästhesien an Händen und Füßen.

Ferner wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vitamin B12-Mangel und dem vermehrten Auftreten von Depressionen, Demenzerkrankungen, Gedächtnisstörungen, Halluzinationen und Persönlichkeitsstörungen festgestellt (*Karnaze, 1990; Healton et al., 1991*).

Schließlich sollte auch auf den negativen Einfluss des Vitamin B12-Mangels auf die Reproduktionsfähigkeit sowie den Schwangerschaftsverlauf eingegangen werden. Es wurden viele Fälle beschrieben, bei denen niedrige Vitamin B12-Konzentrationen zu höheren Abort-beziehungsweise Fehlgeburtsraten führten. Der Grund für diesen Zusammenhang wurde auf der einen Seite mit einem Anstieg der Homocystein-Konzentration erklärt. Wie schon erklärt, kann die Vitamin B12-abhängige Remethylierung des Homocysteins nicht ablaufen mit der Folge einer Hyperhomocysteinämie. Auf der anderen Seite wurden auch Fälle beschrieben, in denen Mutationen im Vitamin B12- und auch im Homocystein-Stoffwechsel zu erhöhten Abortraten führten. In der Untersuchung von Zetterberg et al. (2003) wiesen Embryone, die sowohl eine MTHFR als auch eine Mutation im Transcobalaminbindeprotein haben, eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit einer spontanen Fehlgeburt auf. Dadurch steigt auch die Wahrscheinlichkeit des Feten für die Entwicklung von Neuralrohrdefekten (*Afman et al., 2001; Reznikoff-Etievant et al., 2001; Candito et al., 2003; Westphal et al., 2004; Hübner et al., 2008; VanderJagt et al., 2011*).

## **2.3 Faktoren mit negativem Einfluss auf das Auftreten einer klinischen Schwangerschaft**

Zusammenfassend werden in diesem Abschnitt Faktoren genannt, die einen möglichen positiven oder negativen Einfluss auf das IVF/ICSI-Ergebnis haben.

Beispiele sind das Alter des Paares, der Lebensstil und Hormone, die bei der Stimulation der Ovarien bei einem IVF/ICSI-Behandlungszyklus benutzt werden. Weiterhin von Bedeutung für die Entstehung und Reifung von Eizellen und deren regelrechte Befruchtung und Wachstum sind neben oben genannten Faktoren auch Substanzen beziehungsweise Stoffe, wie zum Beispiel Zytokine.

Das Alter korreliert mit der Homocystein-Konzentration. Sie steigt sowohl bei Männern als auch bei Frauen mit zunehmendem Alter an (*Durand et al., 2001*). Wie bereits beschrieben stellt eine Hyperhomocysteinämie einen Risikofaktor hauptsächlich für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (zum Beispiel Arteriosklerose) dar. Weiterhin wirkt sich ein erhöhter Homocysteinspiegel schädlich auf die plazentare Durchblutungsverhältnisse, die Follikulogenese und auf die ovarielle Steroidbiosynthese aus. Palvik (2006) hat festgestellt, dass hohe Homocysteinmengen zu verminderter Estradiolsekretion der Granulosazellen führen. Eine erhöhte uteroplazentäre Thromboseneigung und Gefäßverschlüsse führen zu vermehrter Abortneigung sowie gehäufte intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) (*Martinelli et al., 2003; Jauniaux et al., 2006*).

Das Alter hat ebenfalls einen wichtigen Stellenwert bezüglich des Auftretens einer klinischen Schwangerschaft, sowohl auf natürlichem Weg als auch bei der extrakorporalen Befruchtung mittels IVF/ICSI-Therapie. Sancken et al. (2005) zeigten, dass mit steigendem Alter auch die Anzahl der aneuploiden Eizellen zunimmt. Das Deutsche IVF-Register (2005) berichtet über eine negative Korrelation zwischen dem Alter der Patientinnen und der Schwangerschaftsrate.

In Van Voorhis (2007) wurde gezeigt, dass mit zunehmendem Alter bei Frauen sowohl hormonelle als auch organische Störungen dazu führen, dass das Wachstum und die Reifung von Eizellen sowie die „Einnistung“ einer befruchteten Eizelle in der Schleimhaut der Gebärmutter erschwert werden.

Zytokine sind Polypeptide, die hauptsächlich in zwei Gruppen unterteilt werden können: Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine. Man teilt sie ein in Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Transforming-Growth-Faktor (TGF), Leukaemia-Inhibiting-Factor (LIF), Colony-stimulating-Factor, Interferone (INF). Zytokine können von allen kernhaltigen Zellen im menschlichen Organismus, und somit auch von Zellen im weiblichen Reproduktionstrakt (Endometrium, Theka- und Granulosazellen, Dezidualzellen der Plazenta) gebildet werden (*Saito, 2000*). Sie haben eine wichtige Rolle als Mediatoren im Immunsystem. Zusätzlich beeinflussen sie das Zellwachstum und sind ebenfalls für die Bildung anderer Zytokine zuständig, so zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen. Zusätzlich sind einige Zytokine an der Angio- und Vaskulogenese von Gefäßen sowohl in der prä- als auch in der postnatalen Phase beteiligt.

Arici et al. (1997) demonstrierten, dass die LIF (Leukaemia-Inhibitory-Faktor)-Konzentration in der Follikelflüssigkeit höher ist als im Serum, und bestätigten das Ovar als Produktionsort für dieses Zytokin. Dadurch konnte gezeigt werden, dass gewisse Zytokine von Zellen im Ovar oder Endometrium selbständig produziert werden können.

Mögliche positive oder negative Einflüsse der Zytokine auf die Reproduktionsmedizin werden kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen bestätigen eine positive Korrelation zwischen dem LIF und der Implantationsrate (*Fry et al., 1992; Cullinan et al., 1996*), der Östrogensynthese, der Follikelzellen sowie der Entwicklung und Qualität der Eizellen. Weiterhin postuliert man einen möglichen Zusammenhang des LIF und der Ursache des PCO-Syndroms und der Endometriose (*Illera et al., 2000*). Auf der anderen Seite wurde jedoch in *Ozornek et al. (1999)* und in *Hsieh et al. (2005)* dieser Zusammenhang widerlegt.

Auch der VEGF (Vascular-Endothelial-Growth-Faktor) konnte bei Patientinnen unter IVF-Behandlung nachgewiesen werden. *Friedman et al. (1997)*, *Ocal et al. (2004)* und *Asamikpoulus et al. (2005)* brachten eine erhöhte VEGF-Konzentration in der FF mit dem Auftreten einer klinischen Schwangerschaft in Zusammenhang. Sie wurde als prognostischer Marker für das Nichteintreten einer Schwangerschaft angesehen. Aber auch ein Zusammenhang mit dem Alter der Patientinnen konnte gezeigt werden. Das bedeutet, dass mit steigendem Alter die VEGF-Konzentration ansteigt (*Friedman et al., 1997; Manau et al., 2000*). Allerdings gibt es auch hier Studienergebnisse, die keine Korrelation zwischen dem VEGF und den IVF/ICSI-Ergebnissen feststellen konnten, zum Beispiel *Benifla et al. (2001)* oder *Kim et al. (2004)*.

Das Vorkommen des Interleukin 1 (IL-1) in den Granulosazellen des Ovars sowie in der Follikelflüssigkeit wirkt hormonabhängig auf die Eizellreifung und -entwicklung sowie auf die Ovulation und letztlich auf die Befruchtungsfähigkeit (*Barak et al., 1992a, b; Watanabe et al., 1994; Jasper, 1995; Tao et al., 1997; Carlberg et al., 2000; Wang et al., 2002*). In diesen Studien wurde postuliert, dass durch die gesteigerte Gefäßpermeabilität, ausgelöst durch IL-1 und dem TNF- $\alpha$ , die Durchlässigkeit für Gonadotropine wie LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) erleichtert wird. Dadurch wird zum Beispiel die Follikelreifung gefördert. Aber auch hier gibt es Studiengruppen, die keine Korrelation zwischen Interleukinen und dem Ergebnis der IVF/ICSI-Behandlung gefunden haben (*Barak et al., 1992b; Bili et al., 1998; Barrionuevo et al., 2000*).

Schließlich wurde auch der negative Einfluss einer erhöhten NO-Konzentration (Stickstoffmonoxid) in den Granulosazellen auf die Steroidbiosynthese, der Entwicklung und Qualität der Eizellen in Van Voorhis et al. (1994) bestätigt.

Die IVF/ICSI-Behandlung beginnt mit der Downregulation der Ovarien zur Unterdrückung des Eisprungs durch Gabe eines GnRH-Analogons (Gonadotropin releasing hormone). Danach erfolgt die Stimulation der Ovarien mit Hilfe von Gonadotropinen (FSH und LH) entweder nach dem langen (LP) oder kurzen Protokoll (SP). In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob eine Stimulationsart und gegebenenfalls welche sich positiv auf die Schwangerschaftsrate auswirkt. Jedoch ist man sich nicht ganz einig, welche Art der ovariellen Stimulation die bessere ist (*Strehler et al., 2001; Devroey et al., 2009a; Verberg et al., 2009*).

## 2.4 Eigene Fragestellung und Zielsetzungen

In der IVF-/ICSI-Behandlung kommt es pro Zyklus in etwa 27 % der Fälle zur Schwangerschaft, diese wiederum enden in 18 % mit einer Geburt (*Felberbaum, 2007*).

Um diese relativ niedrigen Erfolgsaussichten der IVF-/ICSI-Behandlung zu verbessern, hat man sich in den letzten Jahren immer mehr damit beschäftigt, Einflussfaktoren zu finden, die das Ergebnis von IVF-/ICSI beeinflussen.

In Anlehnung an frühere Studien über diesen Themenkomplex bestand die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation in der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 und den Therapieresultaten einer ICSI-Behandlung.

- Zuerst erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen von Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 im Serum und in der Follikelflüssigkeit von 86 Patientinnen, die sich einer ICSI-Behandlung unterzogen hatten.
- Weiterhin erfolgt der Vergleich dieser Konzentrationen zwischen der G1- (25-34 Jahre, n=42) und G2-Altersgruppe (35-43 Jahre, n=44) sowie zwischen der S1- (schwanger, n=23) und S2-Gruppe (nicht schwanger, n=63) auf mögliche signifikante Unterschiede.
- Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den untersuchten Parametern (Homocystein Folsäure, Vitamin B12) besteht.
- Schließlich sollte festgestellt werden, ob Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 mit den klinischen Parametern (Anzahl der gewonnenen, befruchteten und transferierten Eizellen, Befruchtungs- und Schwangerschaftsrate sowie das Auftreten einer Schwangerschaft und Geburt) korrelieren und ob diese die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Schwangerschaft beeinflussen können.

### **3. Material und Methoden**

## **3.1 Probanden**

Es wurden 86 Follikelflüssigkeits- und Serumproben von Patientinnen untersucht, die im Rahmen einer assistierten Reproduktionsmaßnahme in der Homburger Universitätsfrauenklinik von Ende 2008 bis Anfang 2009 in Behandlung waren.

Die Proben wurden im Hinblick auf ihre Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration analysiert und diese mit den retrospektiv aus den Patientenakten entnommenen Daten bezüglich der Schwangerschaft auf vorhandene Korrelationen untersucht.

Die Patientinnen waren zwischen 25 und 43 Jahre alt ( $33,4 \pm 3,8$  Jahre) und alle 86 Paare wurden mit der ICSI-Therapie behandelt.

### **3.1.1 Gruppeneinteilung**

Das Patientenkollektiv wurde einerseits nach dem Alter in eine G1- (25-34 Jahre; n=42) und eine G2-Gruppe (35-43 Jahre; n=44), andererseits nach dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme in eine S1- (schwanger; n=23) und eine S2-Gruppe (nicht schwanger; n=63) aufgeteilt.

Durch diese Einteilung sollte untersucht werden, ob Zusammenhänge zwischen den untersuchten Parametern und den klinischen Daten im Vergleich zwischen den Kollektiven bestehen.

## **3.2 Behandlungsablauf**

Nach einer ausführlichen Anamnese schloss sich eine diagnostische Untersuchung an, die bei der Frau eine vaginale Untersuchung, eine Sonographie, eine Zyklus- und Hormonanalyse sowie, wenn notwendig, eine Laparoskopie mit Chromopertubation zur Untersuchung der Tubendurchlässigkeit beinhaltete. Die Ehemänner der Patientinnen wurden ebenfalls klinisch untersucht, gefolgt von einer Hormon- sowie Spermienuntersuchung. Im Ejakulat, das durch Masturbation gewonnen wurde, erfolgte eine mikroskopische Analyse der Spermienqualität (pH-Wert, Volumen, Farbe, Motilität und Morphologie) gemäß den WHO-Richtlinien (*World Health Organization, 1999*).

Je nach Ursache und Ausprägung der Sterilität erfolgte die Wahl der Befruchtungsmethode. Bei einem normalen Spermioogramm (nach WHO-Richtlinien) gibt es die Möglichkeit, zunächst eine intrauterine Insemination (IUI) durchzuführen. Bei Sterilitätsursachen, wie etwa der Tubenundurchlässigkeit, Endometriose oder bei leichter andrologisch bedingter männlicher Infertilität erfolgt die IVF. Bei einem eingeschränkten Spermioogramm ist das ICSI das Verfahren der Wahl.

Bei dem Patientenkollektiv der vorliegenden Untersuchung wurde ausschließlich die ICSI-Therapie angewandt, da die Mehrzahl der Patienten sich wegen schwerer männlicher Sterilität behandeln ließ oder bei ihnen nach Versagen einer vorherigen IVF-Therapie die ICSI-Behandlung indiziert war.

### **3.2.1 Kontrollierte ovarielle Hyperstimulation**

Es gibt unterschiedliche Behandlungsprotokolle (Protokolle der hormonellen Stimulation der Eierstöcke), mit dem Ziel, eine ausreichende Anzahl von Eibläschen (Follikeln) mit guten Eizellen (Oocyten) heranwachsen zu lassen. Das „lange Protokoll“ mit einem GnRH-Agonisten ist das am häufigsten angewendete Stimulationsprotokoll mit den besten Schwangerschaftsraten in der IVF-/ICSI-Behandlung (*Tan SL, 1992*).

Beim „kurzen GnRH-Agonisten-Protokoll“ erfolgt die tägliche Agonisten-Gabe in der frühen Follikelphase ab dem 2. Zyklustag bis zur hCG-Gabe (*Garcia JE, 1990*).

Für Patientinnen mit Endometriose wurde das „ultralange Protokoll“ entwickelt. Hierbei wird etwa 2-6 Monate vor Gonadotropinstimulation mit der Gabe der GnRH-Agonisten-Gabe begonnen (*Kim CH, 1996*).

Schließlich gibt es ebenfalls das „ultrakurzen Protokoll“. Hierbei endet die GnRH-Agonisten-Gabe frühzeitig in der mittleren bis späten Follikelphase bereits vor der Ovulationsinduktion (*Dorn C und Griesinger G, 2009*).

Alle Patientinnen der vorliegenden Studie wurden gemäß dem „langen Protokoll“ (LP) behandelt. In der zweiten Zyklushälfte (21.-23. Tag) des letzten spontanen Vorzyklus erfolgte eine vaginale Ultraschalluntersuchung, um sicherzustellen, dass der Eisprung stattgefunden hatte und die Patientin sich somit in der Mitte der 2. Zyklusphase befindet. Die Downregulation der endogenen Gonadotropinausschüttung (FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon)) aus der Hypophyse wurde durch eine 14-tägige intramuskuläre Gabe von GnRH-Analoga (*Decapeptyl depot®; Ferring, Kiel, Deutschland*) eingeleitet.

Danach wurden die Konzentrationen von FSH und Östradiol gemessen und man erwartete niedrige Konzentrationen (FSH-Konzentration  $<2$  mU/ml; Östradiol  $<30$  pg/ml). Diese Kontrolle führt man durch, um sicherzugehen, dass die Downregulation ausreichend gewirkt hat. Eine Ultraschallkontrolle der Ovarien wurde durchgeführt, um eine eventuelle Zystenbildung zu erkennen. Daraufhin wurden die Ovarien mittels der Gonadotropine LH und FSH für vierzehn Tage stimuliert. Am 12. Stimulationstag erfolgte eine weitere Ultraschallkontrolle, um zu überprüfen, ob Follikel entstanden sind, und wenn ja, wie groß diese waren. Wenn auch nur ein Follikel einen Durchmesser von  $>18$  mm erreicht hatte, so erfolgte daraufhin die Ovulationauslösung durch die Gabe von 10000 I.E. (Internationale Einheiten) HCG (human chorionic gonadotropin; *Chragon®; Ferring, Kiel, Deutschland*). Anschließend wurden nach etwa 36 bis 38 Stunden mittels sonographisch gesteuerter transvaginaler Punktion die reifen Oozyten aus ihrer Follikelflüssigkeit gewonnen (*Hammadeh et al., 2000*). Zur Lutealphasenunterstützung (zur Entwicklung und Reifung des Endometriums) bekamen alle Patientinnen ab dem ersten Tag nach der Punktion zweimal täglich über mindestens 14 Tage 150 mg Progesteron als Vaginalkapseln. Bei positivem Schwangerschaftstest wurde die Progesterongabe bis zur 12. Schwangerschaftswoche fortgeführt.

### 3.2.2 In-vitro-Fertilisation (IVF)

Bei dem Patientenkollektiv der vorliegenden Studie wurde ausschließlich die Intracytoplasmatische Spermieninjektion angewandt. Der Vollständigkeit halber wird jedoch auch der Behandlungsablauf der In-vitro-Fertilisation beschrieben.

Als Indikation für die IVF gelten bestimmte Formen der Sterilität wie zum Beispiel die Tubenpathologie (z.B. Zustand nach Tubenamputation, nicht mikrochirurgisch behandelbarer Tubenverschluss, Endometriose), eine leichte andrologische Subfertilität und, wenn andere Therapiemaßnahmen ausgeschöpft wurden, die idiopathische Sterilität (*Strowitzki 2000*).

Die Eizellen werden direkt nach Entnahme in ein Nährmedium bestehend aus Ham's F10 mit Humanalbumin (Immuno. Heidelberg, Deutschland) überführt und bei 37 °C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung aufbewahrt. Weiterhin wird dem Nährmedium 10 % Patientenserum zugeführt. Anschließend wird der Reifegrad der Eizellen beurteilt (Abbildung 8, 9, 10).



**Abbildung 8** : Eizelle im Germinalstadium (*Brinsden, 1999*)

*Die unreife Eizelle in der Prophase enthält noch einen großen Kern und dicht um die Eizelle liegende Kumuluszellen. Das erste Polkörperchen ist noch nicht ausgestoßen. Eizellen im Germinalstadium lässt man noch 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> nachreifen.*



**Abbildung 9:** Eizelle in der Metaphase I (Brinsden, 1999)

*In dieser Phase ist der Germinalvesikel nicht mehr vorhanden. Das erste Polkörperchen ist jedoch noch nicht sichtbar. Die Eizellen benötigen eine weitere Inkubation von 5 Stunden.*



**Abbildung 10:** Eizelle in der Metaphase II (Brinsden, 1999)

*Die Corona radiata ist voll ausgebildet und eng anliegend, der Cumulus oophorus breit, das Zytoplasma homogen und das erste Polkörperchen ist ausgestoßen.*

Nur Eizellen, die sich in der Metaphase II-Stadium befinden, sind reif und können mit den aufbereiteten Spermien injiziert werden.

Das Ejakulat der Partner wird am selben Tag nach 4 tägiger Karenz durch Masturbation frisch gewonnen, nach den Richtlinien der World Health Organization (*WHO, 1999*) analysiert und anschließend aufbereitet. Ziel dieser Aufbereitung ist die Selektion von progressiv beweglichen Spermien mit einer normalen Morphologie (und infolgedessen qualitativ gute Spermien für die IVF-/ICSI-Behandlung darzustellen).

Nach etwa 18 Stunden wird überprüft, ob eine Zellteilung stattgefunden hat.

Maximal 3 Eizellen im Vierzellstadium (Abbildung 11), also wenn zwei Vorkerne (Pronuklei) samt Polkörperchen erkennbar sind, können nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden in die Gebärmutter transferiert werden.



**Abbildung 11:** Embryo im Vierzellstadium (*Brinsden, 1999*)

### 3.2.3 Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) wurde erstmalig 1992 erfolgreich durchgeführt (*Palermo et al., 1992*). Damit konnte man Paaren helfen mit schwerer männlicher Subfertilität oder mit Fertilisationsversagen nach IVF-Behandlung helfen. Die Ovarstimulation und die Eizellentnahme erfolgen genauso wie bei der IVF-Behandlung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eizellen nach Entnahme denudiert, das bedeutet, sie wurden von den sie umgebenden Cumuluszellen befreit. Dies erfolgte mittels einer hyaluronidasehaltigen Lösung (80 IU/ml) (Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Deutschland). Anschließend wurden die abgelösten Cumuluszellen mit Hilfe von Glaskapillaren vollständig entfernt. Auf diese Weise kann während der Spermieninjektion keine maternale DNA in die Eizelle gelangen (*Hammadeh et al., 1999*).

Anschließend wurden die Eizellen in ein Nährmedium, bestehend aus Ham's F10-Medium und 10 % igem Patientenserum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung überführt und der Reifegrad beurteilt.

Befand sich die Eizelle noch im Germinalstadium, wurde sie weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Befand sie sich in dem Metaphase I-Stadium, wurde sie für circa 5 weitere Stunden inkubiert.

Nur bei Eizellen, die sich in dem Metaphase II-Stadium befanden, wurden die aufbereiteten Spermien (siehe oben) in das Zytoplasma der Eizelle injiziert.

Nach erfolgter Injektion wurden die Eizellen 18-24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert.

Schließlich überprüfte man, ob eine Befruchtung stattgefunden hat. Der Nachweis von zwei Vorkernen (Pronuklei) (Vorkernstadium) galt als Reifeparameter und bewies somit die Befruchtung (*Rosenbusch et al., 2001*). Die nun entstandenen Embryonen kultivierte man für etwa weitere 48 Stunden und transferierte daraufhin laut Embryonenschutzgesetz maximal drei Embryonen in den Uterus (*Hammadeh et al., 2002a*).

Eine Schwangerschaft konnte 14 Tage nach dem Embryonentransfer mittels  $\beta$ -HCG-Messung im Serum nachgewiesen werden. Fiel der  $\beta$ -HCG-Test positiv aus, wurde die Schwangerschaft mittels transvaginaler Sonographie bestätigt.



**Abbildung 12:** Intrazytoplasmatische Spermieninjektion:

*Die Injektionskapillare durchdringt die Zona pellucida. Die Haltekapillare fixiert die Eizelle, das Polkörperchen ist bei 12 Uhr gelegen, das Spermium ist in der Injektionskapillare sichtbar (Bild: [http://www.endokrinologikum.com/upload/images/CMSEditor/image/icsi\\_2.jpg](http://www.endokrinologikum.com/upload/images/CMSEditor/image/icsi_2.jpg))*

### **3.3 Materialgewinnung**

- Am Tag der Ovulationsauslösung wurde jeder Patientin venöses Blut aus der Brachialisvene zur Bestimmung des Östrogenwerts entnommen. Nach dem Zentrifugieren für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen wurde das Serum nach Abtragung des Zellüberstandes bei -80 °C eingefroren.  
Die Proben sind circa 3 Monate haltbar.
- Am Tag der Follikelpunktion wurde jeder Patientin auch Follikelflüssigkeit entnommen. Man untersuchte die gepolten Follikelflüssigkeiten einer Patientin, also die Follikelflüssigkeit von allen Follikeln einer Patientin. Auf diese Weise kann man die ovarielle Gesamtproduktion beurteilen. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Auch hier wurden die Proben nach Abtragung des Zellüberstandes bei -80 °C eingefroren.  
Die Proben sind circa 3 Monate haltbar.

#### **Datenschutz und Ethikvotum**

Da vor der reproduktionsmedizinischen Behandlung in der Regel jede Patientin nach entsprechender Aufklärung ihre Zustimmung zur Verwendung ihrer Daten zu Studienzwecken gibt wurde auf eine Begutachtung der Ethikkommission verzichtet.

## 3.4 Methoden

### 3.4.1 Bestimmung der Homocystein-Konzentration im S und in der FF

Die Homocystein-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit wurden mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt.

Bei der HPLC handelt es sich um ein Säulen-Flüssigkeits-Chromatographieverfahren. Hierbei wird die Probe über eine flüssige Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) befördert und aufgrund der verschiedenen Polarität der in der Probe enthaltenen Substanzen kann eine Aufspaltung in die einzelnen Bestandteile erfolgen. Hier wird die Stärke der Polarität der untersuchten Substanz ausgenutzt, da eine Substanz je nach Polarität unterschiedlich lang in der Trennsäule verbleiben kann. Die anschließende Detektion findet mittels Fluoreszenz-Spektrometer statt. Das abschließende Ergebnis erhält man in Form einer Elutionskurve im Chromatogramm. Sie zeigt die Abhängigkeit für die Menge (Konzentration) der untersuchten Substanz von der Zeit.

**Tabelle 1:** Inhalt des Homocystein HPLC Kit der Firma Immundiagnostik

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
KC2801 LM	MOPHA	Laufmittel	1x1000 ml
KC 2801 KA	CAL	Kalibrator (lyophilisiert., 1ml; Konzentration)	1 Fläschchen
KC 2801IS	INT STD	Interner Standard (lyophilisiert, 12ml)	1 Fläschchen
KC 2801 RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	1x 25ml
KC 2801 RL	REDSOL	Reduktionslösung (lyophilisiert., 2,4 ml)	1 Fläschchen
KC 2801 DL	DER	Derivatisierungslösung	1x 12 ml
KC 2801 FR	PREC	Fällungsreagenz	1x 12 ml
KC 2801 KO	CRTL 1, CRTL 2	Kontrolle 1 und 2 (lyophilisiert., 250µl; Konzentration)	2x 3 Fläschchen

Die Bestimmung der Konzentration von Homocystein erforderte zuerst eine Probenaufbereitung (siehe unten) sowie eine darauffolgende Derivatisierung (DER). Dies bedeutet, dass als Erstes der interne Standard (INT STD) zu den Proben hinzugegeben wurde und dann wurden sie mit der Reduktionslösung (REDSOL) und der Derivatisierungslösung (DER) vermischt. Dadurch wurde das noch an Albumin gebundene Homocystein freigesetzt und diese in zwei Moleküle gespalten. Die Derivatisierungsreaktion diente der Umsetzung des Homocysteins in eine fluoreszierende Substanz. Im nächsten Schritt wurden den Proben eine Fällungsreagenz (PREC) hinzugegeben, wodurch man eine Abtrennung höher molekularer Substanzen erzielte.

Die Trennung mittels HPLC erfolgte in einem isokratischen Verfahren (das bedeutet, dass die Zusammensetzung der mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich bleibt) bei 30°C auf einer „reserved-phase“-Säule. Bei einer Reserved-Phase-Chromatographie handelt es sich um eine unpolare stationäre Phase. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor (Exzitation: 385 nm; Emission: 515 nm) und über den mitgelieferten Plasma-Kalibrator war die Quantifizierung und die Berechnung der Ergebnisse anhand der Integration der Peakfläche möglich.

#### *Verwendete Laborgeräte und Hilfsmittel:*

- HPLC-Gerät mit Fluoreszenz-Detektor
- reserved phase C18- Säule
- Zentrifuge
- Warmwasserbad
- Verschiedene Pipetten
- 1,5 ml Eppendorfgefäße
- Vortex Wirbelmischer

#### *Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien:*

Die Testreagenzien können bei 2-8 °C, der Kalibrator (Cal), der interne Standard (INT STD) und die Kontrollen (CRTL) bei -20 °C gelagert werden und sind bis zum Verfallsdatum verwendbar. Der Kalibrator wurde mit 1 ml und der Interne Standard mit 12 ml der Reduktionslösung (RECSOL) aufgelöst. Anschließend wurden diese Lösungen aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Um die Kontrollen (CRTL1, 2) in flüssiger Form zu verwenden, wurden diese in 250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst.

Schließlich wurde die Reduktionslösung (REDSOL) mit 2,4 ml Rekonstitutionslösung (RECSOL) gemischt, welche bei 2-8 °C 3 Monate lang haltbar ist.

*Probenvorbereitung:*

Die Proben wurden nach der Abnahme für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Danach können sie bei 4 °C gelagert werden. Für eine längere Lagerung (mehrere Monate bis zu einem Jahr) können die Patientenproben bei -20 bis -80 °C aufbewahrt werden.

*Testdurchführung:*

In 1,5 ml-Reagenzgefäße wurden 50 µl Patientenprobe, Kalibrator (CAL) oder (CRTL 1,2) Kontrolle 1 und 2 (CRTL 1,2) vorgelegt. Hinzu wurden 50 µl Interner Standard (INT STD), 20 µl Reduktionslösung (REDSOL) und 100 µl Derivatisierungslösung (DER) gegeben, gemischt und für 10 Minuten bei 60 °C miteinander reagieren gelassen. Nach Hinzugabe von 100µl Fällungsreagenz (PREC) wurde die Lösung gemischt und für 5 Minuten bei 2 bis 8 °C stehen gelassen, danach musste sie nochmals für 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert werden. Schließlich injizierte man 20 µl der aufgearbeiteten Probe in das HPLC- System.

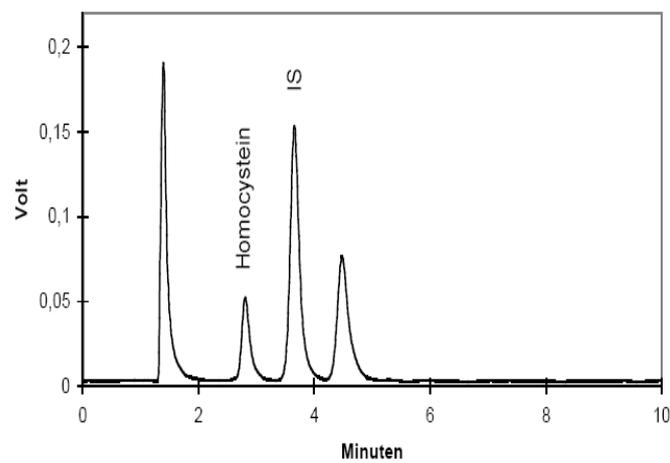
*Chromatographische Bedingungen:*

- Säulenmaterial: MZ Inertsil ODS-2; 5 µm  
MZ PerfectBond ODS- 2; 5 µm  
Bischoff Prontosil Eurobond; 5 µm
- Säulendimension: 125 mm x 4 mm
- Fluss: 0,7- 1,0 ml/ min
- Temperatur: 30 °C
- Detektion: Fluoreszenzdetektion Exzitation: 385 nm  
Emission: 515 nm
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Laufzeit: 5 Minuten

*Auswertung:*

$\frac{\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konzentration des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Interner Standard der Probe}} \times F = \text{Konzentration der Probe}$

$F = \frac{\text{Peakhöhe Interner Standard des Kalibrators}}{\text{Peakhöhe Kalibrator}}$



**Abbildung 13:** Musterchromatogramm

### **3.4.2 Bestimmung der Folsäure-Konzentration im S und in der FF**

Die quantitative Bestimmung der Konzentration der Folsäure wurde maschinell mit ADVIA Centaur-XP-System der Firma Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.) durchgeführt. Dieser ist ein kompetitiver Immunassay, bei der die direkte Chemilumineszenz- Technologie angewandt wird. Die Folsäure in der Patientenprobe konkurriert mit der Folsäure im Reagenz, das Acridiniumester-markiert ist, um eine begrenzte Menge an Folsäurebindendem Protein, das mit Biotin markiert ist. Biotin-markiertes Folsäure-Bindeprotein bindet an Avidin, das kovalent an paramagnetischen Partikel in der Solid Phase gebunden ist. Zur Trennung der Folsäure von den endogenen Bindeproteinen in der Probe wird die Probe im ADVIA Centaur Folate-Test vorbehandelt. Zwischen der Folsäure-Menge in der Patientenprobe und den vom System gemessenen Lichteinheiten (RLUs) besteht eine umgekehrt-proportionale Beziehung.

Detaillierte Beschreibung siehe Herstellerprotokoll.

### **3.4.3 Bestimmung der Vitamin B12-Konzentration im S und in der FF**

Die Konzentration des Vitamin B12 wurde maschinell mit ADVIA Centaur-XP-System der Firma Siemens (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.) durchgeführt. Dieser ist ein kompetitiver Immunassay, bei der die direkte Chemilumineszenz- Technologie angewandt wird. Das Vitamin B12 in der Patientenprobe konkurriert mit dem Acridiniumester-markierten Vitamin B12 im Reagenz und ebenfalls mit dem im Reagenz enthaltenem gereinigtem Intrinsic Faktor. Der Intrinsic Faktor ist an paramagnetischen Partikel gebunden. Zur Freisetzung von Vitamin B12 aus endogenen Bindungsproteinen in der Probe werden das Releasing Agens (Natriumhydroxid) und DTT verwendet. Zwischen der Vitamin B12-Menge in der Patientenprobe und den vom System gemessenen Lichteinheiten (RLUs) besteht eine umgekehrt-proportionale Beziehung.

Eine detaillierte Beschreibung siehe Herstellerprotokoll.

### 3.5 Statistische Auswertung

Zur deskriptiven Statistik wurden zunächst für alle zu untersuchenden Parameter der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Median bestimmt. Dabei wurden jeweils das Gesamtkollektiv, die Altersgruppen G1 und G2 sowie die Gruppen S1 (schwanger) und S2 (nicht schwanger) betrachtet.

Die weitere analytische Statistik zur Untersuchung bestehender Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern erfolgte rechnerisch mittels bivariater Korrelation, wobei jeweils der Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson bestimmt wurde.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde Box & Whisker-Plots verwendet.

Bestehende Korrelationen wurden in Streudiagrammen dargestellt. Zur Berechnung eines p-Wertes wurde der t-Test für verbundene Stichproben bzw. der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Zur Interpretation wurde das Signifikanzniveau wie folgt festgelegt: Ab einem p-Wert von  $\leq 0,05$  liegt statistische Signifikanz vor;  $p \leq 0,01$  gilt als stark signifikant und  $p \leq 0,001$  als hoch signifikant. Ein Korrelationskoeffizient von  $|r| \geq 0,7$  zeigt eine starke Korrelation an.

Um zu untersuchen, ob das Homocystein, die Folsäure oder das Vitamin B12 die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Schwangerschaft beeinflussen, wurde die Odds Ratio bestimmt.

Die statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm SPSS Statistics 17.0 durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

## 4.1 Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Gesamtkollektiv

Ziel der folgenden Untersuchung war es, die Konzentrationen der untersuchten Parameter Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 im Serum und in der Follikelflüssigkeit zu ermitteln und gegebenenfalls deren Zusammenhänge nachzuweisen.

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die ermittelten Konzentrationen.

**Tabelle 2:** Vergleich der Homocystein-, Folsäure und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit

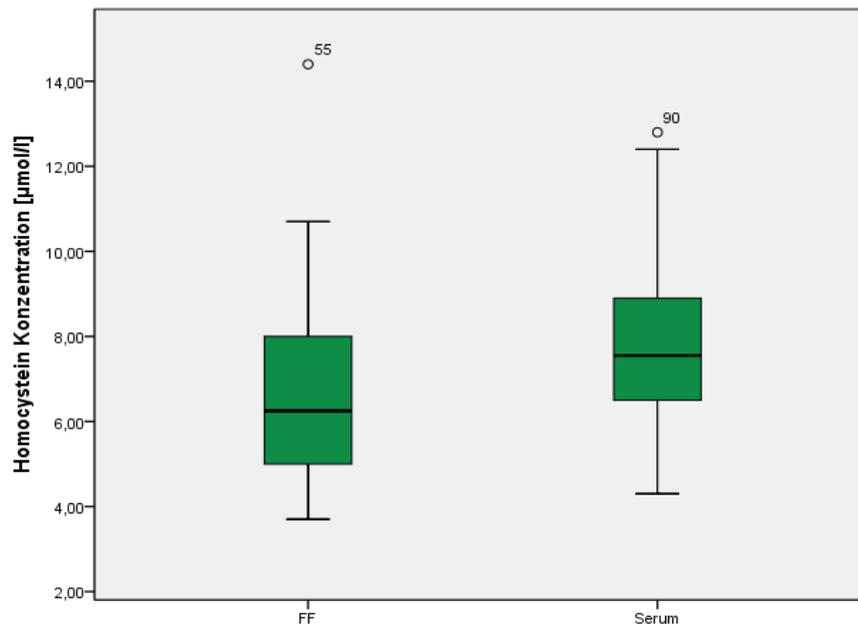
Untersuchte Parameter	Serum [n=86] M ± SD (Median)	Follikelflüssigkeit [n=86] M ± SD (Median)	p-Wert
<b>Homocystein</b> [µmol/l]	7,75 ± 1,77 (7,55)	6,62 ± 1,95 (6,23)	0,001**
<b>Folsäure</b> [ng/ml]	17,17 ± 10,33 (17,08)	23,86 ± 12,27 (23,21)	0,001**
<b>Vitamin B12</b> [pg/ml]	387,76 ± 144,31 (351,0)	783,81 ± 1087,50 (439,0)	0,001**

\*\*Signifikanz auf dem 1%-Niveau ( $p \leq 0,01$ )

M: Mittelwert der Proben; n: Anzahl der Proben

SD: Standardabweichung; p: Signifikanz

Die Homocystein-Konzentration im Serum lag mit  $7,75 \pm 1,77 \mu\text{mol/l}$  im Normbereich. Die entsprechende Konzentration in der Follikelflüssigkeit betrug  $6,62 \pm 1,95 \mu\text{mol/l}$ . Es bestand ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,001$ ) zwischen den Serum- und Follikelflüssigkeits-Konzentrationen (Tabelle 2, Abbildung 14).

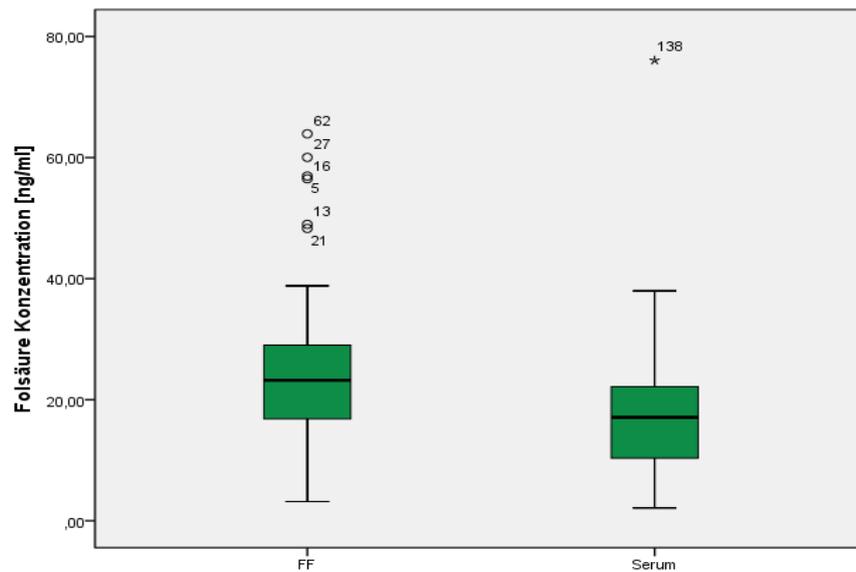


**Abbildung 14:** Boxplot Homocystein-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit

*Die Grenzen und Teilungslinien des Kastens markieren das erste und dritte Quartal bzw. den Median.*

*°: obere Ausreißer, d.h. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 55 in der FF und Probe 90 im Serum).*

Die Folsäure-Konzentration im Serum ( $17,17 \pm 10,33$  ng/ml) lag ebenfalls im Normbereich. Sie war aber signifikant niedriger ( $p= 0,001$ ) als die Konzentration in der Follikelflüssigkeit ( $23,86 \pm 12,27$  ng/ml). Somit ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Folsäure-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit feststellen ( $p= 0,001$ ) (Tabelle 4, Abbildung 15).



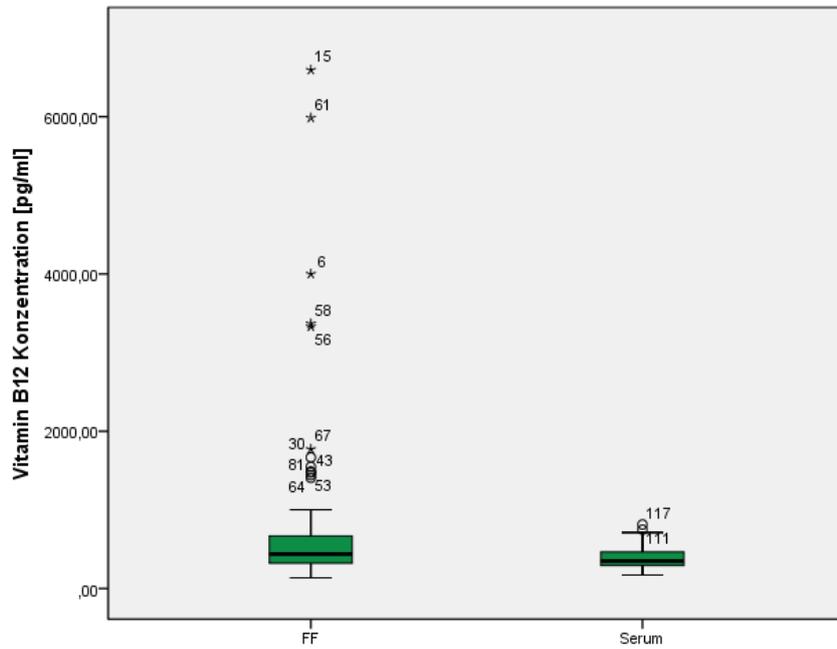
**Abbildung 15:** Boxplot Folsäure-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit

Die Grenzen und Teilungslinien des Kastens markieren das erste und dritte Quartal bzw. den Median.

°: obere Ausreißer, d.h. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 62, 27, 16, 5, 13, 21 in der FF).

\*: obere Extremwerte, d.h. Werte, die weiter als 3 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 138 im Serum).

Die Vitamin B12-Konzentration betrug im Serum  $387,76 \pm 144,31$  pg/ml und in der Follikelflüssigkeit  $783,81 \pm 1087,50$  pg/ml. Die Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit lag damit signifikant höher als die Konzentration im Serum ( $p= 0, 001$ ) (Tabelle 4, Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Boxplot Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit

Die Grenzen und Teilungslinien des Kastens markieren das erste und dritte Quartal bzw. den Median.

°: obere Ausreißer, d.h. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 30; 81; 64; 43; 53 in der FF und Probe 117; 111 im Serum).

\*: obere Extremwerte, d.h. Werte, die weiter als 3 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 15; 61; 6; 58; 56; 67 in der FF).

#### 4.1.1 Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum, in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen den zwei Altersgruppen G1 und G2

Im folgenden Abschnitt wurde der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der untersuchten Parameter im Serum und in der Follikelflüssigkeit in den zwei Altersgruppen (G1=25-34 Jahren; G2=35-43 Jahren) ermittelt.

Die Tabelle 3 gibt die gemessenen Konzentrationen der untersuchten Parameter in beiden Medien (S, FF) in den zwei Altersgruppen G1 und G2 wieder.

**Tabelle 3:** Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen G1 und G2

<b>Untersuchte Parameter</b> / <b>Altersgruppen</b>	<b>G1</b> (n=42) M ± SD (Median)	<b>G2</b> (n=44) M ± SD (Median)	<b>p-Wert</b>
<b>Homocystein (S)</b> [µmol/l]	7,51 ± 1,57 (7,43)	7,99 ± 1,93 (7,62)	0,452
<b>Homocystein (FF)</b> [µmol/l]	6,37 ± 1,96 (5,95)	6,85 ± 1,93 (6,92)	0,191
<b>Folsäure (S)</b> [ng/ml]	16,35 ± 8,21 (17,17)	17,97 ± 12,10 (17,04)	0,794
<b>Folsäure (FF)</b> [ng/ml]	24,96 ± 14,18 (22,69)	22,75 ± 9,98 (23,36)	0,981
<b>Vitamin B12 (S)</b> [pg/ml]	394,49 ± 161,20 (357,22)	381,88 ± 129,55 (343,54)	0,961
<b>Vitamin B12 (FF)</b> [pg/ml]	543,50 ± 498,81 436,51	1018,53 ± 1417,13 (448,01)	0,291

M: Mittelwert der Proben; n: Anzahl der Proben  
SD: Standardabweichung; p: Signifikanz  
G1: 25-34 Jahre; G2: 35-43 Jahre  
S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

Die mittlere Homocystein-Konzentration im Serum lag in der Gruppe 1 bei  $7,51 \pm 1,57$   $\mu\text{mol/l}$  und in der Gruppe 2 bei  $7,99 \pm 1,93$   $\mu\text{mol/l}$ . Ähnliche Werte zeigten sich in der Follikelflüssigkeit (G1:  $6,37 \pm 1,96$   $\mu\text{mol/l}$ ; G2:  $6,85 \pm 1,93$   $\mu\text{mol/l}$ ). Somit bestanden im Hinblick auf die Homocystein-Konzentration zwischen beiden Altersgruppen weder im Serum ( $p=0,452$ ) noch in der Follikelflüssigkeit ( $p=0,191$ ) signifikante Unterschiede.

Die Folsäure-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit wiesen für beide Altersgruppen höhere Werte auf (G1:  $24,96 \pm 14,18$   $\text{ng/ml}$ ; G2:  $22,75 \pm 9,98$   $\text{ng/ml}$ ) als im Serum (G1:  $16,35 \pm 8,21$   $\text{ng/ml}$ ; G2:  $17,97 \pm 12,10$   $\text{ng/ml}$ ). Jedoch gab es weder im Serum ( $p=0,794$ ) noch in der Follikelflüssigkeit ( $p=0,981$ ) einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Die Vitamin B12-Konzentrationen im Serum zeigten in beiden Altersgruppen ähnliche Werte. In der Altersgruppe G1 ergab sich ein Mittelwert von  $394,49 \pm 161,20$   $\text{pg/ml}$ , in G2 von  $381,88 \pm 129,55$   $\text{pg/ml}$ . Im Vergleich zwischen G1 und G2 zeigten die Vitamin B12-Konzentrationen im Serum keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,961$ ).

Betrachtet man die Vitamin B12-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen den zwei Altersgruppen, so zeigte sich in G1 eine niedrigere mittlere Konzentration als in G2 ( $543,50 \pm 498,81$  vs.  $1018,53 \pm 1417,13$   $\text{pg/ml}$ ). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,291$ ).

Somit kann man feststellen, dass zwischen den untersuchten Parametern (im Serum und in der Follikelflüssigkeit) und den Altersgruppen (G1, G2) kein signifikanter Zusammenhang bestand.

#### 4.1.2 Zusammenhang zwischen den Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

Im folgenden Abschnitt wurden die Konzentrationen von Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 im Hinblick auf das Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme verglichen. Das Patientenkollektiv wurde in den zwei Gruppen S1 (schwanger) und S2 (nicht schwanger) eingeteilt.

Die Tabelle 4 stellt die Konzentrationen der untersuchten Parameter für diese beiden Gruppen dar.

**Tabelle 4:** Untersuchte Parameter im Vergleich zwischen S1- und S2- Kollektiv

<b>Schwanger- schaftsgruppen</b>	<b>S1</b> (n=23) M ± SD (Median)	<b>S2</b> (n=63) M ± SD (Median)	<b>p-Wert</b>
<b>Untersuchte Parameter</b>			
<b>Homocystein</b> [µmol/l] (S)	7,92 ± 1,26 (7,74)	7,73 ± 1,96 (7,62)	0,396
<b>Homocystein</b> [µmol/l] (FF)	7,06 ± 1,77 (7,35)	6,52 ± 2,01 (6,11)	0,144
<b>Folsäure</b> [ng/ml] (FF)	17,97 ± 6,56 (18,01)	16,69 ± 11,55 (17,03)	0,246
<b>Folsäure</b> [ng/ml] (FF)	25,08 ± 9,78 (23,22)	23,25 ± 13,20 (22,16)	0,345
<b>Vitamin B12</b> [pg/ml] (S)	351,18 ± 143,67 (330,01)	399,6 ± 144,8 (359,01)	0,192
<b>Vitamin B12</b> [pg/ml] (FF)	416,33 ± 167,28 (362,28)	930,16 ± 1252,26 (473,01)	<b>0,037*</b>

\*Signifikanz auf dem 1%-Niveau ( $p \leq 0,01$ )

M: Mittelwert der Proben; n: Anzahl der Proben

SD: Standardabweichung; p: Signifikanz

S1: schwanger; S2: nicht schwanger

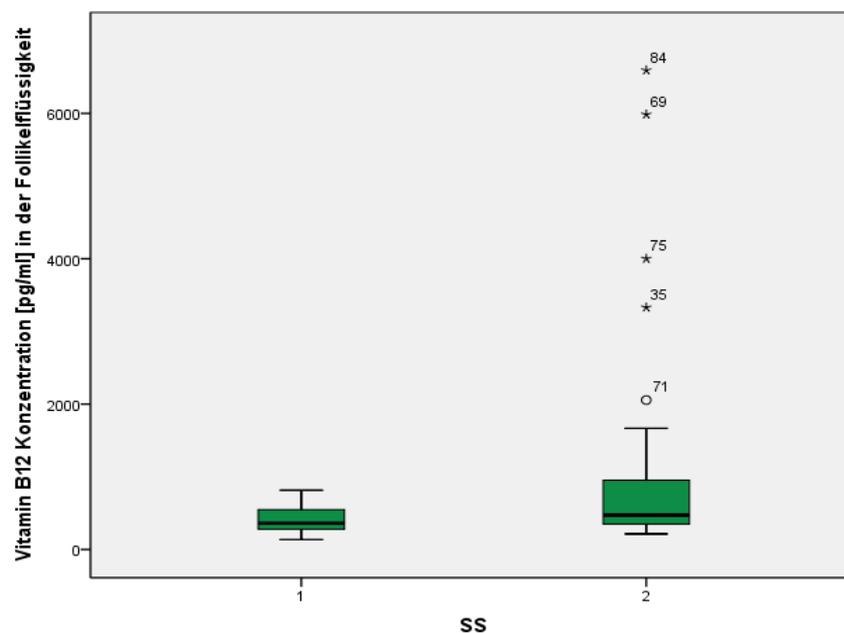
S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

Im Serum der Patientinnen der Gruppe S1 wurde eine mittlere Homocystein-Konzentration von  $7,92 \pm 1,26 \mu\text{mol/l}$  und in der Gruppe S2 eine Konzentration von  $7,73 \pm 1,96 \mu\text{mol/l}$  gemessen. Ein signifikanter Unterschied konnte hier nicht festgestellt werden ( $p=0,396$ ).

Eine ähnliche Verteilung bezüglich der beiden Gruppen S1 und S2 zeigte die Homocystein-Konzentration in der Follikelflüssigkeit ( $7,06 \pm 1,77$  vs.  $6,52 \pm 2,01 \mu\text{mol/l}$ ). Eine Signifikanz war aber auch hier nicht nachweisbar ( $p=0,144$ ).

Ähnliche Verläufe stellten sich für die Folsäure-Konzentrationen in beiden Medien dar. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen S1 und S2 im Serum ( $17,97 \pm 6,56$  vs.  $16,69 \pm 11,55 \text{ ng/ml}$ ,  $p=0,246$ ) und in der Follikelflüssigkeit ( $25,08 \pm 9,78$  vs.  $23,25 \pm 13,20 \text{ ng/ml}$ ,  $p=0,345$ ) zu sehen.

Wie in der Abbildung 17 zu sehen ist, bestand ein signifikanter Unterschied ( $p=0,037$ ) zwischen den zwei Gruppen S1 und S2 bezüglich der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit. Dabei betrug die Konzentration in der S1-Gruppe im Mittel  $416,33 \pm 167,28 \text{ pg/ml}$  und in der S2-Gruppe  $930,16 \pm 1252,26 \text{ pg/ml}$ .



**Abbildung 17:** Boxplot Vitamin B12-Konzentration in S1 und in S2

Die Grenzen und Teilungslinien des Kastens markieren das erste und dritte Quartal bzw. den Median.

°: obere Ausreißer, d.h. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 71 in S2).

\*: obere Extremwerte, d.h. Werte, die weiter als 3 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 84; 69; 75; 35 in S2).

## 4.2 Zusammenhang zwischen den klinische Parameten im Gesamtkollektiv und in den Altersgruppen G1 und in G2

Die Tabelle 5 stellt die klinischen Daten von den Patientinnen dar, die sich dem ICSI-Programm unterzogen haben und in die Untersuchungen einbezogen sind. Dabei wurden die klinischen Daten, die retrospektiv aus den Akten der Patientinnen erhoben wurden, im Gesamtkollektiv und unterteilt in die Altersgruppen der 25- bis 34-Jährigen (G1) und der 35- bis 43-Jährigen (G2) ausgewertet.

**Tabelle 5:** Klinische Parameter im Gesamtkollektiv sowie im Vergleich zwischen Altersgruppe G1 und G2

<b>Klinische Parameter</b>	<b>Gesamtkollektiv</b> (n=86) M ± SD (Median)	<b>G1</b> (n=42) M ± SD (Median)	<b>G2</b> (n=44) M ± SD (Median)	<b>p-Wert</b> G1,G2
Anzahl der gewonnenen Eizellen	8,06 ± 5,22 (7,25)	8,83 ± 5,25 (8,01)	7,30 ± 5,13 (7,13)	0,154
Anzahl der befruchteten Eizellen	3,82 ± 2,92 (3,15)	3,76 ± 3,00 (3,22)	3,88 ± 2,88 (3,41)	0,774
Befruchtungsrate [%]	51,32 ± 29,11 (50,12)	43,11 ± 24,91 (39,23)	59,33 ± 30,91 (69,23)	<b>0,009**</b>
Anzahl der transferierten Eizellen	2,24 ± 0,79 (2,37)	2,13 ± 0,84 (2,11)	2,34 ± 0,74 (2,51)	0,285
Schwangerschaft [%]	26,7 (=23 Pat.)	35,7 (= 15 Pat.)	18,2 (= 8 Pat.)	0,06
Schwangerschaftsrate [%]	26,74	35,71	18,18	0,342
Abort [%]	4,7 (= 4 Pat.)	7,1 (= 3 Pat.)	2,3 (= 1 Pat.)	0,283
Geburt [%]	22,1 (=19 Pat.)	28,6 (= 12 Pat.)	16,0 (= 7 Pat.)	0,175

\*Signifikanz auf dem 5%- Niveau ( $p \leq 0,05$ ); \*\* Signifikanz auf dem 1%-Niveau ( $p \leq 0,01$ )

M: Mittelwert der Proben; n: Anzahl der Proben

SD: Standardabweichung; p: Signifikanz

G1: 25-34 Jahre; G2: 35-43 Jahre

Der Tabelle 5 ist zu entnehmen, dass im Gesamtkollektiv 685 Eizellen von 86 Patientinnen gewonnen wurden. Im Durchschnitt waren dies  $8,06 \pm 5,22$  Eizellen. In der Altersgruppe der 25- bis 34-Jährigen (G1) betrug die Zahl der gewonnenen Eizellen insgesamt 371, durchschnittlich  $8,83 \pm 5,25$  Eizellen. Bei den 35-42 Jährigen (G2) wurden 314 Eizellen gewonnen, was einer durchschnittlichen Eizellgewinnung von  $7,30 \pm 5,13$  Eizellen entsprach. Somit war in der G1 die Zahl der gewonnenen Eizellen zwar höher als in der G2, jedoch zeigte dieser Unterschied keine Signifikanz ( $p= 0,154$ ).

Von den gewonnenen Eizellen wurden im Gesamtkollektiv 325 Eizellen befruchtet, durchschnittlich waren das  $3,82 \pm 2,92$  Eizellen. In der Altersgruppe G1 wurden insgesamt 158 Eizellen befruchtet, was einer durchschnittlichen Befruchtung von  $3,76 \pm 3,00$  Eizellen entsprach. Parallel dazu wurden in der Altersgruppe G2 von den gewonnenen Eizellen insgesamt 167 und im Mittel somit  $3,88 \pm 2,88$  Eizellen befruchtet. Im Vergleich zwischen der jüngeren und der älteren Altersgruppe gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p= 0,774$ ) bezüglich der Anzahl der befruchteten Eizellen. Folglich lag die Befruchtungsrate in der Gruppe 1 bei  $43,11 \pm 24,91$  %, während sie in der Gruppe 2  $59,33 \pm 30,91$  % betrug. Somit bestand ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der Befruchtungsrate im Vergleich zwischen G1 und G2 ( $p= 0,009$ ).

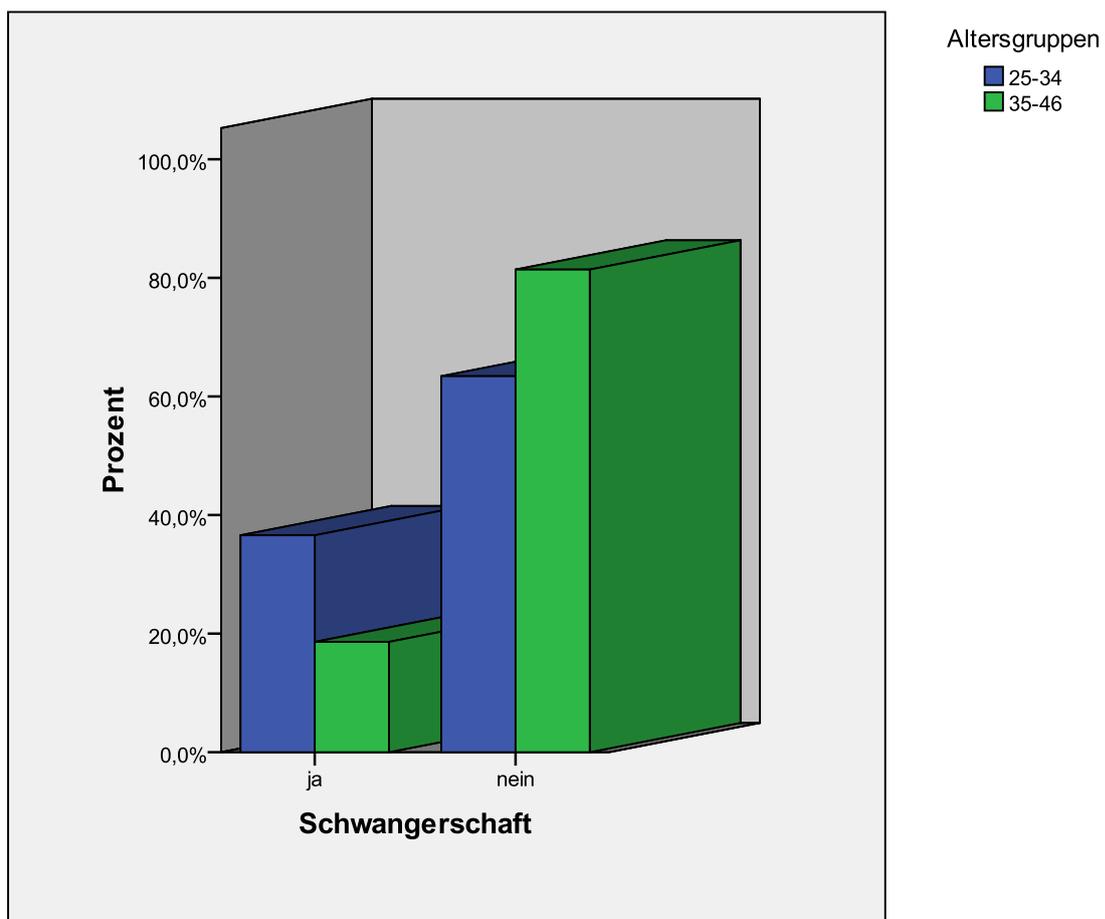
Die Daten über die transferierten Eizellen zeigen, dass im Gesamtkollektiv von den insgesamt 318 befruchteten Eizellen 170 transferiert wurden. Im Mittel machte es einen durchschnittlichen Eizelltransfer von  $2,24 \pm 0,79$  Eizellen aus. In der jüngeren Altersgruppe G1 wurden 81 Eizellen transferiert, dies entsprach im Mittel  $2,13 \pm 0,84$  Eizellen. In der Altersgruppe G2 transferierte man durchschnittlich  $2,34 \pm 0,74$  bei insgesamt 89 Eizellen. Ein Vergleich zwischen beiden Altersgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p= 0,285$ ).

Im Gesamtkollektiv gab es insgesamt 23 Schwangerschaften (26,7 %), davon 4 Aborte (4,7 %). Die mittlere Schwangerschaftsrate betrug somit 26,74 %. In der jüngeren Altersgruppe (G1) wurden 15 Patientinnen (35,7 %) schwanger, somit betrug die Schwangerschaftsrate pro Patientin 35,71 %. In der zweiten Gruppe (G2) wurde bei 8 Patientinnen (18,2 %) eine Schwangerschaft verzeichnet, die Schwangerschaftsrate betrug hier 18,18 %. Somit ist zu bemerken, dass bei jüngeren Patientinnen eine höhere Schwangerschaftsrate zu verzeichnen ist als in der Gruppe der älteren Patientinnen (35,74 % vs. 18,18 %). Obwohl der Unterschied sehr groß ist, zeigt er jedoch keine Signifikanz ( $p= 0,06$ ).

Des Weiteren lässt sich die Schwangerschaftsrate pro transferiertem Embryo berechnen. Diese betrug bei der G1-Altersgruppe 18,5 % und in der G2-Altersgruppe 9,0 %.

Schlussfolgernd erkennt man, dass die Schwangerschaftsrate sowohl pro Patientin, als auch pro transferiertem Embryo in der G1-Altersgruppe circa doppelt so hoch ist als in der G2-Altersgruppe (35,71 vs. 18,18; 18,5 vs. 9,0 %).

In der Abbildung 18 wird das Auftreten einer Schwangerschaft prozentual im Vergleich zwischen G1 und G2 graphisch dargestellt.



**Abbildung 18:** Vergleich zwischen den Altersgruppen G1 und G2 bezüglich der Schwangerschaft

*G1-Kollektiv (25-34 Jahre): blauer Balken; G2-Kollektiv (35-43 Jahre): grüner Balken*

#### 4.2.1 Zusammenhang zwischen den klinischen Parametern und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme

Ein weiteres Ziel der Studie bestand darin, einen möglichen Zusammenhang zwischen den klinischen Daten und dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme, dem Auftreten einer Schwangerschaft, zu klären. Dazu wurden die Patientinnen wieder in die Gruppen S1 (schwanger) und S2 (nicht schwanger) unterteilt.

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

**Tabelle 6:** Klinische Parameter im Gesamtkollektiv sowie im Vergleich zwischen den Gruppen S1 und S2

<b>Klinische Parameter</b> / <b>Schwangerschaftsgruppen</b>	<b>Gesamtkollektiv</b> (n=86) M ± SD (Median)	<b>S1</b> (n=23) M ± SD (Median)	<b>S2</b> (n=63) M ± SD (Median)	<b>p-Wert</b> <b>S1,S2</b>
Anzahl der gewonnenen Eizellen	8,06 ± 5,22 (7,25)	9,22 ± 4,48 (8,14)	7,67 ± 5,47 (6,01)	0,103
Anzahl der befruchteten Eizellen	3,82 ± 2,92 (3,15)	5,43 ± 2,81 (5,27)	3,32 ± 2,77 (3,31)	<b>0,001**</b>
Befruchtungsrate [%]	51,32 ± 29,11 (50,12)	63,59 ± 23,18 (66,73)	46,55 ± 30,13 (42,84)	<b>0,018*</b>
Anzahl der transferierten Eizellen	2,24 ± 0,79 (2,37)	2,61 ± 0,58 (3,34)	2,06 ± 0,82 (2,71)	<b>0,007**</b>

\*Signifikanz auf dem 5%- Niveau ( $p \leq 0,05$ )

\*\* Signifikanz auf dem 1%-Niveau ( $p \leq 0,01$ )

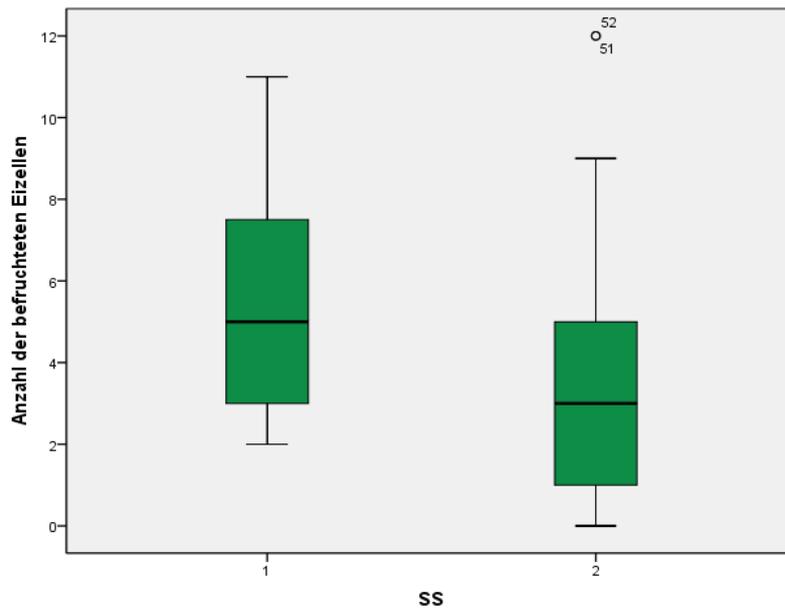
M: Mittelwert der Proben; n: Anzahl der Proben

SD: Standardabweichung; p: Signifikanz

S1: schwanger; S2: nicht schwanger

Im Mittel wurden in der S1-Gruppe  $9,22 \pm 4,48$  und in der S2-Gruppe  $7,67 \pm 5,47$  Eizellen gewonnen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,103$ ).

Ein hoch signifikanter Unterschied ( $p = 0,001$ ) zwischen den Gruppen S1 und S2 fand sich bezüglich der Anzahl der befruchteten Eizellen. In S1 wurden insgesamt 125 Eizellen befruchtet, das entspricht durchschnittlich  $5,43 \pm 2,81$  befruchtete Eizellen. In der Gruppe S2 wurden 197 Eizellen befruchtet. Die durchschnittliche Anzahl der befruchteten Eizellen betrug  $3,32 \pm 2,77$ . Dies ist in der Abbildung 19 graphisch dargestellt.



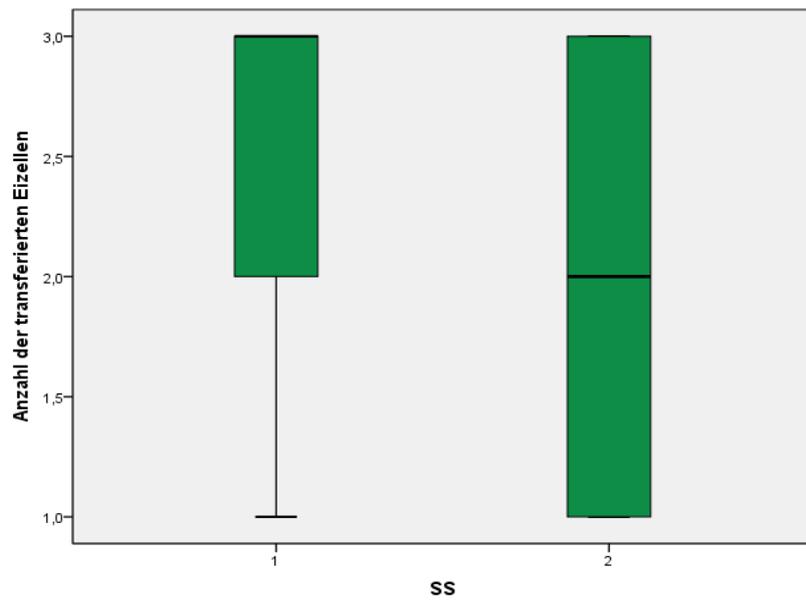
**Abbildung 19:** Boxplot Anzahl der gewonnenen Eizellen in S1 und S2

*Die Grenzen und Teilungslinien des Kastens markieren das erste und dritte Quartal bzw. den Median.*

*°: obere Ausreißer, d.h. Werte, die weiter als 1,5 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegen (Probe 51; 52 in S2).*

Des Weiteren bestand bezüglich der Befruchtungsrate ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen S1 ( $63,59 \pm 23,18 \%$ ) und S2 ( $46,55 \pm 30,13 \%$ ) ( $p= 0,018$ ).

Einen ähnlich hoch signifikanten Unterschied gab es bezüglich der Anzahl der transferierten Eizellen ( $p= 0,007$ ). Hierbei wurden in der S1-Gruppe insgesamt 60, im Durchschnitt  $2,61 \pm 0,58$  Eizellen transferiert. In der S2-Gruppe sind 107 Eizellen transferiert worden. Das sind durchschnittlich  $2,06 \pm 0,82$  Eizellen (Abbildung 20).



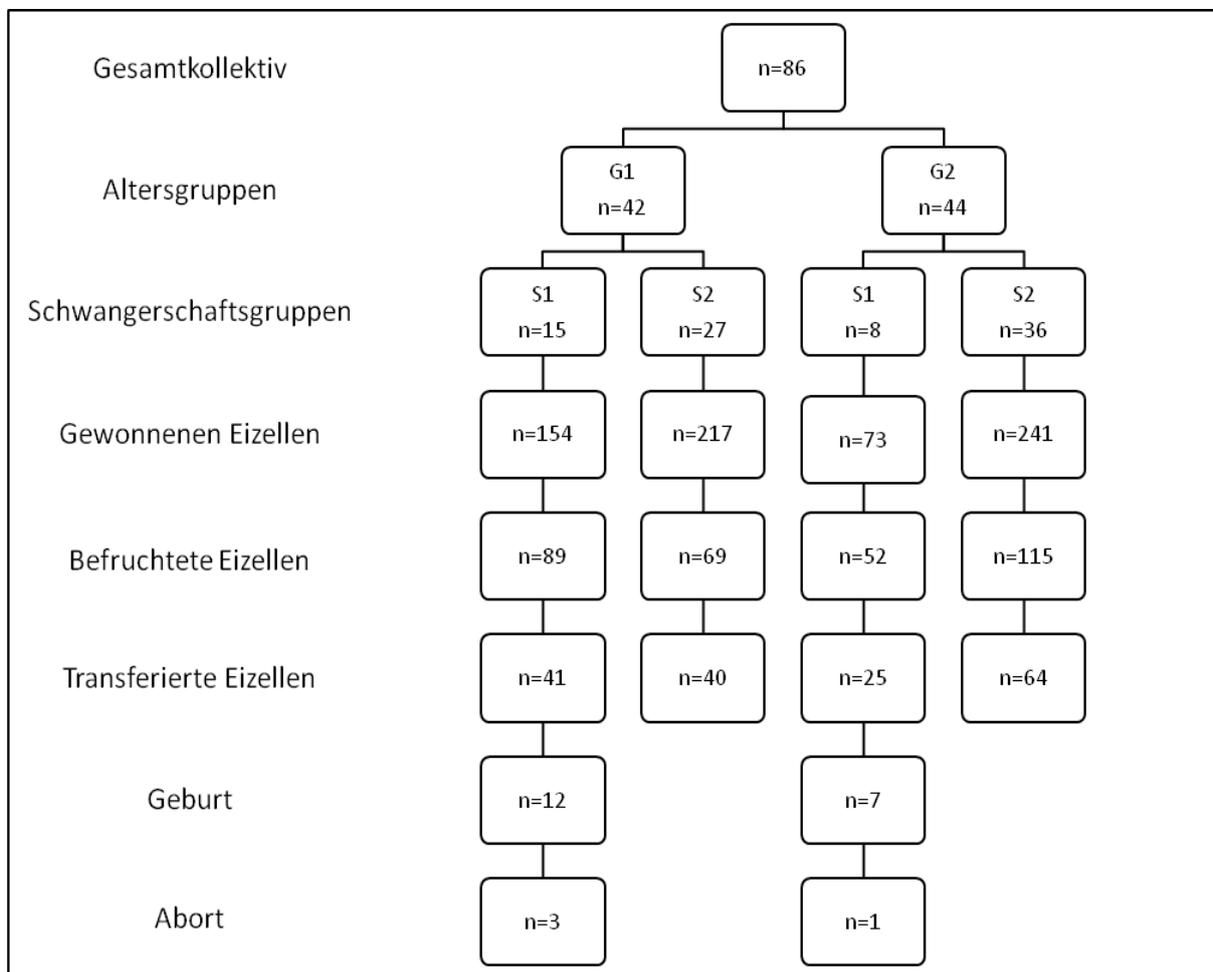
**Abbildung 20:** Boxplot Anzahl der transferierten Eizellen in S1 und S2

*Die Grenzen und Teilungslinien des Kastens markieren das erste und dritte Quartal bzw. den Median.*

### 4.3 Vergleich zwischen dem Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme und den klinischen Parametern in den Altersgruppen G1 und G2

In diesem Abschnitt wurden die klinischen Parameter und das Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme im Vergleich zwischen den beiden Altersgruppen G1 (25-34 Jahre) und G2 (35-43 Jahre) einander gegenübergestellt. Dazu wurden nach Unterteilung des Gesamtkollektivs in die Altersgruppen G1 und G2 diese weiter in die Subgruppen S1 (schwanger) und S2 (nicht schwanger) unterteilt.

Die Aufstellung der Ergebnisse findet sich in der Abbildung 21.



**Abbildung 21:** Klinische Parameter im Gesamt-, G1- und G2- sowie S1- und S2-Kollektiv

n: Anzahl der Proben  
 G1: 25-34 Jahre; G2: 35-43 Jahre  
 S1: schwanger; S2: nicht schwanger

Die Gesamtzahl der gewonnenen Eizellen betrug in G1 371 (im Mittel  $8,83 \pm 5,25$ ), wobei davon 154 Eizellen in der S1-Gruppe gewonnen wurden ( $9,93 \pm 4,07$ ) und 217 Eizellen in S2 ( $8,35 \pm 5,86$ ). Im Vergleich dazu betrug die Anzahl der gewonnenen Eizellen in G2 314 ( $7,30 \pm 5,13$ ). Davon fielen 73 der gewonnenen Eizellen auf S1 ( $2,86 \pm 5,16$ ) und 241 Eizellen auf S2 ( $7,17 \pm 5,19$ ).

Von den insgesamt 158 befruchteten Eizellen in G1 wurden 89 Eizellen in der S1-Gruppe ( $5,93 \pm 2,94$ ) und 69 Eizellen in der S2-Gruppe ( $2,65 \pm 2,51$ ) befruchtet. In der Vergleichsgruppe G2 wurden 167 befruchtete Eizellen registriert, wobei die Verteilung auf die S1-Gruppe mit 52 befruchteten Eizellen ( $4,86 \pm 2,92$ ) und auf die S2-Gruppe mit 115 befruchteten Eizellen fiel ( $4,66 \pm 2,92$ ). Somit lag die Befruchtungsrate in der S1-Subgruppe von G1 bei  $58,61 \pm 21,14$  % und in der S2-Subgruppe mit  $33,52 \pm 22,71$  % deutlich darunter. Analog lag die Befruchtungsrate in der S1-Gruppe von G2 mit  $72,94 \pm 25,32$  % höher als in der S2-Gruppe mit  $56,24 \pm 31,56$  %.

Von den insgesamt 89 befruchteten Eizellen in der S1-Subgruppe der G1-Gruppe wurden 41 transferiert ( $2,53 \pm 0,64$ ). In S2 derselben Gruppe wurden insgesamt 40 Eizellen transferiert ( $1,82 \pm 0,85$ ). Die Vergleichsgruppe G2 verzeichnete in der S1-Subgruppe 25 transferierte Eizellen ( $2,75 \pm 0,46$ ), in der S2-Subgruppe nur 64 ( $2,23 \pm 0,77$ ).

Im Vergleich zwischen den Schwangeren, die der G1-Gruppe angehörten, und denjenigen, die der G2-Altersgruppe zuzuordnen waren, sieht man, dass es bei den erstgenannten in 3 Fällen (7,1 %) zu einem Abort kam, während in der älteren Schwangerengruppe insgesamt eine Schwangerschaft in einem Abort endete (2,3 %).

Zu einer Geburt führten 12 Schwangerschaften (28,6 %) in der G1-Gruppe. In der G2-Gruppe konnten 7 Schwangerschaften bis zum Ende ausgetragen werden (16,0 %).

#### 4.4 Korrelationen und Signifikanzen zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Gesamtkollektiv

Tabelle 7 zeigt, ob Korrelationen zwischen Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 untereinander bestehen.

**Tabelle 7:** Korrelationen und Signifikanzen zwischen den Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit untereinander im Gesamtkollektiv

Untersuchte Parameter		Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (S)	Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (FF)	Folsäure [ng/ml] (S)	Folsäure [ng/ml] (FF)	Vitamin B 12 [pg/ml] (S)	Vitamin B 12 [pg/ml] (FF)
Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (S)	r	1	0,69**	-0,53**	-0,52**	-0,19	-0,21*
	p		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,097	<b>0,051</b>
Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (FF)	r	0,69**	1	-0,45**	-0,37**	-0,29**	-0,21*
	p	<b>0,001</b>		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	<b>0,045</b>
Folsäure [ng/ml] (S)	r	-0,53**	-0,45**	1	0,78**	0,10	0,07
	p	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>		<b>0,001</b>	0,389	0,475
Folsäure [ng/ml] (FF)	r	-0,52**	-0,37**	0,78**	1	0,04	0,05
	p	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>		0,691	0,628
Vitamin B 12 [pg/ml] (S)	r	-0,19	-0,29**	0,10	0,04	1	0,58**
	p	0,097	<b>0,011</b>	0,389	0,691		<b>0,001</b>
Vitamin B 12 [pg/ml] (FF)	r	-0,21*	-0,21*	0,07	0,05	0,58**	1
	p	<b>0,051</b>	<b>0,045</b>	0,475	0,628	<b>0,001</b>	

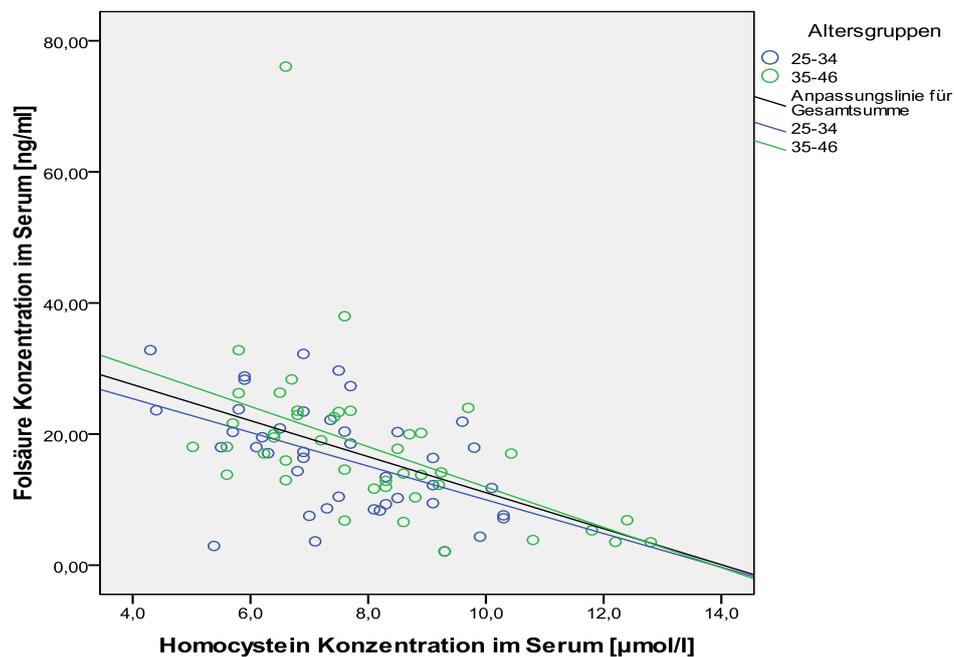
\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

r: Korrelationskoeffizient; p: Signifikanz

S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

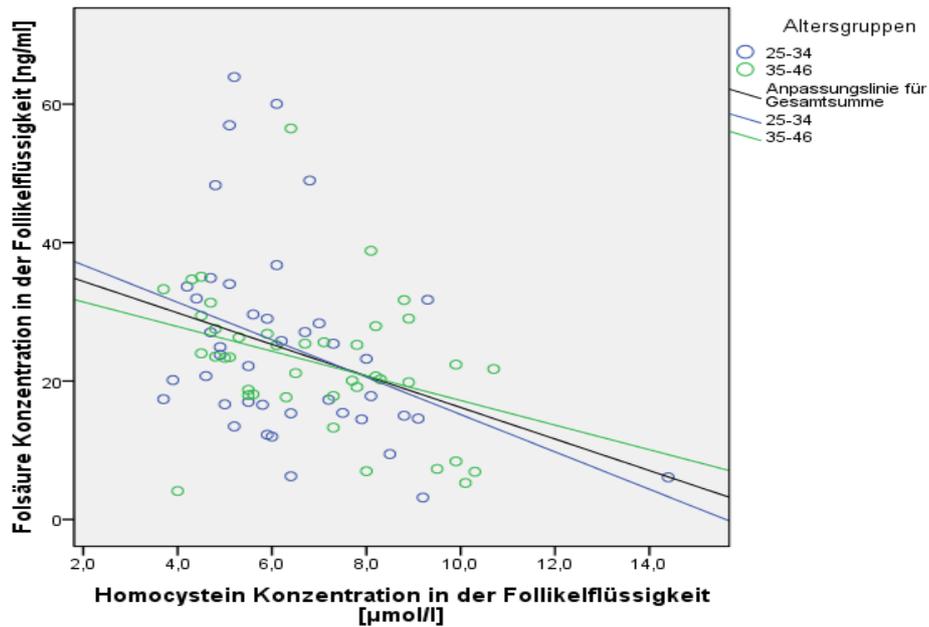
Tabelle 7 illustriert viele zum Teil hoch signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen der untersuchten Parameter. So bestand eine hoch signifikant negative Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und der Folsäure-Konzentration im Serum ( $r = -0,53$ ;  $p = 0,001$ ) (Abbildung 22) und in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,001$ ).



**Abbildung 22:** Korrelation zwischen der Homocystein- und der Folsäure-Konzentration im Serum im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

*Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie*

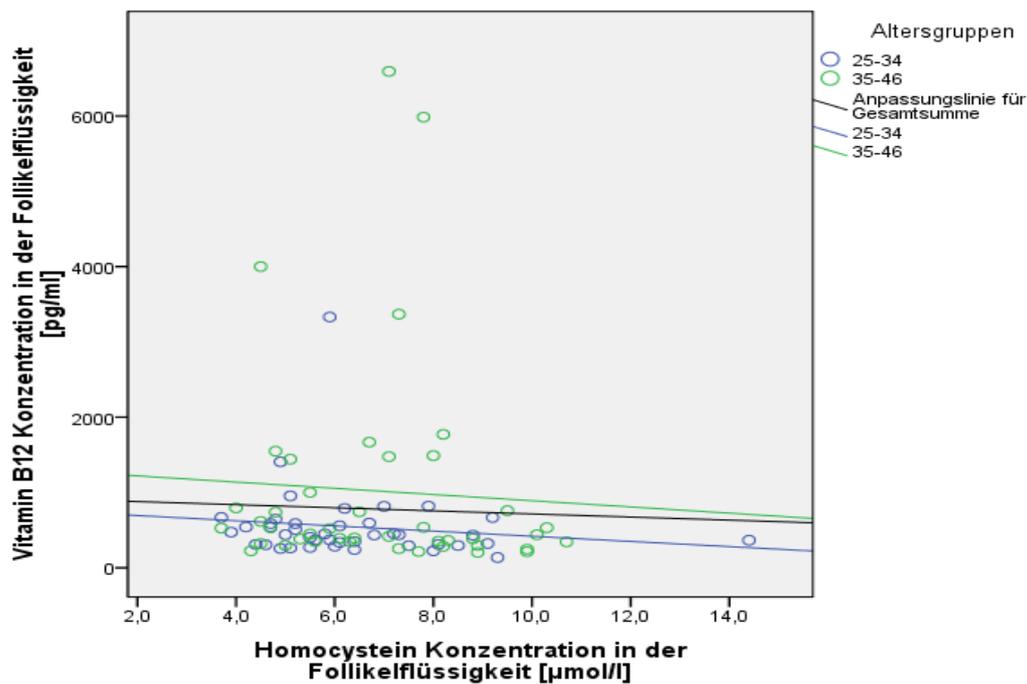
Die Homocystein-Konzentration in der Follikelflüssigkeit korrelierte ebenfalls negativ hoch signifikant mit der Folsäure-Konzentration sowohl im Serum ( $r = -0,45$ ;  $p = 0,001$ ) als auch in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,001$ ) (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Korrelation zwischen der Homocystein- und der Folsäure-Konzentration in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

*Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie*

Eine negativ signifikante Korrelation zeigte sich auch zwischen der Homocystein-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und der Vitamin B12-Konzentration im Serum ( $r = -0,29$ ;  $p = 0,011$ ) und in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,21$ ;  $p = 0,045$ ) (Abbildung 24).



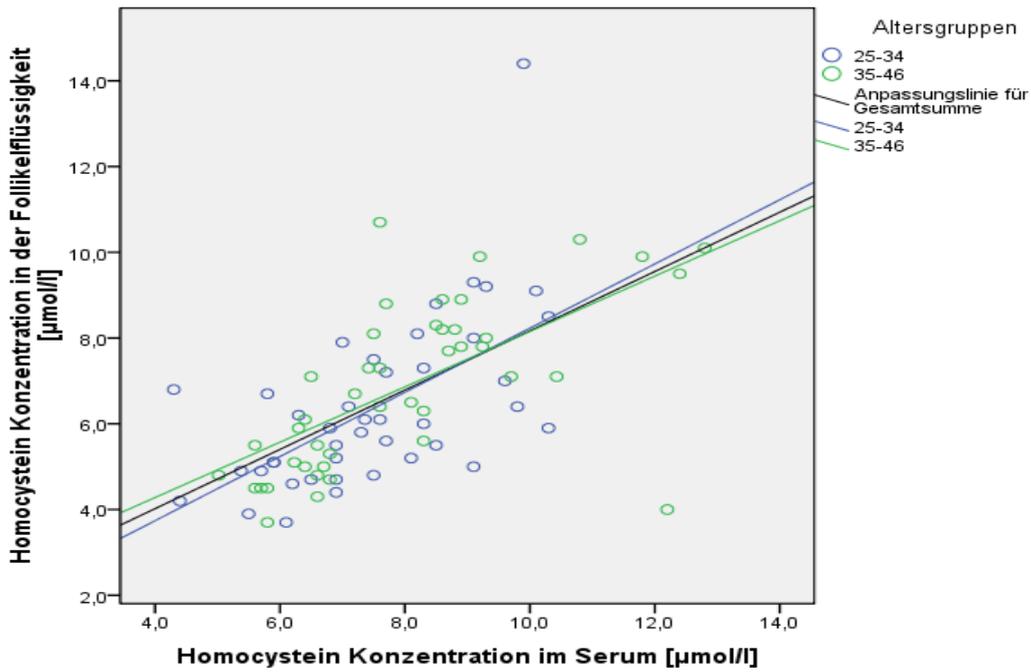
**Abbildung 24:** Korrelation zwischen der Homocystein- und der Vitamin B 12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

*Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie*

Weiterhin bestand eine negativ signifikante Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,21$ ;  $p = 0,051$ ).

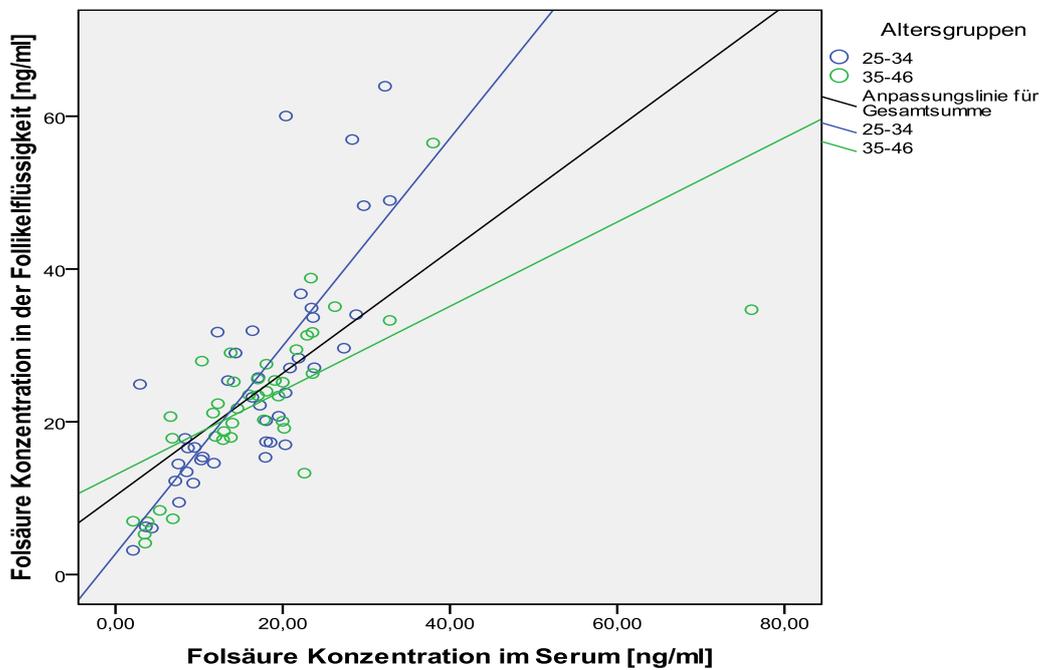
Zwischen der Folsäure und dem Vitamin B12 bestanden in beiden Medien positive, jedoch nicht signifikante Korrelationen.

Festzuhalten ist weiterhin die positive hoch signifikante Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,001$ ), der Folsäure-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit ( $r = 0,78$ ;  $p = 0,001$ ) sowie der Vitamin B12-Konzentration in beiden Medien ( $r = 0,58$ ;  $p = 0,001$ ) (Abbildungen 25, 26, 27).



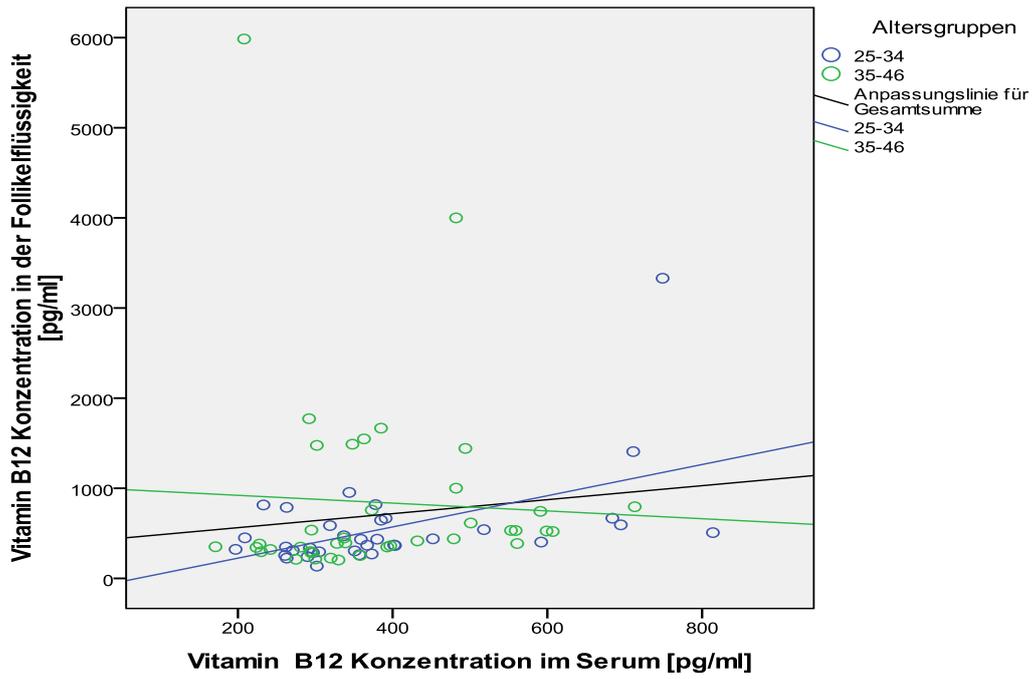
**Abbildung 25:** Zusammenhang zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen Gesamt-,G1- und G2-Kollektiv

Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie



**Abbildung 26:** Zusammenhang zwischen der Folsäure-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen Gesamt-,G1- und G2-Kollektiv

Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie



**Abbildung 27:** Zusammenhang zwischen der Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

*Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie*

#### 4.4.1 Korrelationen und Signifikanzen zwischen den Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit in den zwei Altersgruppen G1 und G2

Die Tabelle 8 illustriert die Korrelationen zwischen den untersuchten Parametern Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 untereinander im Serum und in der Follikelflüssigkeit bei Patientinnen, die zwischen 25 und 34 Jahre alt sind (G1).

**Tabelle 8:** Korrelation zwischen den Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit untereinander in der Altersgruppe G1

Untersuchte Parameter		G1					
		Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (S)	Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (FF)	Folsäure [ng/ml] (S)	Folsäure [ng/ml] (FF)	Vitamin B 12 [pg/ml] (S)	Vitamin B 12 [pg/ml] (FF)
Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (S)	r	1	0,63**	-0,48**	-0,53**	-0,27	-0,31*
	p		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,107	<b>0,042</b>
Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ] (FF)	r	0,63**	1	-0,44**	-0,41**	-0,33	-0,23
	p	<b>0,001</b>		<b>0,003</b>	<b>0,008</b>	0,073	0,131
Folsäure [ng/ml] (S)	r	-0,48**	-0,44**	1	0,81**	0,27	0,29*
	p	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>		<b>0,001</b>	0,108	<b>0,054</b>
Folsäure [ng/ml] (FF)	r	-0,53**	-0,41**	0,81**	1	0,16	0,22
	p	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,001</b>		0,341	0,159
Vitamin B 12 [pg/ml] (S)	r	-0,27	-0,33	0,27	0,16	1	0,71**
	p	0,107	0,073	0,108	0,341		<b>0,001</b>
Vitamin B 12 [pg/ml] (FF)	r	-0,31*	-0,23	0,29*	0,22	0,71**	1
	p	<b>0,042</b>	0,131	<b>0,054</b>	0,159	<b>0,001</b>	

\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0, 01 (2- seitig) signifikant

r: Korrelationskoeffizient; p: Signifikanz

G1: 25-34 Jahre

S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

In Tabelle 9 sind die Korrelationen in Bezug auf die Altersgruppe der 35- bis 43-Jährigen (G2) aufgezeigt.

**Tabelle 9:** Korrelation zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit untereinander in der Altersgruppe G2

Untersuchte Parameter		G2					
		Homocystein [µmol/l] (S)	Homocystein [µmol/l] (FF)	Folsäure [ng/ml] (S)	Folsäure [ng/ml] (FF)	Vitamin B12 [pg/ml] (S)	Vitamin B12 [pg/ml] (FF)
Homocystein [µmol/l] (S)	r	1	0,71**	-0,57**	-0,52**	-0,14	-0,13
	p		<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,372	0,391
Homocystein [µmol/l] (FF)	r	0,71**	1	-0,46**	-0,36**	-0,29	-0,23
	p	<b>0,001</b>		<b>0,002</b>	<b>0,014</b>	0,063	0,132
Folsäure [ng/ml] (S)	r	-0,57**	-0,46**	1	0,76**	-0,08	-0,06
	p	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>		<b>0,001</b>	0,606	0,684
Folsäure [ng/ml] (FF)	r	-0,52**	-0,36*	0,76**	1	-0,06	-0,13
	p	<b>0,001</b>	<b>0,014</b>	<b>0,001</b>		0,704	0,388
Vitamin B12 [pg/ml] (S)	r	-0,14	-0,29	-0,08	-0,06	1	0,81**
	p	0,372	0,063	0,606	0,704		<b>0,001</b>
Vitamin B12 [pg/ml] (FF)	r	-0,13	-0,23	-0,06	-0,13	0,81**	1
	p	0,391	0,132	0,684	0,388	<b>0,001</b>	

\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

r: Korrelationskoeffizient; p: Signifikanz

G2: 35-43 Jahre

S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

Analog zum Gesamtkollektiv verhielten sich die Konzentrationen der einzelnen Parameter auch in den Kollektiven G1 und G2. So sah man, wie den Tabellen 8 und 9 zu entnehmen ist, in beiden Gruppen bei hohen Homocystein-Konzentrationen signifikant niedrige Werte der anderen beiden Parameter.

Im Serum korrelierte die Homocystein-Konzentration negativ signifikant mit der Folsäure-Konzentration in der Altersgruppe G1 ( $r = -0,48$ ;  $p = 0,001$ ) und in G2 ( $r = -0,57$ ,  $p = 0,001$ ). Dies ist in der Abbildung 22 graphisch dargestellt.

Außerdem fanden sich hoch signifikant negative Korrelationen zwischen dem Homocystein im Serum und der Folsäure in der Follikelflüssigkeit in beiden Altersgruppen (G1:  $r = -0,53$ ;  $p = 0,001$ , G2:  $r = -0,52$ ;  $p = 0,001$ ).

Eine negative hoch signifikante Korrelation bestand ferner zwischen dem Homocystein in der Follikelflüssigkeit und der Folsäure im Serum in beiden Altersgruppen (G1:  $r = -0,44$ ;  $p = 0,003$ , G2:  $r = -0,46$ ;  $p = 0,002$ ).

In der Follikelflüssigkeit ergab sich ebenfalls eine negative hoch signifikante Korrelation zwischen der Homocystein- und der Folsäure-Konzentration in der Altersgruppe G1 ( $r = -0,41$ ;  $p = 0,008$ ) sowie eine negativ signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern in der Altersgruppe G2 ( $r = -0,36$ ;  $p = 0,014$ ). Die Abbildung 23 zeigt diese Zusammenhänge graphisch.

Weiterhin bestand in der G1-Gruppe eine negativ signifikante Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,31$ ;  $p = 0,042$ ).

Eine positiv signifikante Korrelation fand sich in der Altersgruppe G1 zwischen Folsäure im Serum und Vitamin B12 in der Follikelflüssigkeit ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,054$ ).

In beiden Altersgruppen zeigten sich ebenfalls signifikant positive Korrelationen zwischen dem Homocystein im Serum und in der Follikelflüssigkeit (G1:  $r = 0,63$ ;  $p = 0,001$ , G2:  $r = 0,71$ ;  $p = 0,001$ ), zwischen der Folsäure im Serum und in der Follikelflüssigkeit (G1:  $r = 0,81$ ;  $p = 0,001$ , G2:  $r = 0,76$ ;  $p = 0,001$ ) sowie zwischen dem Vitamin B12 in beiden Medien (G1:  $r = 0,71$ ;  $p = 0,001$ , G2:  $r = 0,81$ ;  $p = 0,001$ ). Diese Korrelationen sind in den Abbildungen 25 bis 27 graphisch dargestellt.

## 4.5 Korrelationen und Signifikanzen zwischen den Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit und den klinischen Parametern

Im Folgenden wurden sowohl die klinischen als auch die untersuchten Parameter im Hinblick auf bestehende Zusammenhänge untersucht.

Tabelle 10 zeigt bestehende Zusammenhänge unter Angabe der ermittelten Korrelationskoeffizienten  $r$  zwischen Homocystein und den klinischen Parametern im Gesamtkollektiv.

**Tabelle 10:** Korrelation zwischen Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 im Serum und in der FF und den klinischen Parametern

Untersuchte Parameter Klinische Parameter		Homocystein	Homocystein	Folsäure	Folsäure	Vitamin B 12	Vitamin B 12
		[ $\mu\text{mol/l}$ ] (S)	[ $\mu\text{mol/l}$ ] (FF)	[ng/ml] (S)	[ng/ml] (FF)	[pg/ml] (S)	[pg/ml] (FF)
Anzahl der gewonnenen Eizellen	<b>r</b>	-0,01	-0,01	-0,17	-0,24	-0,13	-0,08
	<b>p</b>	0,916	0,941	0,111	0,061	0,253	0,419
Anzahl der befruchteten Eizellen	<b>r</b>	-0,11	-0,003	-0,12	-0,13	-0,16	-0,11
	<b>p</b>	0,288	0,976	0,264	0,211	0,162	0,302
Befruchtungsrate [%]	<b>r</b>	0,01	0,05	-0,11	-0,07	0,03	0,03
	<b>p</b>	0,884	0,641	0,359	0,529	0,753	0,729
Schwangerschaft [%]	<b>r</b>	-0,09	-0,16	-0,12	-0,13	0,15	0,23*
	<b>p</b>	0,401	0,145	0,248	0,348	0,194	<b>0,037</b>
Schwangerschaftsrate [%]	<b>r</b>	0,11	0,16	0,14	0,12	-0,14	0,24*
	<b>p</b>	0,353	0,166	0,213	0,318	0,357	<b>0,044</b>
Abort [%]	<b>r</b>	-0,07	-0,04	0,11	0,04	-0,24*	0,07
	<b>p</b>	0,521	0,662	0,343	0,704	<b>0,044</b>	0,484
Geburt [%]	<b>r</b>	-0,04	-0,08	-0,22	-0,15	0,05	0,21*
	<b>p</b>	0,692	0,413	0,063	0,164	0,646	<b>0,045</b>

\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

r: Korrelationskoeffizient; p: Signifikanz; S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

Es ist festzuhalten, dass die Homocystein-Konzentration sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit negative Korrelationen zu den klinischen Parametern aufwies. So korrelierten zum Beispiel die Anzahl der gewonnenen und befruchteten Eizellen, die Schwangerschaft sowie die Geburt negativ mit der Homocystein-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit. Diese negativen Korrelationen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Weiterhin gab es sowohl positive als auch negative Korrelationen zwischen der Folsäure-Konzentration und den klinischen Parametern, wie der Zahl der entnommenen Eizellen, der befruchteten Eizellen, der Befruchtungsrates, Schwangerschaft usw. Diese wiesen jedoch keine Signifikanz auf.

Weiterhin sind der Tabelle 10 signifikante Korrelationen zwischen der Vitamin B12-Konzentration sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit und den klinischen Parametern zu entnehmen. Besonders zu bemerken ist die signifikante Korrelation zwischen der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $r= 0,23$ ;  $p= 0,037$ ), der Schwangerschaftsrates ( $r= 0,24$ ;  $p= 0,044$ ) bzw. der Geburt ( $r= 0,21$ ;  $p= 0,045$ ). Eine negativ signifikante Korrelation zwischen der Vitamin-Konzentration im Serum und dem Auftreten eines Aborts ( $r= -0,24$ ;  $p= 0,044$ ) ist ebenfalls der Tabelle zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern im Serum und in der FF und dem Auftreten einer Schwangerschaft

	<b>M ± SD</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>95 % Konfidenz- intervall</b>
<b>Homocystein (S)</b> [µmol/l]	7,91 ± 1,21	0,951	0,549 1,646
<b>Homocystein (FF)</b> [µmol/l]	7,12 ± 1,77	0,759	0,498 1,157
<b>Folsäure (S)</b> [ng/ml]	19,26 ± 6,04	0,915	0,811 1,032
<b>Folsäure (FF)</b> [ng/ml]	27,24 ± 9,54	0,992	0,924 1,065
<b>Vitamin B12 (S)</b> [pg/ml]	359,88 ± 143,56	1,000	0,995 1,006
<b>Vitamin B12 (FF)</b> [pg/ml]	412,63 ± 183,29	1,002	0,999 1,005

M: Mittelwert der Proben;  
SD: Standardabweichung  
S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

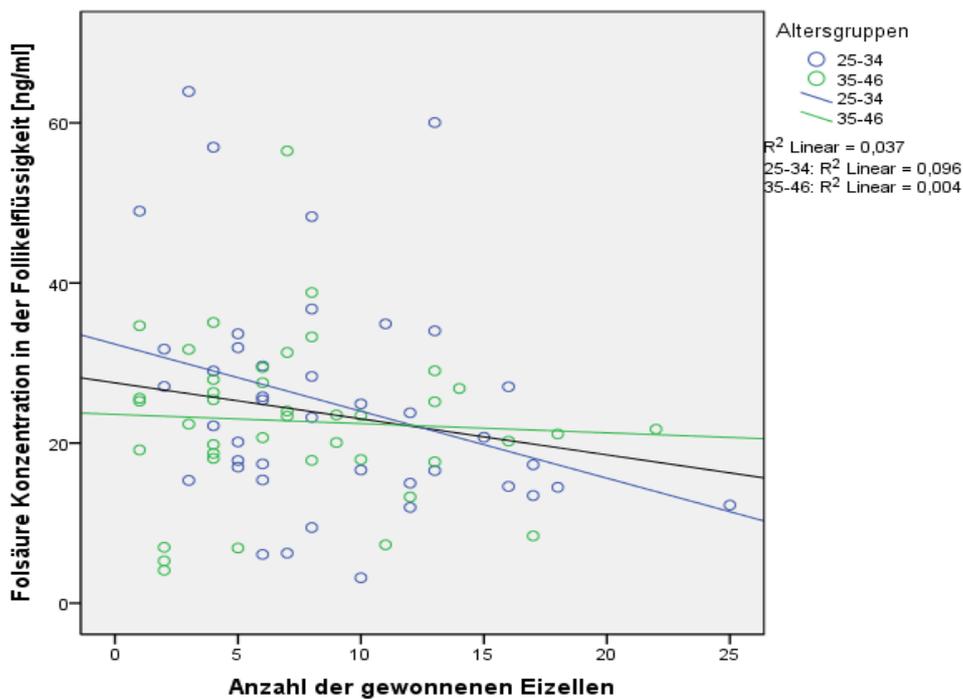
In der Tabelle 11 ist der Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern im Serum und in der FF und dem Auftreten einer Schwangerschaft anhand der jeweiligen Odds Ratio (Assoziationsmaß) wiedergegeben. Man sieht, dass kein Parameter die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Schwangerschaft beeinflusst (Odds Ratio für alle Parameter  $\leq 1$ ).

Bei Betrachtung der untersuchten Parameter im Vergleich zwischen den zwei Schwangerschaftsgruppen S1 und S2 bestand allerdings ein signifikanter Unterschied bezüglich des Vitamin B12 in der FF ( $p= 0,037$ , Abbildung 17). Des Weiteren korrelierte das Vitamin B12 in der FF signifikant mit dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $r= 0,23$ ;  $p= 0,037$ ; Tabelle 10), jedoch, wie in der obigen Tabelle zu sehen ist, beeinflusst Vitamin B12 nicht die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Schwangerschaft.

#### 4.5.1 Korrelationen und Signifikanzen zwischen den Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit und den klinischen Parametern in den Altersgruppen G1 und G2

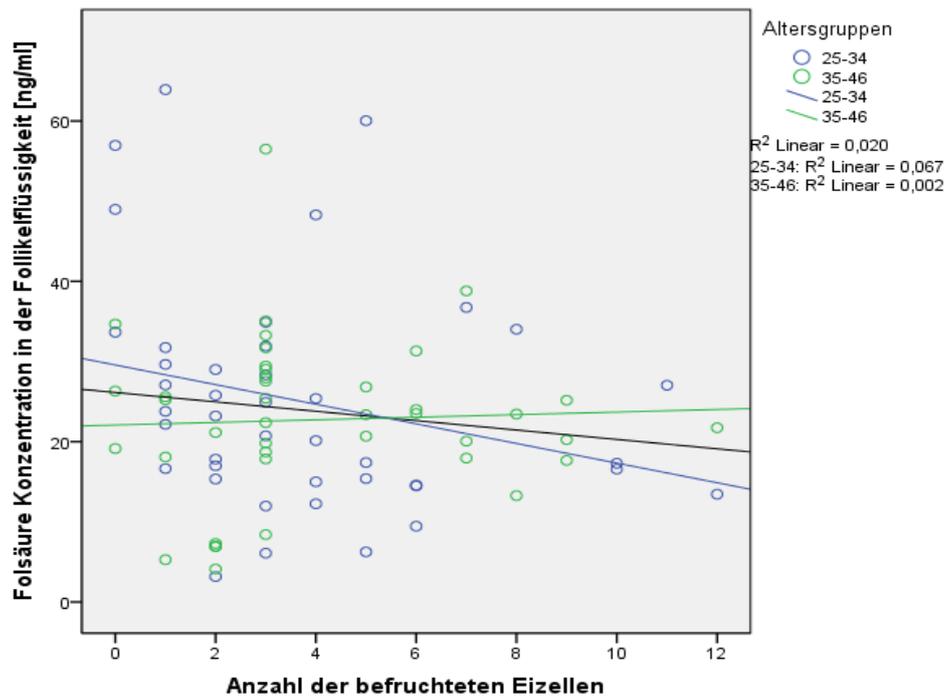
Die Tabelle 12 gibt Korrelationen zwischen den untersuchten und den klinischen Parametern, unterteilt nach den Altersgruppen G1 und G2, wieder.

In der G1-Gruppe bestand eine negativ signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der gewonnenen Eizellen und der Folsäure-Konzentration im Serum ( $r = -0,30$ ;  $p = 0,051$ ) und in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,022$ ; Abbildung 28). Des Weiteren korrelierte die Folsäure in der Follikelflüssigkeit negativ signifikant mit der Anzahl der befruchteten Eizellen ( $r = -0,34$ ;  $p = 0,031$ ; Abbildung 29).



**Abbildung 28:** Korrelation zwischen der Folsäure-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und den gewonnenen Eizellen im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

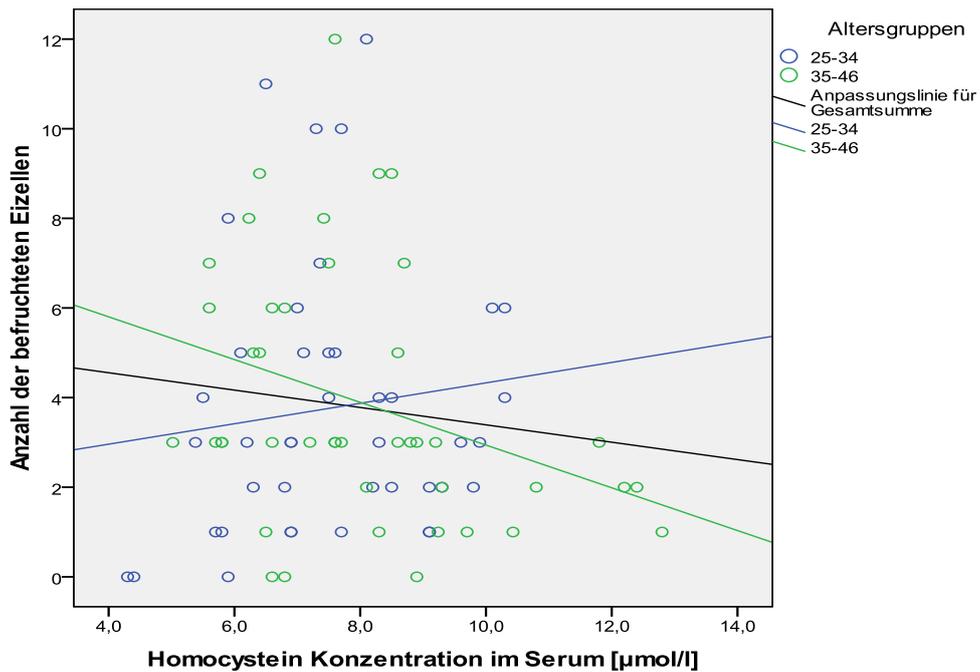
Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie



**Abbildung 29:** Korrelation zwischen der Folsäure-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und den befruchteten Eizellen im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

*Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie*

In der Altersgruppe G2 gab es ebenfalls einige negativ hoch signifikante Korrelationen. Diese bestanden zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und der Anzahl der befruchteten ( $r = -0,41$ ;  $p = 0,006$ ; Abbildung 30) sowie zwischen dem Homocystein in der Follikelflüssigkeit und dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $r = -0,32$ ;  $p = 0,043$ ).



**Abbildung 30:** Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und der Anzahl der befruchteten Eizellen im Vergleich zwischen Gesamt-, G1- und G2-Kollektiv

*Gesamtkollektiv: schwarze Linie; G1-Kollektiv: blaue Kreise, blaue Linie; G2-Kollektiv: grüne Kreise, grüne Linie*

Weiterhin zeigte sich eine positive signifikante Korrelation zwischen der Folsäure in der Follikelflüssigkeit und der Schwangerschaftsrate ( $r= 0,39$ ;  $p= 0,011$ ).

Bezüglich der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und den klinischen Parametern gab es positiv signifikante und zum Teil hoch signifikante Korrelationen. So zum Beispiel zwischen dem Vitamin B12 und dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $r= 0,39$ ;  $p= 0,009$ ), der Schwangerschaftsrate ( $r= 0,36$ ;  $p= 0,034$ ) und dem Auftreten einer Geburt ( $r= 0,34$ ;  $p= 0,021$ ).

Darüber hinaus bestanden keine weiteren signifikanten Korrelationen.

In der folgenden Tabelle 12 werden die Korrelationsergebnisse von beiden Altersgruppen G1 und G2 einander gegenübergestellt.

**Tabelle 12:** Korrelation zwischen der Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum und in der FF und den Klinischen Parametern im Vergleich zwischen den Altersgruppen G1 und G2

Untersuchte Parameter	G1						G2						
		HCY (S)	HCY (FF)	Folsäure (S)	Folsäure (FF)	Vitamin B12 (S)	Vitamin B12 (FF)	HCY (S)	HCY (FF)	Folsäure (S)	Folsäure (FF)	Vitamin B12 (S)	Vitamin B12 (FF)
Gewonnene Eizellen	<b>r</b>	0,22	-0,02	-0,30*	-0,37*	-0,22	0,01	-0,20	0,06	-0,06	-0,06	-0,03	-0,17
	<b>p</b>	0,155	0,895	<b>0,051</b>	<b>0,022</b>	0,228	0,923	0,197	0,667	0,692	0,672	0,841	0,270
Befruchtete Eizellen	<b>r</b>	0,19	0,05	-0,28	-0,34*	-0,36	-0,07	-0,41**	-0,03	0,05	0,07	-0,02	-0,19
	<b>p</b>	0,224	0,726	0,065	<b>0,031</b>	0,06	0,631	<b>0,006</b>	0,831	0,744	0,661	0,871	0,222
Befruchtungsrate[%]	<b>r</b>	0,09	0,07	-0,14	-0,16	-0,22	-0,10	-0,01	0,01	-0,06	0,05	0,19	0,11
	<b>p</b>	0,551	0,650	0,355	0,291	0,192	0,529	0,960	0,926	0,688	0,725	0,237	0,474
Schwangerschaft [%]	<b>r</b>	-0,16	-0,09	-0,11	-0,08	0,27	0,03	-0,05	-0,32*	-0,17	-0,19	0,01	0,39**
	<b>p</b>	0,297	0,576	0,472	0,613	0,105	0,842	0,724	<b>0,043</b>	0,282	0,228	0,914	<b>0,009</b>
Schwangerschaftsrate [%]	<b>r</b>	0,28	0,25	0,07	-0,04	-0,15	-0,10	0,04	0,77	0,25	0,39**	0,09	0,36*
	<b>p</b>	0,940	0,143	0,685	0,781	0,401	0,547	0,120	0,482	0,134	<b>0,011</b>	0,572	<b>0,034</b>
Abort [%]	<b>r</b>	-0,06	0,01	0,12	0,15	0,25	-0,00	-0,13	-0,18	0,08	-0,16	0,21	0,17
	<b>p</b>	0,666	0,924	0,427	0,323	0,138	0,981	0,392	0,242	0,597	0,317	0,183	0,264
Geburt [%]	<b>r</b>	-0,11	-0,05	-0,18	-0,20	0,15	0,06	0,01	-0,24	-0,26	-0,13	0,04	0,34*
	<b>p</b>	0,453	0,748	0,252	0,201	0,364	0,688	0,905	0,194	0,086	0,393	0,771	<b>0,021</b>

\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant

r: Korrelationskoeffizient; p: Signifikanz

S: Serum; FF: Follikelflüssigkeit

G1: 35-34 Jahre; G2: 35-43 Jahre

## **5. Diskussion**

## 5.1 Konzentration von Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 im Serum und in der Follikelflüssigkeit

Ein Ziel der vorliegenden Untersuchung war zunächst der Nachweis und die Bestimmung der Konzentrationen von Homocystein, Folsäure und Vitamin B12 im Serum und in der Follikelflüssigkeit.

Das Homocystein konnte sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit mit Hilfe des HPLC-Systems nachgewiesen werden. Weiterhin gelang es, Folsäure und Vitamin B12 im Serum und in der FF am ADVIA Centaur-XP-System der Firma Siemens zu bestimmen (*Boxmeer et al., 2009; Berker et al., 2009*).

Die Homocystein-Konzentration im Serum ( $7,75 \pm 1,77 \mu\text{mol/l}$ ) war signifikant höher als in der FF ( $6,62 \pm 1,95 \mu\text{mol/l}$ ) ( $p= 0,001$ ). Die Konzentrationen von Folsäure ( $17,17 \pm 10,33 \text{ ng/ml}$ ) und von Vitamin B12 ( $387,76 \pm 144,31 \text{ pg/ml}$ ) im Serum waren jedoch signifikant niedriger als in der FF (Folsäure:  $23,86 \pm 12,27 \text{ ng/ml}$ ; Vitamin B12:  $783,81 \pm 1087,50 \text{ pg/ml}$ ) ( $p= 0,001$ ). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen von Schweigert et al. (2006). Sie haben Proteine, wie zum Beispiel das Haptoglobin, im Serum und in der FF von IVF-/ICSI-Patientinnen gemessen und sahen einen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Proteine in beiden Medien. Sie postulierten, dass gewisse Substanzen aus dem Serum über die „Blut-Follikel-Barriere“ in die Follikelflüssigkeit diffundieren. Diese „Blut-Follikel-Barriere“ wird im Verlauf der Follikulogenese permeabler für Plasmaproteine (*Manarang-Pangan, 1971*).

Berker et al. (2009) untersuchten das Plasma und die Follikelflüssigkeit von 52 Patientinnen mit dem PCO-Syndrom auf das Vorhandensein von Homocystein, Folsäure, Vitamin B12, Malonyldialdehyd und Estradiol. Sie konnten die untersuchten Parameter in beiden Medien nachweisen. Sowohl das Homocystein als auch die anderen Parameter waren jedoch im Plasma signifikant höher als in der FF ( $p<0,001$ ).

Boxmeer et al. (2008) zeigten in ihrer Studie, dass für Homocystein (9,1 vs. 6,6  $\mu\text{mol/l}$ ), Folsäure (30,5 vs. 29,8  $\text{nmol/l}$ ) und Vitamin B12 (319 vs. 208  $\text{pmol/l}$ ) im Serum im Vergleich zur Follikelflüssigkeit höhere Werte bestanden. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Korrelation dieser Parameter in beiden Medien ( $p\leq 0,001$ ).

Der Nachweis dieser Parameter in beiden Medien zeigt ihre direkte oder indirekte Wirkung auf die frühe Embryogenese und die Qualität der Eizellen (*Berker et al., 2009*).

## 5.2 Homocystein-, Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration untereinander

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob die untersuchten Parameter untereinander positiv oder negativ korrelieren.

Eine Hyperhomocysteinämie resultiert unter anderem aus einem Mangel an Folsäure und Vitamin B12, diese kann jedoch durch eine ausreichende Substitution an B-Vitaminen und anderen Nährstoffen ausgeglichen werden (*Ronnenberg et al., 2002; Nilsen et al., 2008; Bibi et al., 2010*). In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen diesen Parametern besteht. Das Homocystein korrelierte negativ mit der Folsäure und dem Vitamin B12, wohingegen die Folsäure und das Vitamin B12 sich gegenseitig positiv beeinflussten.

Ronnenberg et al. (2007) bestätigten diese Korrelation. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen B-Vitaminen wie Vitamin B6, B12, Fولاتen und Homocystein in Zusammenhang mit dem Auftreten einer Schwangerschaft und dem Abortrisiko. Sie stellten negative hoch signifikante Korrelationen sowohl zwischen Homocystein und Folsäure ( $r = -0,17$ ;  $p = 0,001$ ) als auch zwischen Homocystein und Vitamin B12 ( $r = -0,14$ ;  $p = 0,009$ ) fest. Eine positive hoch signifikante Korrelation bestand zwischen der Folsäure und dem Vitamin B12 ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,001$ ).

Boxmeer et al. fanden ebenfalls eine negative Korrelation zwischen Homocystein und Folsäure ( $r = -0,29$ ;  $p = 0,002$ ) und Homocystein und Vitamin B12 ( $r = -0,16$ ;  $p = 0,06$ ) in der FF. Positiv signifikant korrelierte in ihrer Studie die Folsäure mit dem Vitamin B12 ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,007$ ) ebenfalls in der FF.

Vergleichbare Ergebnisse zeigt auch die vorliegende Studie in Bezug auf die untersuchten Parameter. Es lag eine hoch signifikant negative Korrelation zwischen der Homocystein- und der Folsäure-Konzentration sowohl im Serum ( $r = -0,53$ ;  $p = 0,001$ ) als auch in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,37$ ;  $p = 0,001$ ) vor. Eine negative nicht signifikante Korrelation bestand ebenfalls für das Homocystein und das Vitamin B12 im Serum ( $r = -0,19$ ;  $p = 0,097$ ) sowie eine signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern in der Follikelflüssigkeit ( $r = -0,21$ ;  $p = 0,045$ ) im Gesamtkollektiv. Eine positiv signifikante Korrelation zeigte sich zwischen der Folsäure- und der Vitamin B12-Konzentration in G1 ( $r = 0,29$ ;  $p = 0,054$ ) (Tabelle 7, 8).

### 5.3 Korrelation zwischen der Homocystein-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen dem Homocystein und dem ICSI-Ergebnis vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit korrelierte das Homocystein sowohl im Serum als auch in der Follikelflüssigkeit negativ, jedoch nicht signifikant, mit dem ICSI-Ergebnis (zum Beispiel Anzahl der befruchteten, transferierten Eizellen, Schwangerschaft, Geburt) im Gesamtkollektiv. Eine positive nicht signifikante Korrelation bestand im Gesamtkollektiv zwischen der Befruchtungsrate und der Homocystein-Konzentration im Serum ( $r= 0,01$ ;  $p= 0,884$ ) und in der Follikelflüssigkeit ( $r= 0,05$ ;  $p= 0,641$ ). Weiterhin korrelierte die Schwangerschaftsrate nicht signifikant positiv mit der Homocystein-Konzentration in beiden Medien (Serum:  $r= 0,11$ ,  $p= 0,353$ , FF:  $r= 0,16$ ;  $p= 0,166$ ) (Tabelle 10). Diese positiven Korrelationen können dadurch erklärt werden, dass bei den Patientinnen in der vorliegenden Arbeit keine Hyperhomocysteinämie vorlag, sondern ihre Homocystein-Werte sich im Serum im Normbereich befanden (Gesamt vs. G1 vs. G2:  $7,75 \pm 1,77$  vs.  $7,51 \pm 1,57$  vs.  $7,99 \pm 1,93$   $\mu\text{mol/l}$ ). Somit kann man vermuten, dass bei einem optimal geregelten Homocystein-Stoffwechsel das Homocystein einen positiven Einfluss auf Eizellentwicklung, -qualität und allgemein auf die Schwangerschaft haben kann (Boxmeer et al., 2009).

Eine signifikant negative Korrelation bestand in der G2-Gruppe zwischen der Homocystein-Konzentration im Serum und der Anzahl der befruchteten ( $r= -0,41$ ,  $p= 0,006$ ) Eizellen (Abbildung 30). Weiterhin korrelierte in dieser Gruppe die Homocystein-Konzentration in der Follikelflüssigkeit negativ signifikant mit der Schwangerschaft ( $r= -0,32$ ;  $p= 0,043$ ; Tabelle 12).

Die schädliche Wirkung einer Hyperhomocysteinämie liegt in der vermehrten Produktion von ROS, wie Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxyradikale. Die atherogenen Mechanismen der ROS äußern sich zum Beispiel in einer Inaktivierung des NO und somit einer verminderten Vasodilatation sowie einer vermehrten Oxidation der LDL-Partikel. Das Risiko für den oxidativen Stress ist ebenfalls erhöht (Heinecke et al., 1993). Bedaiwy et al. (2002) beschreiben, dass die Produktion von ROS bis zu einem gewissen Grad notwendig ist für eine gute Fertilisationsrate, Embryoqualität und Schwangerschaft. Sikka (2004) und Agarwal et al. (2005) kamen zu der Schlussfolgerung, dass sich aus einer überhöhten

Produktion von ROS und dem daraus folgenden vermehrten oxidativen Stress schädliche Auswirkungen auf die Schwangerschaft und Befruchtungsrates und generell auf das IVF/ICSI-Ergebnis ergeben. Weiterhin untersuchten Berker et al. (2009), ob es einen Zusammenhang zwischen der Homocystein-Konzentration bei PCO-Patientinnen und der Embryoqualität gibt. Sie fanden heraus, dass eine erhöhte Konzentration an Homocystein signifikant negativ mit dem Reifegrad der Eizellen korreliert (Grad 2 vs. Grad 3 Eizellen;  $p < 0,001$ ). Vergleichbare Ergebnisse erhielten Boxmeer et al. (2008). Sie zeigten, dass die Homocystein-Konzentration in der Follikelflüssigkeit von Frauen, die Folsäure eingenommen hatten, also normwertige Homocystein-Konzentrationen hatten, positiv mit dem Durchmesser der Eizellen korrelierten ( $p < 0,05$ ). Dies verdeutlicht, dass eine optimale Homocystein-Konzentration sich positiv auf die Eizellqualität auswirkt.

Die Ergebnisse von Nafiye et al. (2010) stehen in Einklang mit den oben genannten Studien. Sie untersuchten 79 Patientinnen, die sich einer IVF-Therapie unterzogen hatten, und kamen zu der Schlussfolgerung, dass erhöhte Homocystein-Konzentrationen im Serum sich negativ sowohl auf die Anzahl der gewonnenen Eizellen als auch auf die Reife derselben auswirken. Jedoch fanden sie keine Korrelation zwischen dem Homocystein und dem Auftreten einer Schwangerschaft und der Schwangerschaftsrates.

Eine Hyperhomocysteinämie hat ebenfalls Einfluss auf die Fehl- und Frühgeburtsrates, Infertilität und auf Schwangerschaftsassozierte Erkrankungen, wie zum Beispiel die Eklampsie (Steegers-Theunissen et al., 1992, 2004; Nelen et al., 2000). Ronnenberg et al. (2002) setzten in ihrer Untersuchung unter anderem die Homocystein-Konzentration mit der Frühgeburtlichkeit in Zusammenhang. Sie fanden ein etwa vierfach erhöhtes Risiko einer Frühgeburtlichkeit bei Frauen, deren Homocysteinwert  $>12,4 \mu\text{mol/l}$  betrug, und folgerten, dass eine ausreichende Vitaminzufuhr das Risiko einer Hyperhomocysteinämie und somit auch das Risiko der Frühgeburtlichkeit senken können.

Diese Ergebnisse bestätigen den Einfluss des Homocysteins auf das ICSI-Ergebnis und unterstreichen die Bedeutung eines optimal eingestellten Homocystein-Stoffwechsels.

## 5.4 Korrelation zwischen der Folsäure-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis

In diesem Abschnitt sollte geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen der Folsäure-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis vorliegt.

In der vorliegenden Arbeit fand man negative nicht signifikante Korrelationen zwischen der Folsäure-Konzentration im Serum und in der Follikelflüssigkeit und der Anzahl der gewonnenen (Serum:  $r = -0,17$ ;  $p = 0,111$ , FF:  $r = -0,24$ ;  $p = 0,061$ ), befruchteten Eizellen (Serum:  $r = -0,12$ ;  $p = 0,264$ , FF:  $r = -0,13$ ;  $p = 0,211$ ), der Befruchtungsrates (Serum:  $r = -0,11$ ;  $p = 0,359$ , FF:  $r = -0,07$ ;  $p = 0,529$ ), der Schwangerschaft (Serum:  $r = -0,12$ ;  $p = 0,248$ , FF:  $r = -0,13$ ;  $p = 0,348$ ) und der Geburt (Serum:  $r = -0,22$ ;  $p = 0,063$ , FF:  $r = -0,15$ ;  $p = 0,164$ ) (Tabelle 10).

Die Folsäure-Konzentration im Serum der Patientinnen in der vorliegenden Arbeit lagen im Normbereich, sogar im oberen Normbereich (Normalwerte: 5-25 ng/ml). Da die Patientinnen erst nach Auftreten einer Schwangerschaft mit einer Vitaminsupplementierung begonnen haben und somit zum Zeitpunkt der Folsäurebestimmung keinerlei Vitamine eingenommen hatten, kann gefolgert werden, dass das Patientenkollektiv ausreichend mit Folsäure aus der Nahrung versorgt war.

Auffallend war eine negativ signifikante Korrelation zwischen der Folsäure-Konzentration und der Anzahl der gewonnenen Eizellen in beiden Medien in der G1-Altersgruppe (Serum:  $r = -0,30$ ;  $p = 0,051$ , FF:  $r = -0,37$ ;  $p = 0,022$ ). Weiterhin korrelierte die Folsäure in der FF negativ signifikant mit der Anzahl der befruchteten Eizellen ( $r = -0,34$ ;  $p = 0,031$ ; Tabelle 12).

Diese Ergebnisse entsprechen denen der Arbeitsgruppe von Boxmeer et al. (2008). Sie fanden in ihren Untersuchungen einen negativen Einfluss der Folsäure auf die Follikulogenese. Sie beschrieben, dass bei Frauen, die mit Folsäure supplementiert wurden und somit eine erhöhte Folsäure-Konzentration aufwiesen, eine negative Korrelation zwischen der Folsäure und dem Follikeldurchmesser bestand ( $r = -0,74$ ;  $p \leq 0,05$ ). Als mögliche Erklärung zeigten sie, dass sowohl eine zu hohe, zum Beispiel durch eine übermäßige Folsäure-Supplementierung, als auch eine zu geringe Folsäure-Konzentration sich negativ auf das Follikelwachstum auswirkt. Daraus folgerten sie, dass es eine optimale Folsäure-Konzentration geben muss, die die Eizellqualität positiv beeinflusst.

In ihrer Studie von 2009 zeigten Boxmeer et al. jedoch eine positiv signifikante Korrelation zwischen der Folsäure in der Follikelflüssigkeit und dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $p= 0,03$ ). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen der Folsäure in der Follikelflüssigkeit in der G2-Altersgruppe und der Schwangerschaftsrate ( $r= 0,39$ ;  $p= 0,01$ ; Tabelle 12).

Folsäuren haben eine wichtige Funktion als Überträger von C1-Gruppen bei der Synthese von Purinnukleotiden. Des Weiteren sind sie an der Bildung von Desoxythimidin-5'-monophosphat (dTMP) und somit an der DNA-Replikation beteiligt. Ein Mangel an Folsäure stört die DNA-Synthese und führt somit zu Defekten in der DNA-Struktur, zu Strangbrüchen und letztlich zur Apoptose (*Blount et al., 1997*). Folglich ist eine ausreichende Folsäure-Konzentration bei sich schnell teilenden Zellen, zum Beispiel während der präkonzeptionellen Phase, der Gametenbildung, des Embryowachstums und in der Schwangerschaft, aber auch im Kindesalter besonders wichtig für eine zeitgerechte Entwicklung (*Bliek et al., 2004*; *Jaroundi and SenGupta, 2007*).

Twigt et al. (2011) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Folsäureeinnahme und der Follikel- beziehungsweise der Eizellentwicklung. Es wurden von den 50 subfertilen Frauen 24 nach dem langen (LP „conventional ovarian stimulation“) und 26 Frauen nach dem kurzem Protokoll (SP „mild ovarian stimulation“) stimuliert. Des Weiteren wurden 35 dieser Patientinnen vor Beginn der Behandlung mit Folsäure supplementiert. Zwischen den beiden unterschiedlichen „Stimulationsgruppen“ zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der präovulatorischen Follikel (10,6 vs. 7,4;  $p<0,01$ ) und der Anzahl der gewonnenen Eizellen (12,3 vs. 6,7;  $p= 0,001$ ). Auffallend war jedoch, dass in der Gruppe der Frauen, die keine Folsäure zu sich nahmen, eine höhere Anzahl an Follikeln zu finden war (14,1 vs. 6,9;  $p<0,01$ ) im Gegensatz zu der Gruppe mit Folsäuresubstitution (8,9 vs. 7,6;  $p= 0,29$ ). Im Gegensatz dazu haben sich die Anzahl der transferierten Eizellen, die Befruchtungsrate (0,56 vs. 0,48;  $p= 0,36$ ) und die Anzahl der Schwangerschaften (29,2 vs. 15,4 %;  $p= 0,34$ ) in den zwei Stimulationsgruppen nicht unterschieden. Die Untersuchungsgruppe erklärte, dass die Folsäure-Konzentration eine entscheidende Rolle bei der Stimulation der Ovarien spielt. Sie postulierte, dass die Folsäure einen abmildernden Effekt bezüglich der Follikelbildung im Rahmen der Ovarienstimulation hat und zwar durch ihre Interferenz mit dem FSH-Rezeptor und durch die Verringerung der ROS-Konzentration. Auf diese Weise wird eine Hyperstimulation der Ovarien verhindert. Daraus folgt, dass die

Folsäure ihren „abmildernden Effekt“ hauptsächlich auf die frühe Follikelentwicklung auswirkt.

Weiterhin kann eine ausreichende Folsäure-Konzentration die Fehlgeburtsrate sowie das Frühgeburtsrisiko reduzieren (Catov et al., 2007; D’Uva et al., 2007).

## **5.5 Korrelation zwischen der Vitamin B12-Konzentration und dem ICSI Ergebnis**

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen der Vitamin B12-Konzentration und dem ICSI-Ergebnis.

Die Konzentration des Vitamin B12 in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zwischen S1 ( $416,33 \pm 167,28$  pg/ml) und S2 ( $930,16 \pm 1252,26$  pg/ml) zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p= 0,037$ ). Im Serum allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen (S1:  $351,18 \pm 143,67$  pg/ml; S2:  $399,6 \pm 144,8$  pg/ml; Tabelle 4).

Eine Erklärung dafür lieferten zum Beispiel Andersen et al. (1976). Sie fanden in ihren Untersuchungen eine negative Korrelation zwischen dem Gewicht eines Proteins und der Konzentration des Proteins in der Follikelflüssigkeit. Demnach weisen Proteine mit kleinerem Gewicht durch vermehrte Diffusion eine höhere Konzentration in der FF im Vergleich zum Serum auf. Das Vitamin B12 hat eine molekulare Masse von 1,35 kDa (Kiyasu et al., 2000) und diffundiert, gemäß Andersen et al. (1976), schneller aus dem Serum in die FF. Schweigert et al. (2006) stimmten damit nicht überein. Sie zeigten in ihren Untersuchungen, dass auch Proteine mit größerem Gewicht vermehrt in der FF zu finden waren.

Weiterhin zeigten sich in der vorliegenden Arbeit positiv signifikante Korrelationen zwischen dem Vitamin B12 in der Follikelflüssigkeit und dem Auftreten einer Schwangerschaft, der Schwangerschaftsrate und dem Auftreten einer Geburt im Gesamtkollektiv und in der G2-Gruppe (Tabelle 10, 12). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Vitamin B12 eine starke Rolle für das Auftreten und den Verlauf einer Schwangerschaft spielt.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Boxmeer et al. (2009), dass das Vitamin B12 in der Follikelflüssigkeit keinen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Schwangerschaft hat ( $p= 0,51$ ). Weiterhin wiesen sie nach, dass das Vitamin B12 positiv mit der Eizellqualität (zum Beispiel Reifegrad der befruchteten Eizellen) korreliert. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Vitamin B12 zwar mit der Schwangerschaft positiv korreliert, jedoch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Schwangerschaft nicht beeinflusst oder vorhersagt (Tabelle 14).

Das Vitamin B12 hat bedeutende Funktionen im Eiweißstoffwechsel, im Nervensystem, bei Zellwachstum und -teilung sowie bei der Blutbildung. Hauptsächlich ist das Vitamin B12 an zwei enzymatischen Reaktionen beteiligt. Zum einen katalysiert sie als Coenzym Adenosylcobalamin den Abbau ungradzahliger Fettsäuren und verzweigter Aminosäuren. Zum anderen dient Vitamin B12 in Form des Methylcobalamins als Cofaktor bei der Remethylierung von Homocystein zu Methionin beziehungsweise bei der Bildung des SAM als Methylgruppenüberträgers (Rosenblatt, 2001; Wolters et al., 2004).

Verringerte Folsäure- und Vitamin B12-Konzentrationen können zu einer Hyperhomocysteinämie führen. Dies wiederum resultiert in einem erhöhten Risiko für oxidativen Stress und verschlechtert auf diese Weise unter anderem die Eizellqualität und die Wahrscheinlichkeit auf eine Schwangerschaft.

Bennett (2001) erklärte, dass ein Vitamin B12-Mangel ein megaloblastisch verändertes Endometrium verursacht. Dies wiederum erschwert sowohl die Einnistung der Eizelle in die Uterusschleimhaut als auch die Teilung der befruchteten Eizelle. Zur Vorbeugung wird eine Einnahme von Vitaminen, wie Vitamin B12 oder Folsäure, schon vor der Schwangerschaft empfohlen.

In zahlreichen Studien (Bennett, 2001; Reznikoff-Etievant et al., 2002; D'Uva et al., 2007; Hübner et al., 2008; VanderJagt et al., 2011) wurde ein Zusammenhang zwischen verringerten Vitamin B12-Konzentration, einer Hyperhomocysteinämie und einem erhöhten Auftreten von Frühaborten festgestellt. Im Serum der vorliegenden Untersuchung korrelierte das Vitamin B12 im Gesamtkollektiv ebenfalls negativ mit dem Auftreten eines Aborts ( $r= -0,24$ ;  $p= 0,044$ ).

## 5.6 Schlussfolgerung

- Zunächst konnten die untersuchten Parameter im Serum und in der Follikelflüssigkeit nachgewiesen werden.
- Das Homocystein korrelierte signifikant negativ mit der Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration. Die Folsäure und das Vitamin B12 korrelierten positiv signifikant miteinander.
- Die Konzentrationen der untersuchten Parameter in beiden Medien zeigten weder im Vergleich zwischen G1 und G2, noch zwischen S1 und S2 einen signifikanten Unterschied bis auf die Vitamin B12-Konzentration, die zwischen der S1 und S2 ( $416,33 \pm 167,28$  vs.  $930,16 \pm 1252,26$ ;  $p= 0,037$ ) einen signifikanten Unterschied aufwies.
- Die klinischen Parameter zeigten im Vergleich zwischen G1 und G2 bis auf die Befruchtungsrate, die in der G2-Gruppe signifikant höher war als in der G1-Gruppe ( $43,11 \pm 24,91$  vs.  $59,33 \pm 30,91$ ;  $p= 0,009$ ), keinen signifikanten Unterschied. Zwischen S1 und S2 zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl der befruchteten ( $5,43 \pm 2,81$  vs.  $3,32 \pm 2,77$ ;  $p= 0,001$ ) und transferierten Eizellen ( $2,61 \pm 0,58$  vs.  $2,06 \pm 0,82$ ;  $p= 0,007$ ) und der Befruchtungsrate ( $63,59 \pm 23,18$  vs.  $46,55 \pm 30,13$ ;  $p= 0,018$ ).
- Im Serum korrelierte in der G2 das Homocystein negativ signifikant mit der Anzahl der befruchteten Eizellen ( $r= -0,41$ ;  $p= 0,006$ ) und in der Follikelflüssigkeit mit dem Auftreten einer Schwangerschaft ( $r= -0,32$ ;  $p= 0,043$ ).
- Die Folsäure in beiden Medien korrelierte in der G1 negativ signifikant mit der Anzahl der gewonnenen Eizellen ( $r= -0,30$ ;  $p= 0,051$  vs.  $r= -0,37$ ;  $p= 0,022$ ).
- In der G2 korrelierte die Folsäure in der FF positiv mit der Schwangerschaftsrate ( $r= -0,39$ ;  $p= 0,011$ ).
- Statistisch signifikant war auch der Zusammenhang zwischen der Vitamin B12-Konzentration in der Follikelflüssigkeit und dem Auftreten einer Schwangerschaft und einer Geburt sowohl im Gesamtkollektiv als auch in der G2.

- Die untersuchten Parameter zeigt sowohl positive als auch negative Zusammenhänge in Bezug auf die Schwangerschafts- und Befruchtungsergebnisse im Gesamt-, G1-, G2- sowie im S1- und S2-Kollektiv.
- Um eine optimale Konzentration der untersuchten Parameter mit positivem Einfluss auf das Ergebnis der Reproduktionsmaßnahme zu finden, müssen noch weitere Untersuchungen folgen.

## **6. Literaturverzeichnis**

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Afman LA, Van der Put NM et al. (2001) Reduced Vitamin B12 binding the transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *Q J Med* 94: 159-166
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 28-49
3. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP et al. (2006) Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril* 86: 878-885
4. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 41: 183-197
5. Andersen MM, Kroll J, Byskov AG et al. (1976) Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J Reprod Fertil* 48: 109-118
6. Andersen MM, Kroll J, Byskov AG et al. (1976) Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. *J Reprod Fertil* 48: 109-118
7. Andersson A, Hultberg B, Brattström L et al. (1992) Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Biochem* 30: 377-379
8. Arici A, Oral E, Bahtiyar O et al. (1997) Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod* 12: 1233-1239
9. Asimakopoulos B, Nikolettos D, Papachristou N et al. (2005) Follicular fluid levels of vascular endothelial growth factor and leptin are associated with pregnancy outcome of normal women participating in intracytoplasmic sperm injection. *Physiol Res* 54: 263-270
10. ASRM (2006) Definition of "infertility". *Fertil Steril* 86: 228
11. Azem F, Many A, Ben Ami I et al. (2004) Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod* 19: 368-370
12. Bae J, Shin SJ, Cha SH et al. (2007) Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. *Fertil Steril* 87: 351-355
13. Bailey LB (2000) New standard for dietary folate intake in pregnant women. *Am J Clin Nutr* 71: 1304-1307
14. Banerjee R, Ragsdale SW (2003) The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 72: 209-247
15. Barak V, Mordel N, Holzer H et al. (1992b) The correlation of interleukin-1 and tumor necrosis factor to oestradiol, progesterone and testosterone levels in periovulatory follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod* 7: 462-464
16. Barak V, Yanai P, Treves AJ et al. (1992a) Interleukin-1: local production and modulation of human granulosa luteal cells steroidogenesis. *Fertil Steril* 58: 719-725
17. Barrionuevo MJ, Schwandt RA, Rao PS et al. (2000) Nitric Oxide (NO) and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) in Follicular Fluid and Their Correlation With fertilization and Embryo Cleavage. *Am J Reprod Immunol* 44: 359-364

18. Bässler KH, Golly I, Loew D et al. (2002) Vitamin Lexikon. Für Ärzte, Apotheker und Ernährungswissenschaftler. 3. Auflage, Urban& Fischer München Jena
19. Bedaiwy MA, Miller K, Goldberg JM et al. (2002) Assessment of the predictive value of follicular fluid cytokines and reactive oxygen species in IVF cycles. *Fertil Steril* 78: 5–6
20. Benifla JL, Bringuier AF, Sifer C et al. (2001) Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 16: 1376-1381
21. Bennett M (2001) Vitamin B12 deficiency, infertility and recurrent fetal loss. *J Reprod Med* 46:209-212
22. Berker B, Kaya C, Aytac R et al. (2009) Homocysteine concentration in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 24: 2293-2302
23. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung (2007) Ungewollt kinderlos – Was kann die moderne Medizin gegen den Kindermangel in Deutschland tun? [http://www.berlininstitut.org/ungewollt\\_kinderlos.html](http://www.berlininstitut.org/ungewollt_kinderlos.html)
24. Bibi S, Pir MA, Ara Qazi RA et al. (2010) Hyperhomocysteinemia in Pakistani women suffering from unexplained subfertility. *Iran J Reprod Med* 8: 76-79
25. Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K (2002) Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe, Prävention und Therapie mit Mikronährstoffen. Georg Thieme, Stuttgart New York
26. Bili H, Tarlatzis BC, Daniilidid M et al. (1998) Cytokines in the human ovary: presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. *J Assist Reprod Genet* 15: 93-98
27. Blik JB, de Klein A, Luiders TM et al. (2004) New approach for the identification of the folate-related pathways in human embryogenesis. *Cell Mol Biol* 50: 939-944
28. Blount BC, Mack MM, Wehr CM et al. (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3290-3295
29. Boxmeer JC, Macklon NS, Lindemans J et al. (2009) IVF outcomes are associated with biomarkers from the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum Reprod* 24: 1059-1066
30. Boxmeer JC, Steegers-Theunissen RPM, Lindemans J et al. (2008) Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 23: 2570-2576
31. Brinsden PR (ed) (1999) In-vitro-fertilization and assisted reproduction. The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. 2nd ed. Parthenon Publishing, New York London
32. Candito M, Magnaldo S, Bayle J et al. (2003) Clinical B12 Deficiency in One Case of Recurrent Spontaneous Pregnancy Loss. *Clin Chem Lab Med* 41: 1026-1027
33. Carlberg M, Nejaty J, Fröysa B et al. (2000) Elevated expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod* 15: 1250-1255
34. Catov JM, Bodnar LM, Ness RB et al. (2007) Association of Periconceptional Multivitamin Use and Risk of Preterm or Small-for-Gestational-Age Births. *Am J Epidemiol* 166: 296-303

35. Chen P, Poddar R, Tipa EV et al. (1999) Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implication for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 39: 93-109
36. Chen L, QI H, Korenberg J et al. (1996) Purification and properties of human cytosolic folylpoly-gamma-glutamate synthetase and organization, localization, and differential splicing of its gene. *J Bio Chem* 271: 13077–13087
37. Choi SW, Mason JB (2000) Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 130: 129–132
38. Coelho D, Suormala T, Stucki M et al. (2008) Gene Identification for the cbID Defect of Vitamin B12 Metabolism. *N Engl J Med* 358: 1454-1464
39. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS et al. (1996) Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation *Proc Natl Acad Sci* 93: 3115-3120
40. Czeizel AE, Dudas I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327: 1832-1835
41. D.A.C.H.-Liga-Homocystein e.V., (2003) Deutschland, Österreich, Schweiz
42. De Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA et al. (1997) Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 56:643-660
43. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D et al. (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 54: 599-618
44. Deutsches IVF-Register (DIR) (2005) Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, <http://www.deutsches-ivf-register.de>
45. Devroey P, Aboulghar M, Garcia-Velasco J et al. (2009a) Improving the patient's experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod* 24: 764-774
46. DGE (2000) Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (Hrsg.): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Umschau/Braus, Frankfurt am Main
47. Dorn C, Griesinger G (2009) GnRH-Analoga in der Reproduktionmedizin. *Gynäkologische Endokrinologie* 7: 161-170
48. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ et al. (2002) Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation* 105: 22–26
49. Durand P, Prost M, Loreau N et al. (2001) Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 81: 645-672
50. Duthie SJ, Hawdon A (1998) DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J* 12:1491-1497

51. D'Uva M, Di Micco P, Strina I et al. (2007) Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy: a preliminary report. *Thromb J* 5: 10
52. Ebisch IMW, Peters WHM, Thomas CMG et al. (2006) Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 21: 1725-1733
53. Eichholzer M, Luthy J, Moser U et al. (2001) Folate and the risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med W* 131: 539-549
54. Eskes TK (2000) Homocysteine and human reproduction. *Clin Exp Obstet Gynecol* 27:157-67
55. Esterbauer B, Jungwirth A (2009) Erectile dysfunction. *Wien Med Wochenschr* 159: 529-534
56. Felberbaum R, Bühler van der Ven (Hg.) (2007) Das Deutsche IVF-Register 1996-2006-10 Jahre Reproduktionsmedizin in Deutschland. Springer, Heidelberg
57. Ferraroni M, La Vecchia C, D'Avanzo B et al. (1994) Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer. *Brit J Cancer* 70: 1150-1155
58. Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 198 157: 40-44
59. Fox JT, Stover PJ (2008) Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. In Litwack G (eds) *Vitamins and Hormones*, 79: Folic Acid and Folates, Elsevier Inc.
60. Friedman CI, Danforth DR, Herbosa-Encarnacion C et al. (1997) Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil Steril* 68(4): 607-612
61. Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111-113
62. Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ et al. (1992) Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos *Biol Reprod* 46: 470-474
63. Fyfe JC, Madsen M, Hojrup P et al. (2004) The functional cobalamin (vitamin B-12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 103 1573-1579
64. Garcia JE, Padilla SL, Bayati J et al. (1990) Follicular phase gonadotropinreleasing hormone agonist and human gonadotropins: a better alternative for ovulation induction in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 53: 302-305
65. Graw J (2006) *Genetik*. Springer, Berlin Heidelberg
66. Gregory JF (2001) Case study: folate bioavailability. *J Nutr* 131: 1376-1382
67. Hague WM (2003) Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17:459-69
68. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T et al. (1999) Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Andrology* 22: 155-162

69. Hammadeh ME, Braemert B ,Baltés S et al. (2000) Relationship between Ovarian Stimulation Regimen and Cytokine Concentration in Follicular Fluid and Their Effect on Fertilization and Pregnancy Outcome of Patients Undergoing ICSI Program. *Am J Reprod Immunol* 43:12-20
70. Hammadeh ME, Ertan AK, Georg T et al. (2002a) Relationship between Ovarian Stimulation Regimen and interleukin level in Preovulatory Follicular Fluid and Their effect on ICSI Outcome. *Am J Reprod Immunol* 48: 255-261
71. Hammadeh ME, Zenner S, Ong MF et al. (2008) Relationship between reactive oxygen species (ROS), and enzymatic antioxidants and their effect on IVF/ICSI outcome. *Suppl Fertil Steril* 90: 191
72. Heaton EB, Savage DG, Brust JCM et al. (1991) Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine* 70: 229-244
73. Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L et al. (1993) Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms. *J Lipid Res* 34: 2051-2061
74. Herold G et al (2007). *Innere Medizin*, Gerd Herold, Köln
75. Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K et al. (2001) Total homocysteine, vitamin B12 and total antioxidant status in vegetarians. *Clin Chem* 47: 1094-1101
76. Herrmann W, Obeid R (2008) Ursachen und frühzeitige Diagnostik von Vitamin-B12-Mangel. *Dtsch Arztebl* 105: 680-685
77. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ et al. (2001) Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 285: 2981-2986
78. Hsieh Y-Y, Chang C-C, Tsai H-D et al. (2005) Leukemia inhibitory factor in follicular fluid is not related to the number and quality of embryos as well as implantation and pregnancy rates. *Biochem Genetics* 43: 501-506
79. Hübner U, Alwan A, Jouma M et al. (2008) Low serum vitamin B12 is associated with recurrent pregnancy loss in Syrian women. *Clin Chem Lab Med* 46:1265-1269
80. Illera MJ, Juan L, Stewart CL et al. (2000) Effect of peritoneal fluid from women with endometriosis on implantation in the mouse model *Fertil Steril* 74: 41-48
81. Jacobsen DW (1998) Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 44: 1833-1843
82. Jacques PF, Chylack LTJ (1991) Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention. *Am J Clin Nutr* 53: 352-355
83. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP et al. (1999) Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 70: 495–501
84. James SL, Melnyk S, Pogribna M et al. (2002) Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 14: 1638-1741
85. Jaroundi S, SenGupta S (2007) DNA repair in mammalian embryos. *Mutat Res* 35: 53-77

86. Jasper M, Norman R (1995) Immunoreactive interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in thecal, stromal and granulosa cell cultures from normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 10: 1352-1354
87. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ (2006) Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 12: 747-755
88. Karnaze DS, Carmel R (1990) Neurologic and evoked potential abnormalities in subtle cobalamin deficiency states, including deficiency without anemia and with normal absorption of free cobalamin. *Arch Neurol* 47: 1008-1001
89. Kim CH, Cho YK, Mok JE (1996) Simplified ultralong protocol of gonadotrophin releasing hormone agonist for ovulation induction with intrauterine insemination in patients with endometriosis. *HumReprod* 11: 398-402
90. Kim KY, Oh DS, Jeong JH et al. (2004) Follicular blood flow is a better predictor of the outcome of in vitro fertilization- embryo transfer than follicular fluid vascular endothelial growth factor and nitric oxide concentrations. *Fertil Steril* 82: 586-592
91. Kiyasu T, Asakura A, Nagahashi Y et al. (2000) Contribution of Cysteine Desulfurase (NifS Protein) to the Biotin Synthase Reaction of Escherichia coli. *J Bacteriology* 182: 2879-2885
92. Krautler B (2005) Vitamin B12: Chemistry and Biochemistry. *Biochem Soc Trans* 33: 806-810
93. Leischker AH, Kolb GF (2002) Vitamin B12-Mangel im Alter. *Europ J Ger* 4: 120-126
94. Li DK, Daling JR, Mueller BA et al. (1995) Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology* 6: 212-218
95. Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP et al. (1998) Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol Dial Transplant* 13: 656-661
96. Ludwig M, Gromoll J, Hehr U et al. (2004) Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin: Empfehlung zur genetischen Diagnostik bei Kinderwünschpaaren. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 1: 190-193
97. Lübke M (2004) Fertilitätsstörungen und ovarielles Überstimulationssyndrom. In: Bühling KJ, Friedmann W (eds) *Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban & Fischer, München Jena, 38-47
98. Manarang-Pangan S, Menge AC (1971) Immunologic studies on human follicular fluid. *Fertil Steril* 22:367-372
99. Manau D, Balasch J, Jiménez W et al. (2000) Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum Reprod* 15: 1295-1299
100. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM et al. (1995) Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other amino thiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Homocysteine and peripheral vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 232-240
101. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K (1996) Homocysteine and coronary Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 27: 517-527

102. Martinelli I, Taioli E, Ragni G et al. (2003) Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 88: 789-793
103. McKeecer MP, Weir DG, Molloy A et al. (1991) Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Depart Biochem* 81: 551-556
104. Nafiye Y, Sevtap K, Muammer G et al. (2010) The effect of serum and intrafollicular insulin resistance parameters and homocysteine levels of nonobese, nonhyperandrogenemic polycystic ovary syndrome patients on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 93: 1864-1869
105. Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK et al. (1997) Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *J Lancet* 350: 861
106. Nelen WL, Bulten J, Steegers E et al. (2000) Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. *Hum Reprod* 15: 954-960
107. Newman PE (1999) Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA methylation producing mutations which initiate atherosclerosis? *Med Hypotheses* 53: 421-424
108. Nilsen RM, Vollset SE, Rasmussen SA et al. (2008) Folic Acid and Multivitamin Supplement Use and Risk of Placental Abruption: A Population-based Registry Study. *Am J Epidemiol* 167: 867-874
109. Nygard O, Refsum H, Ueland PM et al. (1997) Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 65: 136-143
110. Ocal P, Aydin S, Cepni I et al. (2004) Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115: 194-199
111. Ozornek MH, Bielfeld P, Krussel SP et al. (1999) Epidermal growth factor and leukaemia inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with in vitro fertilization outcome *J Reprod Med* 44: 367-369
112. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340: 17-18
113. Paszkowski T, Clarke RN, Hornstein MD (2002) Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum Reprod* 17: 921-925
114. Pavlik R, Hecht S (2006) Einfluss von Homocystein auf die Estradiol-Sekretion humaner Granulosazellen. *Geburtsh Frauenheilk* 67: 19-22
115. Pels K, Schoebel F-C, Stein D et al. (1997) Homocystein. Bedeutung für Schweregrad und Ausmaß der Koronarsklerose bei angiographisch definierter koronarer Herzkrankheit. *Münch med Wschr* 139: 149-153
116. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ et al. (1994) Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 60: 559-566
117. Rampersaud GC, Bailey LB, Kauwell GP (2002) Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: review and recommendations for practitioners. *J Am Diet Assoc* 102: 1273-1282

118. Resch K-L, Till U, Riezler R, Pütter S (1995) Homocystein. Störungen des B6-, B12- und Folsäure-Metabolismus. Beziehungen zwischen Homocysteinämie und atherosklerotischen, neurologischen und geriatrischen Erkrankungen. Ponte Press, Bochum
119. Reznikoff-Etievant MF, Cayol V, Caronne B et al. (2001) Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutation are risk factors for early recurrent abortion. *Br J Obstet Gynecol* 108: 1251-1254
120. Reznikoff-Etievant MF, Zottoun J, Vaylet C et al. (2002) Low Vitamin B12 level as a risk factor for very early recurrent abortion. *European J Obstet Gynecol and Reprod Bio* 104: 156-159
121. Robinson K, Gupta A, Dennis V et al. (1996) Hyperhomocysteinemia confers an independent increased risk of atherosclerosis in end-stage renal disease and is closely linked to plasma folate and pyridoxine concentrations. *Circulation* 94: 2743-2748
122. Rondon MR, Trzebiatowski JR, Escalante-Semerena JC (1997) Biochemistry and molecular genetics of Cobalamin biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 56: 347-384
123. Ronnenberg AG, Goldman MB, Chen D et al. (2002) Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. *Am J Clin Nutr* 76: 1385-1391
124. Ronnenberg AG, Venners SA, Xiping X et al. (2007) Preconception B-Vitamin and Homocysteine Status, Conception, and Early Pregnancy Loss. *Am J Epidemiol* 166: 304-312
125. Rosenblatt DS, Fenton W (2001) Inherited disorders of folate and cobalamin metabolism in the metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, William S. Sly, Barton Childs, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) McGraw-Hill New York: 3897-3933
126. Rosenbusch B, Schneider M, Kreienberg R et al. (2001) Cytogenetic analysis of human zygotes displaying three pronuclei and one polar body after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 16: 2362-2367
127. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J (1996) Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 15227-15232
128. Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA (1996) Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* 50: 137-181
129. Runnebaum B (1994) Sterilität. In: Gynaekologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin. Anonymous: 117-183
130. Saito S (2000) Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 47:87-103
131. Sancken U, Burfeind P, Engel W (2005) Die Bedeutung des mütterlichen Alters für die Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 2: 109-114
132. Scholl TO, Johnson WG (2000) Folic acid: influence on the outcome of pregnancy *Am J Clin Nutr* 71: 1295-1303
133. Schreiber G (1996) Ursachen der Infertilität des Mannes. *Ärzteblatt Thüringen* 7: 44-47
134. Schweigert FJ, Gericke B, Wolfram W et al. (2006) Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod* 21: 2960-2968

135. Scott JM, Weir DG (1981) The methyl folate trap. A physiological response in man to prevent methyl group deficiency in kwashiorkor (methionine deficiency) and an explanation for folic-acid-induced exacerbation of sub-acute combined degeneration in pernicious anaemia. *Lancet* 318: 337-340
136. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW et al. (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *J Am Med Assoc* 270: 2693-2698
137. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR et al. (1995) Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *J Lancet* 346: 393-396
138. Sikka SC (2004) Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 25: 5-18
139. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER et al. (1988) Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 81: 466-477
140. Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG et al. (1993) Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 81: 3404-3413
141. Stanger O (2004) *Homocystein: Grundlagen, Klinik, Therapie, Prävention*, Verlag für medizinische Wissenschaft Wilhelm Maudrich, Wien
142. Stanger O, Dierkes J, Fowler B et al. (2003) D.A.CH.-Liga homocysteine (German, Austrian and Swiss homocysteine study): consensus paper on the rational use of homocysteine, folic acid and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. guidelines and recommendations. *J Cardio* 10: 190-199
143. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ et al. (1992) Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruption placentae. *Lancet* 339:1122-1123
144. Steegers-Theunissen RP, Steegers EA, Thomas CM et al. (1993) Study on the presence of Homocysteine in the ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 60: 1006-1010
145. Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG et al. (2004) Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol* 104: 336-343
146. Strehler E, Abt M, El-Danasouri I et al. (2001) Impact of recombinant follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropins on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 75: 332-336
147. Strowitzki T (2000) Indikationsbereiche IVF vs. ICSI. *Gynakologe* 33: 777-781
148. Surtees R, Bowron A, Leonard J (1997) Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine betasynthase deficiency: the effect of treatment. *Pediatr Res* 42: 577-582
149. Tamura T, Picciano MF (2006) Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 83: 993-1016
150. Tao M, Kodama H, Kagabu S et al. (1997) Possible contribution of follicular interleukin-1 $\beta$  to nitric oxide generation in human pre-ovulatory follicles. *Hum Reprod* 12:2220-2225
151. Tang T et al. (2006) The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 21: 1416-1425

152. Thomas P, Fenech M (2008) Methylenetetrahydrofolat reductase, common polymorphisms and relation to disease. In Litwack G (eds) *Vitamins and Hormones* 79: 375-392
153. Tönz O (2002) Vom Sinn und Zweck einer generellen Folsäureprophylaxe. *Schweizerisches Medizinisches Forum* 13: 303-310
154. Tremellen K (2008) Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14: 243-258
155. Twight JM, Hammiche F, Sinclair KD et al. (2011) Preconception Folic Acid Use modulates estradiol and Follicular Responses to Ovarian Stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 322-329
156. VanderJagt DJ, Ujah IAO, Ikeh EI et al. (2011) Assessment of the Vitamin B12 Status of Pregnant Women in Nigeria Using Plasma Holotranscobalamin. *ISRN Obstet Gynecol* 2011: 1-8
157. Van der Put NM, Van Straaten HW, Trijbels FJ et al. (2001) Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med* 226: 243-270
158. Van Voorhis BJ (2007) Clinical practice. In vitro fertilization. *N Engl J Med* 356: 379-386
159. Van Voorhis BJ, Dunn M, Snyder G et al. (1994) Nitric oxide: An autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinol* 135: 1799-1806
160. Verberg MF, Macklon NS, Nargund G et al. (2009) Mild ovarian stimulation for IVF. *Human Reprod Update* 15: 13-29
161. Vojkovic M, de Vries JH, Lindemans J et al. (2010) The preconception Mediterranean dietary pattern in couples undergoing in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection treatment increases the chance of pregnancy. *Fertil Steril* 94: 2096-3001
162. Wang HX, Wahlin A, Basun H et al. (2001) Vitamin B12 and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. *Neurology* 56: 1188-1194
163. Wang TT, Chandler CJ, Halsted CH (1986) Intracellular pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal mucosa. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 261: 13551-13555
164. Wang XF, Xing FQ, Chen SL (2002) Interleukin-1beta expression on ovarian granulosa cells and its clinical implication in women undergoing in vitro fertilization. *Di Yi Junyi Daxue Xuebao* 22: 934-936
165. Watanabe H, Nagai K, Yamaguchi M et al. (1994) Concentration of interleukin-1 $\beta$  correlates with prostaglandin E2 and F2 $\alpha$  in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 9: 9-12
166. Watanabe F (2007) Vitamin B12 sources and bioavailability. *Exp Biol Med* 232: 1266-1274
167. Watkins D, Rosenblatt DS (1989) Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am J Med Genet* 34: 427-434
168. Westphal LM, Polan ML, Trant AS et al. (2004) A Nutritional Supplement for Improving Fertility in Women. *J Reprod Med* 49: 289-293
169. Wolters M, Ströhle A, Hahn A (2004) Altersassoziierte Veränderungen im Vitamin B12- und Folsäurestoffwechsel: Prävalenz, Ätiopathogenese und pathophysiologische Konsequenzen. *Z Gerontol Geriatr* 37: 109-135

170. Woo KS, Chook P, Lolin YI et al. (1999) Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. *J Am Colleg Cardiol* 34: 2002–2006
171. World Health Organization (1999) WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. 4. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York
172. Würfel W (2007) Methoden der assistierten Reproduktion bei andrologischen Indikationen. *Blickp Mann* 5: 4-11
173. Zenses MT, Wang P, Casper RF (1995) Cigarette smoking may affect meiotic maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 10: 3213-3217
174. Zetterberg H, Zafiropoulos A, Spandidos DA et al. (2003) Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776 C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 18: 1948-1950

## **7. Danksagung**

## 7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. Mohamad Eid Hammadeh für die Bereitstellung des Themas und für die überaus freundliche Hilfe und Unterstützung. Seine Geduld und seine wertvollen Ratschläge leisteten einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Geisel, Direktor der Klinischen Chemie und des Zentrallabors der Universität des Saarlandes, für die Möglichkeit der uneingeschränkten Nutzung der Laborräume und benötigten Materialien sowie Chemikalien.

Als mein Betreuer hat mich Prof. Dr. med. Geisel geduldig in die wissenschaftliche Arbeit eingeführt, er hatte immer ein offenes Ohr für meine Anliegen und hat sich stets zuverlässig und sorgfältig um die Korrekturen dieser Arbeit gekümmert.

Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. Stefan Gräber vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik danken für seine Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Verarbeitung des Datenmaterials.

Natürlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester dafür, dass sie mich während meines Studiums, dieser Arbeit und in allen schweren Zeiten nicht nur unterstützt, sondern auch unermüdlich motiviert haben.

# PUBLIKATIONEN

## Freie Vorträge:

- M. E. Hammadeh, M. Hoqouq, E. F. Solomayer.  
Correlation between tHcy, Folic Acid and Vitamin B12 concentration in Serum and FF and their effect on ICSI outcome. *American Society for Reproductive Medicine (ASRM), Orlando 2011.*
- M. E. Hammadeh, M. Hoqouq, Rosenbaum P, E. F. Solomayer.  
Homocystein (HCY), Folic acid and Vitamin (B12) levels in Follicular fluid (FF) and serum of patient who became pregnant and those who did not after controlled ovarian hyperstimulation (COH) for ICSI. *American Society for Reproductive Medicine (ASRM), San Diego 2012.*

## Publizierte Abstracts:

- M. E. Hammadeh, M. Hoqouq, E. F. Solomayer.  
Correlation between tHcy, Folic Acid and Vitamin B12 concentration in Serum and FF and their effect on ICSI outcome. *Fertility & Sterility 2011; 96: S93-S94.*
- M. E. Hammadeh, M. Hoqouq, Rosenbaum P, E. F. Solomayer.  
Homocystein (HCY), Folic acid and Vitamin (B12) levels in Follicular fluid (FF) and serum of patient who became pregnant and those who did not after controlled ovarian hyperstimulation (COH) for ICSI. *Fertility & Sterility 2012; 98: S28.*