Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Professor Dr. med. R. Kreienberg

Einfluss des 5-, 10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)-Polymorphismus C677T auf den Erfolg einer extrakorporalen Befruchtung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Von
Florian Kresse
Ulm
2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Karl Sterzik

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Burkhard Manfras

Tag der Promotion: 15.04.2011

ABKÜRZUNGSVERZEICHIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Sterilität 1

1.2 Ursachen für Sterilität 2

1.2.1 Frau 2

1.2.2 Mann 3

1.2.3 weitere Subfertilitätsursachen 3

1.3 Reproduktionsmedizin 4

1.3.1 Verfahren der Reproduktionsmedizin 5

1.3.2 In-vitro-Fertilisation 5

1.3.3 intrazytoplasmatische Spermieninjektion 9

1.4 Bedeutung des Folsäuremetabolismus in der Reproduktion 11

1.4.1 Folsäure 11

1.4.2 Homocystein 12

1.4.3 Methylentetrahydofolatreduktase 14

1.4.4 Oxidativer Stress 15

1.5 Fragestellung 18

2 MATERIAL UND METHODEN 20

3 ERGEBNISSE 24

3.1 Schwangerschaftsraten 24

3.2 Mutationen 25

3.2.1 Mutationen in der IVF-Gruppe 26

3.2.2 Mutationen in der ICSI-Gruppe 26

3.3 Paarkonstellationen, klinische Schwangerschaftsraten und Geburtsraten ..27

3.4 Ergebnisse der logistischen Regressionen 29

3.4.1 IVF 29

3.4.2 ICSI 33

4 DISKUSSION 35

4.1 Komplikationen durch Folsäuremangel, Homocystein und der MTHFR-Mutationen C677T bei extrakorporaler Befruchtung 35

4.1.1 Schwangerschaft und Embryogenese 35

4.1.2 Assistierte Befruchtung 37
4.1.3 Plazentastörungen 40
4.1.4 Präeklampsie 41
4.1.5 Abort 41
4.1.6 männliche Infertilität 43

4.2 Mutationen in der IVF- und ICSI-Gruppe 45
4.2.1 Mutationen im Vergleich zur Literatur 45

4.3 Klinische Schwangerschaftsraten und Geburten 46

4.4 Ergebnisse der logistischen Regressionen 48
4.4.1 IVF-Kollektiv 48
4.4.2 ICSI-Kollektiv 51
4.4.3 Schlussfolgerung 53

5 ZUSAMMENFASSUNG 54

6 LITERATUR 56

7. DANKSAGUNG 68

8. LEBENSLAUF 69

Abkürzungsverzeichnis

ASRM	American society for reproductive medicine
ART	Assistierte Reproduktion
CC	Wildform des des Methylentetrahydrofolatreduktase-Gens
CT	Heterozygote Mutation des Methylentetrahydrofolatreduktase-Gens
DIR	Deutsches IVF Register
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E2	Estradiol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
Hetero	Heterozygote Mutation C677T im Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen
HinfI	Haemophilus influenza
Homo	Homozygote Mutation C677T im Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IU	Internationale Einheiten
IVF	In-vitro-Fertilisation
KI	Konfidenzintervall
klin.	Klinisch
LH	Luteinisierendes Hormon
MTHFR	5-,10-Methylentetrahydofolatreduktase
OR	Odds Ratio
p	Wahrscheinlichkeit
REPL	Recurrent early pregnancy loss
rFSH	Rekombinantes follikelstimmulierendes Hormon
rLH	Rekombinantes luteinisierendes Hormon
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
THF	Tetrahydrofolsäure / Tetrahydrofolat
TT	Homozygote Mutation des Methylentetrahydrofolatreduktase-Gens

1 EINLEITUNG

1.1 Sterilität

Die Wahrscheinlichkeit, dass es bei Paaren mit Kinderwunsch innerhalb von 12 Monaten zu einer Schwangerschaft kommt, liegt bei ca. 90% (Gnoth et al. 2003).
Die ungewollte Kinderlosigkeit stellt ein großes Problem in der Partnerschaft dar. Den Anteil der Paare mit ungewollter Kinderlosigkeit, die sich im reproduktionsfähigen Alter befinden, wird mit ca. 10% beziffert (Van Voorhis 2007). In Deutschland gibt es mehr als 1,2 Millionen ungewollt kinderlose Paare im reproduktionsfähigen Alter.

Ungewollte Kinderlosigkeit ist mit einem hohen Leidensdruck verbunden. Viele Paare sehen in eigenen Kindern den Sinn ihres Lebens und wünschen sich Kinder als Erfüllung ihrer Partnerschaft (Gnoth et al. 2003).

Leider ist die Terminologie der Begriffe, die verminderte Fruchtbarkeit beschreibt, nicht immer eindeutig. Die Bedeutung der Begriffe wird kontrovers diskutiert und hat bisher noch zu keiner einheitlichen Nomenklatur geführt (Habbema et al. 2004, Homburg 2005, Zegers-Hochschild et al. 2009).
Laut Definition der WHO besteht eine Sterilität, wenn bei regelmäßiger sexueller Aktivität und fehlender Kontrazeption innerhalb von 12 Monaten keine Schwangerschaft eintritt (ASRM 2004). Sterilität ist eine Krankheit (ASRM 2008).
Unter Infertilität versteht man die Unfähigkeit eine Schwangerschaft bis zu einem lebensfähigen Kind auszutragen (Gnoth et al. 2003).
Unter männlicher Subfertilität versteht man, dass die Befruchtungsfähigkeit des Spermas eingeschränkt oder gänzlich aufgehoben ist (Würfel 2007).

1.2 Ursachen für Sterilität

Die Ursache für Sterilität findet sich bei etwa 40 % der Fälle bei der Frau, bei 40 % beim Mann, in etwa 10 % findet sich eine Ursache bei beiden Partnern und in 10 % kann keinem eine Ursache zugeordnet werden (Esterbauer 2009)
Eine strikte Trennung in männliche und weibliche Sterilitätsursachen ist nicht immer möglich, da bei einem Teil der ungewollt kinderlosen Paaren auch Konzeptionsstörungen bei beiden Partnern zu finden sind (Agarwal 2005).

1.2.1 Frau

Das Alter der Frau stellt einen entscheidenden Faktor für Fertilität dar (Van Voorhis 2007). Das Durchschnittsalter der Frau bei der Geburt des ersten Kindes steigt, besonders bei Akademikern. Während von 1974 bis 2001 die 25- bis 29-Jährigen die meisten Kinder zur Welt brachten, werden ab 2002 die meisten Kinder von den 30- bis 34-Jährigen zur Welt gebracht (Statistisches Bundesamt 2007).
Als organische Ursache für ungewollte Kinderlosigkeit kann man bei der Frau folgendes unterscheiden (Stauber und Weyerstahl 2005):

- Ovarielle Ursachen: Störung der Follikulogenese, Hypothalamisch-hypophysär bedingte ovarielle Dysfunktionen (Hyperprolaktinämie, Hypophyseninsuffizienz, etc.), Climacterium praecox, Endometriose, PCO-Syndrom (Syndrom der polyzystischen Ovarien), Fehlbildungen (Gonadendyskinesien).
- Tubare Ursachen: Durchgängigkeits-, Beweglichkeitsstörungen, Endometriose, funktionelle Störungen (Eiauffangstörungen, Tubenspasmen).
- Uterine Ursachen: Entzündliche oder traumatische Veränderungen, Fehlbildungen, Tumoren.
- Zervikale Ursachen: Störung der Sekretbildung, Interaktion zwischen Spermien und zervikalen Mukus, Entzündungen.
- Vaginale Ursachen: Fehlbildungen, Entzündungen.

1.2.2 Mann

Bei ca. 30 bis 50% der Männer bleibt die Atiologie der Subfertilität unbekannt (Maier et al. 2000).
Des Weiteren gibt es folgende andrologische Ursachen die eine Subfertilität erklären oder zu einem eingeschränkten Spermiogramm führen (Steck 2001, Esterbauer 2009):

- Varikozele (varizenartige Erweiterung der Venen des Plexus pampiriformis), bei bis zu 35 % der infertilen Männer zu finden
- Kryptorchismus (Lageanomalien des Hodens, Aplasie des Keimepithels etc.)
- Hormonstörungen (hyper- und hypogonadotroper Hypogonadismus, Schildrüsenerkrankungen)
- Bakterielle und virale (z.B. Mumps) Infektionen
- Immunologische Erkrankungen
- Psychische Konflikte
- Allgemeinerkrankungen (Diabetes mellitus).

Eine obstruktive Azoospermie sollte diagnostisch von einer nicht- obstruktiven Azoospermie abgegrenzt werden.
Außerdem wird kontrovers diskutiert ob es in industriell entwickelten Ländern eine Abnahme der gesunden Spermien im Ejakulat gibt. Ob durch Toxine (z.B. im Tabakrauch) die Anzahl der gesunden Spermien abnimmt, ist noch nicht vollständig geklärt (Ramlau-Hansen et al. 2007, Paasch et al. 2008).

1.2.3 weitere Subfertilitätsursachen

Neben psycho-sozialen und zeitlichen Problemen sind auch biologische Ursachen ein Grund ungewollter Kinderlosigkeit.
So können auch Stoffwechselstörungen (Ebisch et al. 2006) oder chromosomale Aberrationen (Ludwig et al. 2004) eine Ursache für Infertilität sein.

Der Einfluss des Folsäure- und Homocysteinmetabolismus auf die Fertilität wurde bereits in Studien von Tamura et al. (2006), Forges et al. (2007) beschrieben.
Der 5-,10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)-Polymorphismus C677T greift in diesen Metabolismus ein: Homozygote Träger dieses Gendefekts neigen zur milden Homocysteinämie, d.h. dass Homocystein in einer erhöhten Konzentration im Blut vorhanden ist (Ebisch et al. 2003).
Homocysteinämie und die MTHFR-Mutation könnte die Fertilität beeinträchtigen (Bezold et al. 2001, Ebisch et al. 2006).
Weiterhin wird auch über den negativen Einfluss der MTHFR-Mutation bei der assistierten Reproduktion berichtet (Azem et al. 2004, Grandone et al. 2004, Qublan et al. 2006, D'Uva et al. 2007).
Es soll im Rahmen dieser Studie diskutiert werden, ob die heterozygote oder homozygote MTHFR-Mutation im Patientenkollektiv einen Einfluss auf die Schwangerschaftsraten nach IVF und ICSI hat und wie dieser Einfluss bedingt sein könnte .

1.3 Reproduktionsmedizin

In England wurde 1978 Luise Brown geboren. Sie war das erste Kind, das durch die In-vitro-Fertilisation (IVF) entstand (Steptoe und Edwards 1978).
In Deutschland gelang es 1981 in Erlangen der Arbeitsgruppe von Trotnow, dass das erste Kind nach künstlicher Befruchtung durch IVF geboren wurde.
Mitte der 1990er Jahre gelang ein weiterer Durchbruchung in der Reprudktionsmedizin: 1992 publizierten Gianpierro Palermo et al. die ersten Ergebnisse über erfolgreiche Fertilisationen und Schwangerschaften durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) (Palermo et al. 1992). Die ICSI kann bei schwerer männlicher Subfertiltät angewendet werden (Würfel 2007). Ein einzelnes Spermium wird direkt in die Eizelle eingebracht.
Bis 2006 wurden weltweit schätzungsweise 3 Millionen Kinder mit Hilfe der assistierten Reproduktion geboren (International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) 2006).

Die epidemiologische Zusammenfassung und Aufarbeitung der assistierten Reproduktion erfolgt in Deutschland durch das Deutsche IVF Register.

1.3.1 Verfahren der Reproduktionsmedizin

Die Reproduktionsmedizin ist ein interdisziplinäres Fach, das sich mit Diagnostik, Therapie und Forschung menschlicher Fortpflanzung befasst.
Die Reproduktionsmedizin bedarf der interdisziplinären Zusammenarbeit von Gynäkologie, Andrologie, Urologie, Endokrinologie, Genetik und Psychologie.

Die allgemeine Diagnostik beinhaltet bei der Frau die Untersuchung der inneren und äußeren Genitale, Beurteilung der Zyklus, basale Hormonanalyse, Screening auf genitale Infektionen und gegebenenfalls weiterführende Diagnostik wie z.B. Tubendurchgängigkeitsprüfung (z.B. Laparaskopie mit Chromopertubation).
Die männliche Diagnostik der Subfertilität umfasst u. a. klinische Untersuchungen, Ejakulatanalysen, Hormonanaylsen und molekulargenetische Untersuchungen (Färber 2001, Van Voorhis 2007).

Da das Verständnis über In-vitro-Fertilisation (IVF) und Intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) für diese Arbeit wichtig sind, werden diese beiden Techniken im Folgenden erläutert.

1.3.2 In-vitro-Fertilisation

Als Indikation für die IVF gelten bestimmte Formen der Steriität bei denen anderen Behandlungsmethoden versagt haben oder aussuchtslos sind. Dazu zählen der „tubare Faktor“ (z.B. Zustand nach Tubenamputation, nicht mikrochirurgisch behandelbarer Tubenverschluss, Endometriose), Formen der leichteren andrologischen Subfertilität und, wenn andere Therapiemaßnahmen ausgeschöpft wurden, die idiopathische Sterilität (Strowitzki 2000).

1.3.2.1 Ovarstimulation

Durch eine kontrollierte ovarielle Überstimulation muss eine genügende Anzahl von reifen Oozyten zu gewinnen. Die Eizellentnahme im spontanen Zyklus spielt heutzutage, wegen der geringeren Chance des Auffindens einer Eizelle, nur noch eine untergeordnete Rolle. (Just und Obruca 2002).

Bei der ovariellen Stimulation wird mit Gonadotropinen (follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH)) gearbeitet (Van Voorhis 2007).
Seit einiger Zeit werden auch gentechnisch hergestellte Hormone benutzt (z.B. recombinantes FSH (rFSH)). Es wird diskutiert, ob sich verschiedene Stimulationsstrategien bezüglich der klinischen Schwangerschaftsrate unterscheiden (Verberg et al. 2009) oder ob nicht (Strehler et al. 2001, Van Wely er al. 2003). Das „ideale“ Stimulationsprotokoll ist bisher noch nicht gefunden worden (Devroey et al. 2009a)
Die Zahl der zur Verfügung stehenden Eizellen, die durch die Stimulation gebildet werden, beträgt, abhängig von der ovariellen Antwort und der Stimulation, ca. 8 Eizellen (Sonntag et al. 2006, Cai et al. 2007).

1.3.2.2 Ovulationsinduktion und Follikelpunktion

Die Ovulationsinduktion wird durch Injektion von ca. 5000 bis 10000 IU (internationale Einheiten) HCG (human chorinic gonadotropine) eingeleitet (Just und Obruca 2002).
Etwa 36 bis 38 Stunden nach Applikation werden mittels sonographisch gesteuerter transvaginaler Biopsie die Oozyten gewonnen. Die Anästhesie der Patientin erfolgt mit Sedierung und Analgesie oder in Vollnarkose. Die einzelnen Follikel werden punktiert und die Follikelflüssigkeit wird zusammen mit den Eizellen abgesaugt.

Die einfache und schnelle Durchführbarkeit in ambulanter oder teilstationärer Behandlung, die hohe Ausbeute an Eizellen und die relativ geringe Schmerz-

haftigkeit sind Vorteile der sonographisch gesteuerten transvaginalen Follikelpunktion (Schoolcarft 2001).

1.3.2.3 Kultur

Anschließend werden die Eizellen aus dem Follikelpunktat entnommen, der Reifegrad beurteilt und in speziellen Nährmedien kultiviert. Die Eizellen liegen im Cumulus Oocyte Komplex, Eizelle mit Zona pellucida und Corona radiata, vor. Die Kultur ist sehr anfällig gegenüber ph-, Osmolarität und Temperaturschwankungen. Es gibt verschiedene Kulturmedien z.B. bestehd aus Elektrolytlösungen mit Glukose, Laktat und Pyruvat (Gardner et al. 2003). Komplexe, sequentielle Medien scheinen die Erfolge einer IVF zu verbessern (Ludiwg 2004). Da sehr viele verschiedene Kulturmedien bei der ART eingesetzt werden, ist eine Standardisierung, zum Vergleich der Kulturmedien, erforderlich (Devroey et al. 2009b)

1.3.2.4 Spermiengewinnung

Das Ejakulat, das durch Masturbation gewonnen wird, ist empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen und muss zeitnah verarbeitet werden.
Darauf erfolgen die Analyse des Ejakulats (ph-Wert, Volumen, Farbe) und die mikroskopische Untersuchung der Spermienqualität. Anhand von Konzentration, Motilität und Morphologie wird in Oligoastenoteratozoospermie (OAT) Grad I, II und III eingetielt (Steck 2001). Anschließend werden die Spermien aufbereitet (Präparation); Ziel dieser Aufbereitung ist die Selektion von progressiv beweglichen Spermien, die eine normale Morphologie haben (Ricci 2009).

1.3.2.5 Insemination

Nach der Praeinkubationszeit werden im Mittel 100 000 Spermien/ml in das Kulturmedium, das die Eizelle enthält, gegeben. Die tatsächliche Anzahl der inseminierten Spermien hängt von dem Volumen des Kulturmediums ab. Bei eingeschränkter Spermienqualität werden mehr Spermien inseminiert (Steck 2001).

1.3.2.6 Embryonenkultur

Die inseminierten Oozyten werden in einem Wärmeschrank bei 37° C bei 5% CO_2 Atmosphäre inkubiert. Die befruchteten Eizellen sind empfindlich gegen äußere Einflüsse wie Schwankungen der Temperatur, der Osmolarität oder des ph-Werts. Innerhalb weniger Stunden penetrieren die Spermien die Eizelle (Tesarik und Mendoza 1996).

1.3.2.7 Fertilisation

Nach ca. 20 Stunden werden die Eizellen auf Befruchtung überprüft. Hierzu müssen Zellen des Cumulus oophorius und der Corono radiata entfernt werden, um die Vorkerne (Pronuklei) beurteilen zu können. Die Zygoten gelten als fertilisiert, wenn sie zwei Vorkerne haben (Rosenbusch et al. 2001).
Es werden nur Zygoten mit zwei Vorkernen und zwei Polkörperchen für Embryonentransfer oder Kryokonservierung verwendet.

1.3.2.8 Embryonentransfer

Die Embryonen werden zwischen 2 und 6 Tagen kultiviert. Mittels eines flexiblen, atraumatischen Einmalkatheters werden die Embryonen in den Uterus überführt (Schoolcarft et al. 2001).

Die Anzahl der transferierten Embryonen hat einen Einfluss auf den Erfolg der IVF. Die klinische Schwangerschaftsrate beträgt, abhängig von weiteren Faktoren wie z.B. mütterliches Alter, nach Transfer von einem Embryo ca. 15%, nach Transfer von zwei Embryonen ca. 33% und nach Transfer von drei Embryonen ca. 29% (DIR 2006).
Die Ergebnisse anderer Studien belegen, dass der Unterschied zwischen dem Transfer von einem Embryo im Vergleich zu dem Transfer von zwei Embryos sich nicht stark auf die Geburtsrate auswirkt. Die erhöhte Geminigarvidität nach Transfer von zwei Embryonen wird jedoch durch den Transfer von nur einem Embryo verringert (Tiitinen et al. 2003, Thurin et al. 2004).

1.3.3 intrazytoplasmatische Spermieninjektion

Die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) wurde erstmalig 1992 erfolgreich durchgeführt (Palermo et al. 1992). Damit wurde ein neuer Weg eröffnet, mit dem man Paaren helfen wollte, für die es vorher, z.B. wegen schwerer männlicher Subfertilität oder Probleme bei der Fertilisierung, keine realistischen Chancen gab.

Die ICSI ist indiziert:

- bei der Behandlung von schwerer männlicher Subfertilität
- zur Verhinderung des Fertilisationsversagens nach IVF (Ludwig et al. 2005, Strowitzki 2000)

Die Ovarstimulation und die Eizellentnahme erfolgen genauso wie bei der IVF-Behandlung (Devroey und Van Steirteghem 2004).

1.3.3.1 Spermieninjektion

Die Spermieninjektion wird an einem ruhigen, luftzug- und erschütterungsfreien Arbeitsplatz ausgeführt.
Am beheizbaren Arbeitsplatz befinden sich Mikrosope, Mikromanipulatoren, Mikroinjektoren mit Halte- und Injektionskapillaren.

Im Unterschied zur konventionellen IVF, wird bei der ICSI die Oozyte denudiert: die Eizelle wird von umgebenden Cumuluszellen befreit. Die Entfernung wird sowohl enzymatisch (mittels verdünnter Hyaluronidase) als auch durch mechanische Manipulation (durch vorsichtiges Pipettieren) vorgenommen. Die Entfernung der Zellen ist einerseits Voraussetzung für die Spermieninjektion anderseits für die bessere Beurteilung der Reife der Eizelle nötig. Mittels einer Injektionspipette wird ein einziges Spermatozoon, mit dem Schwanzteil zuerst, aspiriert. Die Pipette wird durch die Zona pellucida und die Oozytenmembran in das Zytoplasma eingestochen und das Spermatozoon wird dort, mit genügend Abstand vom ersten Polarkörper, injiziert (Devroey und Van Steirteghem 2004).



Abbildung. 1; Intrazytoplasmatische Spermieninjetion: Die Injektionskapillare durchdringt die Zona pellucida und drückt die Ooplasmamembran ein. Das Polkörperchen, der mit der Haltekapillare fixierten Eizelle, ist bei 12 Uhr gelegen, das Spermium in der Injektionskapillare ist sichtbar (Bild: http://www.endokrinologikum.com/upload/images/CMSEditor/image/icsi_2.jpg)

1.3.3.2 Fertilisation und Embryonentransfer

Der Befruchtungserfolg kann nach 16 bis 18 Stunden überprüft werden. Als Befruchtungszeichen dient der mikroskopische Nachweis der Pronuklei.
Der Embryonentransfer verläuft ebenso wie bei der IVF.

1.4 Bedeutung des Folsäuremetabolismus in der Reproduktion

Es gibt zahlreiche Berichte darüber, dass der Folsäurestoffwechsel und Stoffwechselprodukte dieses Metabolismus einen Einfluss sowohl auf extrakorporale Befruchtung wie auf Schwangerschaft in Bezug auf Fertilisation, klinische Schwangerschaftsrate oder Abort haben (Azem et al. 2004, Grandone et al 2004, Qublan et al. 2006). Im folgenden Abschnitt werden einige Aspekte über Folsäure und den Folsäuremetabolismus im menschlichen Körper dargelegt.

1.4.1 Folsäure

Der Name „Folsäure“ leitet sich von dem Lateinischen Wort Blatt (*folium)* ab; die erstmalige Isolation gelang aus ca. vier Tonnen Spinatblätter. Folsäure gehört zu den wasserlöslichen B-Vitaminen und wird auch als Pteroylmonoglutaminsäure bezeichnet. Es existieren verschiedene Folsäureverbindungen im menschlichen Körper.
Folsäure hat essentielle Aufgaben im Aminosäure- und Proteinstoffwechsel. Ihre biologisch aktive Form, die Tetrahydrofolsäure (THF oder Tetrahydrofolat), dient als Coenzym für die Übertragung von C_1-Kohlenstoffatomen (Koletzko und Pietrzik 2004).

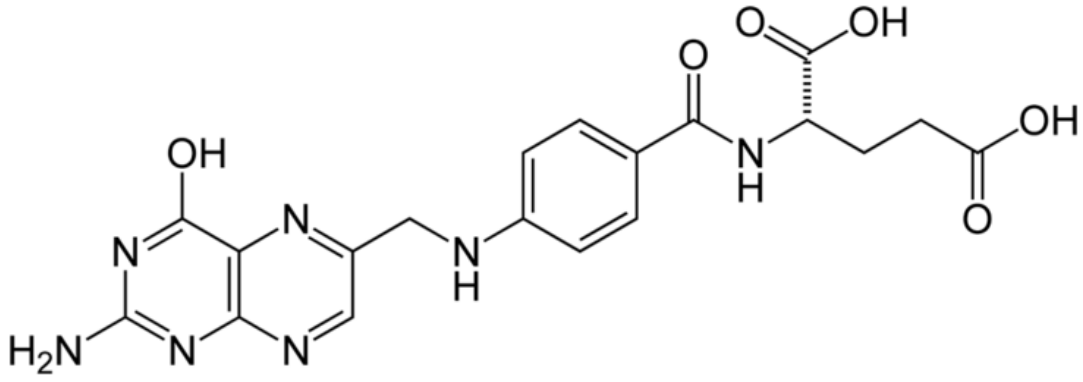

Abbildung 2; Folsäure, atomarer Aufbau (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/43/Folic-acid-2D-skeletal.png).

Diese Kohlenstoffatome werden zur Synthese von Aminosäuren (Purine und Pyrimidine) benötigt; somit ist Folsäure für die RNS-, DNS-Synthese, sowie für die Zellteilung und Zellneubildung essentiell.

Aus diesen Funktionen wird verständlich, dass ein normal funktionierender Folsäurestoffwechsel in der Embryogenese von großer Bedeutung ist (Altmae et al. 2009).
Ein Mangel an Folsäure hat weit reichende Folgen, beginnend mit Problemen bei der Befruchtung der Eizelle und dem Entstehen von Leben bis zu Ateriosklerose oder Thromboembolien, die sich im hohen Alter abspielen.
Es wird diskutiert, ob der Folsäuremangel an sich, oder die Anreicherung von Homocystein zu den verschiedenen Erkrankungen und Fehlbildungen führen (Forges et al. 2007).

1.4.2 Homocystein

Eine besonders wichtige Aufgabe hat die THF im Methioninstoffwechsel. Methionin gibt, als Methylgruppendonator, die Methylgruppe auf verschiedenste intrazelluläre Akzeptoren ab. Homocystein ist ein Abbauprodukt dieses Methioninstoffwechsels, welches entsteht, wenn die Reduktion stattfindet.
Homocystein kann danach entweder regeneriert oder abgebaut werden.

Die Regeneration zu Methionin erfolgt in der Leber über den Betainweg; in den meisten anderen Geweben erfolgt die Regenerierung über den Tetrahydrofolat-stoffwechselweg: Dafür gibt 5-Metyl-tetrahydrofolat seine Methylgruppe ab und wird zu Tetrahydrofolat reduziert.
Tetrahydrofolat wird wiederum über 5,10-Methylen-tetrahydrofolat zu 5-Metyl-tetrahydrofolat regeneriert und kann Homocystein zu Methionin regenerieren.

Für diesen Stoffwechselweg wird, neben anderen Enzymen und Coenzymen, die Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) benötigt (Zetterberg 2004).

Wenn diese Regeneration nur ungenügend gelingt, reichert sich Homocystein im Körper an; diese Anreicherung bezeichnet man als Homocysteinämie.
Homocysteinämie wird seit langem als ein Faktor für die Entstehung von verschiedensten Erkrankungen gesehen.
Die Homocystein induzierte zellulären Dysfunktion wird durch erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen, veränderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), Induktion von oxidativen Stress, Aktivierung von Apoptose und ineffektiver Methylierung verursacht (Forges et al. 2007).

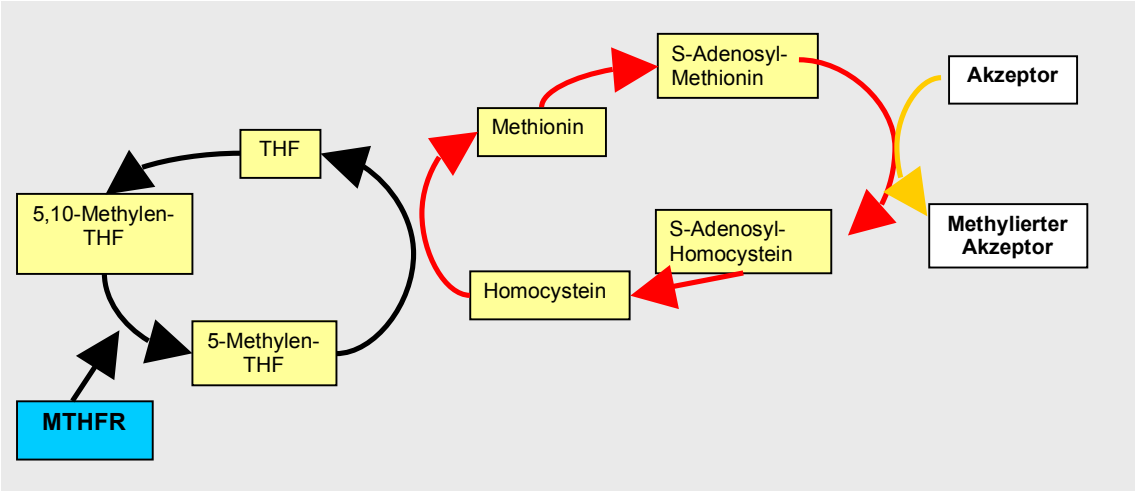

Abbildung 3; Zusammenhang zwischen Methionin und Folsäurestoffwechsel. Vereinfachte Darstellung. MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase), THF (Tetrahydrofolat) (nach Zetterberg 2004).

Hohe Homocystein-Serumspiegel wurden als ein unabhängiger Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Arteriosklerose identifiziert (Welch et al. 1998,

Fritscher 2003). Gleichzeitig wird die Homocysteinämie als ein anerkannter Risikofaktor für zerebrale Erkrankungen, sowie für die Entstehung von venösen Thrombosen gesehen (Malinow et al. 1999, Hagen et al. 2000).
In der Framingham Heart Study wurde eine Assosation zwischen geringem Folsäurespiegeln, erhöhter Homocystein-konzentration im Plasma und der Entstehung von Carotisstenosen beschrieben (Selhub et al. 1995).

Wie der genaue Pathomechanismus der Schädigung abläuft, ist bisher nicht geklärt. Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Ursache der Homocysteininduzierten Probleme zusätzlich in einer vermehrten Plättchenaggregation liegt, die durch die endothelschädigende Wirkung von Homocystein verursacht wird (Steegers-Theunissen et al. 2004, Welch et al. 2006).
Homocystein könnte diese Schäden verursachen indem es oxidative Prozesse entstehen lässt oder fördert (Ebisch et al.2006).
Über weitere Probleme, die mit der Entstehung oxidativen Prozesse einhergehen, wird ab 1.4.4 berichtet.

Die Ursache für die Anreicherung von Homocystein im Körper ist multifaktoriell; es gibt jedoch zwei Hauptursachen, die identifiziert wurden:

1. Folsäuremangel bzw. Vitamin B12 Mangel
2. Polymorphismen in Genen, die Enzyme oder Transportproteine kodieren, die für den Homocysteinmetabolismus wichtig sind (Nelen et al. 2000).

1.4.3 Methylentetrahydofolatreduktase

Wie oben bereits erwähnt, wird Homocystein zu Methionin regeneriert. Diese Remythelierung wird von der 5-, 10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR), die als Coenzym Folsäure und Vitamin B12 benötigt, geleistet.
Es wurden mehrere Mutationen entdeckt, die in diesem Stoffwechselweg involviert sind. 1995 wurde von Goyette et al. die autosomal rezessive Mutation C677T im MTHFR-Gen identifiziert, die zu einer thermolabilen und weniger aktiven Variante

des Enzyms führt. Die Mutation ist durch den Austausch von Cytosin durch Thymin charakterisiert (677C→ T) (Tamura et al. 2006).

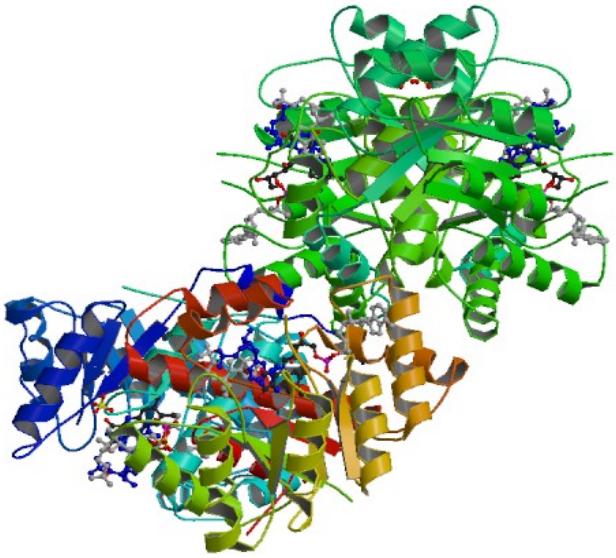

Abbildung 4; MTHFR- (Methylentetrahydrofolatreduktase-) Enzym ohne Mutation. Dreidimensionale Darstellung (http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1ZPT)

Die Restaktivität bei einer homozygoten Mutation (TT) der MTHFR wird mit 30% angegeben, die Restaktivität bei einer heterozygoten Mutation (CT) liegt bei 65% (Bezold 2001). Durch die verringerte Aktivität wird im Körper vermehrt Homocystein angereichert und es kann zu einer leichten Homocysteinämie kommen.

Die Häufigkeit dieser Mutation ist mit bis zu 10% homozygoten und ca. 40% heterozygoten Trägern beträchtlich und spielt somit eine wichtige Rolle im Rahmen der Homocysteinämie (Hertfelder et al.2004).

Die Prävalenz der Mutation scheint jedoch erheblich von ethnischen Faktoren beeinflusst zu sein (Forges et al. 2007). Bei Afrikaner liegt die Prävalenz der heterozygoten C677T Mutation zwischen 6 und 11% (Singh et al. 2005).

1.4.4 Oxidativer Stress

Homocystein scheint eine Rolle in der Entstehung von oxidativen Prozessen zu spielen.

In einem gesunden Körper befinden sich Oxidantien (ROS= reactive oxygen species) und Antioxidantien in Gleichgewicht. Wenn dieses Gleichgewicht in Richtung der Oxidantien gestört wird, entsteht oxidativer Stress (Agarwal et al. 2005, Venkatesh et al 2009).
Oxidativer Stress entsteht also durch ein Übermaß an freien Radikalen, die nicht mehr durch Antioxidantien abgefangen werden können.

Oxidativer Stress kann die Reproduktionsfähigkeit des Mannes beeinträchtigen (Wong et al. 2002). Freie Radikale, wie H_2O_2, werden aber im Rahmen der Reproduktion benötigt; sie beeinflussen viele physiologische Prozesse.
So produzieren Spermatozoen Oxidantien, die sie zur Anheftung an die Oozyte oder für die Akrosomenreaktion benötigen. Allerdings ist eine überhöhte Produktion von ROS schädlich für die Spermatozoen und kann zu DNS Brüchen und Membranschäden führen (Tunc und Tremellen 2009). Hohe Konzentrationen von ROS sind ein unabhängiger Parameter für männliche Subfertilität (Agarwal et al. 2006). Die vielfältigen Ursachen und Auswirkungen werden aktuell in der Literatur diskutiert (Tremellen 2008).

Über die physiologischen Rollen von ROS in der weiblichen Eizelle ist wenig bekannt (Rakesh et al. 2004). Man vermutet, dass die Eizelle ROS für Eizellwachstum und für die Selektion des Primärfollikels benötigt. Aber auch in der Oozyte kann eine überhöhte Produktion von freien Radikalen zu Schäden führen. Frauen, bei denen wegen ungewollter Kinderlosigkeit eine IVF durchgeführt wird, weisen signifikant höhere ROS-Spiegel auf als Frauen, die spontan schwanger werden (Sharma et al. 2004).

Homocystein gilt als Oxidant, während Folsäure ein Antioxidant ist.
Man vermutet, dass Homocystein einerseits durch die Induktion von oxidativen Stress zu Arteriosklerose führen kann (Welch et al. 2006), anderseits werden die auto-oxidativen Eigenschaften von Homocystein selbst mit der Entstehung von Arteriosklerose in Verbindung gebracht (Welch et al.1998).
Beweise, dass oxidativer Stress durch Hyperhomocysteinämie auftreten kann, wurden in Tierversuchen belegt (Lentz 2005).

Auch Steeger-Theunissen vermutet, dass Homocystein ROS, z.B. H_2O_2, bildet und dadurch Endothelschäden verursacht (Steegers-Theunissen et al. 2004).

Mann kann die Entstehung von DNS Brüchen über die Homocystein vermittelte Bildung von ROS erklären (Singh et al. 2004).

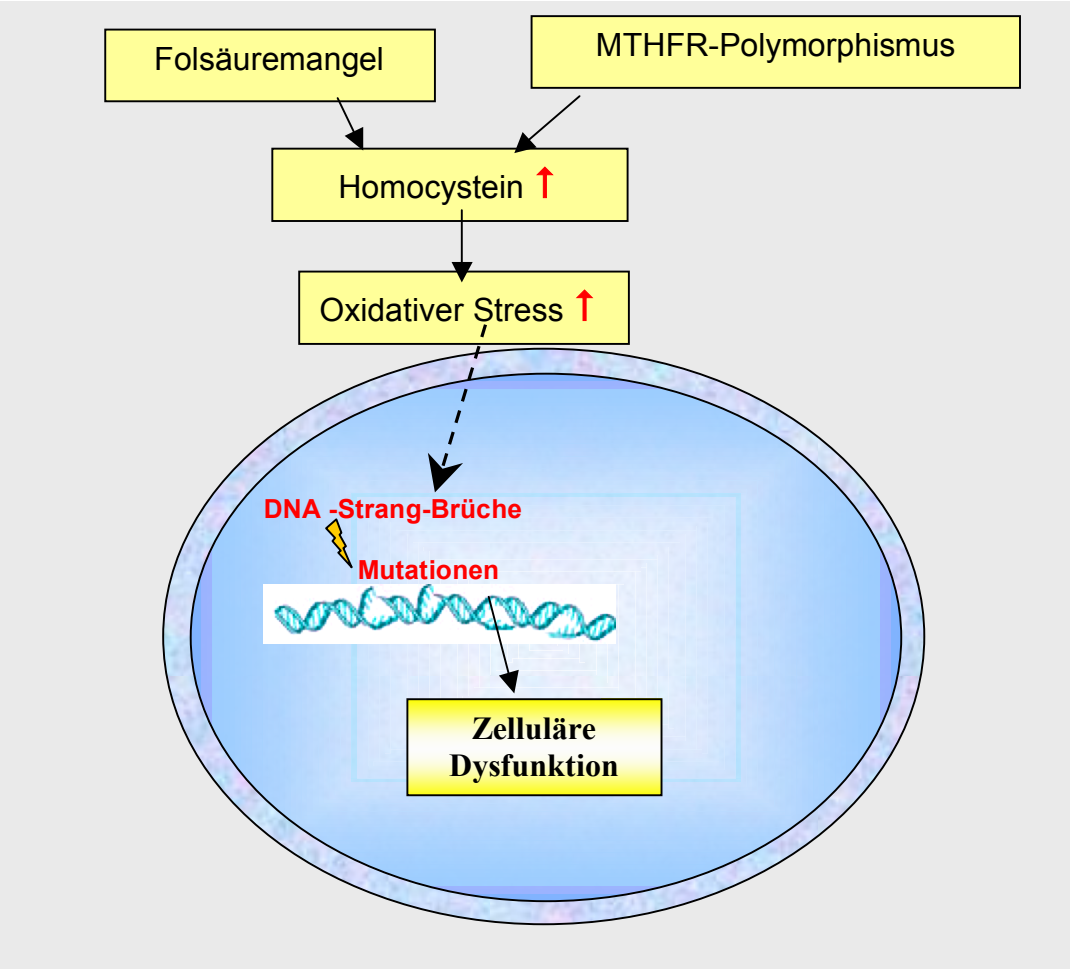

Abbildung 5; Mechanismus des Homocystein induzierten oxidativen Stresses. MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase), DNA (Desoxyribonukleinsäure)

Durch die MTHFR-Mutation wird Homocystein im Körper angereichert. Diese Anreicherung kann das Entstehen von ROS fördern; somit spielt der MTHFR-Polymorphismus eine Rolle in der Entstehung von oxidativen Stress und führt dadurch zu zellulärer Dysfunktion (Agarwal et al. 2005, Forges et al. 2007).

1.5 Fragestellung

Trotz medizinischer Fortschritte ist die Erfolgsrate bezüglich der klinischen Schwangerschaftsrate und Geburt bei der assistierten Reproduktion gering. In der IVF-Behandlung kommt es bei ca. 30% der Embryonentransfers zu einer klinischen Schwangerschaft.
In der ICSI-Behandlung sind die Daten ähnlich: Es kommt bei ca. 28% der Transfers zu einer klinischen Schwangerschaft (DIR 2006).

Die C677T-Mutation im Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen (MTHFR-Gen) wird in seiner Auswirkung auf die Konzeption und auf das Wachstum des Embryos diskutiert.

Diese Arbeit behandelt folgende Fragen:

Wie häufig ist die heterozygote und homozygote MTHFR- C677T-Mutation im Kollektiv der sterilen Patienten?
Wie häufig ist sie bei den Frauen, wie häufig bei den Männern?

Wie häufig ist die MTHFR-Mutation (hetero- und homozygot) in der IVF-Gruppe, wie häufig ist sie in der ICSI-Gruppe vorhanden?

Unterscheiden sich die Mutationshäufigkeiten in den beiden Gruppen voneinander?

Gibt es einen Unterschied in der Mutationshäufigkeit in diesem Kollektiv im Vergleich zu der in der Literatur angegebenen Normalverteilung?

Haben Paare, bei denen ein oder sogar beide Partner eine Mutation im MTHFR-Gen haben, eine geringere Chance nach IVF oder ICSI klinisch schwanger zu werden?

Haben Paare, bei denen ein oder sogar beide Partner eine Mutation im MTHFR-Gen haben, eine geringere Chance nach IVF oder ICSI ein Kind zu bekommen?

2 MATERIAL UND METHODEN

In dieser Arbeit wurden retrospektiv 531 Paare mit unerfüllten Kinderwunsch untersucht, die sich zwischen Januar 1998 und Dezember 2005 im Endokrinologikum Ulm Praxisklinik Frauenstraße Prof. Dr. med. K. Sterzik und Dr. med. E. Strehler, einfanden. Es wurde bei den Paaren, nach ensprechenden Untersuchungen, die Indikation zur extrakorporalen Befruchtung gestellt. Im Rahmen der Routine-Sterilitätsdiagnostik wurde auch das Vorliegen der C677T-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)-Mutation untersucht. Es soll mit dieser Arbeit aufgeklärt werden, ob die Mutation einen Einfluss auf die Schwangerschafts- und Geburtsraten nach extrakorporaler Befruchtung (In-vitro-Fertilisation (IVF) und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI)) hat und auf welche Weise dieser Einfluss zustande kommen kann.

Es wurden bei den 531 Paaren insgesamt 966 Behandlungszyklen durchgeführt (IVF und/oder ICSI).

Alle Patienten wurden im Rahmen der Routinediagnostik auf die Existenz der C677T-Mutation im MTHFR-Gen untersucht.
Der Mutationsnachweis wurde von der Praxis Priv.-Doz. Dr. med. G. Bezold mittels gängigem Schemas von PCR und Restriktionsenzym (HinfI (=Restriktionsenzym aus Haemophilus influenza)) durchgeführt.
Dazu wurde aus den Blutproben der Probanden DNS isoliert. Im Reagenzglas wurde mittels bestimmter Startermoleküle (Primer) die DNS amplifiziert.
Die vervielfältigten DNS-Stücke wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym inkubiert. Restriktionsenzyme sind Eiweiße, die DNS nur bei Vorliegen bestimmter Basenfolgen schneiden. In diesem Fall zerschneidet das Enzym die DNS nur, wenn die C677T-Mutation im MTHFR-Gen vorliegt.
Danach wurden die DNS-Produkte in 5%-igen Agarose-Gel fixiert und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die geschnittenen Bandenpaare wurden unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Das nicht mutierte Allel war 184-bp (Basenpaare) lang, während das mutierte Allel 123-bp lang war (Bezold 2001).

Bis Dezember 2005 wurde dokumentiert, ob bei den erfassten Paaren im Rahmen der IVF-/ ICSI-Behandlung eine klinische Schwangerschaft diagnostiziert wurde und ob es zur Geburt kam.
Die klinische Schwangerschaft wurde durch den sonographischen Nachweis der fetalen Herzaktion in der 7. Schwangerschaftswoche bestätigt.
Das Patientenkollektiv wurde nach der Methode der extrakorporalen Befruchtung (IVF oder ICSI) eingeteilt.
Die Endpunkte „klinische Schwangerschaft“ und „Geburt“ der Behandlungszyklen IVF und ICSI wurden gegenübergestellt. Die prozentuale Mutationsausprägung (normal/ heterozygot/ homozygot) wurde aufgelistet.
Mittels Chi²-Test wurde ein eventueller statistischer Unterschied in den beiden Gruppen errechnet.

Anschließend wurden die Paare nach der C677T-Mutation im MTHFR-Gen sortiert: Jedes Paar wurde in eine von neun möglichen Gruppen eingeteilt, die sich aus der Kombination des Genstatus von beiden Partnern ergaben (z.B.: Frau MTHFR homozygot, Mann MTHFR heterozygot). Es ergaben sich folgende Gruppen:

- Frau heterozygot & Mann heterozygot
- Frau heterozygot & Mann homozygot
- Frau heterozygot & Mann normal
- Frau homozygot & Mann heterozygot
- Frau homozygot & Mann homozygot
- Frau homozygot & Mann normal
- Frau normal & Mann heterozygot
- Frau normal & Mann homozygot
- Frau normal & Mann normal

Neben der allgemeinen deskriptiven Statistik wurde mittels einfach logistischer Regression errechnet, ob Paare bei denen ein Partner oder auch beide Partner eine Mutation im MTHFR-Gen haben, eine geringere Wahrscheinlichkeit haben
a) nach extrakorporaler Befruchtung klinisch schwanger zu sein und

b) nach extrakorporaler Befruchtung das Kind erfolgreich zu entbinden.
Die logistische Regression wurde mit Hilfe des Instituts für Biometrie der Universität Ulm berechnet (Leitung: Prof Dr. R. Muche; Betreuer: B. Einsiedler und K. Hohl).

Die einfache logistische Regression wurde gewählt, da der Einfluss der erklärenden Variablen „männliche MTHFR-Mutation“ und „weibliche MTHFR-Mutation“ untersucht werden sollte und die Zielvariable „schwanger/ nicht schwanger“ ein binäres Messniveau besitzt. Da in der medizinischen Forschung oftmals binäre Zielvariablen auftreten, wird die logistische Regression in der Praxis häufig angewendet (Bender et al. 2002).

Es wurden jeweils im IVF-/ sowie im ICSI-Kollektiv Untersuchungen auf folgende Parameter durchgeführt:

- weiblicher MTHFR-Genstatus vs. klinische Schwangerschaft
- männlicher MTHFR-Genstatus vs. klinische Schwangerschaft
- Paar-MTHFR-Genkonstellation vs. klinische Schwangerschaft

- weiblicher MTHFR-Genstatus vs. Geburt
- männlicher MTHFR-Genstatus vs. Geburt
- Paar-MTHFR-Genkonstellation vs. Geburt

Das Konfidenzintervall wurde für alle Risikoabschätzungen mit 95% berechnet. Eine statistische Signifikanz wurde für einen p–Wert kleiner als 5% festgelegt.
Das Odds Ratio, das als das Verhältnis der Chancen zwischen exponierten (in dieser Arbeit MTHFR-mutierten) und nicht exponierten Personen definiert ist, wurde als Effektmaß verwendet.
Das Odds Ratio kann als Maß für die Stärke des Zusammenhanges gesehen werden (Bender et al. 2002).

Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns wurden alle Tests explorativ durchgeführt.

Insgesamt wurden folgende Daten dokumentiert:

- Patientennummer
- Patientenname
- Geburtsdatum
- MTHFR-Mutation
- Art der extrakorporalen Befruchtung
- Anzahl transferierter Embryonen
- Alter bei Befruchtung
- klinische Schwangerschaft
- Geburt

3 ERGEBNISSE

Die Frauen waren zwischen 19 und 42 Jahren alt (33,17 ± 4,64), das Alter der Männer betrug zwischen 24 und 66 Jahren (36,71 ± 4,86). Das Durchschnittsalter unterschied sich in der IVF- und ICSI-Gruppe nicht.

Es wurden insgesamt 966 Behandlungszyklen bei 531 Paaren durchgeführt.
Bei 495 Behandlungszyklen (51,2%) wurde eine IVF durchgeführt; bei 428 Zyklen (44,3%) wurde eine ICSI als Therapie durchgeführt.

Bei 43 (4,5%) Behandlungszyklen konnte aufgrund unvollständiger Daten nicht beurteilt werden, welche Art von Befruchtung durchgeführt wurde. Diese Daten wurden bei der statistischen Auswertung nicht mit aufgenommen.

3.1 Schwangerschaftsraten

Bei den 966 Behandlungszyklen kam es insgesamt zu 368 (38,1%) klinischen Schwangerschaften. Davon wurden 230 (62,5%) Geburten dokumentiert.

Im IVF-Kollektiv endeten von 495 erfassten Zyklen 196 (39,6%) in einer klinischen Schwangerschaft und davon 122 (62,2%) in einer Geburt.
Im ICSI Kollektiv wurden von 428 erfassten Zyklen 159 (37,1%) klinische Schwangerschaften und davon 102 (64,1%) Geburten dokumentiert (Abbildung 6).

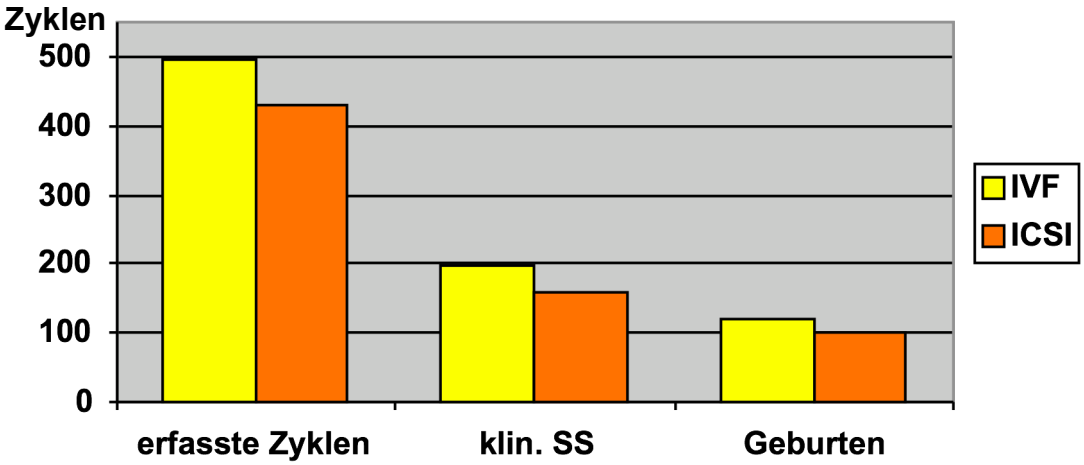

Abbildung 6; Erfasste Zyklen, klinische Schwangerschaften (klin. SS) und Geburten in der In-vitro-Fertilisations- (IVF-) und Intrazytoplasmatische Sperminjektions- (ICSI-) Gruppe.

3.2 Mutationen

Bei den 531 Paaren, die in dieser Studie erfasst wurden, waren von den Frauen 217 heterozygot und 65 homozygot für die Mutation C677T im MTHFR-Gen. 249 Frauen hatten keine Mutation im MTHFR-Gen.
Bei den Männern waren 225 heterozygot und 52 homozygot für die Mutation C677T im MTHFR-Gen. 254 Männer hatten keine Mutation im MTHFR-Gen (Tabelle 1).

Tabelle 1; Relative Häufigkeiten der C677T-Mutation im MTHFR-Gen (Methylentetrahydrofolatreduktase) in dem Gesamtkollektiv; Wildtyp CC (normal bzw. nicht mutiert), heterozygote CT- und homozygote TT-Mutation, Frauen (grün) und Männer (blau).

	wildtyp CC	***heterozygot CT***	***homozygpt TT***
Frauen ♀	46,9 %	40,9 %	12,2 %
Männer ♂	47,8 %	42,4 %	9,8 %

3.2.1 Mutationen in der IVF-Gruppe

Bei der Mutationsanalyse der MTHFR-Mutation im IVF-Kollektiv (294 Paare) stellte sich bei den Frauen heraus, dass 137 keine Mutation, 121 eine heterozygote Mutation und 36 eine homozygote Mutation C677T im MTHFR-Gen hatten. Bei den Männern lag bei 159 keine, bei 110 eine heterozygote und bei 25 eine homozygote C677T-Mutation im MTHFR-Gen vor.

Tabelle 2; MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase)-C677T-Mutationsverteilung in der IVF (In-vitro-Fertilisation) Gruppe; Frauen (grün) und Männer (blau).

	IVF-Kollektiv	
	Frauen ♀	Männer ♂
normal	46,6%	54,1%
heterozygot	41,2%	37,4%
homozygot	12,2%	8,5%
gesamt	*100%*	*100%*

3.2.2 Mutationen in der ICSI-Gruppe

Im ICSI-Kollektiv (237 Paare) hatten 112 Frauen keine Mutation, 96 Frauen eine heterozygote Mutation und 29 Frauen eine homozygote C677T Mutation im MTHFR-Gen. 95 Männer hatten im ICSI-Kollektiv keine Mutation, 115 hatten eine heterozygote Mutation und 27 hatten eine homozygote Mutation im MTHFR-Gen.

Tabelle 3; MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase)-C677T-Mutationsverteilung im ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion)- Kollektiv; Frauen (grün) und Männer (blau).

	ICSI-Kollektiv	
	Frauen ♀	Männer ♂
normal	47,3%	40,1%
heterozygot	40,5%	48,5%
homozygot	12,2 %	11,4%
gesamt	*100 %*	*100 %*

3.3 Paarkonstellationen, klinische Schwangerschaftsraten und Geburtsraten

Da diese Arbeit auch Paare miteinander verglich, wurden alle Paare, die an dieser Studie teilnahmen, nach dem MTHFR-Genstatus von Mann und Frau sortiert. Da Mann und Frau jeweils drei unterschiedliche Genkonstellationen (normal, heterozygot oder homozygot) haben können, wurden insgesamt 9 Kategorien dokumentiert. Gleichzeitig wurde der Erfolg der Geburt eines Kindes dokumentiert (Tabelle 4 und 5).

Tabelle 4; Mutationsausprägung der einzelnen Paare im IVF (In-vitro-Fertilisation) -Kollektiv unterteilt nach nicht schwanger, klinisch schwanger und Geburt; ♀(Frauen) und ♀ (Männder), normal (nicht mutierte), hetero (heterozygot mutierte) und homo (homozygot mutierte) Methylentrahydrofolatreduktase.

	IVF-Kollektiv			
Dvdvsdv **Mutations-ausprägung**	**Anzahl Paare**	**nicht schwanger**	**klin. schwanger**	**Geburt**
♀hetero ♂hetero	45 (15,3%)	27 (60%)	18 (40%)	9 (50%)
♀hetero ♂homo	10 (3,4%)	4 (40%)	6 (60%)	3 (50%)
♀hetero ♂normal	66 (22,4%)	37 (56%)	29 (44%)	21 (72%)
♀homo ♂hetero	13 (4,4%)	5 (38%)	8 (51%)	6 (75%)
♀homo ♂homo	4 (1,4%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (100%)
♀homo ♂normal	19 (6,5%)	12 (63%)	7 (36%)	5 (71%)
♀normal ♂hetero	52 (17,7%)	24 (46%)	28 (53%)	20 (71%)
♀normal ♂homo	11 (3,7%)	6 (54%)	5 (45%)	3 (60%)
♀normal ♂normal	74 (25,2%)	23 (31%)	51 (69%)	43 (84%)
gesamt	294 (100%)	141	153	111

Tabelle 5; Mutationsausprägung der einzelnen Paare im ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion) -Kollektiv unterteilt nach nicht schwanger, klinisch schwanger und Geburt; ♀(Frauen) und ♀ (Männder), ♀(Frauen) und ♀ (Männder), normal (nicht mutierte), hetero (heterozygot mutierte) und homo (homozygot mutierte) Methylentrahydrofolatreduktase.

	ICSI Kollektiv			
Mutations-ausprägung	**Anzahl Paare**	**nicht schwanger**	**klin. schwanger**	**Geburt**
♀hetero ♂hetero	41 (17,3%)	18 (44%)	23 (56%)	16 (70%)
♀hetero ♂homo	11 (4,6%)	5 (45%)	6 (54%)	5 (83%)
♀hetero ♂normal	44 (18,6%)	18 (41%)	26 (59%)	16 (61%)
♀homo ♂hetero	8 (3,4%)	5 (62%)	3 (37%)	2 (66%)
♀homo ♂homo	6 (2,5%)	5 (83%)	1 (17%)	0 (0%)
♀homo ♂normal	15 (6,3%)	9 (60%)	6 (40%)	5 (83%)
♀normal ♂hetero	66 (27,8%)	29 (44%)	37 (56%)	29 (74%)
♀normal ♂homo	10 (4,2%)	6 (60%)	4 (40%)	3 (75%)
♀normal ♂normal	36 (15,2%)	12 (33%)	24 (67%)	16 (66%)

3.4 Ergebnisse der logistischen Regressionen

3.4.1 IVF

3.4.1.1 Weiblicher MTHFR-Genstatus und klinische Schwangerschaft

Die Ergebnisse der logistischen Regression ergaben, dass die Chance auf den Nachweis einer klinischen Schwangerschaft nach IVF für Frauen, die keine Mutation im MTHFR-Gen haben, etwa doppelt so hoch ist, wie für Frauen, die eine heterozygote oder homozygote Mutation in diesem Gen haben (p=0.003).

Tabelle 6 Odds Ratio Wahrscheinlichkeiten auf den Nachweis einer klinischem Schwangerschaft nach IVF (In-vitro-Fertilisation) für Frauen (♀) mit der C677T-Mutation im Methylentetrahydro-folatreduktase-Gen (MTHFR) heterozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal (nicht mutiert) und homozygot mutiert im Vergleich zu normal (nicht mutiert); p (Irrtumswahrscheinlichkeit).

p= 0,0036			
Odds Ratio			
Effekt	p (Schätzer)	95%-Konifidenz-intervall	
♀MTHFR heterozygot vs. ♀MTHFR normal	0,554	0,373	0,823
♀MTHFR homozygot vs.♀MTHFR normal	0,487	0,266	0,891

3.4.1.2 Weiblicher MTHFR- Genstatus und Geburt

Die Berechnungen der einfach logistischen Regression deuten darauf hin, dass die Chance auf eine Geburt eines Kindes nach extrakorporaler Befruchtung mittels IVF, für Frauen, die eine heterozygote Mutation im MTHFR-Gen haben, nur ca. halb so hoch ist, wie für Frauen, die keine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben (p=0,025).

Einen derartigen Chancenunterschied war für homozygot C677T mutierte Frauen im Vergleich zu nicht MTHFR-mutierten Frauen statistisch nicht signifikant.

Tabelle 7; Odds Ratio Wahrscheinlichkeiten auf die Geburt eines Kindes nach IVF (In-vitro-Fertilisation) für Frauen (♀) mit der C677T-Mutation im Methylentetrahydro-folatreduktase-Gen (MTHFR) heterozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal (nicht mutiert) und homozygot mutiert im Vergleich zu normal (nicht mutiert); p (Irrtumswahrscheinlichtkeit).

p= 0,0252

Odds Ratio			
Effekt	p (Schätzer)	95%-Konifidenz-intervall	
♀MTHFR heterozygot vs. ♀MTHFR normal	0,539	0,340	0,853
♀MTHFR homozygot vs.♀MTHFR normal	0,653	0,334	1,277

3.4.1.3 Männlicher MTHFR-Genstatus und klinische Schwangerschaft

Ein Chancenunterschied für eine klinische Schwangerschaft im Vergleich zwischen Paaren mit nicht MTHFR mutierten Männern und heteterozygot mutierten Männern oder zwischen Paaren mit nicht MTHFR mutierten Männern und homozygot mutierten Männern wurde mittels der logistischen Regression statistisch nicht nachgewiesen (p=0,366).

3.4.1.4 Männlicher MTHFR-Genstatus und Geburt

Obwohl in der Berechnung der einfachen logistischen Regression mit der Variable männliche MTHFR-Mutation nur ein p-Wert von 0,0674 ergab (und somit die geforderte Signifikanz nicht erreicht wurde), scheint das Ergebnis der Berechnung erwähnenswert:
Die Chance auf die erfolgreiche Geburt eines Kindes nach IVF scheint für Frauen, deren Partner keine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, ca. doppelt (1/0,421) so hoch zu sein, wie für Frauen die einen C677T-homozygot mutierten Partner haben.

Tabelle 8; Odds Ratio Wahrscheinlichkeiten auf die Geburt eines Kindes nach IVF (In-vitro-Fertilisation) für Männer (♂) mit der C677T-Mutation im Methylentetrahydro-folatreduktase-Gen (MTHFR) heterozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal (nicht mutiert) und homozygot mutiert im Vergleich zu normal (nicht mutiert); p (Irrtumswahrscheinlichtkeit).

p= 0,0674

Odds Ratio			
Effekt	p (Schätzer)	95%-Konifidenz-intervall	
♂MTHFR heterozygot vs. ♂MTHFR normal	0,709	0,455	1,104
♂MTHFR homozygot vs.♂MTHFR normal	0,421	0,181	0,978

3.4.1.5 Paar MTHFR-Genkonstellation und klinische Schwangerschaft

Die Berechnungen der logistischen Regression deuten darauf hin, dass die Chance für eine nachweisbare klinische Schwangerschaft nach IVF für Paare, die keine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, deutlich besser (2- bis 5-fach) ist wie für Paare bei denen ein oder auch beide Partner eine heterozygote oder homozygote Mutation haben (p=0,0004).

Tabelle 9; Odds Ratio Wahrscheinlichkeiten für den Nachweis einer klinischen Schwangerschaft nach IVF (In-vitro Fertilisation) für Paare mit der Mutation C677T im MTHFR (Methylentetrahydrofolat-reduktase)-Gen heterozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal und homozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal; Frauen mit heterozygoter Mutation (♀hetero), Frauen mit homozygoter Mutation (♀homo), Männer mit heterozygoter Mutation (♂hetero), Männer mit homozygoter Mutation (♂homo), Paare ohne Mutation (♀normal ♂normal) p (Irrtumswahrscheinlichkeit).

p= 0,0004

Odds Ratio					
Effekt			p (Schätzer)	95%-Konifidenz-intervall	
♀hetero ♂hetero	vs.	♀normal ♂normal	0,407	0,216	0,767
♀hetero ♂homo	vs.	♀normal ♂normal	0,775	0,237	2,534
♀hetero ♂normal	vs.	♀normal ♂normal	0,332	0,194	0,569
♀homo ♂hetero	vs.	♀normal ♂normal	0,775	0,301	1,992
♀homo ♂homo	vs.	♀normal ♂normal	0,097	0,012	0,798
♀homo ♂normal	vs.	♀normal ♂normal	0,217	0,087	0,538
♀normal ♂hetero	vs.	♀normal ♂normal	0,521	0,304	0,891
♀normal ♂homo	vs.	♀normal ♂normal	0,310	0,127	0,756

3.4.1.6 Paar-MTHFR-Genkonstellation und Geburt

Die Ergebnisse der einfachen logistischen Regression der kombinierten Genkonstellationen von Mann und Frau sind in der Tabelle 10 aufgelistet.

Die Chancen für eine Geburt eines Kindes nach IVF ist für Paare, bei denen kein Partner eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen hat, deutlich besser (ca. 2 bis 5 fach), als für Paare bei denen ein oder auch beide Partner eine Mutation im MTHFR-Gen haben.

Tabelle 10; Odds Ratio Wahrscheinlichkeiten für Geburt nach IVF (In-vitro Fertilisation) für Paare mit der Mutation C677T im MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase)-Gen heterozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal und homozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal; Frauen mit heterozygoter Mutation (♀hetero), Frauen mit homozygoter Mutation (♀homo), Männer mit heterozygoter Mutation (♂hetero), Männer mit homozygoter Mutation (♂homo), Paare ohne Mutation (♀normal ♂normal) p (Irrtumswahrscheinlichkeit).

p= 0,0030					
Odds Ratio					
Effekt			p (Schätzer)	95%-Konifidenz-intervall	
♀hetero ♂hetero	vs.	♀normal ♂normal	0,272	0,123	0,601
♀hetero ♂homo	vs.	♀normal ♂normal	0,524	0,135	2,030
♀hetero ♂normal	vs.	♀normal ♂normal	0,393	0,218	0,708
♀homo ♂hetero	vs.	♀normal ♂normal	0,846	0,316	2,269
♀homo ♂homo	vs.	♀normal ♂normal	0,196	0,024	1,619
♀homo ♂normal	vs.	♀normal ♂normal	0,291	0,105	0,806
♀normal ♂hetero	vs.	♀normal ♂normal	0,488	0,271	0,880
♀normal ♂homo	vs.	♀normal ♂normal	0,198	0,054	0,658

3.4.2 ICSI

3.4.2.1 Weiblicher MTHFR-Genstatus und klinische Schwangerschaft

Die Chance auf den Nachweis einer klinischen Schwangerschaft nach ICSI ist für Frauen, die keine Mutation C677T im MTHFR-Gen haben, mehr als doppelt (1:0,401= 2,5-fach) so hoch, wie für Frauen, die eine homozygote Mutation in diesem Gen haben (p=0.043). Ein Chancenunterschied zwischen nicht MTHFR-Gen mutierten Frauen im Vergleich zu heterozygot MTHFR-Gen mutierten Frauen konnte statistisch nicht gezeigt werden.

Tabelle 11; Odds Ratio Wahrscheinlichkeiten auf Geburt eines Kindes nach Intrazytoplasmatischer Spermineninjektion (ICSI) Frauen (♀) mit der C677T-Mutation im Methylentetrahydrofolatreduktase-Gen (MTHFR) heterozygot mutiert im Vergleich zu (vs.) normal (nicht mutiert) und homozygot mutiert im Vergleich zu normal (nicht mutiert); p (Irrtumswahrscheinlichkeit).

p= 0,0432

Odds Ratio			
Effekt	p (Schätzer)	95%-Konifidenz-intervall	
♀MTHFR heterozygot vs. ♀MTHFR normal	0,932	0,614	1,415
♀MTHFR homozygot vs.♀MTHFR normal	0,401	0,195	0,824

3.4.2.2 Weiblicher MTHFR-Genstatus und Geburt

Der p-Wert der Berechnung betrug lediglich 0,1850; die Ergebnisse wurden als nicht signifikant eingestuft.

3.4.2.3 Männlicher MTHFR-Genstatus und klinische Schwangerschaft

Der p-Wert der Berechnung betrug lediglich 0,29; die Ergebnisse wurden als nicht signifikant eingestuft.

3.4.2.4 Männlicher MTHFR-Genstatus und Geburt

Der p-Wert der Berechnung betrug lediglich 0,22; die Ergebnisse wurden als nicht signifikant eingestuft.

3.4.2.5 Paar-MTHFR-Genkonstellation und klinische Schwangerschaft

Der p-Wert der Berechnung betrug lediglich 0,13; die Ergebnisse wurden als nicht signifikant eingestuft.

3.4.2.6 Paar-MTHFR-Genkonstellation und Geburt

Der p-Wert der Berechnung betrug lediglich 0,95; die Ergebnisse wurden als nicht signifikant eingestuft.

4 DISKUSSION

4.1 Komplikationen durch Folsäuremangel, Homocystein und der MTHFR-Mutationen C677T bei extrakorporaler Befruchtung

In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass sowohl Frauen, bei denen es zu Problemen in der Schwangerschaft kam, wie auch bei Männern, die Fertilitätsprobleme hatten, signifikant mehr Mutationen im MTHFR-Gen haben (Singh et al 2005, Bezold 2001, Haggarty et al. 2006, Lee et al. 2006, Altmae et al. 2009).

Im Nachfolgenden werden einzelne Aspekte der Folgen der MTHFR-Mutation C677T beschreiben.

4.1.1 Schwangerschaft und Embryogenese

Zellteilung ist für das Wachstums und die Entwicklung des Embryos und Feten essentiell. Folsäure spielt im Rahmen der Nukleinsäuresynthese eine große Rolle für die Zellteilung.
So kann bereits geringer Folsäuremangel in der Schwangerschaft zu fehlerhaften zellulären Replikationen und Wachstum im Fetus oder in der Plazenta führen (Scholl u. Johnson 2000).

Eine Metaanalyse bezeichnet Folsäure als essentielles Vitamin in der Embryogenese (Tamura et al. 2006).

Die Wichtigkeit der Folsäure in der Schwangerschaft und Embryogenese ist schon seit langem bekannt:
In den 1950er und 1960er Jahren fand man heraus, dass eine folsäurereiche Ernährung wichtig für die Prävention einer schwangerschaftsinduzierten megaloblastären Anämie ist (Chanarin 1969).

Weiterhin wurde in dieser Zeit festgestellt, dass eine Folsäuresupplementierung während der Schwangerschaft den Folsäuremangel vorbeugen kann; 1970 wurde in den USA die Folsäureeinnahme (200-400 µg/d) für schwangere Frauen erstmals empfohlen.
Seitdem gehört die Einnahme von Folsäure vor und während der Schwangerschaft zur Prophylaxe des Folsäuremangels.

In den 90er Jahren bewies man den Zusammenhang zwischen Folsäuremangel in der Schwangerschaft und dem Entstehen von Neuroalrohrdefekten (Czeizel et al.1992). Neuralrohrdefekte, wie Spina bifida, gehören zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Zentralnervensystems.
Der Neuralrohrverschluss erfolgt im ersten Monat der Schwangerschaft (ca. 22. bis 28. Schwangerschaftstag) (Koletzko et al. 1995). Czeisel et al. (1995) beschrieben, dass eine ausreichende Folsäureernährung, während der Zeit des Neuralrohrverschlusses, Neuralrohrdefekte verhindern kann.

Auch andere Fetopathien scheinen mit dem Folsäurestoffwechsel im Zusammenhang zu stehen:
In einer Studie wird eine 50%-ige Risikoreduktion für das Entstehen von Herzfehlern bei Kindern durch Folsäuresupplementation der Mütter in der Schwangerschaft beschrieben (Czeizel et al. 1992).

Das Auftreten von angeborenen Fehlbildungen der Harnwege wird durch die Einnahme von Folsäurepräparaten vermindert (Li et al. 1995).

Weiterhin gibt es Hinweise dafür, dass Folsäuresupplementierung das Risiko für die kongenitale Entstehung von Lippen-, Kiefer-, und Gaumenspalten senkt (Shaw et al. 1995, Finnell et al. 1998).
Brouns et al. (2008) verglichen in einer Studie 82 schwangere Frauen, die mit Kindern mit Fehlbildungen (z.B. Herzfehler, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte oder Neuralrohrdefekte) schwanger waren, und 110 Frauen die mit gesunden Kindern schwanger waren. Sie stellten u. a. fest, dass die Mutation C677T im MTHFR-Gen in Verbindung mit Folsäure- oder Cobalaminmangel, das Risiko von Fehlbildungen steigert (Brouns et al. 2008).

Van Driel et al. untersuchten den Einfluss der MTHFR-Mutation (C677T und A1298C) auf die Entstehung von Herzfehlern. In ihrer Analyse stellten sich die Polymorphismen aber nicht als starker Risikofaktor heraus und sie fordern ihre Ergebnisse in einer größeren Studie zu bestätigen (Van Driel et al. 2008).

Durch die Einnahme von Folsäure wird die Folsäurekonzetration im Follikel gesteigert und die Konzentration von Homocystein gesenkt (Boxmeer 2008).
Nishio et al. (2008) vermuten, dass Personen mit der homozygoten C677T-Mutation im MTHFR-Gen mehr Folsäure einnehmen müssen um die gleichen Serum-Folsäurespiegel zu erreichen als nicht MTHFR mutierte Personen.
Ob dabei eine tägliche Einnahme von 200 μg Folsäure ausreicht, ist aktuell nicht bekannt

Die Vorgänge während der Embryogenese gelten sowohl für eine Schwangerschaft nach natürlicher Befruchtung, als auch für eine Schwangerschaft nach extrakorporaler Befruchtung. Somit können Erkenntnisse zwischen dem Zusammenhang von Folsäure und Schwangerschaft auch für die künstliche Befruchtung herangezogen werden.

4.1.2 Assistierte Befruchtung

In dieser Studie konnte durch die logistische Regression gezeigt werden, dass die MTHFR-Mutation C677T einen Einfluss auf die IVF hat. Auf die ICSI scheint die Mutation keinen Einfluss zu haben (siehe 3.4.1 und 3.4.2).

Azem et al. (2004) untersuchten, ob Frauen mit häufigen Implantations-misserfolgen nach IVF (4 oder mehr Behandlungszyklen) eine erhöhte Prävalenz für angeborene Thrombophilien haben. Sie entdeckten dabei eine signifikant höhere Prävalenz der homozygoten C677T-Mutation im MTHFR-Gen bei Frauen mit wiederholten Implantationsmisserfolgen im Vergleich zu einer normal fertilen Kontrollgruppe.

Auch Qublan et al. empfehlen, dass man bei Frauen mit wiederholt misslungenen Embryonentransfer nach IVF ein Thrombophiliescreening, welches auch die Untersuchung auf die C677T-Mutation im MTHFR-Gen beinhaltet, durchführen sollte (Qublan et al. 2006).

Eine Gruppe der Universität von Aberdeen (Haggarty et al. 2006) veröffentlichte eine Studie, die sich mit dem Einfluss von B-Vitaminen und deren genetische Determinanten auf den Erfolg nach assistierter Reproduktion beschäftigte. In dieser prospektiven Kohortenstudie wurden 600 Frauen, die mit IVF behandelt wurden, mit normal gebärenden Frauen verglichen. Es wurde mittels eines Fragebogens die Folsäure- und Vitamin B12- Einnahme erfragt. Darauf folgend wurden die Konzentrationen im Plasma und in den Erythrozyten durch Radioimmunoassay gemessen.
Weiterhin wurden die Genvarianten von fünf Enzymen (darunter auch MTHFR) untersucht. Die MTHFR wurde auf die Mutationen C677T und A1298C untersucht. Es wurde errechnet, dass Frauen mit einer homozygoten A1298C Mutation eine geringere Chance haben ein Kind zu entbinden als ohne Mutation (Odds Ratio 0,24 95% Konfidenzintervall 0,08 – 0,71 p=0,003).
Weiterhin ergab sich, dass Frauen, die eine heterozygote C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, im Vergleich zu Frauen, mit einer homozygoten C677T-Mutation, eine bessere Chance haben, eine Lebendgeburt zu haben (OR 1,63 95%CI 1,04-2,56 p=0,034).
Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die zwei Mutationsvarianten (A1298C und C677T) einen Einfluss auf den Erfolg von der IVF haben. Haggarty et al. postulieren in dieser Studie, dass Frauen mit normalen MTHFR-Genotyp eine bessere Chance haben, gesunde Kinder zu entwickeln (Haggarty et al. 2006).

Eine polnische Studie belegt, dass Folsäuresupplementation sowohl den Homocysteinspiegel im Serum als auch den Homocysteinspiegel in der Follikelflüssigkeit senkt. Eizellen, die einer niedrigeren Homocysteinkonzentration ausgesetzt sind, haben eine bessere Qualität für eine künstliche Befruchtung. Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen Homocysteinkonzentration in der Follikelflüssigkeit und dem Reifegrad der Eizelle nachgewiesen (Szymanski et al. 2003).

Hecht et al. (2006) befassten sich mit dem Einfluss der MTHFR-C677T-Mutation auf die Estradiol Synthese.
Sie konnten dabei zeigen, dass die Granulosazellen von homozygot mutierten Frauen im Rahmen der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation mit rekombinantan Follikel-stimulierenden Hormon (rFSH) bei IVF oder ICSI eine signifikant geringere Estradiol (E2) Synthese haben.

Folsäure- und Homcysteinkonzentrationen im Follikel sind von deren Blutserumspiegeln abhängig. Hohe Homcysteinkonzentrationen im Blut haben eine hohe Homcysteinkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit zur Folge (Steegers-Theunissen et al. 1993).

In einer Untersuchung wurde der Einfluss von Homocystein auf die Estradiol-Sekretion von humanen Granulosazellen untersucht.
Dabei wurden Granulosazellen aus Follikelpunktaten von IVF- und ICSI- Patienten verschieden hohen Homocysteinkonzentrationen ausgesetzt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit rFSH oder rekombinaten luteiniserendem Homron (rLH) für 48 Stunden stimuliert und darauf die Estradiol Produktion beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass mit steigender Homocysteinkonzentration die Estradiol Produktion abfiel (Pavlik et al. 2006).
Daraus folgerten Pavlik et al., dass die MTHFR-C677T-Mutation Effekte auf Follikulogenese und ovarielle Steroidbiosynthese besitzt.

Für Altmae et al. spielt besonders die Summe mehrer Mutationen in Thrombophiliegenen eine wichtige Rolle für die Ursache von Infertilität nach IVF (Altmae et al. 2009)

Es existieren aber auch Studien, die keinen Einfluss der MTHFR-C677T-Mutation auf den Erfolg einer künstlichen Befruchtung sehen. In einer Studie von Martinelli et al., die 243 extrakorporal befruchtete Frauen mit 243 spontan konzipierten Frauen verglich, war die MTHFR-Mutationshäufigkeit bei den Frauen, die nicht schwanger wurden, gleich (Martinelli et al. 2003). Bei dieser Studie wurde allerdings nur der Genstatus der Frauen , nicht aber der Männer, überprüft.

Dobson et al. sind ebenso der Meinung, dass die MTHFR-Mutation keinen Einfluss auf Schwangerschaftsraten nach IVF haben. Eizellen würden über einen großen Speicher den Folsäurebedarf der frühen Embryonalanlage decken und der erhöhte Homozysteinspiegel der bei der MTHFR-Mutation entsteht könnte über alternative Wege gesenkt werden (Dobson et al. 2007).

4.1.3 Plazentastörungen

Bereits in der 1970er Jahren wurden Studien erhoben, die sich mit dem Zusammenhang von Folsäuremangel und Plazentastörungen, wie vorzeitige Placentalösung, beschäftigten. Es kam bei den zahlreichen Studien zu keinem klaren Ergebnis, berichten Tamura et al. (2006) in ihrer Metaanaylse: einige Studien belegen einen Zusammenhang von Folsäuremangel und vorzeitiger Placentalösung, während andere Studien keine Assoziation fanden.

Es gibt Theorien, dass eine mögliche Ursache für die Implantationsmisserfolge bei IVF oder ICSI, durch eine erhöhte Thromboseneigung auf Seiten der Mutter bedingt sein könnte. Wenn sich Gefäßverschlüsse in der Plazenta ereignen, kann dies zu Schäden wie retardiertes Wachstum oder Abort führen. Venöse Thrombosen in der Plazenta können ebenfalls zu Störungen in dem Wachstum oder Abort führen (Martinelli et al. 2003).
Eine Thromboseneigung könnte weiterhin dazu führen, dass die utero-plazentare Zirkulation, die essentiell für jegliches Wachstum des Fetus ist, gestört wird (Jauniaux et al. 2006).

Erhöhte Homocysteinspiegel, die zur Induktion eines prokoagulatorischen Milieus führen (Stanger et al. 2003), werden bei kardiovaskulären und thrombotischen Erkrankungen als unabhängiger Risikofaktor angesehen. Dieses prokoagulatorisches Milieu könnte im Rahmen von Plazentastörungen eine Rolle spielen.

4.1.4 Präeklampsie

Tamura et al. (2006) berichten in ihrer Metaanalyse, dass sich seit den 1970er Jahren Studien mit dem Folsäureeinfluss auf Präeklampsie beschäftigen. Die meisten der Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen Folsäure, Homocystein und Präeklampsie finden, obwohl einige andere Studien einen Zusammenhang zwischen MTHFR-C677T-Mutation und Präeklampsie vermuten.

4.1.5 Abort

Bei ungefähr 20% aller Konzeptionen kommt es spontan zum Abort. Es ist vorstellbar, dass durch Komplikationen im Folsäurestoffwechsel diese Abortraten beeinflusst werden (Bae et al 2007).

George et al. (2002) hatten berichtet, dass bei Frauen, die einen niedrigen Plasma-Folsäurespiegel haben (≤ 2,19 ng/mL), im Vergleich zu Frauen, mit normalen Folsäureplasmaspiegel (2,2 bis 3,9 ng/mL), ein erhöhtes Risiko für einen spontanen Abort besteht (odds ratio 1,47; 95. Konfidenzintervall 1,01- 2,14).

Eine Studie von Stemmer besagt, dass Folsäuresupplementierung für Frauen mit wiederholtem Abort dazu beitragen könnte, weitere Aborte zu verhindern (Stemmer 2001).

Die Homocysteinämie, bedingt durch Folsäuremangel, gilt als Risikofaktor für wiederholte Aborte (Wouters et al 1993). Dabei könnte eine inadäquate Vaskularisation im Chorion eine Rolle spielen (Nelen et al. 2000).

Eine Metaanalyse von Nelen et al. (2002), die Studien zwischen Januar 1992 und November 1999 einschließt, beschreibt, dass Hyperhomocysteinämie, bedingt durch die MTHFR-C677T-Mutation, ein Risikofaktor für wiederholten Abort (REPL) ist.

Auch Bae et al. (2007) konnten bei einer Studie, die 94 Aborte untersuchte, eine erhöhte Rate an MTHFR-Mutationen feststellen.
Callejón et al. (2007) sehen in der C677T MTHFR-Mutation eine Ursache für spontane Aborte.

Eine andere Studie ist zu dem Ergebnis gekommen, dass der MTHFR-Polymorphismus nur in manchen Populationen (z.B. in Populationen die eine niedrige Folsäureeinnahme haben) als ein Risikofakror für unerklärbaren wiederholten Abort (URPL= unexplained recurrend pregnancy loss) sei (Ren et al. 2006).

Es gibt allerdings Studien die besagen, dass es keinen Zusammenhang zwischen Hyperhomozysteinämie, bedingt durch einen inadäquaten Folsäuremetabolismus, und Abort gibt:
Foka et al. untersuchten in einer Studie den Zusammenhang zwischen wiederholten Aborten und Mutationen in Thrombophilie-Genen (Faktor V Leiden, Prothrombin, MTHFR C677T). Für die MTHFR-Mutation fanden sie keinen Zusammenhang zum Abort; dies erklärten sie dadurch, dass die (durch die MTHFR-Mutation entstehende) Hyperhomozysteinämie nur gering wäre und keinen Einfluss auf die Embryogenese habe (Foka et al. 2000).

Ob eine Antikoagulation mittels niedermolekularem Heparinen und/ oder Acetylsalicilsäure bei rezidivierenden Implantationsmisserfolgen oder Aborten von Nutzen ist, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt (Diedrich und Bohlmann 2009).

4.1.6 Männliche Infertilität

Bezold et al. (2001) untersuchten die DNS von 255 männlichen Patienten, die Störungen der Fertilität hatten und verglichen sie mit 200 normal fertilen Kontrollpatienten. Sie stellten fest, dass die Prävalenz für eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen im infertilen Kollektiv höher war als in der Kontrollgruppe (p=0,008; Chi^2 –Test).

Auch Singh et al. (2005) konnten in einer Studie mit indischen Patienten zeigen, dass eine C677T-Mutation ein Risikofaktor für Subfertilität bei Männern ist.

Bei einer Studie mit 360 subfertilen Männern, bei denen eine Obstruktion der vasa deferenz als Ursache für Subfertilität ausgeschlossen wurde, wurde die Mutationsprävalenz von 3 verschiedenen Enzymen im Folsäuremetabolismus (MTHFR C677T, Methionin Synthase und Methionin Reduktase) gemessen und mit 325 Patienten ohne chromosomale Abnormitäten verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutationen unabhängig voneinander mit männlicher Subfertilität (Lee et al. 2006) assoziiert sind.

Es wurde in einer Studie, die 103 subfertile Männer und 80 fertile Männer verglich, festgestellt, dass eine kombinierte Gabe von Folsäure und Zink, die Anzahl der progressiv motilen Spermien steigert. Die antioxidativen Eigenschaften von Folsäure und Zink wurden für diese positiven Befunde verantwortlich gemacht (Wong et al. 2002).

Die Folsäurekonzentration im seminalen Plasma hängt von der Blutplasma-Folsäurekonzentration ab (Wallock et al 2001, Wong et al 2002).
Weiterhin stellten Ebisch et al. fest, dass die Konzentation von Homocystein und anderen Thiolen (Cystein, Cysteinylglycin, Gluatathion) bei subfertilen Männern signifikant (p=0,001) höher war als bei normal fertilen Männern. Sie vermuten daher, dass eine erhöhte Homocysteinkonzentrationen mit männlicher Fertilität invers korreliert (Ebisch et al. 2006).

Ebenso stellten Ebisch et al. in einer doppelblinden, placebokontrolliereten Studie mit 113 fertilen und 73 subfertilen Männern fest, dass unter Folsäure- und Zinksupplementierung die Spermienanzahl bei nicht C677T-MTHFR mutierten Männern stieg, bei heterozygot oder homozygot mutierten Männern veränderten sie sich jedoch nicht. Die Mutationshäufigkeiten waren in den beiden Gruppen gleich. Sie folgerten, dass Folsäureenzyme eine wichtigere Rolle in der männlichen Infertilität spielen müssen (Ebisch et al. 2003).

Über die Pathomechanismen der Schädigung durch die C677T-Mutation im MTHFR-Gen ist bisher wenig bekannt.
Die Rolle der Folsäure im Metabolismus und in der Synthese von Ribonukleinsäuren könnte ein Anhaltspunkt für einen möglichen Einfluss sein (Coulam 2009). Weiterhin kann das Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien, in dem auch die MTHFR-Muation eine Rolle spielt, als eine Ursache für männliche Subfertilität vermutet werden (Wong et al. 2002, Ebisch et al. 2003, Venkatesh et al. 2009).

4.1.6.1 Oxidative Prozesse bei Spermatozoen

Oxidantien (reactive oxygen species = ROS) werden physiologischerweise von Spermatozoen produziert. So benötigt das Spermium das Radikal O_2- für die Hyperaktivation. Als Hyperaktivation wird eine Phase während der Fertilisation bezeichnet, in der die Bewegung des Spermiums schnell und peitschenartig ist (De Lamirande et al. 1992).
Weiterhin nimmt man an, dass ROS auch für die Sperma-Zona pellucida Interaktionen wichtig sind (Aitken 1989).

Anderseits ist bekannt, dass menschliche Spermatozoen sehr empfindlich gegen oxidative Schäden sind, weil sie eine hohe Konzentration von ungesättigten Fettsäuren beinhalten. So könnten auch ROS als Ursache für männliche Subfertilität in Frage kommen (Henkel et al. 2004, Tremellen 2008).

Es ist also denkbar, dass Missverhältnisse zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen dazu führen können, dass die Funktionen von Spermatozoen eingeschränkt werden und es somit zu einem Misserfolg bei einer normalen oder künstlichen Befruchtung kommt.

Eine mögliche Ursache könnte die Veränderung an Spermien-DNA durch ROS sein, die folglich dazu führt, dass defekte DNA die Eizelle befruchtet (Tremellen 2008, Venkatesh et al. 2009).
Letztlich ist bisher wenig über die Rolle der ROS in der Schädigung von Spermatozoen bekannt.

4.2 Mutationen in der IVF- und ICSI-Gruppe

Die statistische Analyse mittels Chi²-Test ergab, dass sich mehr Männer mit der C677T-Mutation in der ICSI-Gruppe als in der IVF-Gruppe befanden (Chi²-Test p=0,001).
Daraus kann man schließen, dass die MTHFR-Mutation C677T einen Einfluss auf männliche Subfertilität haben könnte. In welcher Weise die Mutation die Subfertilität beeinflusst, wurde oben bereits beschrieben.

Bei den Frauen unterschied sich die Häufigkeit der C677T-MTHFR-Mutation in der IVF- und der ICSI-Gruppe nicht. Dies kann man wiederum dadurch erklären, dass die ICSI nur bei schwerer männlicher Subfertilität (und bei wiederholten IVF Versagen) indiziert ist und weibliche Faktoren die Therapiewahl zwischen IVF oder ICSI nicht beeinflussen.

4.2.1 Mutationen im Vergleich zur Literatur

Die Mutationshäufigkeit der C677T-Mutation im MTHFR-Gen in unserem Patientengut im Vergleich zu der in der Literatur angegebenen Häufigkeit bei

Europäern kaukasischer Herkunft (Hertfelder et al. 2004) lässt keinen signifikanten Unterschied erkennen (Tabelle 12).

Tabelle 12; MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase)-C677T-Mutationsverteilung bei Frauen (grün) und Männern (blau) in dieser Studie sowie in der Normalbevölkerung; wildtyp CC (keine Mutation), heterozygot CT (heterozygote Mutation) und homozygot TT (homozygote Mutation) im Methylentera-hydrofolatreduktase-Gen

	wildtyp CC	***heterozygot CT***	***homozygot TT***
Frauen in dieser Studie	46,9 %	40,9 %	12,2 %
Männer in dieser Studie	47,8 %	42,4 %	9,8 %
Normalbevökerung (Hertfelder et al. 2004)	50%	40%	10%

Beim Vergleich mit anderen Studien bemerkt man, dass die Prävalenz des MTHFR-C677T-Polymorphismus erheblichen ethnischen Unterschieden unterliegt. In Afrika wird er kaum angetroffen, wohingegen in Mitteleuropa und Nordamerika 30 bis 40 Prozent der Bevölkerung Polymorphismen in diesem Gen aufweisen (Forges et al.2007, Singh et al. 2005).

Dass die Mutationsprävalenzen zwischen den einzelnen Studien sehr streuen, sieht man in Tabelle 13.

Tabelle 13; MTHFR (Methylentetrahydrofolatreduktase)-C677T-Mutationsverteilung bei Männern in verschiedenen Studien; wildtyp CC (keine Mutation), heterozygot CT (heterozygote Mutation) und homozygot TT (homozygote Mutation) im Methylentera-hydrofolatreduktase-Gen

Männer	**wildtyp CC**	**heterozygot CT**	**homozygpt TT**
Lee et al. 2006 (Korea)	50,28 %	31,94 %	17,78 %
Singh et al. 2005 (Indien)	69,5 %	26,5 %	4 %
diese Studie	**47,8 %**	**42,4 %**	**9,8 %**

4.3 Klinische Schwangerschaftsraten und Geburten

In dieser Studie endeten in der IVF-Gruppe 196 (39,6%) Behandlungszyklen in einer klinischen Schwangerschaft und davon 122 (62,2%) in einer Geburt.

In der ICSI-Gruppe endeten 159 (37,1%) Behandlungszyklen in einer klinischen Schwangerschaften und davon 102 (64,1%) in einer Geburt.

Das deutsche IVF Register (DIR) dokumentiert die Behandlungsergebnisse von derzeit 118 Behandlungszentren (2006) in Deutschland. 2006 wurden im Durchschnitt 30% klinische Schwangerschaften pro Embryotransfer und davon 43% Geburten nach IVF dokumentiert. Nach ICSI wurden 28% klinische Schwangerschaften und davon 43% Geburten dokumentiert (Abbildung 7).

Jedoch konnten im DIR in beiden Gruppen etwa 30% der Behandlungszyklen nicht weiter verfolgt werden, da die Patienten häufig den schwangerschaftsbetreuenden Gynäkologen wechseln und somit schlecht nachbeobachtet werden können. Daher können die Behandlungsergebnisse schlecht verglichen werden.

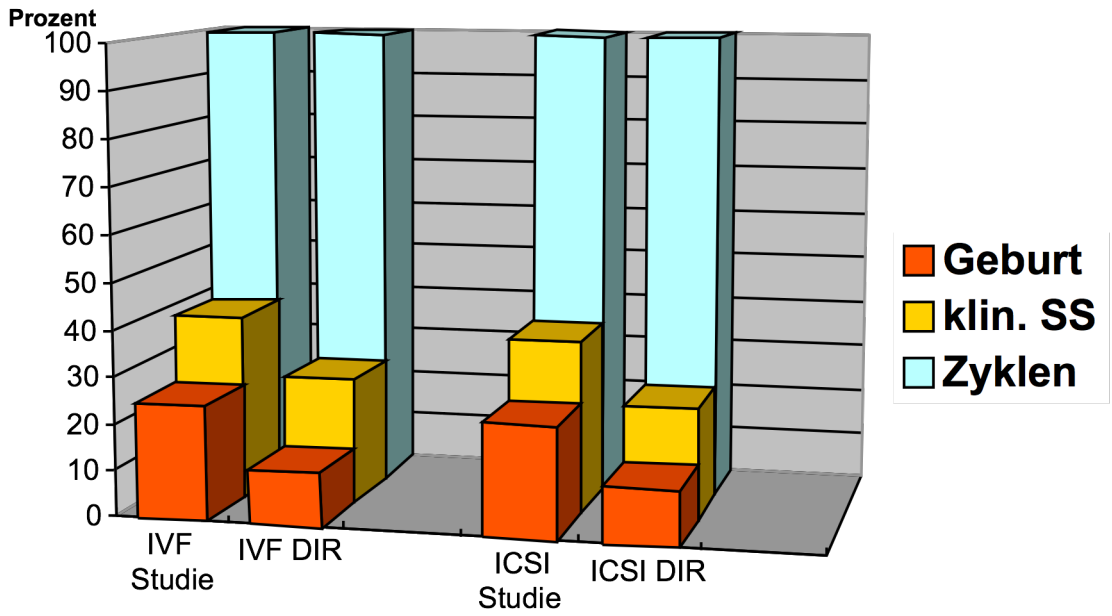

Abbildung 7; Behandlungszyklen (Zyklen), klinische Schwangerschaften (klin. SS) und Geburten in dieser Studie im Vergleich zum deutschen IVF (In-vitro-Fertilisation) Register (DIR) 2006 in Prozent; IVF (In-vitro-Fertilisation), ICSI (Intrazytoplasmatische Spermieninjektion), DIR (Deutsches In-vitro-Fertilisations-Register)

4.4 Ergebnisse der logistischen Regressionen

4.4.1 IVF-Kollektiv

4.4.1.1 Weiblicher MTHFR-Genstatus

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass der weibliche MTHFR-Genstatus einen Einfluss auf den Erfolg einer IVF hat. Frauen, die eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, haben eine geringere Chance, dass eine klinische Schwangerschaft festgestellt wird und es zur Geburt des Kindes kommt. Dies kann durch den Einfluss des Folsäurestoffwechsels und der MTHFR-Mutation auf Eizellqualität, Embryogenese, Plazentastörungen oder Abort erklärt werden (Kapitel 4.1ff)

Auch andere Studien belegen einen Einfluss der MTHFR-Mutation auf viele physiologische Prozesse, die während und nach der Befruchtung im menschlichen Körper stattfinden (Nelen et al. 2000, Bezold 2001, Björklund et al. 2004, Singh et al. 2005, Haggarty et al. 2006, Lee et al. 2006).

Da es aber Studien gibt, die keinen Einfluss der Mutation auf die menschliche Fortpflanzung sehen, besteht bisher kein eindeutiger Konsens darüber, wie bedeutend diese Mutation tatsächlich ist (Foka et al. 2000, Martinelli et al. 2003).

4.4.1.2 Männlicher MTHFR-Genstatus

Im IVF-Kollektiv konnte ein Chancenunterschied für die Diagnose einer klinischen Schwangerschaft im Vergleich zwischen Paaren mit nicht MTHFR mutierten Männern und heterozygot mutierten Männern oder zwischen Paaren mit nicht MTHFR und homozygot mutierten Männern mittels der logistischen Regression statistisch nicht gezeigt werden.

Obwohl bei der Berechnung der einfachen logistischen Regression mit der Variablen männliche MTHFR-Mutation und Geburt nur ein p-Wert von 0,0674 erreicht wurde (und somit der α von 5% nicht ereicht wurde), sind die Ergebnisse interessant:
Die Chance nach IVF schwanger zu werden scheint für Frauen, mit nicht C677T-mutierten Männern ca. doppelt (2,4) so hoch zu sein, wie für Frauen, die einen C677T-homozygot mutierten Partner haben.

Auch andere Studien beschäftigten sich mit einem eventuellen Zusammenhang zwischen MTHFR-Mutation und männlicher Infertilität (siehe auch Kapitel 4.1.6):
Bezold, Singh, Lee und Wong sehen eine MTHFR-Mutation als Risikofaktor für Subfertiliät (Bezold et al. 2001, Wong et al. 2002, Singh et al. 2005, Lee et al. 2006).
Ebisch et al. halten die C677T-Mutation nicht für einen Risikofaktor für männliche Infertilität (Ebisch et al. 2003).

Wie und in wieweit der Folsäurestoffwechsel mit männlicher Fertilität zutun hat ist bis jetzt noch nicht genügend erforscht.
Die Rolle der Folsäure in der Synthese von Ribonukleinsäuren könnte ein Anhaltspunkt für einen möglichen Einfluss sein.
Weiterhin kann das Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien, in dem auch die MTHFR-Mutation eine Rolle spielt, als eine Ursache für männliche Infertilität angesehen werden (Kapitel 4.1.6).

4.4.1.3 Paar-MTHFR-Genkonstellation und Geburt

Da in dieser Arbeit Paare miteinander verglichen wurden, wurden alle Befruchtungen nach der Genkonstellation von Mann und Frau sortiert. Mann und Frau können jeweils drei unterschiedliche Genkonstellationen haben, somit ergeben sich insgesamt 9 Kategorien.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Arbeit zu folgendem Ergebnis kommt:
Die Chancen (ausgedrückt durch Odds Ratio) für die Feststellung einer klinischen Schwangerschaft und die Chance auf Geburt eines Kindes nach IVF sind für Paare, bei denen keiner der beiden Partner eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen hat, deutlich besser (ca. 2 bis 5 fach), als für Paare bei denen ein oder auch beide Partner eine Mutation im MTHFR-Gen haben.

Das relative Risiko ist je nach Genkonstellationen unterschiedlich.
Einige Ergebnisse (z.B. Frau homozygot, Mann heterozygot vs. Frau normal, Mann normal) sind nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung könnte die geringe Fallzahl sein, die in den einzelnen Kategorien letztendlich auftraten. Zum Beispiel gibt es in der Kategorie *„Frau homozygot, Mann heterozygot vs. Frau normal, Mann normal“* nur 13 Paare.
Die restlichen signifikanten Ergebnisse sind bemerkenswert. Gerade bei homozygoten Trägern der MTHFR-C677T-Mutation ist die Chance auf die Feststellung der klinischen Schwangerschaft und die Geburt eines Kindes am geringsten.
Man kann sich fragen, wieso Paare mit dieser geringen Chance nicht in der alltäglichen Praxis auffallen. Eigentlich müssten die Paare im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik hervorstechen, da in der logistischen Regression teilweise eine erheblich geringere Chance errechnet wurde.
Wenn man aber bedenkt, dass die individuellen Erfolge bei einer Befruchtung, durch normalen Geschlechtverkehr oder durch extrakorporale Befruchtung zustande gekommen, auch eher gering sind, relativieren sich die Ergebnisse. Da der Infertilität meist multifaktorielle Ursachen zu Grunde liegen, könnte das untersuchte Patientenkollektiv unter weiteren Infertilitätsursachen leiden.
In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, warum die MTHFR-Muation C667T, bei ihrer häufigen Prävalenz (in Europa ca 10% homozygote Träger), keinen evolutionären Nachteil mit sich bringt.

Leider sind die individuellen Fallzahlen in den einzelnen Kategorien letztendlich doch relativ klein. Mittels einer noch größeren Fallzahl würden sich sicherlich eindeutigere Ergebnisse ergeben.

Da es bisher keine ähnlichen Studien gibt, welche die C677T-MTHFR-Mutation von Paaren mit dem Erfolg einer IVF vergleicht, sollte es angestrebt werden weitere Untersuchungen in dieser Richtung durchzuführen.

4.4.2 ICSI-Kollektiv

Im ICSI-Kollektiv konnte einzig für Frauen mit Mutation im MTHFR-Gen eine geringere Chance für eine Schwangerschaft statistisch signifikant bewiesen werden.
Ansonsten konnte weder für den männlichen MTHFR-Genstatus, oder für Paare, in dieser Studie ein signifikanter Einfluss auf den Erfolg nach ICSI (klinische Schwangerschaft oder Geburt) bewiesen werden.

Die ICSI ist als Therapie nur für die Erzielung einer Schwangerschaft sinnvoll, deren Ausbleiben auf eine männliche Ursache zurückgeführt werden kann, oder weil vorherige Fertilisationsversuche mittels IVF wiederholt fehlgeschlagen sind.
Obwohl in dem ICSI-Kollektiv mehr Männer mit C677T-Mutation im MTHFR-Gen waren als im IVF-Kollektiv, konnte mittels der logistischen Regression kein Einfluss auf den Erfolg nach ICSI bewiesen werden. Auch für die Mutation auf der weiblichen Seite konnte im ICSI-Kollektiv kein Einfluss gefunden werden.

Bei der IVF müssen, im Gegensatz zur ICSI, mehrer physiologische Reaktionen, wie bei einer normalen Befruchtung, ablaufen. Da die Mutation bei der ICSI keinen Einfluss zu haben scheint, könnte es also sein, dass die MTHFR-Mutation in jenen Prozessen der Befruchtung einen Einfluss hat, die von der ICSI umgangen werden.
Die Vermutung würde auch erklären, warum die Mutation nur den Erfolg nach IVF zu beeinflussen scheint.
Ob oder inwieweit einer oder mehrere dieser Prozesse durch die MTHFR-Mutation oder durch die Anreicherung von Homocystein beeinflusst werden, ist noch nicht bekannt. Die Pathomechanismen der Schädigung die in 4.1.6 diskutiert werden, können nur zum Teil zu Erklärungen beitragen.

Weiterführend kann man aus den statistischen Ergebnissen die sich in dieser Arbeit ergeben, schlussfolgern, dass für Paare, bei denen ein oder auch beide Partner eine homozygote Mutation im MTHFR-Gen an der Position C677T haben, die ICSI die erfolgsversprechendere Therapiemethode ist.

4.4.3 Schlussfolgerung

Die genetische Untersuchung, ob eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen vorliegt, kann dazu beitragen Ursachen eines fehlenden Erfolges nach extrakorporaler Befruchtung zu finden.

Paare, bei denen ein Partner oder auch beide Partner eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, haben eine geringere Chance nach IVF eine Schwangerschaft zu erzielen.
Bei der ICSI konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden, ob die Mutation einen Einfluss auf Eintritt und Fortbestehen der Schwangerschaft hat.
Bei Paaren mit einer C677T-Mutationen im MTHFR-Gen wäre deswegen eher die ICSI die Therapie der Wahl.

Da es bisher keine ähnlichen Studien gibt, die den Einfluss des C677T-MTHFR-Polymorphismus bei Paaren mit dem Erfolg einer extrakorporalen Befruchtung vergleicht, sollte es angestrebt werden weitere Untersuchungen in dieser Richtung durchzuführen.

Obwohl die Fallzahl (966 Behandlungszyklen, 531 Paare) in dieser Arbeit nicht gering ist, ergibt sich für jede einzelne der Paar-Genkonstellationen doch eine kleine Gruppe. Zukünftige Studien sollten eine größere Fallzahl anstreben.

5 Zusammenfassung

Um einen möglichen Einfluss des 5-, 10-Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) - Polymorphismus C677T auf den Erfolg (definiert durch den klinischen Nachweis der Schwangerschaft und die Geburt) einer extrakorporalen Befruchtung nach In-vitro-Fertilisation oder Intrazytoplasmatischer Spermieninjektion festzustellen, wurden die Daten von 531 Paaren (insgesamt 966 Behandlungszyklen) retrospektiv erfasst.

Bei allen Patienten wurde eine Mutationsanalyse auf die C677T-Mutation im MTHFR-Gen durchgeführt.

Von Januar 1998 bis Dezember 2005 wurde dokumentiert, ob bei den Paaren eine klinische Schwangerschaft eintrat und ob es zur Geburt kam.

Anschließend wurde das Patientengut nach „C677T-MTHFR-Mutation“ (normal/ heterozygot/ homozygot) und „Art der extrakorporalen Befruchtung“ (In-vitro-Fertilisation / Intrazytoplasmatische Spermieninjektion) eingeteilt und der Erfolg der Fertilisation, der klinischen Schwangerschaftsraten und der Geburt dokumentiert.

Die deskriptive Statistik umfasste die Mutationsverteilung, die In-vitro-Fertilisations- und Intrazytoplasmatische Spermieninjektions- Häufigkeiten, den Nachweis klinischer Schwangerschaften sowie die Geburten.

Die logistische Regression wurde mit den erklärenden Variablen „männliche MTHFR-Mutation“, „weibliche MTHFR-Mutation“, „Paar-MTHFR-Genkonstellation“ und der Zielvariable „klinische Schwangerschaft / keine klinische Schwangerschaft“ und „schwanger / nicht schwanger“ durchgeführt.

In der Analyse stellte sich heraus, dass es in der Intrazytoplasmatischen Spermieninjektions-Gruppe mehr Männern mit Mutationen gab, als in der In-vitro-Fertilisations-Gruppe.

In der In-vitro-Fertilisations-Gruppe wurde durch die logistische Regression ein statistisch signifikanter Einfluss der MTHFR-C677T-Mutation auf den Behandlungserfolg (Nachweis der klinischen Schwangerschaft und der Geburt) nach extrakorporaler Befruchtung gefunden.
Paare, bei denen ein oder beide Partner eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, haben im Vergleich zu Paaren, bei denen keine Mutation vorliegt, eine geringere Chance (ca. 2- bis 5-mal) auf eine klinische Schwangerschaft und die Geburt eines Kindes.

Ein Einfluss des MTHFR-Polymorphismus C677T auf den Erfolg einer Intrazytoplasmatischen Spermieninjektion konnte insgesamt nicht nachgewiesen werden.

Für Paare, bei denen ein oder auch beide Partner eine C677T-Mutation im MTHFR-Gen haben, ist die Intrazytoplasmatische Spermieninjektion somit die Therapie der Wahl.

Die C677T-Mutation im MTHFR-Gen nimmt Einfluss auf Embryogenese, Schwangerschaftverlauf und Geburt.
Bei Männern könnte der MTHFR-C677T-Polymorphismus durch den Einfluss auf oxidative Prozesse zur Subfertilität beitragen.

Letztendlich wären weitere Studien, mit größeren Fallzahlen, über die Bedeutung der C677T-MTHFR-Mutation im Folsäurestoffwechsel auf die extrakorporale Befruchtung sinnvoll.

6 Literatur

1. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK: Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 3: 28-49 (2005)
2. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG, Sikka SC: Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. Fertil Steril 86: 878-885 (2006)
3. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod 41: 183-197 (1989)
4. Allen LH: Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. Am J Clin Nutr 81: 1206-1212 (2005)
5. Altmae S, Stavreus-Evers A, Ruiz JR, Laanpere M, Syvanen T, Yngve A, Salumets A, Nilsson TK: Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. Fertil Steril 94: 130-137 (2009)
6. ASRM: Blastocyst culture and transfer in clinical-assisted reproduction. Fertil Steril 86: 89-92 (2006)
7. ASRM: Definition of "infertility". Fertil Steril 86: 228 (2006)
8. ASRM: Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 89: 1603 (2008)
9. Azem F, Many A, Ben Ami I, Yovel I, Amit A, Lessing JB, Kupferminc MJ: Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. Hum Reprod 19: 368-370 (2004)
10. Bae J, Shin SJ, Cha SH, Choi DH, Lee S, Kim NK: Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T and A1298C) in spontaneously aborted embryos. Fertil Steril 87: 351-355 (2007)
11. Bender R, Ziegler A, Lange S: Logistische Regression. Dtsch Med Wochenschr 127: 11-13 (2002)
12. Berry RJ, Kihlberg R, Devine O: Impact of misclassification of in vitro fertilisation in studies of folic acid and twinning: modelling using population based Swedish vital records. Br Med J 330: 815-818 (2005)

13. Bezold G, Lange M, Peter RU: Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. N Engl J Med 344: 1172-1173 (2001)
14. Bjorklund NK, Evans JA, Greenberg CR, Seargeant LE, Schneider CE, Chodirker BN: The C677T methylenetetrahydrofolate reductase variant and third trimester obstetrical complications in women with unexplained elevations of maternal serum alpha-fetoprotein. Reprod Biol Endocrinol 2: 65-73 (2004)
15. Blockeel C, De Vos M, Verpoest W, Stoop D, Haentjens P, Devroey P: Can 200 IU of hCG replace recombinant FSH in the late follicular phase in a GnRH-antagonist cycle? A pilot study. Hum Reprod 24: 2910-2916 (2009)
16. Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, Storti S, Rizza A, Biagini A: Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. Eur J Hum Genet 11: 671-678 (2003)
17. Boxmeer JC, Brouns RM, Lindemans J, Steegers EA, Martini E, Macklon NS, Steegers-Theunissen RP: Preconception folic acid treatment affects the microenvironment of the maturing oocyte in humans. Fertil Steril 89: 1766-1770 (2008)
18. Brouns R, Ursem N, Lindemans J, Hop W, Pluijm S, Steegers E, Steegers-Theunissen R: Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. Prenat Diagn 28: 485-493 (2008)
19. Bühler K B-P, Kupka M, Dahncke W: Das Deutsche IVF-Register (DIR) 2007. J. Reprodutionsmed. Endokrinol 5: 45-48 (2007)
20. Cai J, Lou HY, Dong MY, Lu XE, Zhu YM, Gao HJ, Huang HF: Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. Fertil Steril 87: 1350-1356 (2007)
21. Callejon G, Mayor-Olea A, Jimenez AJ, Gaitan MJ, Palomares AR, Martinez F, Ruiz M, Reyes-Engel A: Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. Hum Reprod 22: 3249-3254 (2007)

22. Carp H, Dolitzky M, Inbal A: Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. J Thromb Haemost 1: 433-438 (2003)
23. Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Tavares de Almeida I: Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. J Inherit Metab Dis 29: 3-20 (2006)
24. Comhaire FH, Mahmoud A: The role of food supplements in the treatment of the infertile man. Reprod Biomed Online 7: 385-391 (2003)
25. Coulam CB, Jeyendran RS: Thrombophilic gene polymorphisms are risk factors for unexplained infertility. Fertil Steril 91: 1516-1517 (2009)
26. Czeizel AE: Folic acid in the prevention of neural tube defects. J Pediatr Gastroenterol Nutr 20: 4-16 (1995)
27. Czeizel AE, Dudas I: Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. N Engl J Med 327: 1832-1835 (1992)
28. D'Uva M, Di Micco P, Strina I, Alviggi C, Iannuzzo M, Ranieri A, Mollo A, De Placido G: Hyperhomocysteinemia in women with unexplained sterility or recurrent early pregnancy loss from Southern Italy: a preliminary report. Thromb J 5: 10-16 (2007)
29. De Brucker M, Haentjens P, Evenepoel J, Devroey P, Collins J, Tournaye H: Cumulative delivery rates in different age groups after artificial insemination with donor sperm. Hum Reprod 24: 1891-1899 (2009)
30. De Lamirande E, Gagnon C: Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. Free Radic Biol Med 14: 157-166 (1993)
31. De Maat MP, Jansen MW, Hille ET, Vos HL, Bloemenkamp KW, Buitendijk S, Helmerhorst FM, Wladimiroff JW, Bertina RM, De Groot CJ: Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes. J Thromb Haemost 2: 1588-1593 (2004)
32. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R: Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. J Thromb Haemost 3: 292-299 (2005)

33. Devroey P, Aboulghar M, Garcia-Velasco J, Griesinger G, Humaidan P, Kolibianakis E, Ledger W, Tomas C, Fauser BC: 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 (2009 a)
34. Devroey P, Fauser BC, Diedrich K: Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. Hum Reprod Update 15: 391-408 (2009 b)
35. Devroey P, Van Steirteghem A: A review of ten years experience of ICSI. Hum Reprod Update 10: 19-28 (2004)
36. Diedrich K: Neue Enwicklungen in der Reproduktionsmedizin. Dtsch Arztebl 102: 587–591 (2005)
37. Dobson AT, Davis RM, Rosen MP, Shen S, Rinaudo PF, Chan J, Cedars MI: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C variants do not affect ongoing pregnancy rates following IVF. Hum Reprod 22: 450-456 (2007)
38. Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP: Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. Hum Reprod 21: 1725-1733 (2006)
39. Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP: The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. Hum Reprod Update 13: 163-174 (2007)
40. Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der Put N, Wong WY, Steegers-Theunissen RP: C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. Fertil Steril 80: 1190-1194 (2003)
41. El-Khairy L, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM: Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. Am J Clin Nutr 77: 467-472 (2003)
42. Esterbauer B, Jungwirth A: Erectile dysfunction. Wien Med Wochenschr 159: 529-534 (2009)
43. Färber K: Spermienaufbereitung und Abklärung männlicher Infertilität. J Fertil Reprod 11: 44-45 (2001)
44. Finnell RH, Greer KA, Barber RC, Piedrahita JA: Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. Crit Rev Oral Biol Med 9: 38-53 (1998)

45. Fischl F, Huber JC, Obruca A: Zeitliche Optimierung der kontrollierten Hyperstimulation (KOH) in Kombination mit GnrH-Antagonisten und Ovulationshemmer in einem IVF-Programm. J Fertil Reprod 11: 50-51 (2001)
46. Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, Zournatzi V, Makris PE, Bontis J, Kotsis A: Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. Hum Reprod 15: 458-462 (2000)
47. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL: Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. Hum Reprod Update 13: 225-238 (2007)
48. Frank A, Hagen M: Die Bedeutung der Folsäure bei der Prävention von Arteriosklerose und Neuralrohrdefekten. Aktuel Ernahrungsmed 25: 147-150 (2000)
49. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB: Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability. Fertil Steril 79: 407-410 (2003)
50. George L, Mills JL, Johansson AL, Nordmark A, Olander B, Granath F, Cnattingius S: Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. Jama 288: 1867-1873 (2002)
51. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G: Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. Hum Reprod 18: 1959-1966 (2003)
52. Grandone E, Colaizzo D, Vergura P, Cappucci F, Vecchione G, Lo Bue A, Cittadini E, Margaglione M: Age and homocysteine plasma levels are risk factors for thrombotic complications after ovarian stimulation. Hum Reprod 19: 1796-1799 (2004)
53. Habbema JD, Collins J, Leridon H, Evers JL, Lunenfeld B, te Velde ER: Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a proposal. Fertil Steril 82: 36-40 (2004)

54. Haggarty P, McCallum H, McBain H, Andrews K, Duthie S, McNeill G, Templeton A, Haites N, Campbell D, Bhattacharya S: Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. J Lancet 367: 1513-1519 (2006)
55. Hecht S, Pavlik R: Verminderte Estradiol-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit homozygoter Trägerinnen der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase- (MTHFR) 677C>T-Mutation. Geburtsh Frauenheilk 67: 19-22 (2006)
56. Hecht S, Pavlik R, Friese K, Thaler CJ: Einfluss der 677C>T Mutation des 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR)-Gens auf die Estradiol-Synthese humaner Granulosazellen. Geburtsh Frauenheilk 67: 19-22 (2006)
57. Heijnen EM, Eijkemans MJ, De Klerk C, Polinder S, Beckers NG, Klinkert ER, Broekmans FJ, Passchier J, Te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC: A mild treatment strategy for in-vitro fertilisation: a randomised non-inferiority trial. J Lancet 369: 743-749 (2007)
58. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF: Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 83: 635-642 (2005)
59. Hertfelder H, Gnida C: MTHFR-Polymorphismus C677T Sinn und Unsinn der Diagnostik. Deutsches Ärzteblatt 46: 3091-3101 (2004)
60. Hibbard BM, Hibbard ED: Aetiological Factors in Abruptio Placentae. Br Med J 2: 1430-1436 (1963)
61. Homburg R: Towards less confusing terminology in reproductive medicine: a counter proposal. Hum Reprod 20: 316-319 (2005)
62. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ: Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. Hum Reprod Update 12: 747-755 (2006)
63. Just A, Obruca A: Die ovarielle Stimulation und Ovulationsinduktion in der Assistierten Reproduktion. J Fert Reprod 12: 14-16 (2002)
64. Kleinstein J: Endokrinologische Diagnostik bei Infertilität. Gynakologe 38: 319-325 (2005)

65. Koletzko B, von Kries R: Prevention of neural tube defects by folic acid administration in early pregnancy. Joint recommendations of the German Society of Nutrition, Gynecology and Obstetrics, Human Genetics, Pediatrics. Society of Neuropediatrics. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch 35: 2-5 (1995)
66. Koletzko B, Pietrzik K: Gesundheitliche Bedeutung der Folsäurezufuhr. Dtsch Arztebl 101: 1670-1681 (2004)
67. Lee HC, Jeong YM, Lee SH, Cha KY, Song SH, Kim NK, Lee KW, Lee S: Association study of four polymorphisms in three folate-related enzyme genes with non-obstructive male infertility. Hum Reprod 21: 3162-3170 (2006)
68. Lentz SR: Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. J Thromb Haemost 3: 1646-1654 (2005)
69. Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS: Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. Epidemiology 6: 212-218 (1995)
70. Ludwig M, Gromoll J, Hehr U, Wieacker P: Stellungsnahme der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsgenetik der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin: Empfehlung zur genetischen Diagnostik bei Kinderwunschpaaren. J Reproduktionsmed Endokrinol 1: 190-193 (2004)
71. Ludwig M, Katalinic A: Die deutsche ICSI-Follow-up-Studie - Zusammenfassung der Ergebnisse publizierter Arbeiten und Einordnung in die aktuelle Studienlage. J Reproduktionsmed Endokrinol 2: 151-162 (2005)
72. Maier SH, Gschwend JE, Hautmann RE, Löffler M, Sterzik K, Strehler E: Langzeitergebnisse der assistierten Fertilisation. J Fert Reprod 10: 17-23 (2000)
73. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM: Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. Circulation 99: 178-182 (1999)
74. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T: Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. Hum Reprod 21: 3036-3043 (2006)

75. Martinelli I, Taioli E, Ragni G, Levi-Setti P, Passamonti SM, Battaglioli T, Lodigiani C, Mannucci PM: Embryo implantation after assisted reproductive procedures and maternal thrombophilia. Haematologica 88: 789-793 (2003)
76. Neiger R, Wise C, Contag SA, Tumber MB, Canick JA: First trimester bleeding and pregnancy outcome in gravidas with normal and low folate levels. Am J Perinatol 10: 460-462 (1993)
77. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Eskes TK: Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. Fertil Steril 74: 1196-1199 (2000)
78. Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK: Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. Obstet Gynecol 95: 519-524 (2000)
79. Nelen WL, Bulten J, Steegers EA, Blom HJ, Hanselaar AG, Eskes TK: Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. Hum Reprod 15: 954-960 (2000)
80. Nelen WL, Steegers EA, Eskes TK, Blom HJ: Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. J Lancet 350: 861 (1997)
81. Nelen WL, van der Molen EF, Blom HJ, Heil SG, Steegers EA, Eskes TK: Recurrent early pregnancy loss and genetic-related disturbances in folate and homocysteine metabolism. Br J Hosp Med 58: 511-513 (1997)
82. Nishio K, Goto Y, Kondo T, Ito S, Ishida Y, Kawai S, Naito M, Wakai K, Hamajima N: Serum folate and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism adjusted for folate intake. J Epidemiol 18: 125-131 (2008)
83. O'Neill C: Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. Hum Reprod 13: 1312-1316 (1998)
84. Owen EP, Human L, Carolissen AA, Harley EH, Odendaal HJ: Hyperhomocysteinemia--a risk factor for abruptio placentae. J Inherit Metab Dis 20: 359-362 (1997)
85. Paasch U, Salzbrunn A, Glander HJ, Plambeck K, Salzbrunn H, Grunewald S, Stucke J, Vierula M, Skakkebaek NE, Jorgensen N: Semen quality in sub-fertile range for a significant proportion of young men from the general German population: a co-ordinated, controlled study of 791 men from Hamburg and Leipzig. Int J Androl 31: 93-102 (2008)

86. Pavlik R, Hecht S: Einfluss von Homocystein auf die Estradiol-Sekretion humaner Granulosazellen. Geburtsh Frauenheilk 67: 19-22 (2006)
87. Qublan HS, Eid SS, Ababneh HA, Amarin ZO, Smadi AZ, Al-Khafaji FF, Khader YS: Acquired and inherited thrombophilia: implication in recurrent IVF and embryo transfer failure. Hum Reprod 21: 2694-2698 (2006)
88. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP: Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. Hum Reprod 22: 188-196 (2007)
89. Refsum H: Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. Br J Nutr 85 Suppl 2: 109-113 (2001)
90. Ren A, Wang J: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. Fertil Steril 86: 1716-1722 (2006)
91. Reutter H, Birnbaum S, Lacava AD, Mende M, Henschke H, Berge S, Braumann B, Lauster C, Schiefke F, Wenghoefer M, Saffar M, Reich R, Scheer M, Kramer FJ, Knapp M, Mangold E: Family-Based Association Study of the MTHFR Polymorphism C677T in Patients With Nonsyndromic Cleft Lip and Palate from Central Europe. Cleft Palate Craniofac J 45: 267-271 (2008)
92. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G: Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. Fertil Steril 91: 632-638 (2009)
93. Rosenbusch B, Schneider M, Kreienberg R, Brucker C: Cytogenetic analysis of human zygotes displaying three pronuclei and one polar body after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 16: 2362-2367 (2001)
94. Scholl TO, Johnson WG: Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. Am J Clin Nutr 71: 1295-1303 (2000)
95. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK: Embryo transfer: techniques and variables affecting success. Fertil Steril 76: 863-870 (2001)
96. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH: Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. N Engl J Med 332: 286-291 (1995)

97. Sharma R, Agarwal A: Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. Reprod Biol Endocrinol 3: 177-199 (2004)
98. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM: Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. J Lancet 346: 393-396 (1995)
99. Singh K, Singh SK, Sah R, Singh I, Raman R: Mutation C677T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with male infertility in an Indian population. Int J Androl 28: 115-119 (2005)
100. Sonntag B, Schüring A, Simoni M, Kiesel L: Ovarielle Reserve und Stimulierbarkeit. Gynakolo Endokrinol 4: 137-142 (2006)
101. Stauber M: Sterilität und Infertilität. In: Stauber A, Weyerstahl T: Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. Aufl,Thieme, 429-434 (2005)
102. Steegers-Theunissen RP, Steegers EA, Thomas CM, Hollanders HM, Peereboom-Stegeman JH, Trijbels FJ, Eskes TK: Study on the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid. Fertil Steril 60: 1006-1010 (1993)
103. Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA: Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. Obstet Gynecol 104: 336-343 (2004)
104. Stemmer SM: Current progress in early pregnancy investigation. Early Pregnancy 5: 4-8 (2001)
105. Strehler E, Abt M, El-Danasouri I, De Santo M, Sterzik K: Impact of recombinant follicle-stimulating hormone and human menopausal gonadotropins on in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 75: 332-336 (2001)
106. Streiff RR, Little AB: Folic acid deficiency in pregnancy. N Engl J Med 276: 776-779 (1967)
107. Strowitzki T: Indikationsbereiche IVF vs. ICSI. Gynakologe 33: 777-781 (2000)
108. Sutterlin M, Bussen S, Ruppert D, Steck T: Serum levels of folate and cobalamin in women with recurrent spontaneous abortion. Hum Reprod 12: 2292-2296 (1997)

109. Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A: [Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity]. Ginekol Pol 74: 1392-1396 (2003)
110. Tamura T, Picciano MF: Folate and human reproduction. Am J Clin Nutr 83: 993-1016 (2006)
111. Tesarik J, Mendoza C: Spermatid injection into human oocytes. I. Laboratory techniques and special features of zygote development. Hum Reprod 11: 772-779 (1996)
112. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, Bergh C: Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. N Engl J Med 351: 2392-2402 (2004)
113. Tremellen K: Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum Reprod Update 14: 243-258 (2008)
114. Tunc O, Tremellen K: Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. J Assist Reprod Genet 26: 537-544(2009)
115. Van Driel LM, Verkleij-Hagoort AC, de Jonge R, Uitterlinden AG, Steegers EA, van Duijn CM, Steegers-Theunissen RP: Two MTHFR polymorphisms, maternal B-vitamin intake, and CHDs. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 82: 474-481 (2008)
116. Van Voorhis BJ: Clinical practice. In vitro fertilization. N Engl J Med 356: 379-386 (2007)
117. Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi MB, Dada R: Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. Indian J Med Res 129: 127-137 (2009)
118. Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P, Broekmans FJ, Fauser BC: Mild ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod Update 15: 13-29 (2009)
119. Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA: Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. Fertil Steril 75: 252-259 (2001)
120. Welch GN, Loscalzo J: Homocysteine and atherothrombosis. N Engl J Med 338: 1042-1050 (1998)

121. Welch GN, Upchurch GR, Jr., Farivar RS, Pigazzi A, Vu K, Brecher P, Keaney JF, Jr., Loscalzo J: Homocysteine-induced nitric oxide production in vascular smooth-muscle cells by NF-kappa B-dependent transcriptional activation of Nos2. Proc Assoc Am Physicians 110: 22-31 (1998)
122. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP: Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertil Steril 77: 491-498 (2002)
123. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK: Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. Fertil Steril 60: 820-825 (1993)
124. Würfel W: Methoden der assistierten Reproduktion bei andrologischen Indikationen. Blickp Mann 5: 4-11 (2007)
125. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S: The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. Hum Reprod 24: 2683-2687 (2009)
126. Zetterberg H: Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. Reprod Biol Endocrinol 2: 7-15 (2004)

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen recht herzlich bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. med. K. Sterzik danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Dr. med. E. Strehler gilt mein besonderer Dank für die konsequente und motivierende Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit.

Frau B. Einsiedler und Frau K. Hohl danke ich für ihre Hilfe in allen statistischen Fragen.

Nicht zu letzt möchte ich Frau B. Eberle für Ihre Hilfe bei der Datenerfassung danken.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	**Florian Kresse**
Geburtsdatum:	23.08.1980
Anschrift:	Eckstraße 18 89231 Neu-Ulm
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

09/1987 - 07/1989	Grundschule St. Laurentius, Saarburg
09/1989 - 07/1994	Graser- Volksschule, Bayreuth
09/1994 - 07/1996	Graf- Münster Gymnasium, Bayreuth
09/1996 - 06/2001	Stiftung Landheim Schondorf am Ammersee (Gymnasium mit Internat) Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
08/2000- 10/2000	Praktikum bei dem Bayerischen Roten Kreuz, Bayreuth
07/2001 - 04/2002	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr im Sanitätsdienst der Luftwaffe, Neuburg an der Donau
04/2002 - 07/2002	Krankenpflegedienst (im Rahmen der Approbationsordnung) im Krankenhaus „Hohe Warte“ in Bayreuth
08/2002 - 07/2004	Medizinstudium an der Albert Szent- Györgyi Universität, Szeged/ Ungarn Physikum
10/2004 - 10/2008	Medizinstudium an der Universität Ulm
02/2005 -04/2005	Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe Klinikum Bayreuth (Prof. Dr. A. Tulusan)
08/2005 -09/2005	Famulatur im „Centro médico de Caracas“, Caracas/ Venezuela; Teilnahme an der “Fundacion proyecto Maniapure” nahe Caicara del Orinoco/ Venezuela
02/ 2006	Praxisfamulatur Allgemeinmedizin Dr. Kresse, Bayreuth

03/ 2006	Praxisfamulatur Kardiologie Dr. Hornig, Bayreuth
08/2006	Famulatur in der HNO- Klinik in der Universität Ulm (Prof. Rettinger)
08/2007 - 12/2007	Erstes Tertial Praktisches Jahr an der Universitätsfrauenklinik Ulm (Prof. Kreienberg)
12/2007 - 04/2008	Zweites Tertial Praktisches Jahr in der Chirurgie der University of Kwazulu- Natal, Durban/ Südafrika)
04/2008 – 07/2008	Drittes Tertial Praktisches Jahr in der Internistischen Klinik der Universität Ulm (Prof. Adler)
11/2008	Staatsexamen
ab 01/2009	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Ehingen in der Abteilung Gynnäkologie und Geburtshilfe (Chefarzt Dr. K. Gnad und Dr. U. Göretzlehner)

Fremdsprachen

Englisch	fließend
Spanisch	ausgebaute Grundkenntnisse