

Personal pdf file for
C. J. Thaler

With compliments of Georg Thieme Verlag

www.thieme.de

Folate Metabolism and Human Reproduction

DOI 10.1055/s-0034-1383058
Geburtsh Frauenheilk 2014; 74: 845–851

For personal use only.
No commercial use, no depositing in repositories.

Publisher and Copyright:
© 2014 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0016-5751

Reprint with the
permission by
the publisher only

 **Thieme**

Folate Metabolism and Human Reproduction

Folatmetabolismus und menschliche Fortpflanzung

Author

C. J. Thaler^{1,2}

Affiliations

¹ Department and Outpatient Clinic for Gynaecology and Obstetrics, Hospital of the Ludwig Maximilian University of Munich, Großhadern Campus, Hormone & Fertility Centre Großhadern, Munich

² Department and Outpatient Clinic for Gynaecology and Obstetrics, Hospital of the Ludwig Maximilian University of Munich, City Centre Campus, Hormone & Fertility Centre City Centre, Munich

Key words

- assisted reproduction
- folate metabolism
- homocysteine
- human reproduction
- folliculogenesis

Schlüsselwörter

- assistierte Reproduktion
- Folatmetabolismus
- Homocystein
- menschliche Fortpflanzung
- Follikulogenese



Deutschsprachige
Zusatzinformationen
online abrufbar unter:
[www.thieme-connect.de/
ejournals/toc/gebfra](http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/gebfra)

received 31. 7. 2014
revised 13. 8. 2014
accepted 14. 8. 2014

Bibliography

DOI [http://dx.doi.org/
10.1055/s-0034-1383058](http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1383058)
Geburtsh Frauenheilk 2014; 74:
845–851 © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 0016-5751

Correspondence

Prof. Christian J. Thaler
Hormon- & Kinderwunsch-
zentrum Großhadern
Klinik und Poliklinik für Frauen-
heilkunde und Geburtshilfe
Klinikum der Ludwig-Maxi-
milians-Universität München
Campus Großhadern
Marchioninistraße 15
81377 Munich
Thaler@med.uni-muenchen.de

Abstract

Folate metabolism affects ovarian function, implantation, embryogenesis and the entire process of pregnancy. In addition to its well-established effect on the incidence of neural tube defects, associations have been found between reduced folic acid levels and increased homocysteine concentrations on the one hand, and recurrent spontaneous abortions and other complications of pregnancy on the other. In infertility patients undergoing IVF/ICSI treatment, a clear correlation was found between plasma folate concentrations and the incidence of dichorionic twin pregnancies. In patients supplemented with 0.4 mg/d folic acid undergoing ovarian hyperstimulation and oocyte pick-up, carriers of the MTHFR 677T mutation were found to have lower serum estradiol concentrations at ovulation and fewer oocytes could be retrieved from them. It appears that these negative effects can be compensated for in full by increasing the daily dose of folic acid to at least 0.8 mg. In carriers of the MTHFR 677T genotype who receive appropriate supplementation, AMH concentrations were found to be significantly increased, which could indicate a compensatory mechanism. AMH concentrations in homozygous carriers of the MTHFR 677T genotype could even be overestimated, as almost 20% fewer oocytes are retrieved from these patients per AMH unit compared to MTHFR 677CC wild-type individuals.

Biochemistry of Folates and Folic Acid

Folates are folic acid compounds that occur naturally in food; they are part of the vitamin B complex and are an essential nutritional component

Zusammenfassung

Der Folatmetabolismus hat vielfältige Effekte auf ovarielle Funktion, Implantation, Embryogenese und den gesamten Verlauf der Schwangerschaft. Neben dem gut etablierten Einfluss auf die Inzidenz neuraler Fusionsdefekte finden sich Zusammenhänge zwischen verminderten Folsäure- und erhöhten Homocysteinkonzentrationen einerseits und gehäuften Spontanaborten und anderen Schwangerschaftskomplikationen andererseits. Zusätzlich zeigt sich bei Kinderwunschpatientinnen im Rahmen der IVF/ICSI-Behandlung ein deutlicher Zusammenhang zwischen Plasma-Folat-Konzentrationen und der Inzidenz dichorionaler Geminischwangerschaften. Im Rahmen der ovariellen Hyperstimulation finden sich bei Trägerinnen der MTHFR-677T-Mutation unter einer Folsäure-Substitution mit täglich 0,4 mg negative Effekte auf die Zahl gewonnener Oozyten sowie die maximale Konzentration von Östradiol am Tag der Ovulationsauslösung. Diese Effekte sind offenbar vollständig kompensierbar durch Erhöhung der täglichen Folsäuredosis auf mind. 0,8 mg. Bei entsprechend substituierten Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps finden sich die AMH-Konzentrationen signifikant erhöht, was auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten könnte. Tatsächlich könnten die AMH-Konzentrationen homozygoter Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps allerdings überschätzt werden, denn bei ihnen konnten durchschnittlich fast 20% weniger Oozyten pro AMH-Einheit gewonnen werden als bei Individuen mit dem MTHFR-677CC-Wildtyp-Genotyp.

of the human diet. More than 150 folate compounds are known. Folates are characterized by a pteridine and a para-aminobenzoic acid ring, with up to 8 glutamate residues attached to the carboxyl terminus (● Fig. 1). Folates are therefore

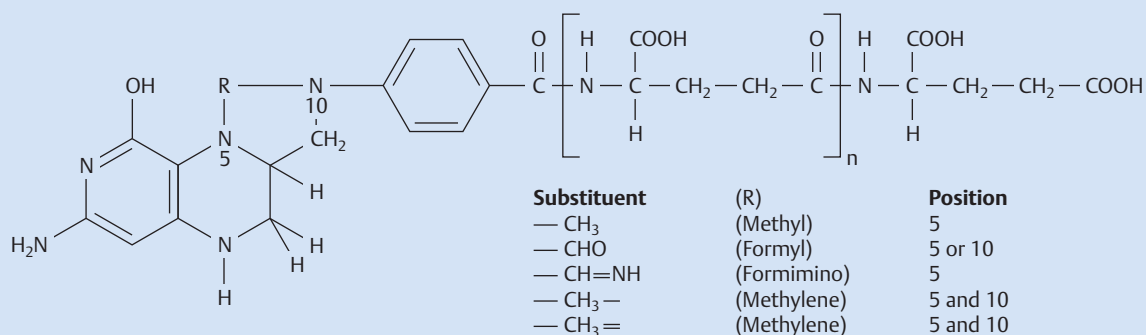


Fig. 1 Folates are characterized by a pteridine and a para-aminobenzoic acid ring, with up to 8 glutamate residues attached to the carboxyl terminus. Synthetic folic acid has a monoglutamate residue at the end of the carboxyl

group; a pteroyl monoglutamate, it is the most stable form of folate. Methylene groups are bound at N-positions 5 and 10. The methylene group at N-position 5 is released on donation of the methyl group (from [1]).

also referred to as pteroyl polyglutamates. Folic acid is a synthetic compound with a monoglutamate residue at the end of the carboxyl group; a pteroyl monoglutamate, it is the most stable form of folate. Folic acid is commonly used in pharmaceuticals and dietary supplements [1]. All of these vitamin-active compounds, whether they are natural or synthetic, are referred to under the umbrella term “folate”. As the term “folic acid” is only used for the synthetic vitamin form, references such as “folic acid requirement” and “folic acid deficiency” are no longer strictly correct [2]. Individual folate compounds demonstrate different absorption rates; folic acid is highly absorbed, whereas the availability of folates from food is limited and difficult to assess on an individual basis. The bio-availability of individual folates in food is primarily influenced by the ratio of mono- and polyglutamates [3], with a mean availability of around 50% in a mixed diet [4].

Folates (from Lat. folium: leaf) are found in green leafy vegetables and wholemeal products. Because of their high water solubility and sensitivity to heat and light, longer storage and cooking times lead to a high loss of folate activity. Overall, folate intake in the European population is insufficient, and this particularly affects people with increased folate requirements, such as women wishing to become pregnant and pregnant women. The German Nutrition Society recommends that pregnant women and women who wish to become pregnant consume at least 0.55 mg of a folic acid equivalent daily, which is rarely achieved without supplementary synthetic folic acid, even when adhering to a folate-rich diet [5].

Metabolism of Homocysteine and Folic Acid

The importance of folate and of sufficient folate intake is because of its role as a precursor to 5-methyltetrahydrofolate, which acts as a methyl group donor for the re-methylation of homocysteine to methionine (● Fig. 2). Folate deficiency thus leads indirectly to elevated plasma homocysteine concentrations. Folate deficiency also results in lower concentrations of S-adenosyl methionine, an important methyl group donor required for epigenetic processes (gene methylation) and for basic processes of cell metabolism (DNA synthesis, protein synthesis).

In addition to folate intake, enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) plays a crucial role in the availability of 5-methyltetrahydrofolate and its methyl groups [1] (● Fig. 2). This

is biologically relevant in view of the numerous, relatively prevalent mutations of the MTHFR gene which significantly influence the stability and thus the functioning of the enzyme. The most common MTHFR mutation is a nucleotide exchange in position 677 of the MTHFR gene, (C<T) which involves amino acid substitution from alanine to valine in position 222 [6–8]. The resulting thermolabile MTHFR variant displays an activity loss of around 70% in homozygous 677TT carriers, and of 35% in heterozygous 677CT individuals. In the Caucasian population, around 10% of people are homozygous (677TT) and 40% heterozygous (677CT). Only 50% display the wild-type (677CC) mutation and thus uninhibited MTHFR activity. The MTHFR 677C>T polymorphism is clinically significant because of the resulting risk of elevated homocysteine concentrations and the reduced availability of S-adenosyl methionine as a methyl group donor [9–11]. However, this can be compensated for by an increasing folic acid or 5-methyltetrahydrofolate intake [1, 6–8, 11, 12].

Clinical Significance of Folate Metabolism

There are numerous indicators that show that folate deficiency alone or in combination with MTHFR mutations and the resulting hyperhomocysteinaemia are associated with higher risks of complications in pregnancy, such as intrauterine growth retardation or increased rates of premature births and miscarriages [1, 12, 13]. This is clinically significant, as patients with recurrent spontaneous abortion (RSA) show a normalisation of initially elevated homocysteine concentrations within a few weeks after starting supplementation with 0.8 mg/d folic acid [13]. The homocysteine-lowering effect is most marked in RSA patients with an MTHFR 677T mutation, as these women initially have the highest homocysteine concentrations at baseline and subsequently showed the greatest decline in concentrations following folic acid supplementation [13].

Folic acid substitution and neural tube defects

The most dramatic effect of folic acid fortification is the drop in the incidence of neural tube defects (NTD) after folic acid substitution. The importance of folate intake for human embryopathy was already suspected in the mid-1960s [14, 15], and extensive empirical evidence for the preventative effect of the vitamin was subsequently collected in the 1980s and 1990s [15–22].

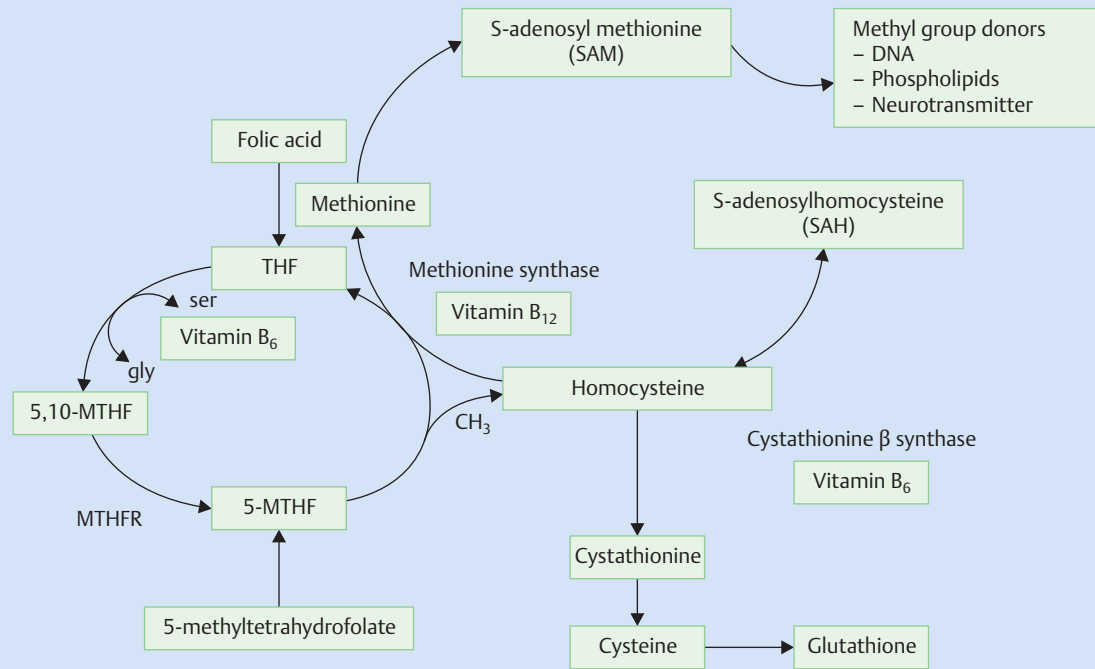


Fig. 2 Folic acid and folates are precursors to 5-methyltetrahydrofolate, which in turn acts as a methyl group donor for the re-methylation of homocysteine to methionine. Folate deficiency thus leads indirectly to elevated plasma homocysteine concentrations. Folate deficiency also results in lower

concentrations of S-adenosyl methionine, an important methyl group donor for epigenetic processes (gene methylation) and for basic processes of cell metabolism (DNA synthesis, protein synthesis).

In a meta-analysis of 8 case control studies Goh et al. were finally able to demonstrate that periconceptual supplementation with folic acid-containing multivitamin preparations (folic acid dosage 360–800 µg/d; continued during the 1st trimester) reduced the NTD risk by 33% (odds ratio [OR]: 0.67; 95% confidence interval: 0.58–0.77) [23]. In their meta-analysis of three cohort studies and a prospective randomised controlled study, Blencowe et al. even found that NTD risk was reduced by 62% by folic acid supplementation prior to conception (95% CI: 0.49–0.71) [24]. In view of this data, more than 50 countries now promote supplementation programmes to improve the folate intake. In the USA and Canada, flour and breakfast cereals are enriched with folate and, despite the relatively low concentrations (additional folic acid intake of 80 to 200 µg/d), the prevalence of NTD has dropped by 19–23% [25–27] and the incidence of spina bifida was reduced by 31% [28].

Folic acid fortification and anovulatory and oligoovulatory sterility

An initially unexpected effect of folic acid substitution on ovulation and subsequent conception rates was found in a subgroup analysis done within the Nurses' Health Study [29]; the study found that the risk of anovulatory or oligoovulatory sterility was significantly reduced following regular folic acid intake, depending on the dosage, and that the incidence of anovulation-related sterility in women with the highest daily folic acid intake (top-most quintile) was reduced by 59%.

Folate Metabolism and Assisted Reproduction

The comprehensive study by Haggarty et al. carried out in the Grampian region of North-east Scotland found that folate status had far-reaching effects on aspects of assisted reproduction [30]. The study determined the regular folate and vitamin B₁₂ intake in detailed individual interviews with 602 women undergoing fertility treatment consisting of in vitro fertilisation (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Serum folate and homocysteine concentrations were measured at the same time. Surprisingly, the analysis discovered that women with a high daily folic acid intake, high plasma folate concentrations and high plasma vitamin B₁₂ concentrations were significantly more likely to conceive twins. All IVF/ICSI patients were assessed following the transfer of 2 viable embryos, and, in addition to maternal age, plasma folate concentrations were found to be a major influencing factor for the rate of clinical twin pregnancies (Fig. 3) [30]. Other indications for a link between folate metabolism and IVF pregnancy rates were reported in a prospective study by Broxmer et al. [31]. They analysed concentrations of homocysteine, vitamin B₁₂ (cobalamin) and folate in the blood and follicular fluids of IVF patients and investigated their effect on pregnancy rates following single embryo transfer. They found a positive correlation between plasma cobalamin concentrations and better embryo morphology as well as a significant association between high folate concentrations in follicular fluid and subsequent pregnancy rates (adjusted odds ratio 3.26; $p < 0.03$). The authors concluded that local folate/homocysteine metabolism in follicular fluid plays a significant role for embryogenesis and pregnancy rates [31].

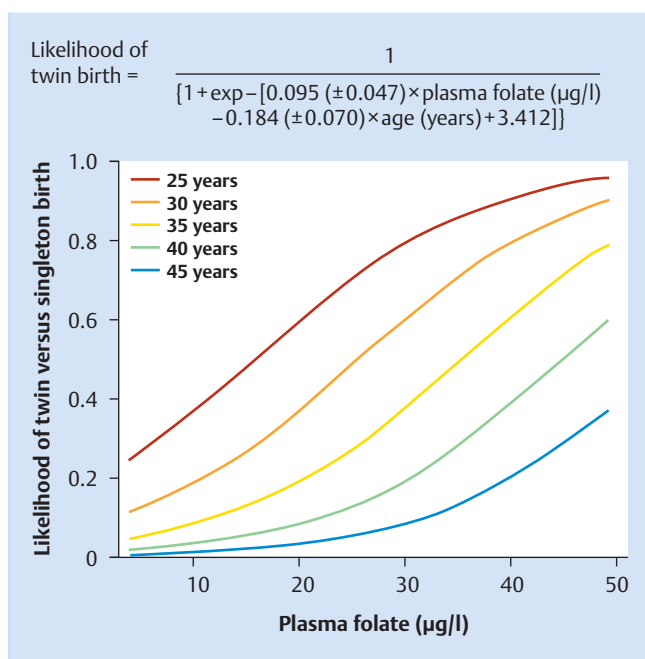


Fig. 3 Probability of twin pregnancy following IVF/ICSI and the subsequent transfer of two viable embryos (Y axis). The likelihood of having a twin pregnancy is dependent on maternal age (the younger the mother, the higher the probability). A positive correlation was found in every age group between the likelihood of twin pregnancy and plasma folate concentrations (X axis) (from [30]).

Table 1 When evaluating different ethnic populations, a negative correlation was found between MTHFR 677TT homozygosity and the incidence of spontaneously conceived dichorionic twins: a relatively high number of MTHFR 677TT homozygous individuals (20%) are reported in Asian populations where dichorionic twins are relatively rare (6 out of 1000). In African populations, the incidence of spontaneously conceived dichorionic twins is relatively high at 30 per 1000, while the incidence of MTHFR 677TT homozygosity is below detection limits. The Caucasian population holds a mid-position, with 11–13 spontaneously conceived twin births out of 1000 and a MTHFR 677TT homozygosity of around 9% (modified from [23]).

	Incidence of twins (1/1000)	TT homozygosity (%)
African populations	32.1	0.0
▶ Ghana		
▶ West Africa		
Caucasian populations	11.0–13.0	9.0
▶ Netherlands		
▶ Central Europe		
Asian populations	6.0	20.0
▶ Hong Kong		
▶ South China		

Folate Metabolism and Ovarian Function

MTHFR 677C>T polymorphism and incidence of dichorionic twins

Our own cohort studies show that the MTHFR 677T genotype is much less common in mothers of spontaneously conceived dichorionic twins compared to mothers with singleton births, and this difference was statistically significant [32]: While the typical genotype distribution in a Central European population was found in 159 mothers with singleton births (49% CC; 42% CT;

50% TT), only 23% of mothers of twins had the heterozygous and 5% of mothers of twins had the homozygous T-allele. This means that the incidence of twins born to T-allele carriers was significantly reduced (0.43; 0.21–0.84; $p = 0.008$) [32]. This negative correlation between MTHFR 677T occurrence and the incidence of spontaneously conceived dichorionic twins is also found in global evaluations of different ethnic populations. A relatively high number of 677T-homozygous individuals (20%) are reported in Asian populations, where the incidence of spontaneous twin births is known to be relatively low (6 out of 1000) compared with African regions, where the incidence of spontaneous dichorionic twins is relatively high at 30 per 1000 and where the incidence of 677T homozygosity is below detection limits. The Caucasian population holds a mid-position, with 11–13 dichorionic twin births out of 1000 and a 677TT homozygosity of around 10% (Table 1) (compiled in [32]).

MTHFR 677 C>T polymorphism and incidence of dichorionic twins

In subsequent studies, we investigated the biological mechanisms behind the influence of the MTHFR 677T mutation on the incidence of dichorionic twins; specifically, we investigated the effect of mutation on folliculogenesis and ovulation, fertilisation and implantation. For this, we used a model of controlled ovarian hyperstimulation and of in-vitro fertilisation. In a total of 992 oocytes, we were able to show that neither in-vitro fertilisation rates nor implantation rates differed significantly within the three different MTHFR 677CT genotypes [33]. However, during controlled ovarian hyperstimulation, we found that MTHFR 677T genotype significantly affected FSH requirement, estradiol concentrations and number of retrieved oocytes. Carriers of the T mutation had significantly higher total levels of active recombinant FSH ($p < 0.03$) but significantly lower maximum estradiol concentrations ($p < 0.002$) and significantly fewer retrieved oocytes ($p < 0.006$). The older the patients were, the more pronounced the effect was [33]. In subsequent studies, we were able to demonstrate that primary cultures of human granulosa-lutein cells from IVF/ICSI patients with the MTHFR 677T genotype displayed significantly lower estradiol synthesis rates under standardised conditions in vitro [34]. The MTHFR effect was independent of FSH and LH receptor expression and function, as stimulation rates from recombinant FSH and LH were independent of MTHFR 677CT genotype (Figs. 4a to c) [34].

MTHFR 677 C>T polymorphism and increased folic acid substitution

Extensive studies suggest that the increased risk for neural tube defects [11, 12, 14–29] and spontaneous abortion [35] and the increased homocysteine concentrations associated with MTHFR 677T mutation [13] can be compensated for by increased folate substitution. Our own initial investigations into the influence of MTHFR 677T mutation on the incidence of dichorionic twin pregnancies were conducted using folic acid substitution at a dose of just 0.4 mg/d, as recommended at the time [32]. Daily folic acid substitution during our studies into MTHFR 677T effects on ovarian hyperstimulation and estradiol synthesis also only consisted of 0.4 mg/d [33]. The American study by Rosen et al. then suggested for the first time that the MTHFR 677T effect on ovarian hyperstimulation could be reversed by a significantly higher folate intake, as is common in the USA (folic acid supplements in flour and cereals, higher vitamin doses in vitamin B tablets) [36]. In a follow-up study, we therefore investigated 271 IVF/ICSI

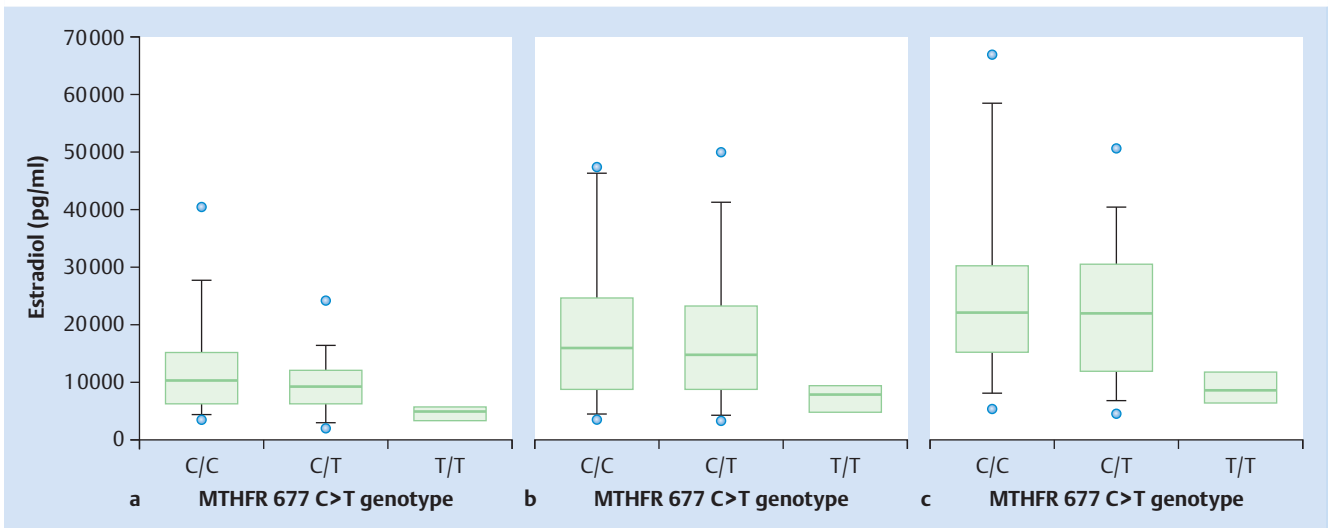


Fig. 4a to c Estradiol production by human granulosa cells obtained from the follicular fluids of IVF/ICSI patients and cultivated for 72 hours. Granulosa cells from homozygous carriers of the MTHFR 677TT mutation displayed significantly lower estradiol synthesis and release ($p < 0.006$). This same effect

was found for unstimulated (a), FSH-stimulated (b) and LH-stimulated (c) granulosa cells, indicating that the MTHFR-677T effect is not primarily produced through the expression or function of gonadotropin receptors (from [34]).

patients who were given a daily dose of at least 0.8 mg/d folic acid or 0.4 mg/d folic acid in combination with 0.4 mg/d 5-methyltetrahydrofolate. In order to verify compliance with this folic acid regime, we individually interviewed a sample consisting of 71 of these patients about the regularity and dosage of their folic acid intake; in all cases we were able to confirm that the prescribed folic acid supplementation was taken regularly and correctly (Dr. Roman Pavlik, personal statement). We found significant changes in the key data for hyperstimulation treatment with this increased folic acid dosage, compared to our initial publication which was based on an intake of 0.4 mg folic acid/day. In contrast to the initial publication, we now found no direct MTHFR 677T effects on FSH requirement or the number of oocytes. However, multiple linear regression analysis again confirmed the negative influence of the MTHFR 677 TT genotype on the number of retrieved oocytes ($p = 0.008$) [37]. This initially unexpected finding could be explained by significantly increased anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations in carriers of the MTHFR 677T genotype. Mean AMH concentrations in homozygous carriers of the MTHFR 677T genotype were highly significantly and heterozygous carriers of the MTHFR 677CT genotype were significantly ($p = 0.002$ and $p = 0.04$, respectively) higher than in MTHFR 677CC wild-type patients (● Fig. 5) [37]. The elevated AMH values in carriers of the MTHFR 677T genotype indicate an increased rate of recruited follicles, suggesting a compensatory mechanism, whereby increased folate fortification compensates for the initially reduced cyclical recruiting in carriers of the MTHFR 677T genotype. Folate substitution with at least 0.8 mg/d thus completely nullifies the negative MTHFR 677T effect on the total number of retrieved oocytes, suggesting that folate fortification would be advisable for IVF/ICSI patients. At least in carriers of the MTHFR 677T genotype, increased folic acid substitution was associated with a relative increase in AMH concentrations [37]. The significant correlation between AMH concentrations and number of oocytes described above was confirmed for all 3 MTHFR 677CT genotypes ($p < 0.001$), with the regression line for MTHFR 677CC wild-type patients shifted upwards by almost 20% compared with MTHFR 677TT individuals (● Fig. 6; [37]). This

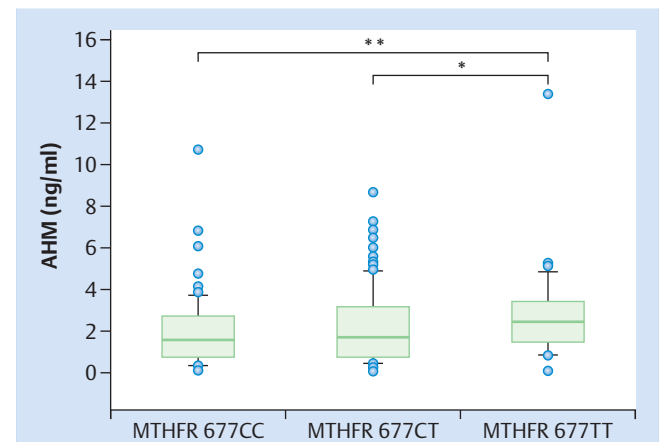


Fig. 5 Under substitution with at least 0.8 mg/d folic acid, AMH concentrations in IVF/ICSI patients with a homozygous MTHFR 677TT mutation are significantly higher compared to heterozygous MTHFR 677CT patients ($* p < 0.04$) or wild-type MTHFR 677CC patients ($** p < 0.002$). This is particularly remarkable in view of the fact that there were no differences in the total number of retrieved oocytes between the different MTHFR 677 genotypes (from [37]).

has a practical significance for clinical practice. It is important to be aware that AMH levels in 677TT patients, at least in patients receiving folate supplementation, are around 20% higher, meaning that these levels could be interpreted as “incorrectly too high”. In fact, the regression lines in ● Fig. 6 show that oocyte numbers are approximately 20% lower at same AMH concentrations and with the stimulation regime in homozygous carriers of the MTHFR 677TT genotype. It is therefore advisable to factor in the individual MTHFR 677CT genotype and folate supplementation in the assessment of AMH concentrations.

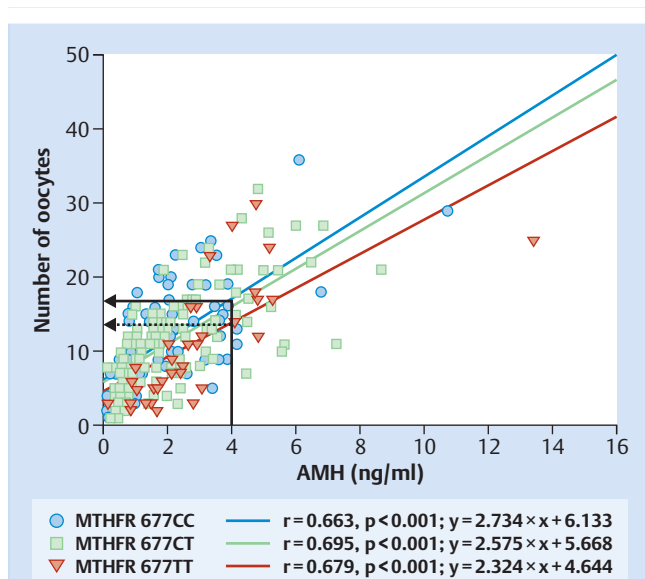


Fig. 6 The significant ($p < 0.001$) correlation between AMH concentrations and number of retrieved oocytes following controlled ovarian hyperstimulation and follicular puncture is also found in individual evaluations of the three MTHFR 677 genotypes. However, the correlation line for IVF/ICSI carriers of the homozygous MTHFR 677TT mutation (red line) shifts downwards, i.e. towards lower oocyte numbers. Patients with AMH concentrations of 4 ng/ml and the MTHFR 677TT genotype were found to have an average of 13 oocytes (arrow with broken line on the left), while carriers of the wild-type MTHFR 677CC genotype on the same stimulation regime had an average of 16 oocytes (arrow with continuous line on the left). This is clinically relevant because AMH concentrations in carriers of the homozygous MTHFR 677TT mutation could be overestimated by around 20%, at least with regard to expected oocyte numbers (modified from [37]).

Conclusions

Folate metabolism affects ovarian function, implantation, embryogenesis and the entire process of pregnancy. In addition to its well-established effect on the incidence of neural tube defects, associations have been found between reduced folic acid levels and increased homocysteine concentrations on the one hand, and recurrent spontaneous abortion and other complications of pregnancy on the other. In infertility patients undergoing IVF/ICSI treatment, a clear correlation was found between plasma folate concentrations and the incidence of dichorionic twin pregnancies. Negative effects on the number of retrieved oocytes and maximum estradiol concentrations on the day ovulation is triggered have been reported for MTHFR 677T patients under folic acid substitution of 0.4 mg daily undergoing ovarian hyperstimulation. These effects can be compensated for in full by increasing the daily dose of folic acid to at least 0.8 mg; this daily dosage seems advisable for IVF/ICSI patients. AMH concentrations are significantly increased in carriers of the MTHFR 677TT genotype who undergo adequate substitution, which could indicate a compensatory mechanism. In fact, AMH concentrations could even be overestimated in homozygous MTHFR 677TT carriers, as almost 20% fewer oocytes are retrieved from them per AMH unit compared to carriers of the MTHFR 677CC wild-type.

Acknowledgement

I would like to take this opportunity to give special thanks to Professor Friese. In recent years, he has made a major contribution to stabilising and strengthening gynaecological endocrinology and reproductive medicine in the LMU gynaecology departments with regard to staff, structures and equipment.

Conflict of Interest

I have given lectures on folic acid for Merck Selbstmedikation and Aristo Pharma.

References

- 1 Ströhle A, Wolters M, Willers J et al. Mikronährstoffe in den verschiedenen Lebensphasen der Frau (Teil 3) – Schwangerschaft: Nahrung für einen optimalen Start ins Leben. *Gyne* 2014; 5: 33–39
- 2 Brönstrup A. Folat und Folsäure. *Ernähr Umschau* 2007; 9: 538–544
- 3 Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients* 2011; 3: 475–490
- 4 Saubertich HE, Kretsch MJ, Skala JH et al. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 1016–1028
- 5 Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr: Folat. Online: <http://www.dge.de/pdf/ws/Referenzwerte-2013-Folat.pdf>; last access: 23.07.2014
- 6 Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111–113
- 7 Kang SS, Zhou J, Wong PW et al. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414–421
- 8 McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK et al. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* 1996; 83: 195–198
- 9 Verhoeff BJ, Trip MD, Prins MH et al. The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 161–166
- 10 Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW et al. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia. *QJM* 1996; 89: 571–577
- 11 Jacques PF, Bostom AG, Williams RR et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7–9
- 12 Ströhle A, Wolters M, Hahn A. Nährstoffsupplemente – Möglichkeiten und Grenzen. Teil 2: Ausgewählte Risikogruppen – Supplemente in der Schwangerschaft. *Med Monatsschr Pharm* 2013; 36: 252–266
- 13 Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998; 128: 1336–1341
- 14 Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965; 1: 1254
- 15 Laurence KM, James N, Miller MH et al. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981; 282: 1509–1511
- 16 Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832–1835
- 17 Czeizel AE. Controlled studies of multivitamin supplementation on pregnancy outcomes. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 678: 266–275
- 18 Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child* 1981; 56: 911–918
- 19 Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ et al. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980; 1: 339–340
- 20 Smithells RW, Sheppard S, Wild J et al. Prevention of neural tube defect recurrences in Yorkshire: final report. *Lancet* 1989; 2: 498–499

- 21 *Smithells RW*. Multivitamins for the prevention of neural tube defects. How convincing is the evidence? *Drugs* 1989; 38: 849–854
- 22 Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991; 338: 131–137
- 23 *Goh YI, Bollano E, Einarson TR et al*. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28: 680–689
- 24 *Blencowe H, Cousens S, Modell B et al*. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* 2010; 39 (Suppl. 1): i110–i121
- 25 *Choumenkovitch SF, Selhub J, Wilson PW et al*. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. *J Nutr* 2002; 132: 2792–2798
- 26 *Quinlivan EP, Gregory JF 3rd*. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 221–225
- 27 *Dietrich M, Brown CJ, Block G*. The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr* 2005; 24: 266–274
- 28 *Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD et al*. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology* 2002; 66: 33–39
- 29 *Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA et al*. Use of multivitamins, intake of B vitamins, and risk of ovulatory infertility. *Fertil Steril* 2008; 89: 668–676
- 30 *Haggarty P, McCallum H, McBain H et al*. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006; 367: 1513–1519
- 31 *Boxmeer JC, Macklon NS, Lindemans J et al*. IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum Reprod* 2009; 24: 1059–1066
- 32 *Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ*. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C→T mutation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2659–2662
- 33 *Thaler CJ, Budiman H, Ruebsamen H et al*. Effects of the common 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness to recombinant follicle-stimulating hormone. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 251–258
- 34 *Hecht S, Pavlik R, Lohse P et al*. Common 677C→T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects follicular estradiol synthesis. *Fertil Steril* 2009; 91: 56–61
- 35 *Quéré I, Mercier E, Bellet H et al*. Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hyperhomocysteinemia. *Fertil Steril* 2001; 75: 823–825
- 36 *Rosen MP, Shen S, McCulloch CE et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertil Steril* 2007; 88: 632–638
- 37 *Pavlik R, Hecht S, Ochsenkühn R et al*. Divergent effects of the 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness and anti-Müllerian hormone concentrations. *Fertil Steril* 2011; 95: 2257–2262



Folatmetabolismus und menschliche Fortpflanzung

Folate Metabolism and Human Reproduction

Autor

C. J. Thaler^{1,2}

Institute

¹ Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern, Hormon- & Kinderwunschzentrum Großhadern, München

² Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Innenstadt, Hormon- & Kinderwunschzentrum Innenstadt, München

Schlüsselwörter

- assistierte Reproduktion
- Folatmetabolismus
- Homocystein
- menschliche Fortpflanzung
- Follikulogenese

Key words

- assisted reproduction
- folate metabolism
- homocysteine
- human reproduction
- folliculogenesis

eingereicht 31. 7. 2014

revidiert 13. 8. 2014

akzeptiert 14. 8. 2014

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1383058>
 Geburtsh Frauenheilk 2014; 74: 1–7 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0016-5751

Korrespondenzadresse

Prof. Christian J. Thaler
 Hormon- & Kinderwunschzentrum Großhadern
 Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
 Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
 Campus Großhadern
 Marchioninistraße 15
 81377 München
 Thaler@med.uni-muenchen.de

Zusammenfassung

Der Folatmetabolismus hat vielfältige Effekte auf ovarielle Funktion, Implantation, Embryogenese und den gesamten Verlauf der Schwangerschaft. Neben dem gut etablierten Einfluss auf die Inzidenz neuraler Fusionsdefekte finden sich Zusammenhänge zwischen verminderten Folsäure- und erhöhten Homocysteinkonzentrationen einerseits und gehäuftem Spontanaborten und anderen Schwangerschaftskomplikationen andererseits. Zusätzlich zeigt sich bei Kinderwunschpatientinnen im Rahmen der IVF/ICSI-Behandlung ein deutlicher Zusammenhang zwischen Plasma-Folat-Konzentrationen und der Inzidenz dichorialer Geminischwangerschaften. Im Rahmen der ovariellen Hyperstimulation finden sich bei Trägerinnen der MTHFR-677T-Mutation unter einer Folsäure-Substitution mit täglich 0,4 mg negative Effekte auf die Zahl gewonnener Oozyten sowie die maximale Konzentration von Östradiol am Tag der Ovulationsauslösung. Diese Effekte sind offenbar vollständig kompensierbar durch Erhöhung der täglichen Folsäuredosis auf mind. 0,8 mg. Bei entsprechend substituierten Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps finden sich die AMH-Konzentrationen signifikant erhöht, was auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten könnte. Tatsächlich könnten die AMH-Konzentrationen homozygoter Trägerinnen des MTHFR-677TT-Genotyps allerdings überschätzt werden, denn bei ihnen konnten durchschnittlich fast 20% weniger Oozyten pro AMH-Einheit gewonnen werden als bei Individuen mit dem MTHFR-677CC-Wildtyp-Genotyp.

Biochemie von Folaten und Folsäure

Als Folate bezeichnet man die natürlicherweise in Lebensmitteln vorkommenden Folsäureverbindungen, die einen Teil des Vitamin-B-Komplexes

Abstract

Folate metabolism affects ovarian function, implantation, embryogenesis and the entire process of pregnancy. In addition to its well-established effect on the incidence of neural tube defects, associations have been found between reduced folic acid levels and increased homocysteine concentrations on the one hand, and recurrent spontaneous abortions and other complications of pregnancy on the other. In infertility patients undergoing IVF/ICSI treatment, a clear correlation was found between plasma folate concentrations and the incidence of dichorionic twin pregnancies. In patients supplemented with 0.4 mg/d folic acid undergoing ovarian hyperstimulation and oocyte pick-up, carriers of the MTHFR 677T mutation were found to have lower serum estradiol concentrations at ovulation and fewer oocytes could be retrieved from them. It appears that these negative effects can be compensated for in full by increasing the daily dose of folic acid to at least 0.8 mg. In carriers of the MTHFR 677TT genotype who receive appropriate supplementation, AMH concentrations were found to be significantly increased, which could indicate a compensatory mechanism. AMH concentrations in homozygous carriers of the MTHFR 677TT genotype could even be overestimated, as almost 20% fewer oocytes are retrieved from these patients per AMH unit compared to MTHFR 677CC wild-type individuals.

darstellen und essenzieller Nahrungsbestandteil sind. Insgesamt sind mehr als 150 Folatverbindungen bekannt, wobei diese sich jeweils durch einen Pteridin- und einen para-Aminobenzoesäurering auszeichnen, an dessen Carboxylende bis

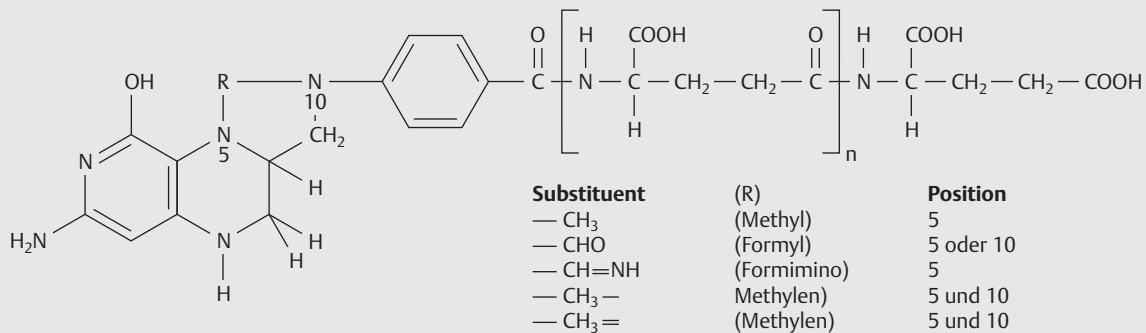


Abb. 1 Folate zeichnen sich jeweils durch einen Pteridin- und einen para-Aminobenzoesäuerung aus, an dessen Carboxylende bis zu 8 Glutamatreste gekoppelt sind ($n = 8$). Die synthetische Folsäure weist am Ende der Carboxylgruppe einen Monoglutamatrest ($n = 1$) auf und stellt als Pteroylmono-

glutamat die stabilste Folatform dar. An den N-Positionen 5- und 10 können Methylengruppen gebunden werden. Die Methylengruppe an der N-Position 5 wird bei der Donation der Methylgruppe freigesetzt (aus [1]).

zu 8 Glutamatreste gekoppelt sind (● **Abb. 1**). Man spricht daher auch von Pteroylpolyglutamat. Davon abzugrenzen ist die Folsäure, eine synthetische Verbindung, die am Ende der Carboxylgruppe einen Monoglutamatrest aufweist und als Pteroylmonoglutamat die stabilste Folatform darstellt. Sie wird üblicherweise in Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt [1]. Alle vitaminaktiven Verbindungen, seien sie natürlichen oder synthetischen Ursprungs, werden unter dem Oberbegriff Folat zusammengefasst. Da der Begriff „Folsäure“ nur für die synthetische Vitaminform verwendet wird, sind Bezeichnungen wie „Folsäurebedarf“ und „Folsäuremangel“ streng genommen nicht mehr korrekt [2]. Die einzelnen Folatverbindungen weisen eine unterschiedliche Absorptionsrate auf: So wird Folsäure nahezu quantitativ aufgenommen, während die Verfügbarkeit der Folate aus Nahrungsmitteln eingeschränkt und im Einzelfall schwer abschätzbar ist. Die Bioverfügbarkeit einzelner Folate wird primär beeinflusst vom Verhältnis der Mono- und Polyglutamate in der Nahrung [3], wobei die mittlere Verwertbarkeit bei einer gemischten Kost bei etwa 50% liegt [4].

Folate finden sich in grünem Blattgemüse (Folium: das Blatt) sowie in Vollkornprodukten. Angesichts der hohen Wasserlöslichkeit und der Hitze- und Lichtempfindlichkeit führen längere Lager- und Kochzeiten zu einem hohen Verlust an Folataktivität. Insgesamt ist die Folatversorgung der europäischen Bevölkerung unzureichend und dies betrifft besonders Menschen mit erhöhtem Folatbedarf, wie etwa Frauen mit Kinderwunsch und Schwangere. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt für Schwangere und Frauen mit Kinderwunsch die tägliche Aufnahme von mind. 0,55 mg Folsäure-Äquivalent, was auch bei bewusst folatreicher Ernährung ohne Zusatz synthetischer Folsäure nur selten erreicht wird [5].

Metabolismus von Homocystein und Folsäure

Die hohe Bedeutung von Folat und einer adäquaten Zufuhr ergibt sich besonders aus dessen Rolle als Vorläufer von 5-Methyl-Tetrahydrofolat (Metafolin), welches wiederum als Methylgruppendonator für die Re-Methylierung von Homocystein zu Methionin fungiert (● **Abb. 2**). Entsprechend führt ein Folatmangel indirekt zu erhöhten Plasma-Homocystein-Konzentrationen. Sekundär ergeben sich auch geringere Konzentrationen an S-Adenosyl-Methionin, welches wiederum als wichtiger Methylgruppen-

donator, u. a. für epigenetische Vorgänge (Methylierung von Genen) und für elementare Prozesse des Zellmetabolismus (DNA-Synthese, Proteinsynthese) erforderlich ist.

Neben der Menge an aufgenommenen Folaten spielt die Funktion des Enzyms Methylen-Tetra-Hydrofolat-Reduktase (MTHFR) für die Verfügbarkeit von Metafolin und damit dessen Methylgruppen eine entscheidende Rolle [1] (● **Abb. 2**). Dies ist biologisch relevant angesichts mehrerer, relativ prävalenter Mutationen im MTHFR-Gen, welche die Stabilität und damit die Funktion des Enzyms wesentlich beeinflussen. Die häufigste MTHFR-Mutation ergibt sich durch einen Nucleotidaustausch in Position 677 des MTHFR-Gens, (C<T) was in Position 222 einen Aminosäureaustausch von Alanin nach Valin mit sich bringt [6–8]. Die entstehende thermolabile MTHFR-Variante zeigt bei homozygoten 677TT-Trägern einen Aktivitätsverlust um etwa 70%, bei heterozygoten 677CT-Individuen um 35%. In der kaukasischen Bevölkerung sind etwa 10% der Menschen homozygot (677TT) und 40% heterozygot (677CT) betroffen. Lediglich 50% zeigen den Wildtyp (677CC) und damit die unverminderte MTHFR-Aktivität. Klinisch bedeutsam ist der MTHFR-677C>T-Polymorphismus angesichts des hieraus resultierenden Risikos für erhöhte Homocysteinkonzentrationen und verminderte Verfügbarkeit von S-Adenosyl-methionin als Methylgruppendonator [9–11]. Dies kann allerdings durch erhöhte Aufnahme von Folsäure oder Metafolin kompensiert werden [1, 6–8, 11, 12].

Klinische Bedeutung des Folatmetabolismus

Es finden sich umfangreiche Hinweise, wonach der Folatmangel alleine oder in Kombination mit entsprechenden MTHFR-Mutationen bzw. die resultierende Hyperhomocysteinämie mit höheren Risiken für Schwangerschaftskomplikationen, etwa der intrauterinen Wachstumsretardierung oder gehäuften Früh- und Fehlgeburten, assoziiert sind [1, 12, 13]. Dieser Aspekt erscheint klinisch von erheblicher Bedeutung, zumal betroffene Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten (RSA) durch Gabe von 0,8 mg Folsäure innerhalb weniger Wochen eine Normalisierung der zunächst erhöhten Homocysteinkonzentrationen zeigen [13]. Tatsächlich ist dieser Effekt am deutlichsten für RSA-Patientinnen mit einer MTHFR-677T-Mutation, denn diese Frauen hatten zunächst die höchsten, nach der Folsäuretherapie dagegen die niedrigsten Homocysteinkonzentrationen [13].

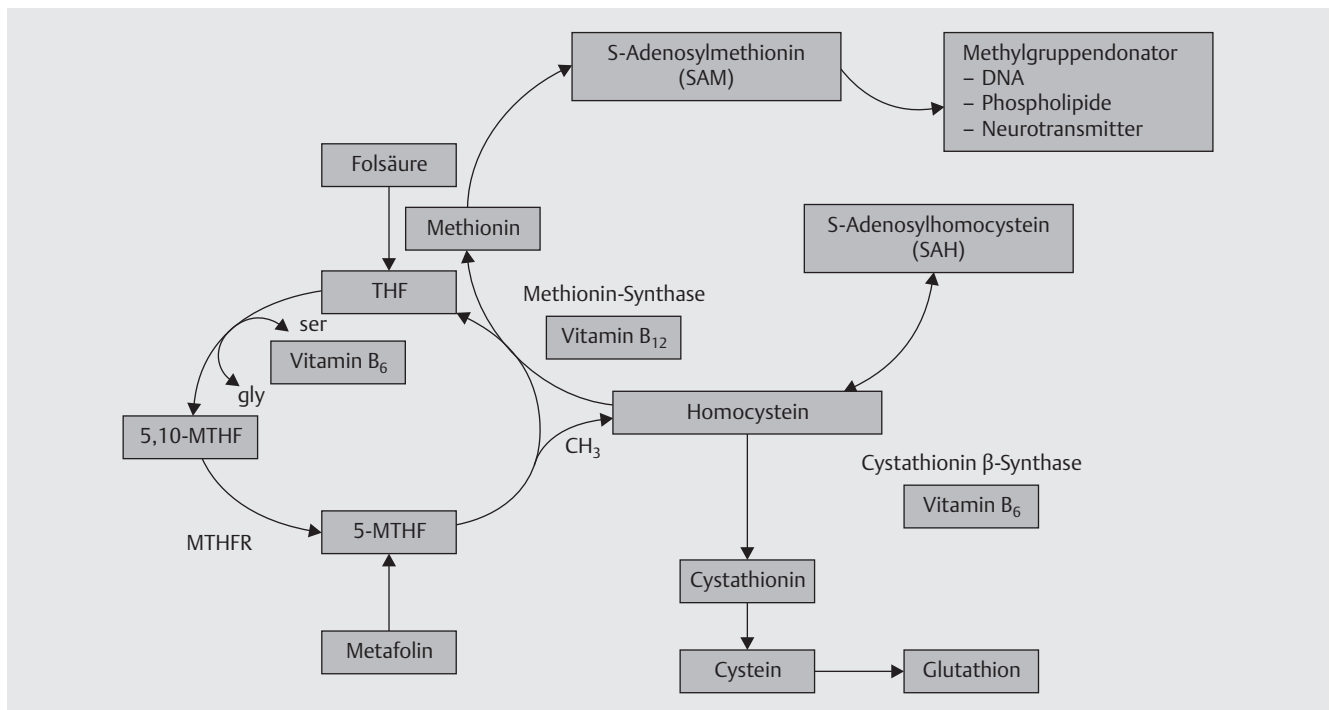


Abb. 2 Folsäure bzw. Folate sind Vorläufer von 5-Methyl-Tetrahydrofolat (Metafolin), das wiederum als Methylgruppendonor für die Re-Methylierung von Homocystein zu Methionin fungiert. Entsprechend führt ein Folatmangel indirekt zu erhöhten Plasma-Homocystein-Konzentrationen. Sekun-

där ergeben sich auch geringere Konzentrationen an S-Adosyl-Methionin, welches wiederum als wichtiger Methylgruppendonor, u. a. für epigenetische Vorgänge (Methylierung von Genen) und für elementare Prozesse des Zellmetabolismus (DNA-Synthese, Proteinsynthese) erforderlich ist.

Folsäuresubstitution und neurale Fusiondefekte

Am eindrucksvollsten sind die Effekte der Folsäure-Fortikation auf die Inzidenz neuraler Fusionsdefekte (NRD) belegt. Bereits Mitte der 1960er-Jahre vermutet [14,15], konnten in den 1980er- und 1990er-Jahren umfangreiche empirische Belege für einen präventiven Effekt des Vitamins erbracht werden [15–22]. Schließlich konnten Goh et al. anhand einer Metaanalyse von 8 Fallkontrollstudien zeigen, dass die perikonzeptionelle Supplementierung mit folsäurehaltigen Multivitaminpräparaten (Folsäuredosis 360–800 µg/d; fortgesetzt während des 1. Trimesters) das NRD-Risiko um 33% vermindert (Odds Ratio [OR]: 0,67; 95%-Konfidenzintervall: 0,58–0,77) [23]. In ihrer Metaanalyse von 3 Kohortenstudien und einer prospektiv randomisiert kontrollierten Studie ermittelten Blencowe et al. sogar ein um 62% reduziertes NRD-Risiko, wenn präkonzeptionell Folsäuresupplemente zugeführt wurden (95%-KI: 0,49–0,71) [24].

Angesichts dieser Daten praktizieren mehr als 50 Länder inzwischen Anreicherungsprogramme zur Verbesserung der Folatversorgung. So werden in den USA und in Kanada Mehle und Frühstückszerealien mit Folat angereichert, und hier konnte trotz der relativ geringen Konzentration (zusätzliche Folsäureaufnahme 80 bis 200 µg/d) eine Reduktion der NRD-Prävalenz um 19–23% [25–27] und der Spina bifida um 31% [28] erreicht werden.

Folsäuresubstitution und an-/oligoovulatorische Sterilität

Ein zunächst ungeahnter Einfluss der Folsäuresubstitution auf Ovulation und nachfolgende Konzeptionsraten ergibt sich aus einer Subgruppenanalyse der Nurses Health Study [29]: Hier fand sich das Risiko einer an-/oligoovulatorischen Sterilität signifikant und dosisabhängig durch regelmäßige Einnahme von

Folsäure vermindert, und bei Frauen mit der höchsten täglichen Folsäureeinnahme (oberste Quintile) fand sich die Inzidenz einer anovulationsbedingten Sterilität um 59% reduziert.

Folatmetabolismus und assistierte Reproduktion

Umfangreiche Effekte des Folatmetabolismus auf Rahmenaspekte der assistierten Fortpflanzung ergeben sich aus der flächendeckenden Studie von Paul Haggarty et al. in der Grampian Region von Nord-Ost-Schottland [30]. Hier wurden bei insgesamt 602 Patientinnen im Rahmen von Behandlungszyklen mittels In-vitro-Fertilisation (IVF) oder intrazytoplasmatischer Spermatozoen-Injektion (ICSI) sehr aufwendig in Einzelinterviews die regelmäßige Aufnahme von Folat und Vitamin B₁₂ ermittelt. Gleichzeitig wurden die Konzentrationen von Plasmafolat und Homocystein gemessen. Völlig überraschend ergab diese Auswertung, dass Frauen mit hoher täglicher Folsäureeinnahme, hohen Plasmafolatkonzentrationen sowie hohen Plasmavitamin-B₁₂-Konzentrationen signifikant häufiger Gemini konzipierten. Tatsächlich fand sich bei der Auswertung aller IVF/ICSI-Patientinnen nach Transfer von 2 entwicklungsfähigen Embryonen die Plasmafolatkonzentration neben dem Lebensalter als wesentlicher Einflussfaktor auf die Rate klinischer Geminischwangerschaften (Abb. 3) [30].

Weitere Hinweise auf den Zusammenhang von Folsäuremetabolismus und IVF-Schwangerschaftsraten ergab eine prospektive Studie von Broxmer et al. [31]: Sie analysierten Konzentrationen von Homocystein, Vitamin B₁₂ (Cobalamin) und Folat in Blut und Follikelflüssigkeiten von IVF-Patientinnen und untersuchte deren Einfluss auf die Schwangerschaftsraten nach Single Embryo

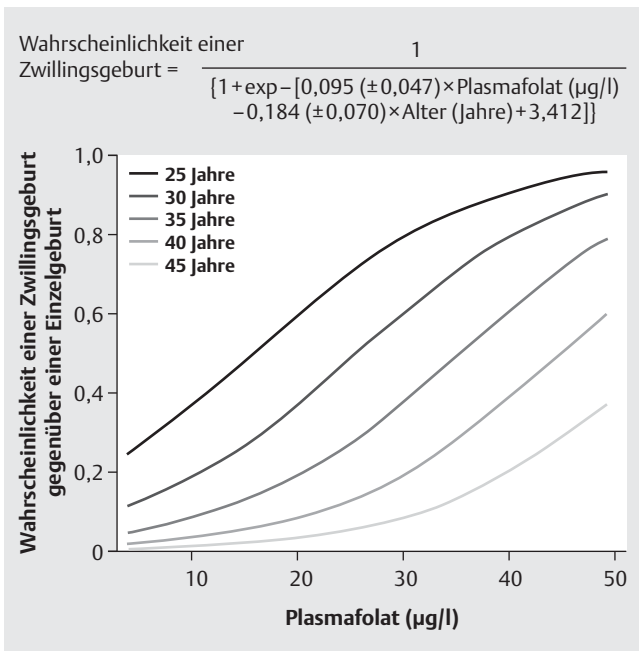


Abb. 3 Wahrscheinlichkeit einer Geminischwangerschaft nach IVF/ICSI und dem nachfolgenden Transfer von 2 entwicklungsfähigen Embryonen (Y-Achse). Die Geminiwahrscheinlichkeit ist vom Alter der Patientinnen abhängig (je jünger, umso höher). Zusätzlich findet sich die Geminiwahrscheinlichkeit in jeder Altersgruppe positiv korreliert mit der Plasmafolatkonzentrationen (X-Achse) (aus [30]).

Tab. 1 Bei der Betrachtung unterschiedlicher ethnischer Populationen findet sich eine negative Beziehung zwischen der MTHFR-677TT-Homozygotie und der Inzidenz spontan konzipierter dichorialischer Geminigeburten: Bei Asiatinnen werden relativ viele MTHFR-677TT-homozygote Individuen (20%) beschrieben, und hier sind dichoriale Geminigeburten relativ selten (6 auf 1000). Bei Afrikanerinnen ist die Inzidenz spontan konzipierter dichorialischer Geminigeburten mit 30 pro 1000 relativ hoch, während die Inzidenz der MTHFR-677TT-Homozygotie unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die kaukasische Bevölkerung nimmt bei dieser Gegenüberstellung mit 11–13 spontan konzipierten Geminigeburten auf 1000 und mit einer MTHFR-677TT-Homozygotie von 9% eine Mittelstellung ein (modifiziert nach [23]).

	Zwillingsinzidenz (1/1 000)	TT-Homozygotie (%)
Afrikaner	32,1	0,0
▶ Ghana		
▶ Westafrika		
Kaukasier	11,0–13,0	9,0
▶ Niederlande		
▶ Zentraleuropa		
Asiaten	6,0	20,0
▶ Hongkong		
▶ Südchina		

Transfer. Hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen plasmatischen Cobalaminkonzentrationen und günstiger embryonaler Morphologie sowie ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohen Folatkonzentrationen in der Follikelflüssigkeit und nachfolgenden Schwangerschaftsraten (adjustierte Odds Ratio 3,26; $p < 0,03$). Die Autoren zogen den Schluss, dass der lokale Folat/Homocysteinmetabolismus in der Follikelflüssigkeit erheb-

liche Bedeutung für die resultierende Embryogenese sowie die nachfolgende Schwangerschaftsrate besitzt [31].

Folatmetabolismus und ovarielle Funktion

▼ MTHFR-677C>T-Polymorphismus und dichoriale Geminizidenz

Eigene Kohortenuntersuchungen zeigen, dass bei Müttern spontan konzipierter dichorialischer Gemini gegenüber Einlingsmüttern der funktionseinschränkende MTHFR-677T-Genotyp hochsignifikant seltener nachweisbar ist [32]: Während sich bei 159 Einlingsmüttern die bekannte Genotypverteilung der mitteleuropäischen Bevölkerung nachweisen ließ (49% CC; 42% CT; 50% TT), fanden sich bei den Zwillingmüttern lediglich 23% mit hetero- und 5% mit homozygotem T-Allel. Hieraus errechnet sich für T-Allel-Träger eine signifikante Reduktion der Geminizidenz auf 0,43 (0,21–0,84; $p = 0,008$) [32]. Diese negative Korrelation von MTHFR-677T-Auftreten und der Inzidenz spontan konzipierter dichorialischer Geminigeburten findet sich auch bei der weltweiten Betrachtung unterschiedlicher ethnischer Populationen wieder: tatsächlich werden bei Asiatinnen mit der hier bekannten relativ geringen Inzidenz spontaner Geminigeburten (6 auf 1000) relativ viele 677T-homozygote Individuen (20%) beschrieben, gegenüber afrikanischen Regionen, in denen die spontane Inzidenz dichorialischer Gemini mit 30 pro 1000 relativ hoch ist und in denen die Inzidenz der 677T-Homozygotie offenbar unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die kaukasische Bevölkerung nimmt bei dieser Gegenüberstellung mit 11–13 dichorialischen Geminigeburten auf 1000 und einer 677T-Homozygotie von knapp 10% jeweils eine Mittelstellung ein (▶ **Tab. 1**) (Zusammenstellung in [32]).

MTHFR-677C>T-Polymorphismus und dichoriale Geminizidenz

In nachfolgenden Untersuchungen analysierten wir die Frage nach dem biologischen Mechanismus für den Einfluss der MTHFR-677T-Mutation auf die Inzidenz dichorialischer Gemini: Konkret untersuchten wir dabei den Effekt der Mutation auf Follikulogenese und Ovulation, auf die Fertilisation und/oder die Implantation. Wir nutzten hierzu das Modell der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation und das der In-vitro-Fertilisation. Zunächst konnten wir an insgesamt 992 Oozyten zeigen, dass sich innerhalb der 3 unterschiedlichen MTHFR-677CT-Genotypen weder die Fertilisationsraten in vitro noch die Implantationsraten signifikant unterschieden [33]. Allerdings fanden sich im Rahmen der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation signifikante Effekte des MTHFR-677T-Genotyps auf FSH-Bedarf, Östradiolkonzentration und Zahl asservierter Oozyten: Trägerinnen der T-Mutation zeigten einerseits eine signifikant höhere Gesamtmenge an appliziertem rekombinanten FSH ($p < 0,03$), gleichzeitig aber signifikant geringere maximale Östradiolkonzentrationen ($p < 0,002$) und signifikant weniger asservierte Oozyten ($p < 0,006$). Diese Effekte waren umso ausgeprägter, je älter die betroffenen Kinderwunschpatientinnen waren [33]. In anschließenden Studien konnten wir nachweisen, dass auch Granulosa-Luteinzell-Primärkulturen von IVF/ICSI-Patientinnen mit dem MTHFR-677T-Genotyp unter standardisierten Bedingungen in vitro signifikant geringere Östradiolsyntheseraten zeigen [34]. Dabei war der MTHFR-Effekt offenbar unabhängig von Expression und Funktion der FSH- und LH-Rezeptoren, denn die Stimula-

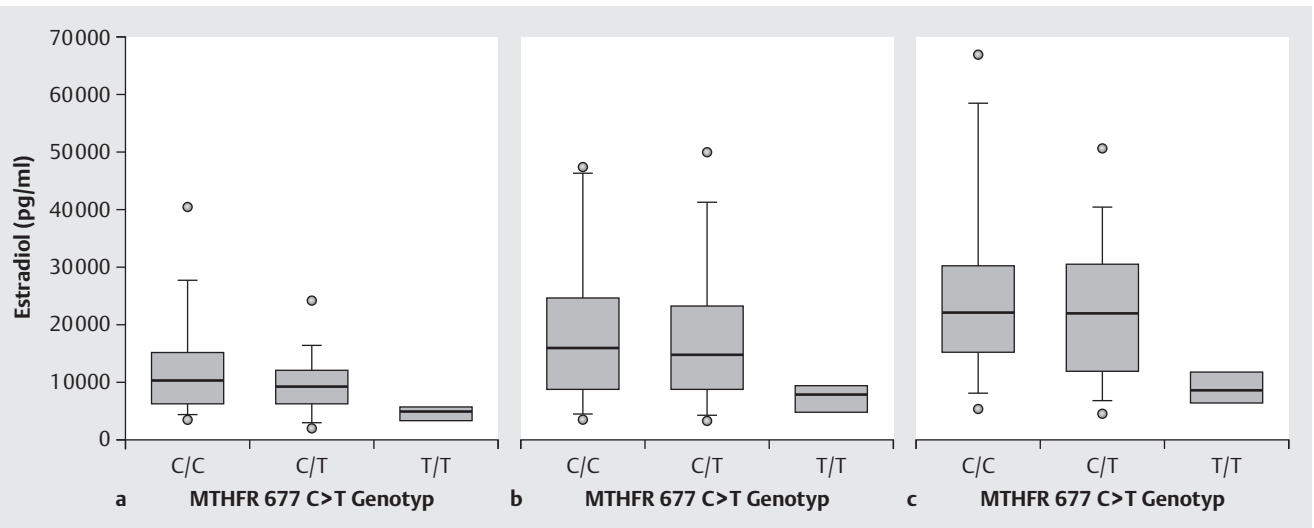


Abb. 4a bis c Estradiolproduktion humaner Granulosazellen, die aus den Follikelflüssigkeiten von IVF/ICSI-Patientinnen gewonnen und 72 Stunden kultiviert wurden. Granulosazellen von homozygoten Trägerinnen der MTHFR-677TT-Mutation zeigten eine signifikant geringere Estradiolsynthese und -freisetzung ($p < 0,006$). Dieser Effekt fand sich in gleicher Weise bei

unstimulierten (a) wie auch bei FSH- (b) und LH-stimulierten (c) Granulosazellen und dies spricht dafür, dass der MTHFR-677T-Effekt nicht primär über die Expression oder Funktion der Gonadotropinrezeptoren vermittelt wird (aus [34]).

tionsraten durch rekombinantes FSH und LH waren unabhängig vom MTHFR-677CT-Genotyp (Abb. 4a bis c) [34].

MTHFR 677-C>T-Polymorphismus und erhöhte Folsäuresubstitution

Umfangreiche Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die erhöhten Risiken für neurale Fusionsdefekte [11, 12, 14–29] und Spontanaborte [35] sowie erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Zusammenhang mit der MTHFR-677T-Mutation [13] durch eine erhöhte Folatzufuhr kompensierbar sind. Tatsächlich waren unsere eigenen initialen Untersuchungen zum Einfluss der MTHFR-677T-Mutation auf die Inzidenz dichorialer Geminischwangerschaften unter einer Substitution mit der in dieser Zeit empfohlenen Dosis von lediglich 0,4 mg Folsäure/Tag entstanden [32]. Auch bei unseren Studien zu MTHFR-677T-Effekten auf ovarielle Hyperstimulation und Estradiolsynthese lag die tägliche Folsäuresubstitution lediglich bei 0,4 mg/d [33]. Die US-amerikanische Studie von Rosen et al. legte dann erstmals den Schluss nahe, dass unter einer in den USA üblichen deutlich höheren Folatzufuhr (Folsäurezusatz in Mehl und Zerealien, höher dosierte Vitamin-B-Tabletten) der MTHFR-677T-Effekt auf die ovarielle Hyperstimulation reversibel ist [36]. In einer Anschlussstudie untersuchten wir daher 271 IVF/ICSI-Patientinnen, die täglich mind. 0,8 mg Folsäure bzw. 0,4 mg Folsäure in Kombination mit 0,4 mg Metafolin erhalten hatten. Um die Compliance hinsichtlich dieser Folsäuresubstitution zu verifizieren, wurde eine Stichprobe von 71 dieser Patientinnen in Einzelinterviews auf Regelmäßigkeit und Dosierung der Folsäureeinnahme befragt und hierbei wurde in allen Fällen bestätigt, dass die rezeptierte Folsäuresupplementation regelmäßig und korrekt eingenommen worden war (Dr. Roman Pavlik, persönliche Mitteilung). Tatsächlich fanden sich unter dieser erhöhten Folsäuredosierung gegenüber unserer Erstpublikation unter 0,4 mg Folsäure/Tag deutliche Veränderungen für die Eckdaten der Hyperstimulationsbehandlung: Im Gegensatz zu unserer Erstpublikation zeigten sich jetzt keine unmittelbaren MTHFR-677T-Effekte auf FSH-Bedarf oder Oozytenzahl. Allerdings bestätigte sich im Rahmen der multiplen

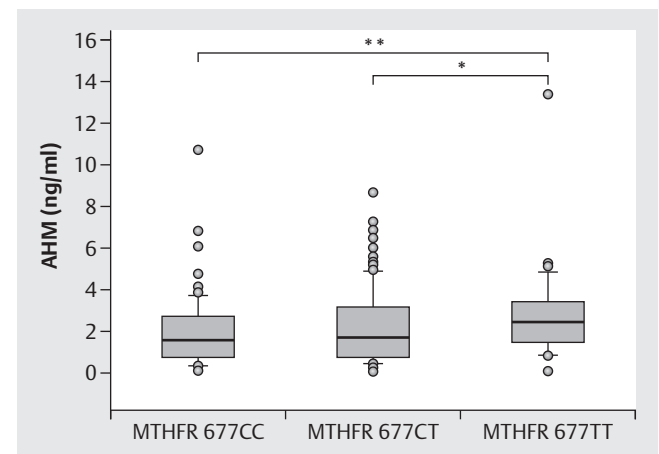


Abb. 5 Unter der Substitution mit mind. 0,8 mg Folsäure/Tag finden sich bei IVF/ICSI-Patientinnen mit homozygoter MTHFR-677TT-Mutation signifikant höhere AMH-Konzentrationen als bei heterozygoten MTHFR-677CT-Patientinnen (* $p < 0,04$) und bei den Wild-Type-MTHFR-677CC-Patientinnen (** $p < 0,002$). Dies ist bemerkenswert angesichts der Tatsache, dass sich zwischen den unterschiedlichen MTHFR-677-Genotypen keine Unterschiede in der Gesamtzahl gewonnener Oozyten fanden (aus [37]).

linearen Regressionsanalyse weiterhin der negative Einfluss des MTHFR-677TT-Genotyps auf die Zahl gewonnener Eizellen ($p = 0,008$) [37]. Diese zunächst unerwartete Konstellation scheint möglicherweise erklärbar angesichts signifikant erhöhter AMH-Konzentrationen bei Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps. Tatsächlich lagen die durchschnittlichen AMH-Konzentrationen von homozygoten Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps hoch signifikant ($p = 0,002$) und von heterozygoten Trägerinnen des MTHFR-677CT-Genotyps signifikant ($p = 0,04$) über dem der Patientinnen mit dem MTHFR-677CC-Wildtyp (Abb. 5) [37]. Die erhöhten AMH-Werte von Trägerinnen des MTHFR-

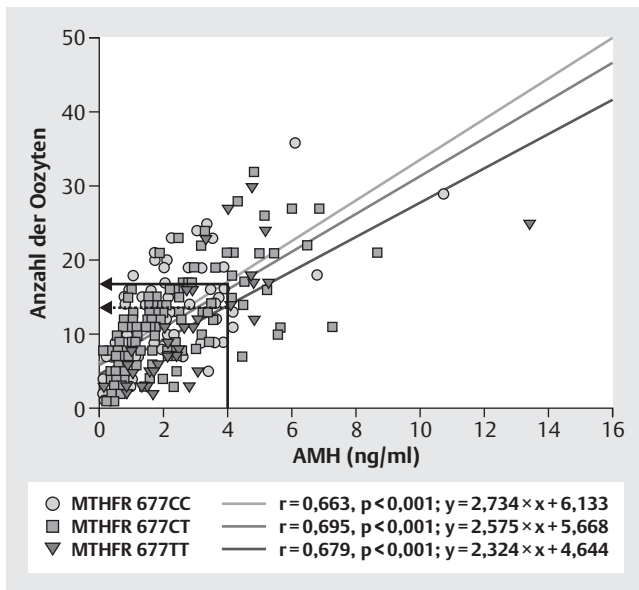


Abb. 6 Die beschriebene Korrelation zwischen AMH-Konzentration und der Zahl gewonnener Oozyten nach kontrollierter ovarieller Hyperstimulation und Follikelpunktion findet sich auch in signifikanter ($p < 0,001$) Weise bei individueller Darstellung der 3 MTHFR-677-Genotypen wieder. Allerdings stellt sich die Korrelationsgerade der IVF/ICSI-Patientinnen mit homozygoter MTHFR-677TT-Mutation (dunkelgraue Korrelationsgerade) nach unten, d. h. in Richtung geringerer Oozytenzahlen, verschoben dar, d. h. in Richtung geringerer Oozytenzahlen verschoben. So finden sich z. B. bei Patientinnen mit AMH-Konzentration von 4 ng/ml und dem MTHFR-677TT-Genotyp durchschnittlich etwa 13 Oozyten (Pfeil mit unterbrochener Linie nach links), dagegen bei gleichem Stimulationschema durchschnittlich 16 Oozyten (Pfeil mit durchgehender Linie nach links), wenn sie den Wild-Type-MTHFR-677CC-Genotyp besitzen. Dieser Aspekt scheint klinisch relevant, da die AMH-Konzentration bei homozygoten MTHFR-677TT-Mutationsträgerinnen zumindest hinsichtlich der zu erwartenden Oozytenzahlen um fast 20% überschätzt werden könnten (modifiziert nach [37]).

677T-Genotyps signalisieren eine erhöhte Rate initial rekrutierter Follikel und dies könnte auf einen kompensatorischen Effekt hinweisen, mit dem sich die zunächst verminderte zyklische Rekrutierung der Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps unter erhöhter Folatfortifikation wieder kompensiert. Im Ergebnis gleicht die Folatsubstitution mit mind. 0,8 mg also die negativen MTHFR-677T-Effekte auf die Gesamtzahl asservierter Oozyten offenbar komplett aus und scheint daher zumindest für IVF/ICSI-Patientinnen ratsam. Diese erhöhte Folsäuresubstitution hat zumindest bei Trägerinnen des MTHFR-677T-Genotyps den Nebenbefund relativ erhöhter AMH-Konzentrationen [37]. Für alle 3 MTHFR-677CT-Genotypen bestätigte sich die beschriebene signifikante Korrelation zwischen AMH-Konzentration und Oozytenzahl ($p < 0,001$), wobei die Regressionsgerade für den MTHFR-677CC-Wild-Type gegenüber den MTHFR-677-TT-Individuen um fast 20% nach oben verschoben ist (◉ **Abb. 6**; [37]). Diese Daten haben durchaus auch praktische Bedeutung für die klinische Routine. Hier sollte darauf geachtet werden, dass AMH-Werte von 677-TT-Patientinnen, zumindest bei erhöhter Folatversorgung, im Durchschnitt um etwa 20% höher ausfallen und damit als „falsch zu hoch“ interpretiert werden können. Tatsächlich zeigt sich angesichts der Regressionsgeraden in ◉ **Abb. 6**, dass für ein und denselben AMH-Wert bei gleichem Stimulationschema in homozygoten Trägerinnen des MTHFR-677TT-Genotyps um fast 20% geringere Oozytenzahlen zu erwarten sind. Es

empfiehlt sich also, in die sorgfältige Bewertung der AMH-Konzentration auch den individuellen MTHFR-677CT-Genotyp und die Folatversorgung einzubeziehen.

Fazit für die Praxis

Der Folatmetabolismus hat vielfältige Effekte auf ovarielle Funktion, Implantation, Embryogenese und den gesamten Verlauf der Schwangerschaft. Neben dem gut etablierten Einfluss auf die Inzidenz neuraler Fusionsdefekte finden sich Zusammenhänge zwischen verminderten Folsäure- und erhöhten Homocystein-konzentrationen einerseits und gehäuftem Spontanaborten und anderen Schwangerschaftskomplikationen andererseits. Zusätzlich zeigt sich bei Kinderwunschpatientinnen im Rahmen der IVF/ICSI-Behandlung ein deutlicher Zusammenhang zwischen Plasma-Folat-Konzentrationen und der Inzidenz dichorialer Geminischwangerschaften. Im Rahmen der ovariellen Hyperstimulation finden sich bei MTHFR-677-T-Patientinnen unter einer Folsäure-Substitution mit täglich 0,4 mg negative Effekte auf die Zahl gewonnener Oozyten sowie die maximalen Konzentration von Östradiol am Tag der Ovulationsauslösung. Diese Effekte sind offenbar vollständig kompensierbar durch Erhöhung der täglichen Folsäuredosis auf mind. 0,8 mg und diese tägliche Dosis scheint zumindest für IVF/ICSI-Patientinnen ratsam. Bei entsprechend substituierten Trägerinnen des MTHFR-677TT-Genotyps finden sich die AMH-Konzentrationen signifikant erhöht, was auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten könnte. Tatsächlich könnten die AMH-Konzentrationen homozygoter MTHFR 677 TT-Trägerinnen allerdings überschätzt werden, denn bei ihnen konnten durchschnittlich fast 20% weniger Oozyten pro AMH-Einheit gewonnen werden als bei Trägerinnen des MTHFR-677CC-Wild-Types.

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Professor Friese sagen. Er hatte in den vergangenen Jahren wesentlichen Anteil daran, dass die Säule der Gynäkologischen Endokrinologie und Reproduktionsmedizin an den Frauenkliniken der LMU personell, strukturell und apparativ stabilisiert und gestärkt werden konnte.

Interessenkonflikt

Ich habe für Merck Selbstmedikation und Aristo Pharma Vorlesungen über Folsäure gehalten.

Literatur

- 1 Ströhle A, Wolters M, Willers J et al. Mikronährstoffe in den verschiedenen Lebensphasen der Frau (Teil 3) – Schwangerschaft: Nahrung für einen optimalen Start ins Leben. *Gyne* 2014; 5: 33–39
- 2 Brönstrup A. Folat und Folsäure. *Ernähr Umschau* 2007; 9: 538–544
- 3 Ohrvik VE, Witthoft CM. Human folate bioavailability. *Nutrients* 2011; 3: 475–490
- 4 Sauberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH et al. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 1016–1028
- 5 Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr: Folat. Online: <http://www.dge.de/pdf/ws/Referenzwerte-2013-Folat.pdf>; Stand: 23.07.2014

- 6 Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111–113
- 7 Kang SS, Zhou J, Wong PW et al. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 414–421
- 8 McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK et al. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* 1996; 83: 195–198
- 9 Verhoeff BJ, Trip MD, Prins MH et al. The effect of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation on levels of homocysteine, folate, vitamin B12 and on the risk of premature atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 141: 161–166
- 10 Harmon DL, Woodside JV, Yarnell JW et al. The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia. *QJM* 1996; 89: 571–577
- 11 Jacques PF, Bostom AG, Williams RR et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996; 93: 7–9
- 12 Ströhle A, Wolters M, Hahn A. Nährstoffsupplemente – Möglichkeiten und Grenzen. Teil 2: Ausgewählte Risikogruppen – Supplemente in der Schwangerschaft. *Med Monatsschr Pharm* 2013; 36: 252–266
- 13 Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr* 1998; 128: 1336–1341
- 14 Hibbard ED, Smithells RW. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965; 1: 1254
- 15 Laurence KM, James N, Miller MH et al. Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981; 282: 1509–1511
- 16 Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992; 327: 1832–1835
- 17 Czeizel AE. Controlled studies of multivitamin supplementation on pregnancy outcomes. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 678: 266–275
- 18 Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child* 1981; 56: 911–918
- 19 Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ et al. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980; 1: 339–340
- 20 Smithells RW, Sheppard S, Wild J et al. Prevention of neural tube defect recurrences in Yorkshire: final report. *Lancet* 1989; 2: 498–499
- 21 Smithells RW. Multivitamins for the prevention of neural tube defects. How convincing is the evidence? *Drugs* 1989; 38: 849–854
- 22 Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991; 338: 131–137
- 23 Goh YI, Bollano E, Einarson TR et al. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 2006; 28: 680–689
- 24 Blencowe H, Cousens S, Modell B et al. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* 2010; 39 (Suppl. 1): i110–i121
- 25 Choumenkovitch SF, Selhub J, Wilson PW et al. Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions. *J Nutr* 2002; 132: 2792–2798
- 26 Quinlivan EP, Gregory JF 3rd. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 221–225
- 27 Dietrich M, Brown CJ, Block G. The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr* 2005; 24: 266–274
- 28 Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD et al. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology* 2002; 66: 33–39
- 29 Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA et al. Use of multivitamins, intake of B vitamins, and risk of ovulatory infertility. *Fertil Steril* 2008; 89: 668–676
- 30 Haggarty P, McCallum H, McBain H et al. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort study. *Lancet* 2006; 367: 1513–1519
- 31 Boxmeer JC, Macklon NS, Lindemans J et al. IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum Reprod* 2009; 24: 1059–1066
- 32 Hasbargen U, Lohse P, Thaler CJ. The number of dichorionic twin pregnancies is reduced by the common MTHFR 677C→T mutation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2659–2662
- 33 Thaler CJ, Budiman H, Ruebsamen H et al. Effects of the common 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness to recombinant follicle-stimulating hormone. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 251–258
- 34 Hecht S, Pavlik R, Lohse P et al. Common 677C→T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects follicular estradiol synthesis. *Fertil Steril* 2009; 91: 56–61
- 35 Quére I, Mercier E, Bellet H et al. Vitamin supplementation and pregnancy outcome in women with recurrent early pregnancy loss and hyperhomocysteinemia. *Fertil Steril* 2001; 75: 823–825
- 36 Rosen MP, Shen S, McCulloch CE et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ovarian follicular activity. *Fertil Steril* 2007; 88: 632–638
- 37 Pavlik R, Hecht S, Ochsenkühn R et al. Divergent effects of the 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness and anti-Müllerian hormone concentrations. *Fertil Steril* 2011; 95: 2257–2262