

임산부에서의 Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 유전자 변이, 엽산 및 비타민 B₁₂ 결핍과 고호모시스틴 혈증이 재태기간과 출산아의 체중에 미치는 영향

박혜숙¹ · 김영주² · 하은희^{1*} · 이화영³ · 장남수⁴ · 홍윤철⁵ · 방명걸⁶ · 김우경⁷

¹이화여자대학교 의과대학 예방의학교실

²이화여자대학교 의과대학 산부인과학교실

³이화여자대학교 의과대학 해부학교실

⁴이화여자대학교 가정대학 식품영양학과

⁵인하대학교 의과대학 산업의학과

⁶GenDix, Inc

⁷단국대학교 자연과학대학 식품영양학과

*서울 서대문구 대현동 11-1, 120-750

The risk of MTHFR variants, folate and vitamin B₁₂ deficiencies and hyperhomocysteinaemia during pregnancy associated with short gestational age and reduced birth weight

Hyesook Park¹, Young Ju Kim², Eun Hee Ha^{1*}, Hwa Young Lee³, Nam Soo Chang⁴, Yun-Chul Hong⁵, Myung Geol Pang⁶, and Woo kyoung Kim⁷

¹Department of Preventive Medicine, Ewha Womans University

²Department of Obstetrics and Gynecology, Ewha Womans University

³Department of Anatomy, Ewha Womans University

⁴Department of Food and Nutritional Sciences, Ewha Womans University

⁵Department of Occupational Medicine, Inha University

⁶GenDix, Inc

⁷Department of Food Science and Nutrition, Dankook University

(Received January 31, 2003 / Accepted February 21, 2003)

ABSTRACT : The purpose of this study was to evaluate whether the MTHFR variants, folate and vitamin B₁₂ deficiencies increase the risk of hyperhomocysteinaemia and adverse pregnancy outcome such as short gestational age or reduced birth weight. Healthy pregnant women (n=136; 24-28 gestational weeks; 20-40 years old), who visited Ewha Womans University Hospital for prenatal care, participated in this study. At the time of delivery, trained nurses recorded the pregnancy outcome from medical chart. We determined maternal MTHFR polymorphisms (C to T substitution at nucleotide 677) and measured serum homocysteine, vitamin B₁₂, and folate concentrations. We compared serum homocysteine level by MTHFR genotype, serum folate and serum vitamin B₁₂ levels using ANOVA. To evaluate the association between serum homocysteine level and pregnancy outcome, we compared the gestational age and birth weight by serum homocysteine levels using multiple regression analysis, adjusting for other potential predictors. Mean level of serum homocysteine was highest among pregnant women of the MTHFR variants with low levels of serum folate and vitamin B₁₂. Regarding association with birth outcome, we found the relationship between homocysteine levels and increased gestational age (p=0.03) and reduced birth outcome (p>0.05). Our data demonstrates that serum level of folate and vitamin B₁₂ among pregnant women affects significantly serum homocysteine levels, and the genetic polymorphism of MTHFR modulates the relationship between them. However, we did not have conclusive evidence of association between high homocysteine level and adverse pregnancy outcome such as preterm or low birth weight.

Key words : Methylene tetrahydrofolate reductase, 엽산, 고호모시스틴혈증, 재태기간, 체중, 임신부

*To whom correspondence should be addressed

서 론

과거 연구들에 의하면 많은 산과적 문제들이 고호모시스틴 혈증과 연관이 되어 있다(de Falco *et al.*, 2000; Aubard *et al.*, 2000). 고호모시스틴혈증은 동맥경화 및 정맥혈전증의 위험을 증가시키고, 임신 시에는 신경관결손(Kirke *et al.*, 1993; Mills *et al.*, 1995), 유산(Wouters *et al.*, 1993; Burke *et al.*, 1992; Ray and Lastin, 1999), 태반 경색과 파열(Ray and Lastin, 1999; de Falco *et al.*, 2000)과 연관이 되어 있다.

고호모시스틴혈증은 호모시스틴 대사과정 중의 재메틸화(remethylation) 또는 황전환작용(transsulfuration)에 영향을 주는 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 영향을 받을 수 있다(Aubard *et al.*, 2000). 또한 메틸렌테트라하이드로폴레이트 환원효소(Methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*)의 유전자변이가 혈중 호모시스틴의 농도를 높이는 것으로 나타났다(Brattstrom *et al.*, 1998). 이러한 고호모시스틴혈증은 높은 농도의 엽산과 비타민 B₁₂에 의해 낮아질 수 있지만 임신기간 동안에는 엽산과 비타민 B₁₂의 영양상태가 비임신시기보다 낮아지기 때문에 고호모시스틴혈증의 위험도가 증가될 가능성이 있다(Molloy *et al.*, 1977; Koehnick *et al.*, 2001).

임신기간 동안, 엽산과 비타민 B₁₂의 저농도 상태는 *MTHFR* 유전자변이와 상호작용하여 호모시스틴의 농도를 높여 태아 또는 태반의 세포 성장과 재생에 장애를 초래하여(James, 1997) 조기분만 및 자궁내 발육지연을 일으킬 수 있다. 중등도로 증가된 호모시스틴 농도는 태반의 혈관질환과 연관되어 산과적 문제를 일으킨다는 보고(Wang *et al.*, 2000; de Falco *et al.*, 2000)도 있고 태반의 결체조직의 완전성(integrity)에 영향을 주어 조기파열을 일으킨다는 보고도 있다(Ferguson *et al.*, 2001). 다른 보고에 의하면 저농도의 엽산과 고농도의 호모시스틴 혈증을 가진 산모에서 출산한 아기의 발육이 저하되었다는 보고(Scholl *et al.*, 1996)도 있다. 최근에는 중국임산부를 대상으로 한 연구에서 임신 전 호모시스틴 농도가 조산과 출산과 연관되어 있다는 보고도 있다(Ronnenberg *et al.*, 2002).

그러나 아직까지 고호모시스틴이 재태기간과 출산아의 체중에 영향을 주는 지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 *MTHFR* 유전자변이, 엽산 및 비타민 B₁₂ 결핍과 이러한 요인들과 연관된 고호모시스틴혈증이 재태기간과 출산아의 체중에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

연구대상 및 방법

연구대상

산전진찰을 위해 일개 3차의료기관을 방문한 24-28주의

건강한 임신부(n=136; 20-40세)를 대상으로 하여 인구학적 특성, 키, 몸무게, 간접흡연에 대한 정보를 수집하였고 유전형과 영양학적 지표를 위한 혈액을 채취하였다. 이들을 대상으로 분만 시에 훈련된 간호사가 출생결과를 기록하였다.

분석방법

엽산 및 비타민 B₁₂ 농도 측정

공복시 정맥혈을 채취하여 3000×g 로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -70°C에 보관하여 분석하였다. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)- fluorescence detection method에 의해 혈청 호모시스틴의 농도를 측정하였고, 혈청 비타민 B₁₂와 엽산의 농도는 Radioimmunoassay kit(Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

MTHFR 유전자다형성 분석

DNA는 Aquapure Genomic DNA blood kit(Biorad Pacific LTD., Kowloon, Hongkong)을 이용하여 추출하여 -80°C에서 보관하였다. 준비된 DNA를 가지고 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 시행하였다. PCR은 50ng의 DNA, 200 mM dNTPs, 각 primer 0.3 mmol/3 ml, PCR buffer 및 0.5 unit의 Taq polymerase로 시행하였으며 총량은 10 μl이다. 사용한 primers는 5'-TGAAGGAGAAGGTGTC-TGCCGGA-3', 5'-AGGACGGTGGGTGAAGTG-3'이다. 반응온도와 시간은 95°C 60초, annealing temperature에서 60초, 72°C 60초로 수행하였고 35회를 반복하였다. 4 μl의 PCR산물을 16unit의 *HinfI* 제한효소(8U; Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)로 분해하였다. Nucleotide 677에서의 C에서 T로의 치환은 extra *HinfI* 제한부위를 만들어 원래의 198-base pair PCR fragment를 175-와 23-base pair fragment로 찢르게 된다. 증폭된 생성물은 2.5% glycerol을 포함하는 0.5 X Mutation Detection Enhancement(이하 MDE라 함; FMC, Rockland, ME) gel에 loading 하였고 6시간동안 20W에서 전기영동을 시행하였다.

통계 분석

MTHFR 유전자 변이, 혈청 엽산과 비타민 B₁₂의 농도에 따른 혈청 호모시스틴 농도와 재태기간, 출산아 체중을 ANOVA와 student t-test를 이용하여 분석하였다. 또한 혈청 호모시스틴 농도에 대한 *MTHFR* 유전자 변이-혈청 엽산 상호작용, *MTHFR* 유전자 변이-혈청 비타민 B₁₂ 상호작용의 효과를 ANOVA 분석을 통해 평가하였다.

호모시스틴 농도와 출생결과와의 연관성을 평가하기 위해, 호모시스틴 농도에 따라 재태기간과 출생시 체중을 ANOVA 분석을 통해 비교하였다. 혈청 호모시스틴 농도는 하위 25백분위수 미만(<6.22 μmol/l), 25-50백분위수(6.22 μmol/l-7.75

μmol/l 이하), 50-75백분위수(7.75 μmol/l-9.80 μmol/l 이하), 75-90백분위수(9.80 μmol/l-11.75 μmol/l 이하), 그리고 90백분위수초과(>11.75 μmol/l)의 다섯 군으로 분류하였다.

연구결과

연구대상자의 일반적 특성과 출산결과는 표 1과 같다. 연구대상자의 평균연령은 30.9세였으며 혈청 엽산, 비타민 B₁₂, 호모시스틴의 농도는 각각 9.0ng/ml, 486.3pg/ml, 8.3 μmol/l였다. MTHFR 유전형은 677CT heterozygous 변이형이 48.5%, 677TT homozygous 변이형이 17.2%였다. 연구대상자의 평균 재태기간은 38.6주였으며 출산아의 체중은 3138.9g였다.

표 2에서는 MTHFR 유전자형, 혈청 엽산 및 비타민 B₁₂ 농도에 따른 혈청호모시스틴 농도, 재태기간, 출산아의 체중을 살펴보았다. MTHFR 유전자변이군에서 호모시스틴의 농도가 증가하는 소견을 보여주었다(p-value 0.06). 그러나 재

태기간, 출산아의 체중은 MTHFR 유전형에 따른 차이가 없었다. 엽산과 비타민 B₁₂의 경우도 엽산의 농도가 낮은 군에서 호모시스틴의 농도가 현저히 증가하였고 비타민 B₁₂의 농도가 낮은 군에서도 유의하지는 않지만 호모시스틴의 농도가 약간 증가하였다. 혈청 엽산이나 비타민 B₁₂ 농도군에 따른 재태기간과 출산아의 체중은 저농도군에서 다소 감소하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

그림 1과 2에서는 혈청 호모시스틴농도에 대한 혈청엽산과 MTHFR 유전형의 상호작용과 혈청비타민 B₁₂와 MTHFR 유전형의 상호작용을 보여주고 있다. 혈청 호모시스틴 농도는 저농도의 엽산군이면서 동시에 MTHFR 유전자변이군에서 가장 높았으며 그 다음은 혈청엽산 저농도군, MTHFR 유전자변이군의 순이었다. 혈청 호모시스틴농도에 대한 혈청엽산과 MTHFR 유전자 상호작용은 통계적으로 유의하지 않았다(p-value 0.39). 혈청 호모시스틴농도에 대한 혈청비타민 B₁₂ 농도와 MTHFR 유전형의 상호작용에서도 저농도의 비타민 B₁₂군이면서 동시에 MTHFR 유전자변이군에서 호모시스틴 농도가 가장 높았으며 혈청 호모시스틴농도에 대한 혈청엽산과 MTHFR 유전자 상호작용은 통계적으로 유의하였다(p-value 0.02).

출산결과와의 연관성 측면에서 MTHFR 유전자형, 엽산 저농도군, 비타민 B₁₂ 저농도군은 재태기간이나 출산아의 체중과 유의한 연관성을 보이지 않았다. 그러나 혈청 호모시스틴의 경우 호모시스틴농도가 25백분위수 이하인군과 90백분위 이상군에서 다른 군에 비해 재태기간과 출산아 체중이 감소하였으며 특히 출산아 체중과는 유의한 연관성(p=0.02)을 보였다(Fig 3).

Table 1. Characteristics of pregnant women at 24-28 weeks of pregnancy and birth outcomes (N=136)

Characteristics	Mean (SD) Number (%)
Age (year)	30.9 (3.4)
MTHFR CC	47 (34.6)
CT	66 (48.5)
TT	23 (16.9)
Folate (ng/ml)	9.0 (4.9)
Vitamin B12 (pg/ml)	486.3 (298.6)
Homocysteine (μmol/l)	8.3 (3.1)
Gestational age (weeks)	38.6 (2.0)
Baby birth weight (g)	3138.9 (552.6)

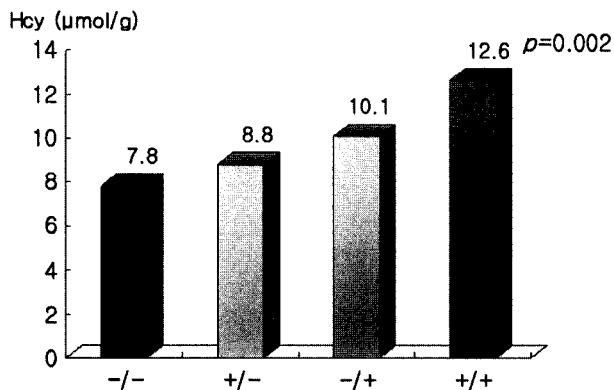


Fig. 1. Interaction of MTHFR variant and folate deficiency on homocysteine level during pregnancy Interaction of Folate *MTHFR p = 0.39.
 -/- MTHFR CC and CT/Folate ≥ 3.5 ng/ml (n=103)
 +/- MTHFR TT/Folate ≥ 3.5 ng/ml (n=19)
 -/+ MTHFR CC and CT/Folate < 3.5 ng/ml (n=10)
 +/+ MTHFR TT/Folate < 3.5 ng/ml (n=4).

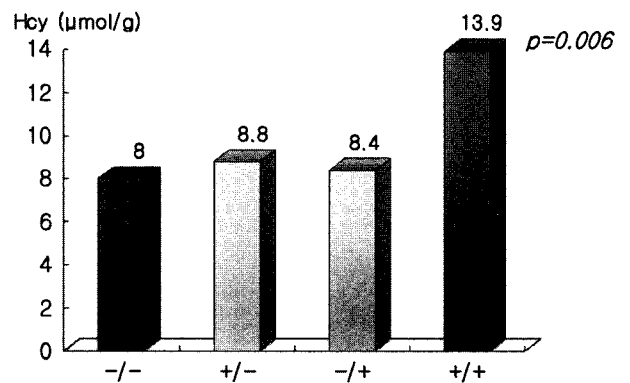


Fig. 2. Interaction of MTHFR variant and Vitamin B₁₂ deficiency on homocysteine level during pregnancy Interaction of Vitamin B₁₂ *MTHFR p=0.02.
 -/- MTHFR CC and CT/Vitamin B₁₂ ≥ 216.31 pg/ml (n=101)
 +/- MTHFR TT/Vitamin B₁₂ ≥ 216.31 pg/ml (n=20)
 -/+ MTHFR CC and CT/Vitamin B₁₂ < 216.31 pg/ml (n=12)
 +/+ MTHFR TT/Vitamin B₁₂ < 216.31 pg/ml (n=3).

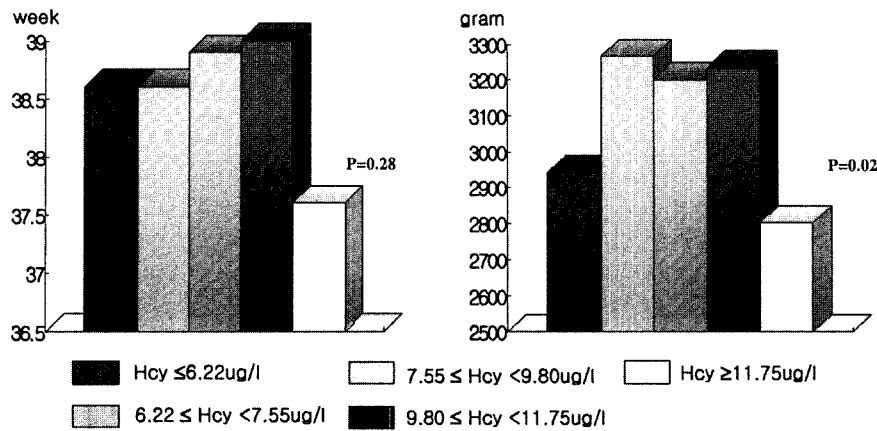


Fig. 3. Gestational age and birth weight by homocysteine level at 24-28 weeks of pregnancy.

Table 2. Prenatal maternal homocysteine level at 24-28 weeks of pregnancy, gestational age, and baby birth weight by *MTHFR*, serum folate and vitamin B₁₂ levels

	Number	Homocysteine mean (SD), $\mu\text{mol/l}$	Gestational age mean (SD), weeks	Baby birth weight mean (SD), g
MTHFR				
CC	47	7.6 (2.6)	38.5 (2.5)	3087.0 (599.1)
CT	66	8.3 (2.6)	38.8 (1.4)	3183.3 (468.3)
TT	23	9.5 (4.5)	38.7 (2.4)	3117.4 (680.5)
	p-value	0.06	0.70	0.65
Folate				
3.4ng/ml+	122	8.0 (2.9)	38.6 (2.0)	3118.9 (562.3)
<3.4ng/ml	14	10.8 (3.2)	39.4 (1.4)	3313.6 (436.9)
	p-value	0.01	0.16	0.21
Vitamin B₁₂				
216.31pg/ml+	121	8.1 (2.9)	38.6 (2.0)	3120.1 (599.3)
<216.31pg/ml	15	9.5 (4.0)	39.1 (1.9)	3290.7 (485.2)
	p-value	0.09	0.38	0.26

고 찰

호모시스틴은 필수 아미노산 메티오닌의 중간 대사산물이다. 고호모시스틴 혈증은 여러 요인에 의해 발생할 수 있으나 가장 중요한 요인은 호모시스틴 대사과정 중에 관여하는 효소 관련 유전자의 변형과 이들 효소에 관여하는 비타민, 엽산, 비타민 B₁₂와 비타민 B6의 결핍이다. 호모시스틴 대사과정에 관여하는 유전자는 *MTHFR*로서 임신부 *MTHFR* 유전자의 TT형에서 고농도의 호모시스틴이 관찰되었다는 보고가 있다(Murakami *et al.*, 2001). 호모시스틴 농도는 *MTHFR* 유전자의 작용과 더불어 엽산의 대사과정에서 생성되는 테트라하이드로폴레이트의 유효성에 의존한다. 또한 비타민 B₁₂ 역시 대사과정에서 적절한 기능을 수행하는데 필요한 보조역할을 한다. 많은 연구에서 엽산과 비타민 B₁₂ 결핍시에 호모시스틴 농도가 높아지는 것을 보고하였다(Kang *et al.*, 1987; Stabler *et al.*, 1988; Ubbink *et al.*, 1993).

엽산 결핍은 호모시스틴의 메틸화에 필요한 메틸테트라하이드로폴레이트의 감소를 가져와 호모시스틴의 농도를 높인다. 비타민 B₁₂ 역시 호모시스틴의 재메틸화 과정의 메티오닌 합성 활성도의 손실을 일으킨다. 본 연구에서도 엽산 저농도 임신부 군과 비타민 저농도 임신부 군에서 혈중 호모시스틴의 평균농도가 증가함을 보여주었다. 또한 *MTHFR* 유전자 변이군이면서 엽산 또는 비타민 농도가 낮은 군에서 호모시스틴의 농도가 가장 높음을 보여주어 고호모시스틴 혈증에 대한 유전-영양 상호작용을 보여주었다.

엽산과 비타민 B₁₂는 태아의 성장과 재태기간에 영향을 줄 수 있다. 엽산과 비타민 B₁₂ 결핍은 모체의 적혈구생성, 배아의 성장, 자궁과 태반의 성장에 장애를 준다(Wagner *et al.*, 1993; Caretti *et al.*, 1998). 일부 연구에서는 임신기간 동안의 엽산 또는 비타민 B₁₂ 저농도가 조산아 분만 또는 저체중아 출산의 위험과 연관된다는 보고를 하고 있다(Whiteside *et al.*, 1968; Lyengar & Rajalakshmi, 1975;

Techernia *et al.*, 1982; Scholl *et al.*, 1996). 그러나 본 연구에서는 엽산과 비타민 B₁₂ 저농도가 재태기간과 출산아 체중과 유의한 연관성을 보이지 않았다.

최근에 조산분만에 대해서는 탈락막의 혈관변성 기전의 중요성이 강조되고 있다(Salafia *et al.*, 1991; Arias *et al.*, 1993). 모체 태반층의 동맥벽의 약화가 조기태반박리의 원인이 될 수 있다. Goddijn-Wessel 등(1996)은 태반박리로 진행한 환자의 31%에서 대조군에 비해 유의한 차이로 고호모시스틴혈증을 가진다고 보고하였고 De Vries 등(1997)은 전자간증이 없는 태반박리환자의 26%에서 임신 후 3개월에 고호모시스틴혈증이 있었음을 발견하였다. Kramer 등(2001)은 고호모시스틴혈증이 탈락막의 혈관변성과 조산분만을 일으킨다고 하였다. 이는 임신기간동안 MTHFR 유전자-엽산의 상호작용 또는 MRHFR 유전자-비타민B₁₂의 상호작용이 고호모시스틴 혈증을 초래하고 고호모시스틴혈증이 탈락막 혈관변성을 일으켜 조기분만, 저체중아 출산을 야기할 것으로 생각된다. 최근 중국임산부를 대상으로 한 연구에서 임신전 호모시스틴 농도가 조산아 출산과 연관된다는 보고도 있다.

본 연구에서는 단변량 분석을 통해 살펴본 것을 임신 중기의 호모시스틴 농도가 낮은 군과 높은 군 모두에서 출생아의 체중이 낮게 나타났다. 호모시스틴의 정상 농도는 5-12 μmol/l(de Falco *et al.*, 2000)로서 저농도의 호모시스틴 혈증과 고농도의 호모시스틴혈증이 모두 출생아의 체중과 연관이 있을 것을 생각해볼 수 있다. 저농도의 호모시스틴혈증은 필수아미노산의 부족에서 기인할 수 있으므로 이로 인한 태아 성장의 지연이 발생할 수 있다고 보여지나 아직까지 이에 대한 보고는 없다.

고농도의 호모시스틴혈증은 태반 내피세포의 Nitric oxide 생성의 손상을 주어 태반의 모체측 혈관의 급성동맥경화를 일으킬 수 있다(Stamler *et al.*, 1993). 호모시스틴은 hydrogen peroxide를 형성하는 pro-oxidant properties를 가지고 있어 동맥경화증의 발생에 중요한 low-density lipoprotein의 산화를 가져올 수 있다(Guthikonda & Haynes, 1999). 또한 고농도의 호모시스틴은 procoagulant endothelial cell factor를 활성화시키고 anticoagulant substance protein C와 thrombomodulin을 비활성화시켜 thrombin의 형성을 촉진시켜(Guthikonda & Haynes, 1999) 태반 혈관의 혈전증을 일으키고 용모막의 성장과 다발성 경색을 일으킬 수 있으며 또한 동맥벽의 약화는 조기 태반파열을 일으킬 수 있다(de Falco *et al.*, 2000).

그러나 본 연구에서는 다음의 제한점이 있다. 고호모시스틴 농도를 가진 산모가 적어 호모시스틴과 출산결과와의 연관성을 보는데 다소 제한이 있어서 향후 더 많은 임산부를 대상으로 한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다. 또한

임신 중 호모시스틴 농도의 측정을 임신 중기 단 1회에 걸쳐 측정하여 전반적인 임신기간동안의 호모시스틴 농도를 반영하지 못하였으며 임신초기, 중기, 후기의 임신기간에 따라 호모시스틴 농도를 측정하여 임신단계별 농도와 임신결과와의 연관성을 살펴보는 것이 필요하다. 그 외에도 호모시스틴 농도에 영향을 줄 수 있는 혈액소치, 크레아티닌, 알부민의 농도를 보정하지 못하였으므로 다양한 변수들을 고려한 분석이 향후 이루어져야 할 것으로 생각한다.

결론적으로 MTHFR 유전자 변이 임산부에서는 임신 중기의 엽산결핍 또는 비타민 B₁₂결핍이 임신기간동안 혈중 호모시스틴의 농도를 유의하게 높이는 것으로 보인다. 또한 호모시스틴이 낮은 군과 높은 군에서 출산아의 체중이 낮게 나타났다. 이러한 소견은 유전적 요인과 영양상태가 출산아 체중에 영향을 미치는 것을 나타내는 것으로서 산전진찰시에 중요한 의미를 가질 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 보건의료기술 연구개발사업(01-PJ1-PG1-01CH15-0009) 연구비 지원에 의해 수행되었음

참고문헌

- Arias, F., Rodriguez, L., Rayne, S.L., and Krans, F.T. (1993): Maternal placental vasculopathy and infection: two distinct subgroups among preterm patients with preterm labour and preterm ruptured membrane, *Am J Obstet Gynecol.*, **168**, 585-591.
- Aubard, Y., Darodes, N., and Cantaloube, M. (2000): Hyperhomocysteinemia and pregnancy: review of our present understanding and therapeutic implications, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, **93**, 157-165.
- Brattstrom, L., Wilcken, D.E., Ohrvik, J., and Brudin, L. (1998): Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*, **98**, 2520-2526.
- Carretti, N.G., Ditto, A., and Guifoni, C.G. (1998): Vitamin B12 levels in pregnancy influence erythropoietin response to anemia, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, **80**, 63-66.
- de Falco, M., Polio, F., Scaramellino, M., Pontillo, M., and Di Lieto, A. (2000): Homocysteinaemia during pregnancy and placental disease, *Clin Exp Obst Gyn.*, **XXVII**, 3-4.
- de Vries, J.L.P., Dekker, G.A., Huijgens, P.C., Jakobs, C., Blomberg, B.M.E., and van Geijn, H.P. (1997): Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies, *Br J Obstet Gynecol.*, **104**, 1248-1254.
- Ferguson, S.E., Smith, G.N., and Walker, M.C. (2001): Maternal plasma homocysteine levels in women with preterm premature rupture of membranes, *Med Hypotheses*, **56**, 85-90
- Goddijn-Wessel, T.A., Wouters, M.G., van de Molen, E.F., Spuijbroek, M.D., Steegers-Theunissen, R.P., Blom, H.J.,

- Boers, G.H. and Eskes, T.K. (1996): Hyperhomocysteinemia: a risk factor for placental abruption or infarction, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, **66**, 23-29.
- Guthikonda S., Haynes W.G. (1999): Homocysteine as a novel risk factor for atherosclerosis, *Curr Opin Cardiol*, **14**, 283-291.
- James, W.P. (1997): Long-term fetal programming of body composition and longevity, *Nutr Rev.*, **55**, S31-43.
- Kang, S.S., Wong P.W., and Norusis, M. (1987): Homocysteinemia due to folate deficiency, *Metabolism*, **36**, 458-462.
- Kramer, M.S., Goulet, L., Lydon, J., Seguin, L., McNamara, H., Dassa, C., Platt, R.W., Chen, M.F., Gauthier, H., Genest, Jr. J., Kahn, S., Libman, M., Rozen, R., Masse, A., Miner, L., Asselin, G., Benjamin, A., Klein, J., and Koren, G. (2001): Socio-economic disparities in preterm birth: causal pathways and mechanisms, *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, **15** (Suppl. 2), 104-123.
- Kirke, P.N., Molloy, A.M., Daly, L.E., Burke, H., Weir, D.G., and Scott, J.M. (1993): Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects, *Q J Med.*, **86**, 703-708.
- Koebnick C., Heins U.A., Hoffmann I., Dagnelie P.C., Leitzmann C. (2001): Folate status during pregnancy in women is improved by long term high vegetable intake compared with the average western diet, *J Nutr.*, **131**, 733-739.
- Lyengar, L., and Rajalakshmi, K. (1975): Effect of folic acid supplement on birth weights of infants, *Am J Obstet Gynecol.*, **122**, 332-336.
- Mills, J.L., McPartlin, J.M., Kirke, P.N., Lee, Y.J., Conley, M.R., Weir, D.G., and Scott, J.M. (1995): Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural tube defects, *Lancet*, **345**, 149-151.
- Molloy, A.M., Daly, S., Mills, J.L., Kirke, P.N., Whitehead, A.S., Ramsbottom, D., Conley, M.R., Weir, D.G., and Scott, J.M. (1997): Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red cell folates: implications for folate intake recommendations, *Lancet*, **349**, 1591-1593.
- Murakami, S., Matsubara, N., Sation, M., Miyakaw, S., Shoji, M., and Kubo, T. (2001): The relation between plasma homocysteine concentration and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in pregnant women, *J Obstet Gynaecol Res.*, **27**, 349-352.
- Ronnenberg, A.G., Goldman, M.B., Cheri, D., Aitken, I.W., Willett, W., Selhub, J., and Xu, X. (2002): Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women, *Am J Clin Nutr.*, **76**, 1385-1391.
- Salafia, C.M., Vogel, C.A., Vintzileos, A.M., Bantham, K.F., Pezzullo, J., and Silberman, L. (1991): Placental pathological findings in preterm birth, *Am J Obstet Gynecol.*, **165**, 934-938.
- Scholl, T.O., and Johson, W.G. (2000): Folic acid: influence on the outcome of pregnancy, *Am J Clin Nutr.*, **71**, 1295S-1303S.
- Scholl, T.O., Hediger, M.L., Schall, J.I., Khoo, C.S., and Fischer, R.L. (1996): Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy, *Am J Clin Nutr.*, **63**, 520-525.
- Stabler, S.P., Marcell, P.D., Podell, E.R., Allen, R.H., Savage, D.G., and Lindenbaum, J. (1988): Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J Clin Invest.*, **81**, 466-474.
- Stamler J.S., Osborne J.A., Jaraki O., Rabbani L.E., Mullins M., Singel D., Loscalzo J.(1993): Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*, **91**, 308-318.
- Tchernia, G., Blot, I., Rey, A., Kaltasser, J.P., Zittoun, J., and Papiernik, E. (1982): Maternal folate status, birth weight and gestational age, *Dev Pharmacol Ther.*, **4**, 58-65.
- Ubbink, J.B., Vermaak, W.J.H., van der Merwe, A., and Becker, P.J. (1993): Vitamin B12, vitamin B6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia, *Am J Clin Nutr.*, **57**, 47-53.
- Wagner, C. (1995): Biochemical role of folate in cellular metabolism. In: *Folate in Health and Disease*, Bailey, L.B. pp. 23-42. New York: Marcel Dekker.
- Wang, J., Trudinger, B.J., Duarte, N., Wilcken, D.E., and Wang, X.L. (2000): Elevated circulating homocyst(e)ine levels in placental vascular disease and associated pre-eclampsia, *Br J Obstet Gynecol.*, **107**, 935-938.
- Whiteside, M.G., Ungar, B., Path, M.C., Cowling, D.C., and Path, F.C. (1968): Iron, folic acid and vitamin B12 levels in normal pregnancy, and their influence on birth-weight and the duration of pregnancy, *Med J Aust.*, **1**, 338-342.
- Wouters, M.G., Boers, G.H., Blom, H.J., Trijbels, F.J., Thomas, C.M., Borm, G.F., Steegers-Theunissen, and Eskes, T.K. (1993): Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss, *Fertil Steril.*, **60**, 820-825.