

Måling av metylmalonsyre, homocystein og metionin ved kobalamin- og folatmangel og homocystinuri

Sammendrag

Bakgrunn. Mangel på kobalamin (vitamin B₁₂) eller folat er hyppige tilstander som disponerer for anemi og kronisk sykdom. Forhøyet nivå av metylmalonsyre i plasma/serum er en indikator på kobalaminmangel, mens økning av totalhomocysteinnivået i plasma skjer både ved kobalaminmangel og folatmangel. Disse to biomarkørene er således komplementære og rekvireres ofte sammen.

Material og metode. Vi oppsummerer artikler, funnet via Medline, som omhandler nyere strategier for laboratoriediagnostikk av kobalamin- og folatmangel.

Resultater og fortolkning. Individualisert diagnostikk har fått ny aktualitet fordi matberikning og ukritisk supplementering med folsyre sannsynligvis kan ha negative helsemessige effekter. Tolking av metylmalonsyre- og homocysteinresultater forutsetter kjennskap til nyrefunksjonen, fordi nivået av begge metabolitter øker ved nyresvikt. Plasma-homocysteinnivået øker dessuten ved homocystinuri, en medfødt tilstand med mye høyere prevalens (1 : 6 400) enn tidligere antatt. Disse pasientene responderer ofte positivt på homocysteinsenkende terapi. Hos pasienter med homocystinuri er det svært høye nivåer av metionin i plasma. Opplysning om metioninnivået vil derfor kunne skille disse fra pasienter med tilstander som vitaminmangel eller nyresvikt, som gir normale eller subnormale metioninnivåer. Komplementaritet, logistikk, lavt prøvevolum og kostnader taler for samtidig bestemmelse av metylmalonsyre, homocystein og metionin i én enkeltprøve. Lave prøvevolumer muliggjør metabolittbestemmelse hos nyfødte og spedbarn.

Oppgitte interessekonflikter:
Se til slutt i artikkelen

Per Magne Ueland
per.ueland@ikb.uib.no
Farmakologisk seksjon
Institutt for indremedisin
Universitetet i Bergen
5021 Bergen

Jørn Schneede
Avdelning för klinisk farmakologi
Umeå Universitet

Mangel på kobalamin (vitamin B₁₂) er en relativt ubred tilstand, særlig hos eldre, der den oftest skyldes nedsatt kobalaminabsorpsjon som følge av mangel på intrinsisk faktor ved atrofisk gastritt. En annen utsatt befolkningsgruppe er vegetarianere. Kobalaminmangel hos disse er et økende problem i de skandinaviske land, delvis som følge av mattradisjoner hos enkelte innvandringsgrupper. Tidlig diagnose og behandling er viktig, spesielt fordi langvarig mangel kan gi irreversibel myelopati (1, 2).

Folatmangel rammer en annen befolkningsgruppe, særlig personer med et dårlig kosthold med lite frukt og grønnsaker og høyt inntak av enkle karbohydrater. Slik ernæring er hyppig hos barn og unge, men også hos eldre. Andre årsaker til folatmangel er malabsorpsjonstilstander, alkoholisme og bruk av visse legemidler, som for eksempel antiepileptika (2).

Uttalt folatmangel gir, i likhet med kobalaminmangel, en makrocytær anemi (2). I de siste 20 år er tiltakende oppmerksomhet viet de helsemessige konsekvensene av marginal eller lett folatmangel, som ofte ikke gir anemi. Lavt inntak av folater er i økende grad blitt assosiert med svangerskapskomplikasjoner og misdannelser. Når det gjelder nevrallrørsdefekter, spiller sannsynligvis folatmangel en kausal rolle, ettersom folattilskudd i første trimester reduserer risikoen for rekurrent nevrallrørsdefekt med over 50 % (3). Lett folatmangel er også blitt knyttet til sykdommer som kolorektalcancer (4), depresjon, nedsatt kognitiv funksjon og hjerte- og karsykdom (3).

Diagnostikk av kobalamin- og folatmangel har tradisjonelt vært basert på hematologiske variabler samt på bestemmelse av kobalamin og folat i serum. I de senere år har funksjonsmarkørene homocystein og metylmalonsyre fått en økende betydning i diagnostikken (1, 2). I denne artikkelen vil vi sammenfatte nyere litteratur som omhandler bruk av disse markørene, deres komplementaritet samt vise hvordan tilleggsbestemmelse av metioninnivået kan være av differen-

sialdiagnostisk betydning i forhold til den medfødte sykdommen homocystinuri.

Materiale og metode

I denne artikkelen oppsummerer vi litteratur, tilgjengelig via Medline, som omhandler nyere strategier for laboratoriediagnostikk av kobalamin- og folatmangel. Ut fra en skjønsmessig vurdering ble de mest relevante artikler tatt med.

Matberikning og tilskudd av folsyre

Individualisert utredning av folatstatus har fått aktualitet i lys av nyere data som viser mulige negative helsemessige konsekvenser av folsyreberikning av mel og av overforbruk av folsyrepreparater (5).

Berikning av mel ble introdusert i USA og Canada for ti år siden som følge av at folsyretilskudd i første trimester beskytter mot nevrallrørsdefekter. Resultater fra intervensjonsstudier med folsyre publisert de siste årene viser imidlertid en ikke-signifikant tendens i retning av økt totalinsidens av kreft (6) samt økt risiko for bryst- (7) og tykktarmskreft (4). Det er dessuten nylig vist at en 20 år lang utvikling med fallende insidens av kolorektal kreft i USA og Canada plutselig ble brutt på et tidspunkt som faller sammen med introduksjon av folsyreberikning (8).

Disse funnene, sammen med tallrike observasjonsstudier som viser beskyttende effekt av adekvat folatstatus mot kreftutvikling i colon/rectum og andre organer, er i tråd med resultater fra dyreeksperimentelle studier – folatmangel fremmer overgangen fra normal til malign celle (karsinogenese), folsyretilskudd motvirker karsinogenese, men fremmer veksten av etablerte kreftceller.

Hovedbudskap

- Nivå av metylmalonsyre og totalhomocystein i serum/plasma er etablerte markører ved diagnostikk og oppfølging av kobalamin- og folatmangel
- Samtidig bestemmelse av metionin gir differensialdiagnostiske holdepunkter i forhold til homocystinuri og nyresvikt
- Uredning av kobalaminstatus hos nyfødte er blitt aktuelt i lys av nyere forskningsdata. Massespektrometriske metoder gir mulighet for metabolittbestemmelse i små prøvevolumer

ler. Det er derfor grunn til å advare mot ukritisk inntak av høye doser folsyre hos personer med adekvat folatstatus, særlig gjelder det eldre (4). Dessuten kan folsyretilskudd forsinke diagnostiseringen av kobalaminmangel og motvirke terapeutisk effekt av folatantagonister og noen antiepileptika (4). Folsyretilskudd bør derfor kun gis på individuelle indikasjoner etter utredning av folatstatus.

Vitaminnivåer i blod

Ved mistanke om kobalaminmangel bestemmes ofte først serum-kobalaminnivået. Men kobalaminbestemmelse har en rekke svakheter. Serum-kobalamin er høyt og har ingen diagnostisk verdi hos personer som får tilskudd av kobalamin, og ved leversykdom og kronisk myeloproliferativ sykdom kan nivåene være svært høye (> 500 pmol/l) uten at dette reflekterer kobalaminstatusen (1, 2). Svært lave verdier (< 70 pmol/l) ses ved genetisk mangel på transkobalamin I (haptokorrin), en tilstand som finnes hos 15% av dem med uforklarlig lave kobalaminnivåer og som ikke er assosiert med klinisk sykdom (9).

For de fleste metoder for serum-kobalaminbestemmelse settes grensen ved 150 pmol/l (10). Men på grunn av testens manglende spesifisitet har man foreslått et inter-

vall mellom 90 pmol/l og 200 pmol/l der den diagnostiske utredningen bør suppleres med metabolittmålinger (11).

Holotranskobalamin II er den fraksjonen av kobalamin som er bundet til transkobalamin II. Det representerer den del av det sirkulerende kobalaminet som er tilgjengelig for reseptormediert opptak i celler og vev. Publiserte data tyder på at måling av holotranskobalamin II har en noe bedre prediktiv verdi enn serum-kobalamin og trolig vil kunne erstatte denne testen (12). Men også holotranskobalamin II-nivået øker etter kobalamininntak, og det påvirkes av nyrefunksjonen. I tillegg er det usikkert hvorvidt genetiske polymorfismer i *transkobalamin II*-genet påvirker nivået uavhengig av kobalaminstatus (13). En annen ulempe er kostnaden ved analysen, som er vesentlig høyere enn den for serum-kobalamin.

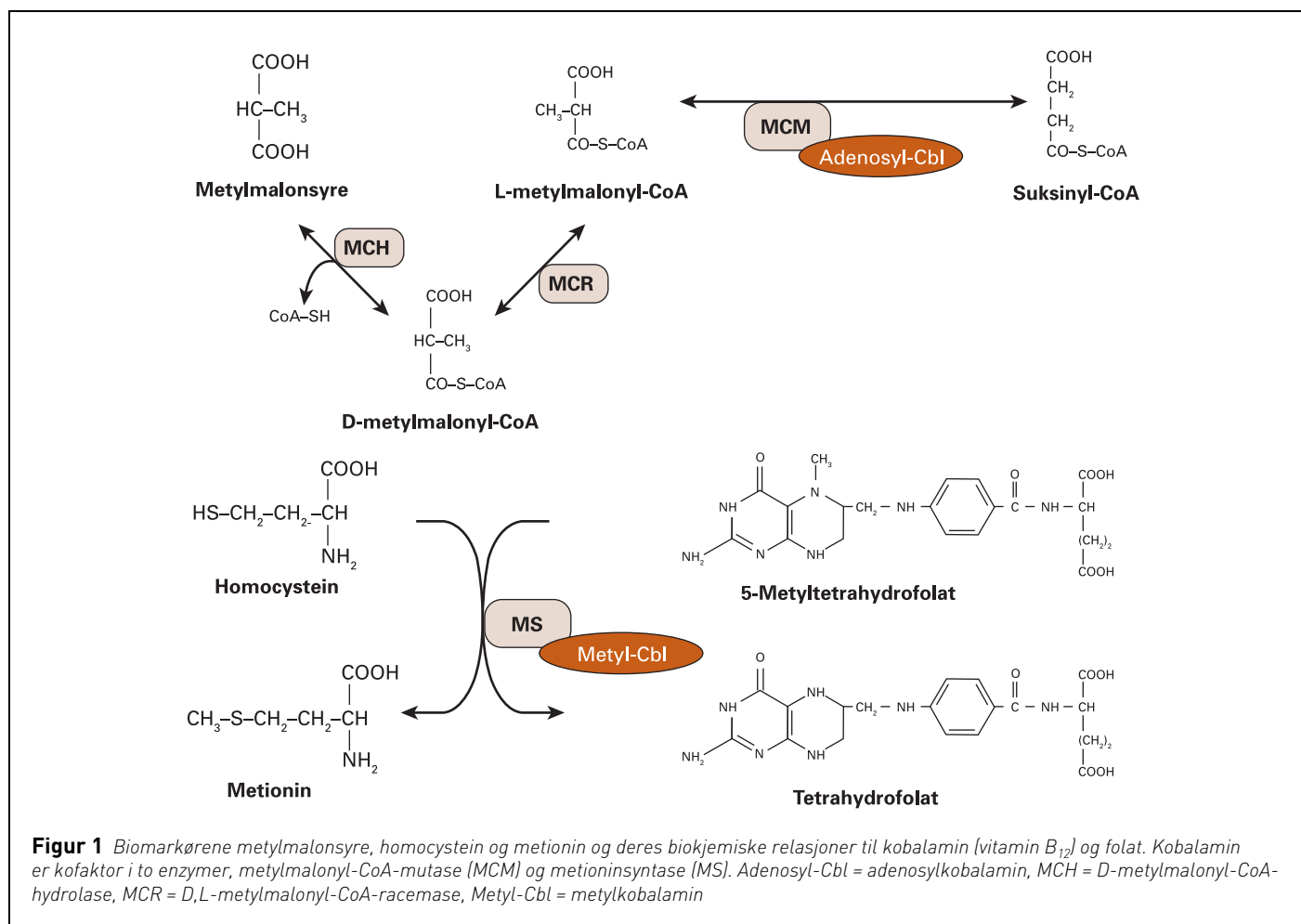
Bestemmelse av folat i serum/plasma er likeledes ofte første steg ved klinisk-kjemisk utredning av folatmangel. Nedre normalgrense har variert mellom forskjellige metoder og over tid, men settes gjerne til 7 nmol/l (10). Svakheter ved denne testen er ustabilitet i folatnivået i blod og serum og økning i plasma-/serumnivået umiddelbart etter folatinntak (2). Folatnivået i helblod eller røde blodceller ble tidligere oppfattet som et mål på gjennomsnittlig folatstatus

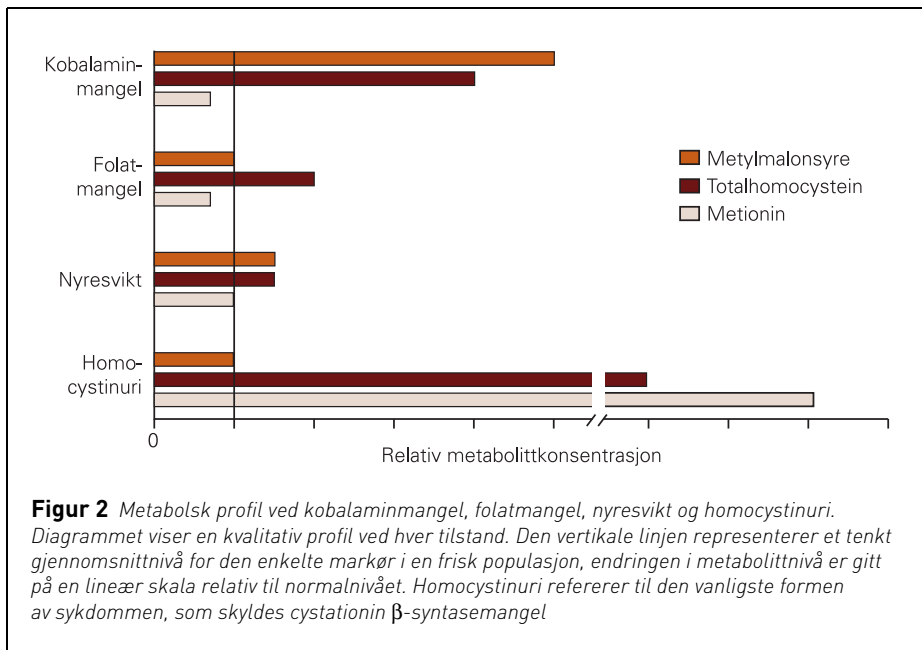
over et tidsrom tilsvarende levetiden for erythrocytter (ca. 120 dager). Men bestemmelse av erythrocyttfolat er i de senere år tatt ut av repertoaret ved en rekke laboratorier, hovedsakelig på grunn av metodologiske problemer (2).

Biokjemisk grunnlag

Kobalamin fungerer som kofaktor for kun to enzymer i mammalske celler (fig 1). Dette forklarer nivåøkningen av både metylmalonsyre og homocystein i blod ved lav kobalaminstatus. Det ene kobalaminavhengige enzymet bruker folatformen, 5-metyltetrahydrofolat, som substrat (2). Dette forklarer hvorfor også folatmangel gir økning i homocysteinnivå. Syntesen av metionin fra homocystein er kvantitativt viktig. Det er derfor en tendens til lave metioninnivåer i serum/plasma ved både folat- og kobalaminsvikt (14, 15).

Cystationin β -syntase er det hastighetsbegrensende enzymet ved nedbrytningen av homocystein. Mangel på dette enzymet er den viktigste årsaken til den medfødte tilstanden homocystinuri, som biokjemisk karakteriseres ved en kraftig økning av homocyst(e)innivået i serum/plasma så vel som i urin. Homocystinuri gir, i motsetning til kobalamin- eller folatsvikt, også en svær økning i plasma-/serumnivået av metionin (15).





sorpsjon eller udiagnostisert pernisiøs anemi (2). Slike barn har utilstrekkelige kobalaminlagre allerede ved fødselen, og kobalaminstatusen forverres ytterligere som følge av at kobalaminmengden i brystmelken er direkte relatert til de lave nivåene i morens blod. Kobalaminsvikt hos nyfødte og spedbarn kan ha negative effekter på den psykomotoriske utviklingen (21). Det er for eksempel vist at barn som fikk såkalt makrobiotisk diett opp til seks års alder hadde nedsatt kognitiv funksjon (22) og lav beintetthet (23) i ungdomsårene.

I nyere studier er det påvist høy frekvens av forhøyede nivåer av homocystein og metylmalonsyre, kombinert med lave konsentrasjoner av kobalamin, hos tilsynelatende friske spedbarn (24, 25). Disse biokjemiske tegn på kobalaminsvikt var særlig hyppige hos brystmelkernærte barn (26). En mulig forklaring på disse funnene er organimmaturitet og høye mengder av forstadier til metylmalonsyre i brystmelk. Men en nylig utført intervensjonsstudie med parenteral tilførsel av kobalamin ved seks ukers alder viste at konsentrasjonen av både metylmalonsyre og i særdeleshet homocystein ble redusert til nivåer man normalt finner hos eldre barn og voksne med adekvat kobalaminstatus (27). Det er derfor ikke usannsynlig at nyfødte er disponert for kobalaminmangel, dvs. en situasjon som tilsvarende den som ligger til grunn for rutinemessig tilskudd av parenteralt vitamin K og peroralt vitamin D til nyfødte. Brystmelk er en utilstrekkelig kilde til både vitamin K og vitamin D og tilskudd er nødvendig for å forhindre mangel hos barnet (28).

Metylmalonsyre, homocystein og metionin i klinisk diagnostikk

Metylmalonsyre og homocystein i serum/plasma er etablerte markører for kobalamin- og folatmangel, og undersøkelse for disse rekvireres ofte sammen (16). Normalverdier for metylmalonsyre og homocystein regnes som konsentrasjoner under henholdsvis 0,26 $\mu\text{mol/l}$ og 15 $\mu\text{mol/l}$. Kobalaminsvikt gir en økning i serum-/plasma-metylmalonsyrenivå, som gjerne stiger til 0,5–10 $\mu\text{mol/l}$, avhengig av graden av vitaminmangel. Samtidig øker ofte homocysteinnivået, som kan nå svært høye konsentrasjoner (50–100 $\mu\text{mol/l}$) ved alvorlig kobalaminmangel (17).

Folatmangel gir også en økning i homocysteinnivå, men ofte mer moderat enn det man observerer ved kobalaminmangel. Homocysteinnivået øker sjelden til over 25 $\mu\text{mol/l}$. Isolert folatmangel har ingen effekt på konsentrasjonen av metylmalonsyre (2).

Forhøyet nivå av metylmalonsyre og homocystein ved kobalaminmangel og forhøyet nivå av homocystein ved folatmangel faller i løpet av dager ved tilførsel av det aktuelle vitamin. Kobalamin normaliserer ikke høyt homocysteinnivå ved folatmangel, og folsyre senker ikke metylmalonsyrenivået ved kobalaminmangel (2). Tvert imot kan man iblant observere en paradoksal økning av metylmalonsyrenivået når kobalaminmangel blir feilbehandlet med folsyre (Schneede J., upublisert observasjon). Disse metaboliske responsene øker den diagnostiske spesifisitet til metylmalonsyre og homocystein og tillater en evaluering av behandlingseffekten i tidlig fase.

Nedsatt nyrefunksjon gir økt nivå av både metylmalonsyre og homocystein, og en moderat økning av nivået av disse metabolittene må alltid tolkes i lys av nyrefunksjonen (2). En norsk undersøkelse viste at ca. 8% av dem med grenseverdier for metylmalon-

syre eller homocystein hadde nedsatt nyrefunksjon. Hos personer med isolert økning av metylmalonsyrenivået var denne andelen betydelig mindre (17). Samtidig bestemmelse av kreatininnivå vil forbedre den diagnostiske verdi av markørbestemmelsen.

Nyere anvendelsesområder

Svært høye konsentrasjoner av homocystein, gjerne over 100 $\mu\text{mol/l}$, ses ved homocystinuri. Sykdommen har et svært varierende fenotypisk uttrykk og debuterer gjerne med linselukasjon eller tidlig okklusiv karsykdom. De typiske trekkene, som marfanoid habitus eller mental retardasjon, er ofte fraværende (18).

Homocystinuri er en viktig differensialdiagnose ved hyperhomocysteinemi, fordi homocystinuriprevalensen er mye høyere enn det man tidligere antok. En nyere studie i en frisk norsk befolkning viste at minst 2,5% er bærere av de vanligste mutasjoner i *cystationin* β -*syntase*-genet. Dette gir en sykdomsprevalens på minst 1:6 400 (19). Tidlig diagnose av homocystinuri er avgjørende, fordi homocysteinsenkende terapi med B-vitaminer og betain reduserer morbiditeten og mortaliteten dramatisk. Et verdifullt diagnostisk verktøy er metioninbestemmelse. Metioninkonsentrasjonen ved homocystinuri er svært høy, ofte over 100 $\mu\text{mol/l}$ (18), og skiller seg fra normale eller lave metioninnivåer (< 40 $\mu\text{mol/l}$) hos personer med B-vitaminmangel (15).

Ved alvorlig nyresvikt kan homocysteinnivået komme opp på 60–70 $\mu\text{mol/l}$. Metioninkonsentrasjonen, derimot, øker ikke ved nyresvikt (20), og metionin kan brukes i differensialdiagnostisk sammenheng (fig 2).

Der finnes flere rapporter som beskriver alvorlig kobalaminmangel hos brystmelkernærte barn av mødre med kobalaminmangel som følge av ensidig vegetarkost, malab-

samme prøve er derfor ønskelig av logistiske og ressursmessige hensyn, ettersom marginalkostnaden ved å addere flere analytter er ubetydelig ved metoder basert på massepektrometri. Når en slik metode også inkluderer metionin (30), vil man dessuten kunne fange opp pasienter med homocystinuri. De små prøvevolumer som medgår til massepektrometriske analyser (ofte < 100 µl) tillater dessuten bestemmelse av metylmalonsyre- og homocysteinnivå i kapillarprøver fra nyfødte og spedbarn.

Oppgitte interessekonflikter: *Jørn Schneede er styreformann og Per Magne Ueland styremedlem i B12 Stiftelsen (en veldedig stiftelse for fremme av forskning innen funksjonell vitamin B₁₂-mangel). Schneede er også styremedlem i firmaet Bevit, som i sin helhet er eid av stiftelsen.*

Litteratur

- Schneede J, Ueland PM. Novel and established markers of cobalamin deficiency: complementary or exclusive diagnostic strategies. *Semin Vasc Med* 2005; 5: 140–55.
- Wickramasinghe SN. Diagnosis of megaloblastic anaemias. *Blood Rev* 2006; 20: 299–318.
- Scott JM. Reduced folate status is common and increases disease risk. It can be corrected by daily ingestion of supplements or fortification. *Novartis Found Symp* 2007; 282: 105–17; discussion 17–22, 212–8.
- Kim YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 267–92.
- Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1123–8.
- Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578–88.
- Charles D, Ness AR, Campbell D et al. Taking folate in pregnancy and risk of maternal breast cancer. *BMJ* 2004; 329: 1375–6.
- Mason JB, Dickstein A, Jacques PF et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1325–9.
- Carmel R. Mild transcobalamin I (haptocorrin) deficiency and low serum cobalamin concentrations. *Clin Chem* 2003; 49: 1367–74.
- Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1289–98.
- Holleland G, Schneede J, Ueland PM et al. Cobalamin deficiency in general practice. Assessment of the diagnostic utility and cost-benefit analysis of methylmalonic acid determination in relation to current diagnostic strategies. *Clin Chem* 1999; 45: 189–98.
- Clarke R, Sherliker P, Hin H et al. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007; 53: 963–70.
- Morkbak AL, Heimdal RM, Emmens K et al. Evaluation of the technical performance of novel holotranscobalamin (holoTC) assays in a multicenter European demonstration project. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1058–64.
- Maree KA, van der Westhuyzen J, Metz J. Inter-relationship between serum concentrations of methionine, vitamin B12 and folate. *Int J Vitam Nutr Res* 1990; 60: 136–41.
- Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG et al. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 1993; 81: 3404–13.
- Bolann BJ, Solli JD, Schneede J et al. Evaluation of indicators of cobalamin deficiency defined as cobalamin-induced reduction in increased serum methylmalonic acid. *Clin Chem* 2000; 46: 1744–50.
- Schneede J, Ueland PM, Kjaerstad SI. Routine determination of serum methylmalonic acid and plasma total homocysteine in Norway. *Scand J Clin Lab Invest* 2003; 63: 355–67.
- Yap S, Naughten ER, Wilcken B et al. Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 335–40.
- Refsum H, Fredriksen A, Meyer K et al. Birth prevalence of homocystinuria. *J Pediatr* 2004; 144: 830–2.
- McDonald SP, Whiting MJ, Tallis GA et al. Relationships between homocysteine and related amino acids in chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2001; 55: 465–70.
- Stabler SP, Allen RH. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 299–326.
- Louwman MW, van Dusseldorp M, van de Vijver FJ et al. Signs of impaired cognitive function in adolescents with marginal cobalamin status. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 762–9.
- Dhonukshe-Rutten RA, van Dusseldorp M, Schneede J et al. Low bone mineral density and bone mineral content are associated with low cobalamin status in adolescents. *Eur J Nutr* 2005; 44: 341–7.
- Bjorke Monsen AL, Ueland PM. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 7–21.
- Monsen AL, Refsum H, Markestad T et al. Cobalamin status and its biochemical markers methylmalonic acid and homocysteine in different age groups from 4 days to 19 years. *Clin Chem* 2003; 49: 2067–75.
- Bjorke Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001; 108: 624–30.
- Bjorke Monsen AL, Sætran H, Torsvik I et al. A common metabolic profile in infants indicating impaired cobalamin status responds to cobalamin supplementation. *Pediatrics* 2008; akseptert for publisering.
- Leaf AA. Vitamins for babies and young children. *Arch Dis Child* 2007; 92: 160–4.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3–32.
- Windelberg A, Arseth O, Kvalheim G et al. Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine, and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 2103–9.

Manuskriptet ble mottatt 1.10. 2007 og godkjent 6.1. 2008. Medisinsk redaktør Odd Terje Brustugun.