

Methylmalonzuurconcentraties bij gezonde Nederlandse kinderen

M. HOGEVEEN¹, I. van BEIJNUM², A. van ROOIJ³, L. KLUIJTMANS³, M. den HEIJER⁴ en H. BLOM⁵

Inleiding

Cobalamine (Cbl) is in de vorm van methylcobalamine een cofactor voor methioninesynthase in de remethylering van homocysteïne naar methionine en in de vorm van adenosylcobalamine in de omzetting van L-methylmalonyl-CoA tot succinyl-CoA door het methylmalonyl-CoA-mutase (1). Een intracellulair Cbl-tekort kan dus leiden tot verhoogde totaal-plasma-homocysteïne(tHcy)- en methylmalonzuur(MMA)-concentraties. Aangezien tHcy door een veelvoud van factoren kan worden beïnvloed en MMA slechts door Cbl en ernstige nierdisfunctie, wordt plasma-MMA als een meer specifieke en gevoelige marker voor intracellulaire Cbl-deficiëntie beschouwd. Cbl-deficiëntie kan op de kinderleeftijd leiden tot een scala van niet-specifieke, maar soms zeer ernstige symptomen, zoals voedingsproblemen, 'failure to thrive', ontwikkelingsachterstand en convulsies en kan resulteren in zowel reversibele als irreversibele neurologische schade (2). Recente studies suggereren dat Cbl-deficiëntie relatief vaak voorkomt bij zuigelingen en kinderen (3). Wij bepaalden plasma MMA-concentraties bij gezonde Nederlandse kinderen en bestudeerden welke factoren van invloed zijn op deze MMA-concentraties. De resultaten van dit onderzoek zijn relevant voor de diagnose en behandeling van Cbl-deficiëntie, om de mogelijke langetermijneffecten daarvan te beschrijven en om het effect van eventuele therapie te kunnen onderzoeken.

Methoden

Bij 186 Nederlandse kinderen werd de plasma-MMA-concentratie bepaald. Oudere kinderen werd via school om hun medewerking gevraagd aan dit onderzoek, jongere kinderen (<11 jaar) werden gerekruteerd via onze polikliniek op moment van bloedafname voor andere diagnostische en/of therapeutische redenen. Drie ml EDTA-bloed werd afgenomen, op ijs bewaard en binnen 4 uur afgedraaid, waarna het EDTA-plasma in een vriezer bij -20 °C werd bewaard. Indien mogelijk werd

ook bloed afgenomen in een heparinebuis voor de bepaling van Cbl en creatinine (4). Plasma-tHcy werd bepaald met een HPLC-methode zoals beschreven door Fiskerstrand, met enige modificaties (5). Plasma-MMA werd bepaald met behulp van een nieuwe LC-MS/MS-methode (6). Plasma-Cbl werd bepaald met de Dualcount Solid PhaseBoil Radioassay. Statistische analyse werd gedaan met SPSS software (versie 12.0.1). Logaritmische transformatie werd toegepast op de data. Multivariabele lineaire regressieanalyse werd gebruikt om de mogelijke invloed van variabelen op plasma-MMA-concentraties te bestuderen. Analyses werden niet uitgevoerd bij kinderen jonger dan 1 jaar in verband met het kleine aantal kinderen waarbij alle bepalingen konden worden verricht (n=5).

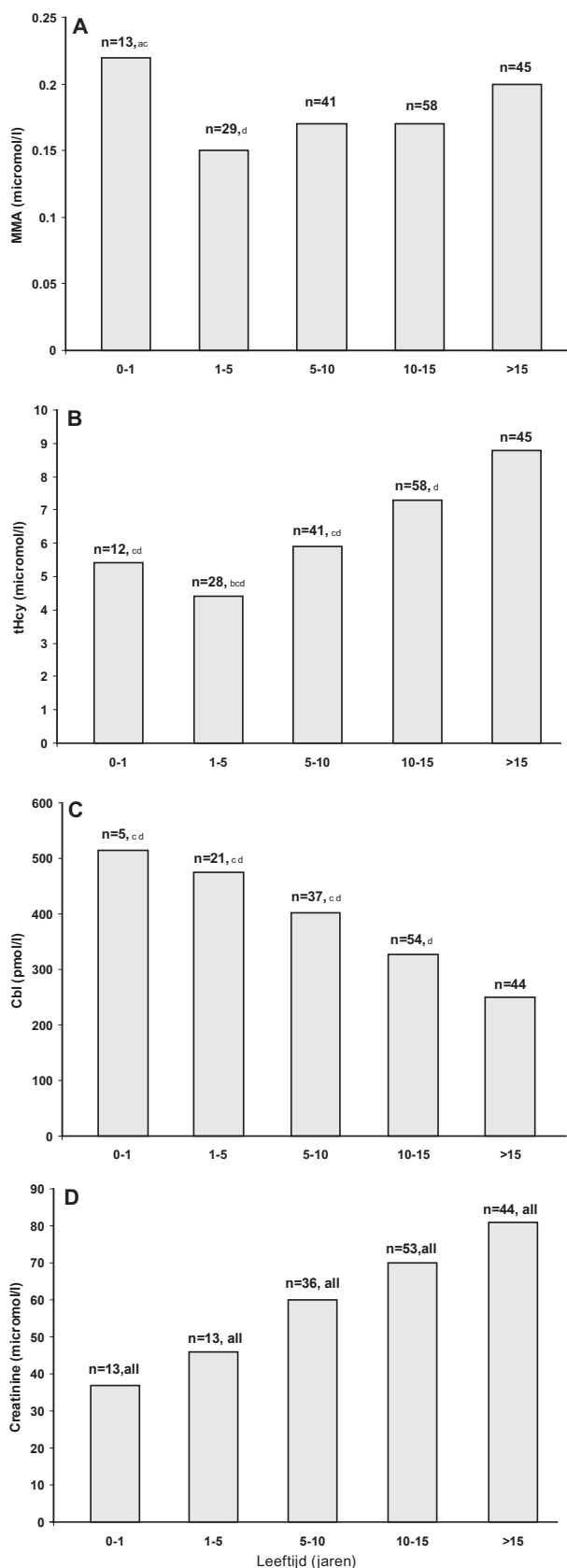
Resultaten

In totaal werden 186 kinderen geïncludeerd (92 jongens, 94 meisjes). De mediane leeftijd bedroeg 11,3 jaar (range 0,01-19,3). Het geometrisch gemiddelde (GM) plasma-MMA was 0,17 µmol/l (95% CI: 0,02-0,38; P95:0,34), GM plasma-tHcy 6,6 µmol/l (95% CI: 3,1-13,9; P95:11,4), GM plasma-Cbl 339 pmol/l (95% CI: 139-824; P95:784) en het GM plasmacreatinine was 65 µmol/l (95% CI:39-111; P95:94). Er werden geen verschillen in plasma-MMA-, -tHcy-, -Cbl- of -creatinineconcentraties gevonden tussen beide geslachten, noch tussen kinderen met en zonder puberteitskenmerken. Om de eventuele leeftijdsafhankelijkheid van de diverse variabelen te bestuderen berekenden we het GM van plasma-MMA, -tHcy, -Cbl en -creatinine in verschillende leeftijdsgroepen (figuur 1a-d). De 95^e percentiel voor plasma-MMA bedroeg 0,30; 0,36; 0,30; en 0,42 µmol/l respectievelijk voor kinderen in de leeftijdscategorie 2-5 jaar; 5-10 jaar; 10-15 jaar; en ouder dan 15 jaar. Tussen plasma-MMA, -tHcy, -creatinine en leeftijd werden positieve correlaties gevonden (respectievelijk $r = 0,21$, $r = 0,63$, $r = 0,68$; allen $p < 0,05$); plasma Cbl vertoonde een negatieve correlatie met leeftijd ($r = -0,53$, $p < 0,05$). Associaties tussen MMA en Cbl en tussen tHcy en Cbl waren respectievelijk $r = -0,35$ en $r = -0,41$; beide $P < 0,001$. MMA was niet gecorreleerd aan creatinine ($r = 0,07$, $p = 0,38$). Kinderen met een Cbl-concentratie onder de 10^e percentiel (<200 pmol/l) hadden hogere plasma-MMA-concentraties in vergelijking met kinderen met hogere Cbl-concentraties (GM plasma-MMA 0,25 en 0,17 µmol/l, $p = 0,003$). Uit multivariabele lineaire regressieanalyse kwam Cbl als sterkste determinant voor MMA naar voren: 1% daling in plasma-Cbl resulteerde in 0,41% stijging in plasma-MMA. In een regressiemodel met Cbl, leeftijd, geslacht en creatinine als variabelen, verklaarde Cbl 19% van de variatie in plasma-MMA (andere factoren elk <0,1%).

Department of Paediatrics, Metabolic and Endocrine Diseases¹ and Children's Heart Centre²; Laboratory of Paediatrics and Neurology³; Department of Endocrinology and Department of Epidemiology and Biostatistics⁴, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen; Metabolic Unit, Department of Clinical Chemistry⁵, VU University Medical Centre, Amsterdam

E-mail: M.Hogeveen@cukz.umcn.nl

Dit artikel is een Nederlandse bewerking en samenvatting van: Methylmalonic acid values in healthy Dutch children. Eur J Nutr. 2008; 47(1): 26-31.



Figuur 1. Geometrisch-gemiddelde concentraties van plasma-MMA (A), serum-Cbl (B), plasma-tHcy (C) en serumcreatinine (D) in verschillende leeftijdsgroepen. De letters a-d geven significante verschillen weer tussen leeftijdscategorieën ($p < 0,05$). Letter a symboliseert een significant verschil met het geometrisch gemiddelde van kinderen van 1-5 jaar, letter b met kinderen van 5-10 jaar, letter c symboliseert een significant verschillend geometrisch gemiddelde ten opzichte van kinderen van 10-15 jaar en letter d ten opzichte van kinderen ouder dan 15 jaar.

Tabel 1. Lineair regressiemodel voor de relatie tussen plasma-MMA en plasma-Cbl gestratificeerd voor verschillende leeftijdsgroepen. Data werden logaritmisch getransformeerd. Resultaten worden weergegeven in beta-coëfficiënten met 95%-betrouwbaarheidsintervallen tussen haakjes. De beta-coëfficiënt geeft % verandering in logaritmisch getransformeerd plasma-MMA weer, volgend op een eenheid verandering in logaritmisch veranderd plasma-Cbl. * = p waarde $< 0,05$

	Cbl	Cbl, creatinine	Aantal
1-5 jaar	-0,04 (-0,5 to 0,4)	0,02 (-0,7 to 0,8)	21
5-10 jaar	-0,35 (-0,7 to -0,03)*	-0,33 (-0,7 to 0,006)*	37
10-15 jaar	-0,34 (-0,6 to -0,06)*	-0,35 (-0,6 to -0,07)*	54
> 15 jaar	-0,64 (-0,99 to -0,3)*	-0,64 (-0,99 to -0,3)*	44

We vonden een significante interactie tussen Cbl en leeftijd en berekenden de relatie tussen MMA en Cbl na stratificatie voor leeftijd. We observeerden een negatieve relatie tussen MMA en Cbl in elke leeftijdsgroep, die sterker werd met toenemende leeftijd (p 'for trend' 0,045) (tabel 1).

Discussie

Plasma-Cbl is de sterkste determinant van plasma-MMA in Nederlandse kinderen. De negatieve associatie wordt sterker bij hogere leeftijd. Plasma-MMA-concentraties verschillen tussen kinderen met normale en lage Cbl-concentraties. In de hele groep werd geen verschil in plasma-MMA, -Cbl, -tHcy of -creatinine gevonden tussen beide geslachten. Leeftijd vertoonde een positieve associatie met plasma-MMA, -tHcy en -creatinine, echter, voor MMA was dit zeer gering. De hoogste plasma-MMA-concentraties worden gevonden bij zuigelingen, zowel door ons in een zeer beperkte groep ($n=13$) als door anderen (7). Aangezien dit vaak gepaard gaat met verhoogde tHcy-concentraties en/of verlaagde Cbl-concentraties suggereert dit een intracellulaire Cbl-deficiëntie. Intracellulair Cbl kan deficiënt zijn zonder duidelijk verlaagde plasma-Cbl-concentraties. Plasma-Cbl-bepaling geeft de som van zowel aan haptocorrine gebonden Cbl als het aan transcobalamine gebonden Cbl weer. Alleen het transcobalamine-gebonden Cbl, doorgaans ~20% van het totaal aan plasma-Cbl, kan worden opgenomen door de cel voor intracellulaire processen (8).

Conclusie

Wij adviseren om bij een breed spectrum aan klinische symptomen, zeker bij zuigelingen, aan de mogelijkheid van (intracellulaire) Cbl-deficiëntie te denken en wij beschouwen plasma-MMA als de belangrijkste marker voor nadere evaluatie. Wij stellen voor bij kinderen ouder dan 1 jaar 0,30 $\mu\text{mol/l}$ als bovengrens te hanteren.

Referenties

- Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. *FASEB J* 1993; 7: 1344-53.
- Rosenblatt DS, Whitehead VM. Cobalamin and folate deficiency: acquired and hereditary disorders in children. *Semin Hematol* 1999; 36: 19-34.

3. Monsen AL, Refsum H, Markestad T, Ueland PM. 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.
4. van Beynum I, den Heijer M, Thomas CM, Afman L, Oppenraay-van ED, Blom HJ. Total homocysteine and its predictors in Dutch children. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1110-6.
5. te Poele-Pothoff MT, van den Berg M, Franken DG et al. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma. *Ann Clin Biochem* 1995; 32 (Pt 2): 218-20.
6. Blom HJ, van Rooij A, Hogeveen M. A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 645-50.
7. Bjorke Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics* 2001; 108: 624-30.
8. Wiersinga WJ, de Rooij SE, Huijmans JG, Fischer C, Hoekstra JB. [Diagnosis of vitamin B12 deficiency revised]. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149: 2789-94.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2009; 34: 229-232

Analyse van plasmatryptofaan, -kynurenine en -3-hydroxykynurenine met behulp van XLC-MS/MS

W.H.A. de JONG, R. SMIT, E.G.E. de VRIES* en I.P. KEMA

Inleiding

Serotonine is een representant uit de groep van biogene aminen, die via enkele gelijkende stappen gevormd worden uit essentiële aminozuren en betrokken blijken te zijn bij vele fysiologische processen. Het aminozuur L-tryptofaan wordt in ons lichaam voor het grootste gedeelte gebruikt voor eiwitsynthese. Een klein variabel percentage wordt gebruikt als voorloper van serotonine. De belangrijkste metabole route van tryptofaan is de kynurenine-'pathway'. De eerste stap in deze route, vorming van kynurenine, wordt gekatalyseerd door twee heem-afhankelijke enzymen, tryptofaan-2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11) en indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO; EC 1.13.11.17). TDO komt vrijwel alleen in de lever voor terwijl IDO in de periferie en het centraal zenuwstelsel aanwezig is. De verhouding tussen tryptofaan en kynurenine weerspiegelt de IDO-activiteit en daarmee de beschikbaarheid van tryptofaan. Pro-inflammatoire stimuli als interferon- γ induceren IDO-expressie (1-3). Een belangrijke cytotoxische metabooliet van kynurenine is 3-hydroxykynurenine. De concentraties van deze stof in plasma zijn veel lager dan die van tryptofaan en kynurenine.

Variatie in tryptofaanconcentratie door IDO/TDO-inductie beïnvloedt de productie van serotonine. Analyse van tryptofaan en de kynureninemetaboolieten is daarom belangrijk voor onderzoek naar pathofysiologische condities waarbij serotonine een belangrijke rol speelt, zoals carcinoïd tumoren met excessieve serotonineproductie, stemmingsstoornissen zoals depressie met een verminderde serotonine beschikbaarheid, ontsteking, immunosuppressie, transplantatie en

zwangerschap (1, 2). Om de (patho)fysiologische mechanismen van dit metabolisme te kunnen bestuderen is het belangrijk dat tryptofaan en zijn grootse afbraakproduct (i.e. kynurenine) gemakkelijk kunnen worden gekwantificeerd in kleine volumina met hoge juistheid en precisie.

Deze studie beschrijft een sensitieve, specifieke, en geautomatiseerde high-throughput-methode bestaande uit onlinevastefase-extractie gekoppeld aan vloeistofchromatografie (LC) met tandem-massaspectrometrie (MS/MS) detectie (XLC-MS/MS) voor de simultane extractie, concentratie, scheiding, en massaselectieve detectie van tryptofaan en zijn metaboolieten kynurenine en 3-hydroxykynurenine in plasma. De tryptofaan-kynurenineratio in plasma wordt o.a. gebruikt bij onderzoek naar leukemie (4) en prostaatkanker (5). Omdat bij gebruik van deze markers in de diagnostiek, naast analytische variatie, ook de biologische variatie van belang is, hebben we in deze studie de biologische intra- en interdagvariatie van tryptofaan, kynurenine en hun ratio bepaald.

Materiaal en methoden

Reagentia, oplossingen en monsters

De gebruikte reagentia en oplossingen waren van HPLC-kwaliteit. L-tryptofaan, D,L-kynurenine en D,L-3-hydroxykynurenine waren van Sigma-Aldrich Ltd. De gedeutereerde interne standaard L-tryptofaan-2',4',5',6',7'-d5 was van C/D/N Isotopes en L-kynurenine-3',4',5',6'-d4 was van Buchem BV. 3-hydroxykynurenine-d2 werd zelfgemaakt (8).

Blancoplasma voor kalibratiecurves werd verkregen door dialyse van gepoold plasma. Bloed werd afgenomen door middel van venapunctie in 10-ml-vacutainerbuizen (Becton Dickinson) met K₂EDTA als anti-coagulans. Plasma werd opgeslagen bij -20°C.

Afdelingen Laboratorium Geneeskunde en Medische Oncologie*, Universitair Medisch Centrum, Groningen

E-mail: i.p.kema@lc.umcg.nl.