

ne phosphate acyltransferase in human skin fibroblasts: studies of the properties using a new assay method. *Biochim Biophys Acta* 1986; 879: 286-291.

## Summary

*Peroxisomal disorders. Schutgens RBH, Wanders RJA. Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 13-20.

Peroxisomes catalyze essential metabolic functions in mammalian cells. In humans, peroxisomal dysfunction usually results in severe disease. At present, in at least 16 human disorders a dysfunction of one or multiple peroxisomal enzymes

has been established. A remarkable genetic and phenotypic variability is observed in many of the peroxisomal disorders. Precise diagnosis can be achieved by biochemical assays and all peroxisomal disorders in which this is relevant can be diagnosed prenatally, thus providing the option of genetic counselling.

Recent studies focus on the unravelling of details of the biogenesis of peroxisomes, identification of mutations and on the evaluation of specific therapies. Yeast mutants proved to be valuable model systems.

*Key-words: peroxisomes; peroxisomal disorders; Zellweger syndrome; X-linked adrenoleucodystrophy.*

*Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 20-26

## Hyperhomocysteinemie

H.J. BLOM<sup>1</sup>, G.H.J. BOERS<sup>2</sup>, T.K.A.B. ESKES<sup>3</sup> en J.M.F. TRIJBELS<sup>1</sup>

De eventuele relatie van cystathionine  $\beta$ -synthase (CS) deficiëntie en thermolabiliteit van 5,10-methyleen-tetrahydrofolaatreductase (MTHFR) met milde hyperhomocysteinemie (MHH) is bestudeerd bij patiënten met vroegtijdige arteriosclerose. Slechts één van de 20 bestudeerde patiënten met MHH vertoonde een CS-activiteit in de range van obligaate heterozygoten voor CS-deficiëntie, terwijl vijf van de 21 patiënten met MHH de zogenaamde thermolabele vorm van MTHFR hadden.

Geconcludeerd mag worden dat heterozygotie voor CS-deficiëntie waarschijnlijk niet een belangrijke oorzaak is voor milde hyperhomocysteinemie. Bij ongeveer 25% van de patiënten met milde hyperhomocysteinemie wordt het metabolisme van homocysteïne waarschijnlijk verstoord door de thermolabele vorm van MTHFR.

*Trefwoorden: homocysteïne; methionine; cystathionine  $\beta$ -synthase; methyleentetrahydrofolaat reductase*

In 1962 rapporteerden zowel Carson en Neill (1) als Gerritsen et al (2), onafhankelijk van elkaar, de aanwezigheid van hoge concentraties van homocystine in de urine van enkele mentaal geretardeerde kinderen. In de daarop volgende jaren werden behalve

mentale retardatie ook andere klinische kenmerken geassocieerd met homocystinurie bekend, zoals vroegtijdige arteriosclerose en trombose, ectopia lentis en skeletafwijkingen. In 1964 toonden Mudd et al (3) aan dat homocystinurie veroorzaakt wordt door een deficiëntie van cystathionine  $\beta$ -synthase (CS). Naast de verhoogde homocystinespiegels in urine en plasma vertonen patiënten met homocystinurie hypermethioninemie en hypocysteinemie. Homocystinurie kan ook veroorzaakt worden door methyleentetrahydrofolaat reductase (MTHFR) deficiëntie. Deze patiënten worden gekenmerkt door mentale retardatie, vroegtijdige arteriosclerose en trombose, maar vertonen geen ooglenstosclerose of skeletafwijkingen. In plasma van deze patiënten is methionine verlaagd en cystathionine vaak verhoogd.

Daarnaast kan homocystinurie ook veroorzaakt worden door defecten in het vitamine B12 metabolisme (Cbl C, D, E of F) en ernstige deficiënties van vitamine B12 of foliumzuur (tabel 1).

### Milde hyperhomocysteinemie

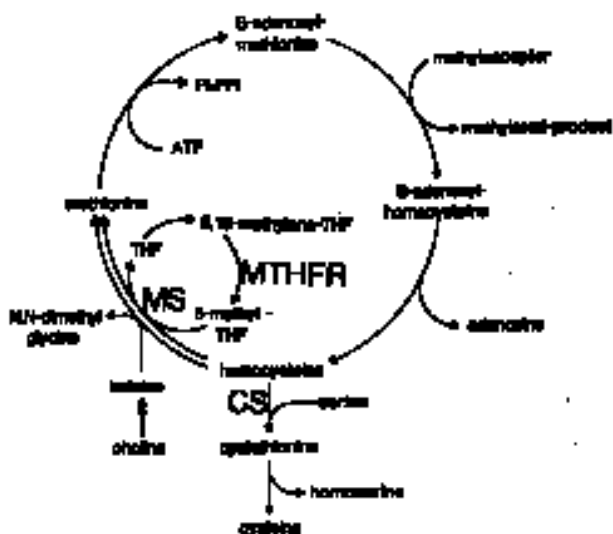
#### *Hart- en vaatziekten*

De hoge incidentie van arteriosclerose en trombose op zeer jonge leeftijd bij patiënten met homocystinurie (ernstige hyperhomocysteinemie) is zeer opvallend. In het Academisch Ziekenhuis Nijmegen is ook de relatie tussen milde hyperhomocysteinemie (MHH) en vroegtijdige arteriosclerose en trombose uitvoerig bestudeerd. In 1985 toonden Boers et al (4) aan dat MHH met een hoge prevalentie van 28% voorkomt bij patiënten met cerebrale of perifere arteriosclerose. Deze bevinding is vervolgens door een tiental verschillende onderzoeksgroepen bevestigd (zie overzichten 5-8). Verder is gebleken dat MHH een risicofactor is voor coronaire insufficiëntie en trombose (5-10).

*Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie<sup>1</sup>, Endocrinologie, Interne Geneeskunde<sup>2</sup>, Gynaecologie/Obstetrie<sup>3</sup>, Academisch Ziekenhuis Nijmegen*

Gebruikte afkortingen: MHH: milde hyperhomocysteinemie; CS: cystathionine  $\beta$ -synthase; MTHFR: methyleentetrahydrofolaat reductase; MeTHF: 5-methyltetrahydrofolaat

Correspondentie: Dr. H.J. Blom, Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.



**Figuur 1.** Homocysteïne/methionine metabolisme. MS: methionine synthase; MTHFR: methyleentetrahydrofolaatreductase; CS: cystathionine  $\beta$ -synthase

### Obstetrische complicaties

Behandeling met foliumzuur van hyperhomocysteïnemie patiënten laat de homocysteïne spiegel dalen. Toediening van foliumzuur aan vrouwen die zwanger willen worden verlaagt het risico op het krijgen van een kind met een defect aan de neurale buis (11). Om deze reden werd in ons centrum de relatie bestudeerd tussen MHH en het optreden van neurale buisdefecten.

Aangezien de aanwezigheid van risicofactoren voor hart- en vaatziekten een negatief effect op het verloop van de zwangerschap kan uitoefenen, werd eveneens onderzoek verricht naar het vóórkomen van MHH bij vrouwen met herhaalde spontane miskramen of ernstige placentaire infarctering. Het resultaat van dit onderzoek is dat een hoge prevalentie (20-25%) van MHH wordt gevonden bij moeders van een kind met een defect aan de neurale buis en bij vrouwen met herhaalde spontane miskramen of ernstige placentaire infarctering (12-16).

### Homocysteïne metabolisme

Homocysteïne ontstaat uit methionine na afsplitsing van een methylgroep in de transmethyleringsroute (figuur 1). In deze route fungeert S-adenosylmethionine als methyl donor in meer dan 100 verschillende transmethyleringsreacties, zoals methylering van DNA, eiwitten, fosfolipiden en xenobiotica (17). Homocysteïne wordt afgebroken door cystathionine  $\beta$ -synthase en cystathionase in de transsulfureringsroute tot cysteïne. Tevens kan homocysteïne weer gemethyleerd worden tot methionine door methionine synthase (5-methyltetrahydrofolaat-homocysteïne methyltransferase) of door betaïne-homocysteïne methyltransferase. Het enzym methionine synthase draagt de methylgroep van 5-methyltetrahydrofolaat (MeTHF) over aan homocysteïne via vitamine B12. MeTHF wordt gevormd uit methyleentetrahydrofolaat door methyleentetrahydrofolaatreductase (MTHFR). Het homocysteïne/methionine metabolisme wordt voornamelijk gereguleerd door S-adenosylmethionine (AdoMet). AdoMet stimuleert CS en remt MTHFR (17). Het gevolg is dat hoge AdoMet spiegels resulteren in homocysteïne afbraak, terwijl lage AdoMet concentraties conservering van homocysteïne via remethylering bevorderen.

### MATERIAAL EN METHODEN

#### Bepaling totaal homocysteïne

Totaal (vrij plus eiwitgebonden) homocysteïne wordt bepaald in EDTA-plasma met behulp van HPLC (high performance liquid chromatography) en fluorescentie detectie, in grote lijnen zoals beschreven door Fiskerstrand et al (18) met enkele modificaties (19,20). Kort samengevat: een programmeerbare monsterverwerker (Gilson model 232 BIO, Dilutor 401) wordt gebruikt voor geautomatiseerde reductie ( $\text{NaBH}_4$  met dithioerytol), derivatisering (monobromobimane) en monster injectie. Het eluens bestaat uit 30 mmol/l ammoniumnitraat, 40 mmol/l ammoniumformiaat en 4 mmol/l tetrabutylammoniumwaterstofsulfaat (pH 3,2). Het homocysteïne-derivaat wordt van de kolom (Supelcosil LC-18 15 cm, 4,6 mm, 3

**Tabel 1.** Homocystinurie en hyperhomocysteïnemie

	Homocystinurie of ernstige hyperhomocysteïnemie	Milde hyperhomocysteïnemie
Concentratie homocysteïne in plasma	>50 $\mu\text{mol/l}$	normaal tot 50 $\mu\text{mol/l}$
Bekende oorzaken	CS deficiëntie MTHFR deficiëntie Ernstige deficiëntie van foliumzuur Ernstige deficiëntie van vitamine B12 Defecten in het vitamine B12 metabolisme	Deficiëntie van foliumzuur Deficiëntie van vitamine B12 Thermolabiel MTHFR
Bepalingen voor diagnostiek	Totaal homocysteïne Overige metabolieten (methionine, cystathionine, totaal cysteïne) Enzymatisch onderzoek Mutatie detectie	Totaal homocysteïne (methionine belastingstest) Enzymatisch en moleculair genetisch onderzoek (nog niet geschikt voor routinematige toepassing)

µm) geëluëerd met een 0 tot 10,5% acetonitril gradiënt in 11 min (loopsnelheid 1 ml/min). De intra- en interrun variatie coëfficiënten zijn <5%.

De concentratie van totaal homocysteïne is ongeveer 5x hoger in plasma dan in urine. Bovendien bevat plasma minder storende componenten voor de homocysteïne bepaling dan urine. Daardoor wordt het onderzoek naar stoornissen in de homocysteïne stofwisseling bij voorkeur in plasma uitgevoerd. Aangezien in volbloed de vorming van homocysteïne nog doorgaat, moet het bloed meteen gecentrifugeerd worden. Indien dit niet mogelijk is, kan het bloed enkele uren op ijs bewaard worden. De meest betrouwbare resultaten worden verkregen met EDTA-plasma.

### **Methionine belastingstest**

Patiënten, welke verdacht worden te lijden aan MHH, worden oraal belast met 0,1 g L-methionine/kg lichaamsgewicht. Methionine is de gemethyleerde precursor van homocysteïne. In Nijmegen komen momenteel in aanmerking voor deze test patiënten met perifere, coronaire of cerebrale arteriosclerose of trombose e.c.i. en vrouwen met herhaalde spontane abortus of ernstige placentaire infarcering e.c.i. De lever- en nierfuncties moeten normaal zijn en er mag geen sprake zijn van een deficiëntie van vitamine B6, B12 of foliumzuur. De methionine belastingstest wordt als volgt uitgevoerd (een protocol wordt op verzoek toegezonden):

De patiënt blijft vanaf middernacht nuchter en om 9.00 uur wordt 5 cc veneus bloed afgenomen in een EDTA-buis. Vervolgens krijgt de patiënt 0,1 gram L-methionine per kilogram lichaamsgewicht toegediend. Methionine wordt in poedervorm in sinaasappelsap gesuspenseerd om de bijmaak te elimineren. Zes uur na methionine inname (15.00 uur) wordt wederom 5 cc veneus bloed afgenomen. Gedurende de test wordt een methionine-arm dieet gebruikt.

Het afgenomen EDTA-bloed wordt bij voorkeur zo snel mogelijk gedurende 10 min gecentrifugeerd of op ijs bewaard (maximaal 3 uur). Het plasma wordt vervolgens verstuurd of bewaard bij -20 °C. De concentratie van totaal homocysteïne in plasma blijft bij kamertemperatuur enkele dagen constant. Het EDTA-plasma kan dus eventueel bij kamertemperatuur worden verstuurd.

In het Academisch Ziekenhuis Nijmegen hanteren we op dit moment de volgende referentiewaarden (2,5% tot 97,5% range) voor totaal homocysteïne (µmol/l) bij mannen 8-18 nuchter en 25-54 zes uur na methionine belasting; premenopausale vrouwen 6-15 nuchter en 18-51 na belasting; postmenopausale vrouwen 6-19 nuchter en 25-69 na belasting. De diagnose MHH wordt gesteld indien de homocysteïne waarde van de patiënt na methionine belasting hoger is dan de bovengenoemde referentiewaarden, in aanwezigheid van normale spiegels van vitamine B6, B12 en foliumzuur.

Momenteel onderzoeken we het homocysteïne metabolisme (nuchter en na methionine belasting) bij 50 vrijwilligers uit een "doorsnee" huisartsenpraktijk in Nederland. Tevens zullen de resultaten van de methionine belastingstesten uitgevoerd over de afgelopen

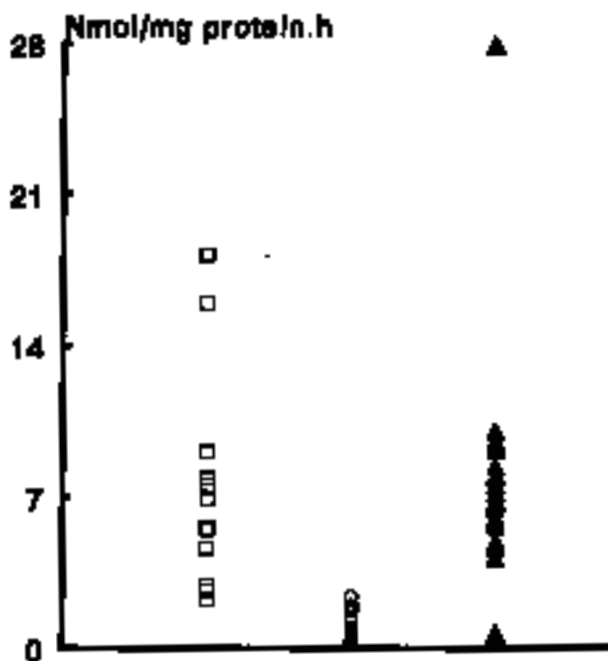
jaren bij patiënten in het Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit Amsterdam en Leijenburg Ziekenhuis te Den Haag bijeengevoegd worden, om tot een betere risicoschatting van totaal homocysteïne in plasma (voor en na methionine belasting) te komen. Naar verwachting zullen de referentiewaarden en de interpretatie van de methionine belastingstest in 1995 enigszins aangepast worden.

### **Cystathionine synthase bepaling**

De cystathionine synthase activiteit wordt bepaald in gekweekte fibroblasten volgens Fowler et al (21) met enkele aanpassingen. Het celpellet wordt gesuspenseerd in 250 µl 50 mM kaliumfosfaat en 0,1% Lubrol, pH=7,4. Na centrifugatie, 10 min bij 10000xg, wordt het supernatant gebruikt voor de bepaling. Het "assay" mengsel bevat: 0,1 M Tris-HCl, 8 mM serine, 2,5 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] serine (170 mCi/ mmol), 1 mM pyridoxalfosfaat, 15 mM L-homocysteïne en 50 µl fibroblasten supernatant; totaal volume 100ml, pH=8,6. Incubaties worden ook uitgevoerd zonder toevoeging van pyridoxalfosfaat. Na 5 min preincubatie bij 37 °C, wordt de incubatie gestart door toevoeging van L-homocysteïne. Na 4 uur incubatie bij 37 °C, wordt 15 ml van het incubatiemengsel opgebracht op Whatman 3mm "chromatography paper", 46 x 2,5 cm. [<sup>14</sup>C]Serine wordt in 40 uur gescheiden van [<sup>14</sup>C]cystathionine door chromatografie in isopropanol:H<sub>2</sub>O:mierezuur = 80:20:6. De positie van cystathionine wordt in stukjes geknipt en de radioactiviteit wordt bepaald. De cystathionine synthase activiteit wordt uitgedrukt in nmol cystathionine/uur/mg eiwit. Eiwit wordt bepaald volgens Lowry et al (22).

### **Bepaling van methyleentetrahydrofolaatreductase (MTHFR)**

De activiteit van MTHFR wordt radiochemisch in de niet-fysiologische richting bepaald in lymfocyten geïsoleerd uit bloed. [Me-<sup>14</sup>C] Me-THF is het substraat in de aanwezigheid van menadion als electronenacceptor. De activiteit wordt bepaald in geïsoleerde lymfocyten (23,24). De lymfocyten worden gesuspenseerd in 50 mM kaliumfosfaat pH 7,2 en vervolgens drie maal bevroren en ontdooid en 40 min afgedraaid bij 15800xg. Een gedeelte van het supernatant wordt gedurende 5 min bij 46 °C geïncubeerd voor de bepaling van de hitte-stabiliteit van MTHFR. Het incubatiemengsel met een eindvolume van 600 µl, bestaat uit 0,18 M kaliumfosfaat (pH 6,8), 1,15 mM EDTA (pH 7,0), 11,5 mM ascorbinezuur, 54 µM FAD, 20 µM [Me-<sup>14</sup>C] Me-THF (5,0 x 10<sup>5</sup> dpm), 3,5 mM menadion en maximaal 250 µl enzymextract (gepreïncubeerde of normale supernatant). De incubatie (37 °C, 20 min in het donker) wordt gestart door toevoeging van menadion. De incubatie wordt gestopt door toevoeging van 10 µl 1,0 M "drager" formaldehyde, 50 µmole dimedon in 200 µl ethanol:water (1:1) en 100 µl 3,0 M kaliumacetaat (pH 4,5). Dit reactiemengsel wordt verhit tot 95 °C gedurende 15 min, en vervolgens 10 min gekoeld op ijs. Daarna wordt drie ml toluen toegevoegd en stevig geschud



**Figuur 2.** Cystathionine  $\beta$ -synthase activiteit in gekweekte fibroblasten van 12 gezonde vrijwilligers ( $\square$ ), 13 obligaat heterozygoten voor cystathionine  $\beta$ -synthase deficiëntie ( $\circ$ ) en 20 patiënten met arteriosclerose en milde hyperhomocysteinemie ( $\blacktriangle$ ).

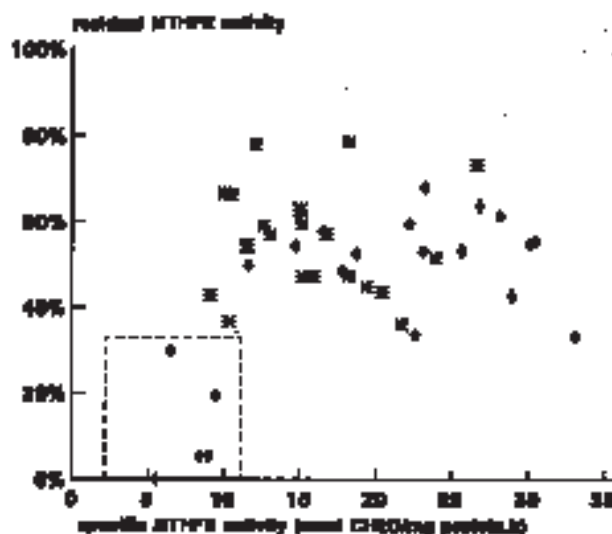
gedurende 15 sec. Na centrifugatie bij lage snelheid wordt de radioactiviteit gemeten in 2,0 ml van de toluen-laag. Eiwit wordt bepaald volgens Lowry et al (22). De enzym activiteit worden uitgedrukt in nmol formaldehyde/uur/mg eiwit.

## RESULTATEN EN DISCUSSIE

Homocystinurie (ernstige hyperhomocysteinemie) ten gevolge van een defect in CS of MTHFR wordt gekenmerkt door sterk verlaagde enzymactiviteiten in fibroblasten (CS of MTHFR) en lymfocyten (MTHFR) (data niet weergegeven). Draggers van deze afwijkingen (bijvoorbeeld ouders van deze patiënten) vertonen een matig verlaagde enzymactiviteit met waarden gelegen tussen de patiënten en controles in (voor CS zie figuur 2 en voor MTHFR zijn de data niet weergegeven).

Als mogelijke oorzaak voor MHH werd heterozygotie voor CS-deficiëntie opgevoerd (4,25). De resultaten weergegeven in figuur 2 en verder onderzoek uitgevoerd in samenwerking met Dr. B. Fowler uit Basel (data niet weergegeven), wijzen echter uit dat deze conclusie niet juist is. De bevinding dat MHH een veel hogere prevalentie vertoont dan heterozygotie voor CS-deficiëntie (26) pleit eveneens tegen CS-deficiëntie als belangrijkste oorzaak voor MHH. Aangezien het humane CS-cDNA bekend is (27), zijn we momenteel bezig een eventuele betrokkenheid van het CS-gen bij MHH definitief uit te sluiten, dan wel te bevestigen. In hetzelfde kader brengen we momenteel mutaties in het CS-gen bij ernstige hyperhomocysteinemie (homocystinurie) in kaart. Dit onderzoek heeft reeds geleid tot het ontdekken van vier nog niet eerder beschreven mutaties.

Zeer recent vonden we dat een relatief milde defi-



**Figuur 3.** Methylene tetrahydrofolaat reductase activiteiten in geïsoleerde lymfocyten van 20 gezonde vrijwilligers (\*) en 21 patiënten met arteriosclerose en milde hyperhomocysteinemie (♦). De X-as geeft de specifieke enzym activiteit weer en de Y-as de rest-activiteit van het enzym na preïncubatie bij 46 °C. Het vierkant met gestreepte lijn geeft weer de thermolabele enzymactiviteiten.

ciëntie van MTHFR (de zogenaamde thermolabele vorm) als één van de enzymatische oorzaken van MHH beschouwd moet worden (24). Deze deficiëntie kenmerkt zich door een MTHFR-activiteit van ongeveer 50% van de normale activiteit en door verhoogde inactivatie bij een preïncubatie bij 46 °C (23,24). Onze bevindingen weergegeven in figuur 3, duiden erop dat MHH in ten minste 25% van de gevallen verklaard kan worden door deze thermolabele variant van MTHFR (24). Het MTHFR-gen is recentelijk gelokaliseerd op chromosoom 1p36.3 en het cDNA is grotendeels gepubliceerd (28). Het MTHFR-gen wordt door ons bestudeerd om de genetische oorzaken op te sporen van zowel de thermolabele vorm van MTHFR als de ernstige deficiënte vorm van MTHFR betrokken bij homocystinurie.

MHH kan biochemisch volledig genormaliseerd worden m.b.v. foliumzuur, al dan niet in combinatie met vitamine B6, B12 en/of betaïne (29-31). Helaas is het klinisch effect van deze therapie vooralsnog onbekend. Wel hebben onderzoekers van het VU-ziekenhuis te Amsterdam kunnen aantonen, dat bij patiënten met MHH het vasculaire endotheel mogelijk geactiveerd is, vanwege verhoogde spiegels in het bloed van trombomoduline, van Willebrand Factor en endotheline. De homocysteïne verlagende therapie (foliumzuur 5 mg/dag, plus vitamine B6 250 mg/dag) heeft eventueel een gunstig effect op het endotheel, omdat door deze therapie de concentraties van trombomoduline, van Willebrand Factor en endotheline in bloed significant werden verlaagd (32,33). Wel is het beschermend effect van foliumzuur (4 mg/dag) vastgesteld op het herhaald optreden van neurale buisdefecten (11).

Screening op MHH bij gezonde familieleden van patiënten met MHH laat zien, dat MHH in veel gevallen

genetisch bepaald wordt (5,6,8, eigen waarnemingen). Momenteel is echter ons standpunt dat routinematige screening op MHH onder familieleden van MHH patiënten niet gerechtvaardigd is, omdat het tot nu toe onbekend is of de homocysteïne verlagende therapie daadwerkelijk het risico op hart- en vaatziekten of op obstetrische complicaties, zoals herhaalde spontane abortus of ernstige placentaire infarctering, vermindert (34).

Starkebaum en Harlan (35) constateerden dat gekweekte endotheelcellen beschadigd werden door hoge concentraties van het vrije homocysteïne via vorming van  $H_2O_2$ . In veel artikelen wordt dan ook lipidperoxydatie genoemd als pathobiochemisch mechanisme bij hyperhomocysteinemie. Echter bij homozygoten voor CS-deficiëntie met vaak zeer hoge homocysteïne spiegels werd door ons (36,37) geen verhoogde LDL-oxxydatie of andere aanwijzingen voor verhoging van lipidperoxydatie vastgesteld. Op dit moment moeten wij concluderen dat er geen goed mechanisme bekend is, op basis waarvan de endotheel beschadigende werking van homocysteïne verklaard kan worden (38).

Geconcludeerd mag worden dat MHH een veel voorkomende risicofactor is voor hart- en vaatziekten en obstetrische complicaties. Heterozygotie voor CS-deficiëntie is waarschijnlijk niet de belangrijkste oorzaak voor MHH. Enzymatische oorzaken voor MHH moeten onder meer gezocht worden in verlaagde activiteiten van MTHFR. Naast genetische afwijkingen wordt de manifestatie van MMH waarschijnlijk ook bepaald door externe factoren, zoals inname van diverse vitamines. MMH kan met behulp van goedkope en relatief ongevaarlijke vitamine therapie volledig worden genormaliseerd. Het klinisch effect van de homocysteïne verlagende therapie is vooralsnog onbekend.

### Homocysteïne onderzoek

Op de afdelingen Kindergeneeskunde en Endocrinologie van het Academisch Ziekenhuis Nijmegen werd rond 1980 gestart met onderzoek aan homocystinurie. De afgelopen 15 jaar heeft het homocysteïne/methionine onderzoek een enorme vlucht genomen (4,10,12-16,19,20,24,29-34,36-54). Momenteel participeren de afdelingen Kindergeneeskunde, Interne Geneeskunde (Endocrinologie, Gastroenterologie, Laboratorium Endocrinologie en Voortplanting), Gynaecologie/Obstetrie, Geriatrie en Toxicologie aan de homocysteïne-werkgroep Nijmegen. Nauwe samenwerkingsverbanden bestaan er met het Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit Amsterdam (Kindergeneeskunde, Vaatchirurgie), Leijenburg Ziekenhuis te Den Haag (Hematologie) en het Gaubius Instituut te Leiden. In totaal werken binnen het bovengenoemde samenwerkingsverband 9 promovendi (waarvan 7 in Nijmegen) aan diverse projecten, variërend van klinische interventie-studies tot basaal enzymatisch en moleculair genetisch onderzoek op subsidies van onder meer de Stichting Primaire Preventie Aangeboren Afwijkingen, De Nederlandse Hartstichting, het Preventiefonds, het Prinses Beatrix Fonds en het Termeulen Fonds.

Internationaal wordt actief samengewerkt met Dr. J. Finkelstein (Washington, USA), Dr. W.A. Gahl (Bethesda, USA), Prof. J. Kraus (Denver, USA), Dr. R. Rozen (Montreal, Canada), Dr. O. Labudova (Bonn, Duitsland) en Dr. B. Fowler (Bazel, Zwitserland).

Het klinisch biochemisch onderzoek aan hyperhomocysteinemie op het Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie van het AZN kan als volgt worden ingedeeld:

- Onderzoek aan metaboliëten: zoals de bepalingen van totaal homocysteïne, methionine, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteïne, cystathionine, totaal cysteïne in diverse lichaamsvloeistoffen, zoals plasma, liquor en urine.
- Onderzoek aan enzymen: activiteitsmetingen van CS, methionine synthase, MTHFR en thermolabel MTHFR.
- Moleculair genetisch onderzoek aan CS, MTHFR en thermolabel MTHFR: mutatie detectie en expressie van recombinant eiwit voor opheldering van de functionele betekenis van mutaties.
- Pathobiochemisch onderzoek: de rol van lipidperoxydatie in hyperhomocysteinemie het effect van afwijkend homocysteïne metabolisme op vasculair endotheel en endothele markers.

### Literatuur

1. Carson NAJ and Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962; 37: 505-513.
2. Gerritsen T, Vaughn JG and Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962; 9: 493-496.
3. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 1964; 143: 1443-1445.
4. Boers GHJ, Smals AGH, Trijbels JMF, Fowler B, Bakkeren JAJM, Schoonderwaldt HC, Kleijer WJ, Kloppenborg PWC. Heterozygosity for homocystinuria in peripheral and cerebral occlusive arterial disease. *N Engl J Med* 1985; 313: 709-715.
5. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill 1989, p 693-734.
6. Ueland PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In Francis RB (ed) *Artherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis and endothelial function*, Marcel Dekker Inc, New York, 1992, p 183-236.
7. Brattström L and Lindgren A. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for stroke. *Neurol Res* 1992; 14: 81-84.
8. Kang SS, Kong PWK, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 279-298.
9. Falcon CR, Cattaneo, Panzeri D, Martinelli I and Mannucci PM. High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1080-1083.
10. Bienvenu T, Ankri A, Chadeaux B, Montalescot G and Kamoun P. Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Tromb Res* 1993; 70: 123-129.
11. MRC Vitamin Study Research Group: Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338: 131-137.

12. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels JMF and Eskes TKAB. Hyperhomocysteinaemia and recurrent spontaneous abortion or abruptio placentae. *Lancet* 1992; 339: 1122-1123.
13. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Steegers EAP, Trijbels JMF, Thomas CMG and Eskes TKAB. Effect of sub-50 oral contraceptives on homocysteine metabolism: a preliminary study. *Contraception* 1992; 45: 129-139.
14. Wouters MCAJ, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels JMF, Thomas CMG, Borm GF, Steegers-Theunissen RPM and Eskes TKAB. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993; 60: 820-825.
15. Steegers-Theunissen RPM, Homocysteine, vitamins and neural-tube defects, PhD. Thesis, University of Nijmegen, Netherlands, 1993.
16. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels JMF, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CMG, Borm GF, Wouters MGAJ, Eskes TKAB. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural tube defects. *Metabolism*, in press
17. Finkelstein JD Methionine metabolism in mammals. *J Nutr* 1990; 1: 228-237.
18. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G and Ueland PM Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993; 39: 263-271.
19. Blom HJ, Wevers RA, Verrips A, Trijbels JMF. CSF homocysteine and the cobalamin status of the brain. *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 517-519.
20. TePoele-Pothoff MTWB, VandeBerg M, Franken DG, Boers GHJ, Jakobs C, DeKroon IFI, Eskes TKAB, Trijbels JMF, Blom HJ. Three different methods for the determination of total homocysteine in plasma. *Ann Clin Biochem*, in press.
21. Fowler B, Kraus J, Packman S, Rosenberg LE. Evidence for three distinct classes of cystathionine  $\beta$ -synthase mutants in cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1978; 61: 645-653.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
23. Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991; 48:536-545
24. Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, Stevens EMB, Trijbels JMF and Blom HJ. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Human Genet*, in press.
25. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten A, Cahalane S, Fowler B and Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 128-36.
26. Daly L, Robinson K, Tan KS, Graham I. Hyperhomocysteinemia: a metabolic risk factor for coronary heart disease determined by both genetic and environmental influences? *Quart J Med* 1993; 86: 685-689.
27. Kraus JP, Manju Swaroop KL, Ohura T, Tahara T, Rosenberg LE, Roper MD and Kozich V. Human cystathionine  $\beta$ -synthase cDNA: sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Human Mol Genet* 1993; 2: 1633-1638.
28. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG and Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 1994; 7: 195-200.
29. Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels JMF, Kloppenborg PWC. Homocysteine lowering effect of treatment with vitamin B6, folic acid and betaine in vascular patients with mild hyperhomocysteinemia. *Arterioscl Thromb* 1994;14: 465-470
30. Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, Trijbels JMF. Effect of various regimens of vitamin B6 and folic acid on mild hyperhomocysteinemia in vascular patients. *J Inher Metab Dis* 1994; 17: 159-162.
31. VandeBerg M, Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, Jakobs C, Stehouwer CDA and Rauwerda JA. Combined vitamin B6 plus folic acid therapy in young patients with arteriosclerosis and hyperhomocysteinemia. *J Vascul Surg*, in press.
32. VandenBerg M, Boers GHJ, Franken DG, Blom HJ, VanKamp GJ, Jakobs C, Rauwerda JA, Kluft C and Stehouwer CDA. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in young patients with peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest*, in press.
33. VandenBerg M, Stehouwer CDA, Boers GHJ, Rauwerda JA and Kluft C. Arterial disease in hyperhomocysteinemia and the effect of treatment: a pilot study. *Fibrinolysis* 1994; 8, suppl 2: 88-90.
34. DenHeijer M, Bos GMJ, Gerrits WBJ, Blom HJ. Will a decrease of blood homocysteine by vitamin supplementation reduce the risk for vascular disease? *Fibrinolysis*, 1994; 8, suppl 2: 91-92.
35. Starkebaum G and Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77: 1370-1376.
36. Blom HJ, Engelen DPE, Boers GHJ, Stadhouders AM, Sengers RCA, de Abreu R, TePoele-Pothoff and Trijbels JMF. Lipid peroxidation in homocysteinemia. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 419-22.
37. Blom HJ, Kleinveld HA, Boers GHJ, Demacker PNM, Hak-Lemmers HLM, Te Poele-Pothoff MTWB and Trijbels JMF. Lipid Peroxidation and Susceptibility of Low-Density Lipoprotein to In Vitro Oxidation in Hyperhomocysteinemia. *Eur J Clin Invest*, in press.
38. Blom HJ and VandeMolen E. Pathobiochemical implications of hyperhomocysteinemia. *Fibrinolysis* 1994; 8, suppl 2: 86-87.
39. Boers GHJ, Smals AGH, Drayer JIM, Trijbels JMF, Leermakers AI and Kloppenborg PWC. Pyridoxine treatment does not prevent homocysteinemia after methionine loading in adult homocystinuria patients. *Metabolism* 1983; 32: 290-297.
40. Boers GHJ, Fowler B, Smals AGH et al. Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts. *Human Genet* 1985; 69: 164-169.
41. Boers GHJ, Homocystinuria: homozygosity versus heterozygosity, PhD Thesis, University of Nijmegen, Netherlands, 1985.
42. Gahl WA, Bernardini I, Finkelstein JD, Tangerman A, Martin JJ, Blom HJ, Mullen KD, Mudd SH. Transsulfuration in an adult with hepatic methionine adenosyltransferase deficiency. *Clin Invest* 1988; 81: 390-397.
43. Blom HJ, Boers GHJ, van den Elzen JPAM, Gahl WA, Tangerman A. Transamination of methionine in humans. *Clin Science* 1989; 76: 43-49.
44. Blom HJ, Boers GHJ, van den Elzen JPAM, van Roesel JMM, Trijbels JMF, Tangerman A. Differences between premenopausal women and young men in the transamination pathway of methionine catabolism, and the protection against vascular disease. *Eur J Clin Invest* 1988; 18: 633-639.
45. Blom HJ, Boers GHJ, van Roesel JMM, Trijbels JMF, Tangerman A. Cystathionine synthase deficient patients do not utilize the transamination pathway of methionine to control hypermethioninemia and homocysteinemia. *Metabolism* 1989; 38: 577-582.
46. Blom HJ. Pathobiochemical aspects of methionine. PhD Thesis, University of Nijmegen, Netherlands, 1988.
47. Blom HJ, Boers GHJ, Gahl WA, Tangerman A, Trijbels JMF. Alternative methionine degradation via the trans-



- mination pathway: an option for therapy for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 375-378.
48. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Trijbels JMF and Eskes TKAB. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N Eng J Med* 1991; 324: 199-200.
  49. Blom HJ, Davidson AJ, Finkelstein JD, Luder AS, Bernardini I, Martin JJ, Tangerman A, Trijbels JMF, Mudd SH, Goodman SI, Gahl WA. Persistent hypermethioninemia with dominant inheritance. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 188-197.
  50. Franken DG, Vreugdenhil A, Boers GHJ, Verrips A, Blom HJ, Novakova IRO. Hyperhomocysteinemia and protein C-deficiency type 1 in one family. *Stroke* 1993; 24: 1599-1600.
  51. VanderMooren MJ, Wouters MCAJ, Blom HJ, Schellekens LA, Eskes TKAB, Rolland R. Hormone replacement therapy may reduce high serum homocysteine in postmenopausal women. *Eur J Clin Invest*, in press.
  52. Stet EH, DeAbreu RA, Bokkerink JPM, Blom HJ, Lambooy HJ, Vogels-Mentink TM, DeGraaf-Hess AC, VanRaay-Selten, Trijbels JMF. Reduction of S-adenosylmethionine synthesis by 6-mercaptopurine and methylmercaptopurine ribonucleoside in Molt F4 malignant lymphoblasts. *Biochem J*, in press.
  53. Steegers-Theunissen RPM, Boers GHJ, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CMG, Trijbels JMF, Borm GF, Eskes TKAB.

Neural-tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am J Obst Gyn*, in press.

54. VanAerts LAGJM, Blom HJ, DeAbreu RA, Trijbels JMF, Eskes TKAB, Copius Peereboom-Stegeman JHJ and Noordhoek J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured post-implantation rat embryos. *Teratology*, in press.

### Summary

*Hyperhomocysteinemia. Blom HJ, Boers GHJ, Eskes TKAB en Trijbels JMF. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 20-26.*

Cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency and thermolability of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) were examined as a possible cause of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature vascular disease. Only one out of 20 patients with mild hyperhomocysteinemia and vascular disease had cystathionine  $\beta$ -synthase activity in the range of obligate heterozygotes for cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. Five out of 21 patients with mild hyperhomocysteinemia and vascular disease had thermolabile MTHFR.

In conclusion, heterozygosity for cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency is probably not a major cause for mild hyperhomocysteinemia. In about 25% of the hyperhomocysteinemic patients with premature vascular disease, abnormal homocysteine metabolism can be attributed to thermolabile MTHFR.

*Key-words: homocysteine; methionine; cystathionine  $\beta$ -synthase; methylenetetrahydrofolate reductase.*

*Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 26-31*

## Detectie en klinische relevantie van geactiveerde bloedplaatjes

M.C.L. SCHAAP en A. STURK

Enkele jaren geleden is een techniek op de flowcytometer beschreven, waarbij de in-vivo activatiestatus van de bloedplaatjes kan worden gemeten. Deze maakt gebruik van een combinatie van twee monoclonale antistoffen per monster: één gericht tegen een plaatjes-specifiek antigeen (glycoproteïne Ib), de ander tegen een antigeen dat verhoogd of verlaagd op het oppervlak van het bloedplaatje tot expressie komt bij activatie van deze cel. De laatste jaren zijn veel klinische studies verricht met antistoffen om de toestand van de fibrinogeen receptor te meten, of tegen oorspronkelijk granulaire gelocaliseerde componenten die bij de secretoire reactie op het oppervlak voorradig komen (P-selectine, GP53). Hierbij is aangetoond dat de bloedplaatjes in een verhoogde activatietoestand circuleren bij bijvoorbeeld cardiobypass, PTCA behandeling, hemodialyse, pre-eclampsie en cocaïne gebruik. De techniek is voldoende reproduceerbaar

en gevoelig om ook in andere klinische situaties de mogelijke geactiveerde toestand van het circulerende bloedplaatje te onderzoeken. Dit zou vervolgens therapeutisch van nut kunnen zijn, hetgeen recent in een klinische studie met een Fab fragment van een antistof tegen het GPIIb/IIIa complex van de bloedplaatjes is aangetoond in patiënten die een PTCA ondergaan.

### De fysiologische en pathologische rol van bloedplaatjes

Bloedplaatjes spelen een belangrijke rol bij de hemostase of bloedstelping. Activatie van het stollingssysteem resulteert in een fibrine netwerk dat met name van belang is voor de secundaire hemostase, de bestendiging van de bloedprop die ontstaat bij de beschadiging van een vaatwand. Vandaar dat defecten in het stollingssysteem van een patiënt met name leiden tot nabloedingen bij bijvoorbeeld kiesextracties. Daarentegen zijn de bloedplaatjes met name van belang voor de primaire hemostase, de vorming van een bloedplaatjesprop die in eerste instantie naast vasoconstrictie de lesie in de vaatwand dicht. De vorming van de plaatjesprop is het gevolg van de activatie van bloedplaatjes onder invloed van een veelheid aan sti-

*Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis Leiden*

Correspondentie: Prof. Dr. Sturk, afdeling Klinische Chemie (CKCL), Gebouw-1, E-2-P, Academisch Ziekenhuis Leiden, Rijnsburgerweg 10, 2333 AA Leiden.