

Methylmalonsäure zur Bestimmung des Vitamin B₁₂-Mangels

Heinz Troxler^a, Martin Hersberger^a, Matthias Baumgartner^b

Kinderspital, Zürich

^a Abteilung für Klinische Chemie und Biochemie, ^b Abteilung für Stoffwechsel und Molekulare Pädiatrie

Grundlagen

Vitamin B₁₂, oft auch als Cobalamin bezeichnet, ist ein kobalthaltiges und wasserlösliches Vitamin, das durch Bakterien hergestellt wird. Höhere Organismen wie der Mensch oder Pflanzen können dieses Molekül nicht synthetisieren, und es muss durch den Verzehr von Fleisch, Eiern oder Milchprodukten aufgenommen werden. In Tieren wird Vitamin B₁₂ durch Mikroben produziert. Vitamin B₁₂ hat zwei wichtige Funktionen im Stoffwechsel. Zum einen dient es in Form von Methylcobalamin als Cofaktor für das Enzym Methionin-Synthase. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Homocystein zur Aminosäure Methionin. Zum anderen ist es als Adenosylcobalamin Cofaktor für das Enzym Methylmalonyl-Coenzym A Mutase, das die Umwandlung vom Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA katalysiert. Diese Mutase ist im Abbau von verschiedenen Aminosäuren, ungeradzähligen Fettsäuren und Cholesterin involviert.

Klinik des Vitamin B₁₂-Mangels

Klinisch führt ein Vitamin B₁₂-Mangel meist vor den hämatologischen Zeichen der perniziösen Anämie zu teilweise irreversiblen neurologischen Veränderungen. Dabei führt eine Demyelinisierung der peripheren Nerven zu Polyneuropathie mit Hypästhesie und Parästhesien. Eine Demyelinisierung im Rückenmark führt zur funikulären Myelose mit Gangunsicherheit, Pyramidenbahnzeichen und Paresen, während zentral Psychosen und Demenzen entstehen. Der Vitamin B₁₂-Mangel wirkt sich aber auch auf die rasch proliferierenden Epithelien des Magen-Darm-Traktes aus und vermindert deren Zellreifung. Dies führt zu Hunter Glossitis mit brennender, glatt-roter Zunge und zu Diarrhoe.

Problematik der Spiegelbestimmung

Vitamin B₁₂ ist im Blut hauptsächlich an die Proteine Transcobalamin und Haptocorrin gebunden, wobei nur der an Transcobalamin gebundene kleinere Teil (rund 10–25%) biologisch verfügbar und damit aktiv ist. Dieser Komplex von Transcobalamin und Vitamin B₁₂ wird Holotranscobalamin genannt. Die Bestimmung von Vitamin B₁₂ im Serum zur Abklärung des Vitamin B₁₂-Status

weist deshalb eine limitierte Spezifität und Sensitivität auf. Um abzuklären, ob ein echter Mangel vorherrscht, kann eine zusätzliche Bestimmung des Holotranscobalamins oder der zwei Metabolite Methylmalonsäure und Homocystein Klarheit verschaffen. Beim Vitamin B₁₂-Mangel ist das Holotranscobalamin erniedrigt, während die Konzentrationen der beiden Metabolite ansteigen, da ihre Weiterverarbeitung zu Succinat respektive Methionin gestört ist.

Methylmalonsäure-Bestimmung mit Massenspektrometrie

Methylmalonyl-CoA wird als freie Methylmalonsäure im Urin, Serum oder im Plasma mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. In Abbildung 1 ist das Prozedere schematisch dargestellt. Die Methylmalonsäure wird in einem ersten Schritt zusammen mit anderen organischen Säuren mit einem Lösungsmittel extrahiert und danach chemisch derivati-

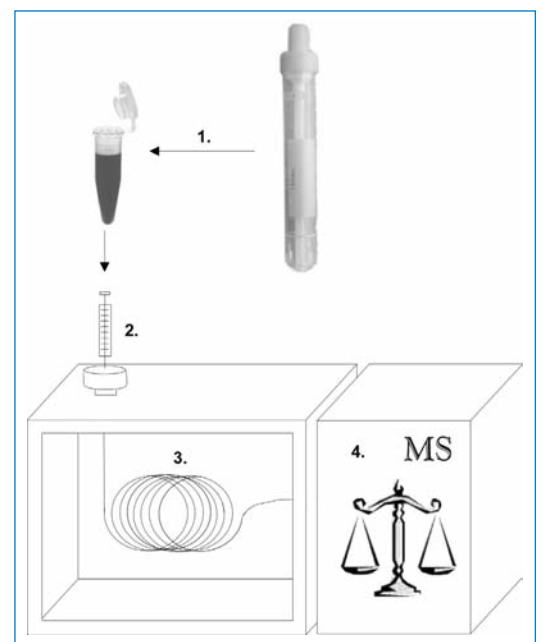


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Methylmalonsäure-Bestimmung. Schritt 1: Extraktion und Derivatisierung.

Schritt 2: Injektion.

Schritt 3: Auftrennung.

Schritt 4: Massenspektrometrische Detektion.

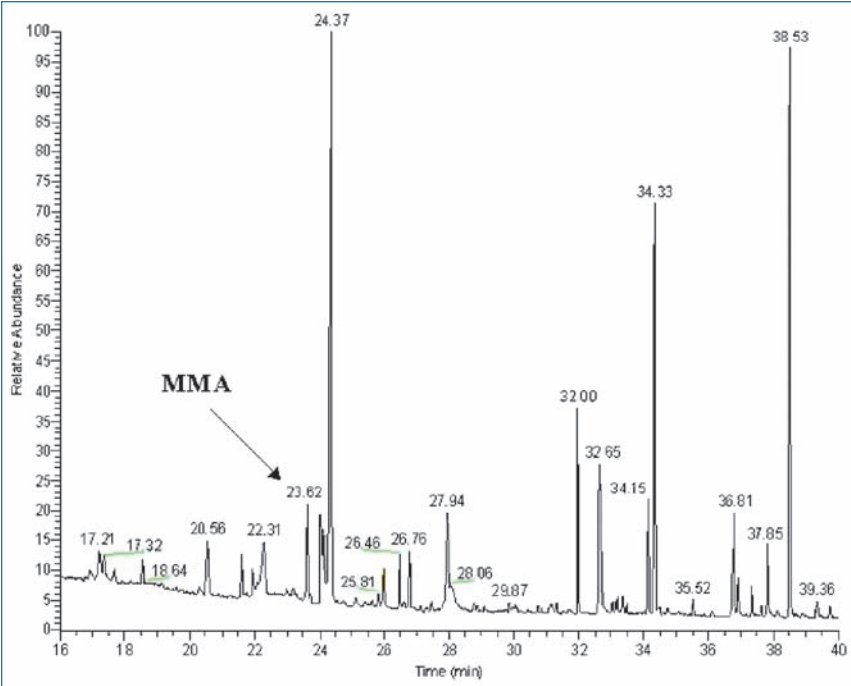
siert (Schritt 1). Jetzt werden die Säuren mit einem Gaschromatographen aufgetrennt und direkt mit einem Massenspektrometer detektiert. Dabei wird der Säureextrakt im Injektor zum Verdampfen gebracht (Schritt 2) und auf eine 25 Meter lange, dünne Glaskapillare, deren Innenwand mit einer Flüssigkeit beschichtet ist, geleitet. Die verschiedenen Säuren durchlaufen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit die Glaskapillare (Schritt 3) und eluieren eine nach der anderen aus dem Gaschromatographen direkt in das Massenspektrometer. Hier werden die Analyte gewogen, d.h. die Massen der einzelnen Säuremoleküle werden gemessen (Schritt 4) und somit detektiert.

Für die Bestimmung von Methylmalonsäure sollten rund 5 ml Urin (Gefäss ohne Zusatz) oder etwa 1 ml Serum/Plasma abgenommen und ins spezialisierte Labor geschickt werden. Die Proben können ohne Kühlung verschickt werden, müssen dann jedoch am nächsten Tag im Labor ankommen.

Die Stärken von massenspektrometrischen Tests sind zweifellos deren hohe Spezifität und Selektivität. Bei der Massenspektrometrie wird ein sehr spezifisches Charakteristikum des Analyten, nämlich seine Masse (Gewicht), analysiert. Retentionszeit und Massenspektrum bilden zusammen ein hochspezifisches Kriterium für die Analyse. Auch die Sensitivität ist ein Pluspunkt. Mit dieser Analyse können bereits kleinste Mengen des Analyten detektiert und quantifiziert werden. Die Schwächen liegen beim erhöhten Preis dieser

Analyse, der bei 180 Taxpunkten liegt. Für die hohen Kosten der Analyse sind die relativ arbeitsintensive Aufarbeitung der Proben und die teuren Instrumente (GC-MS-Systeme) verantwortlich.

Beispiel: Kleinkind einer Veganerin

In Abbildung 2  ist das organische Säureprofil (Chromatogramm) aus dem Urin eines Kleinkindes dargestellt. Die Mutter, eine Veganerin, ernährte ihr Kind nur mit Muttermilch, was zu einem Vitamin B₁₂-Mangel beim Kind führte. Die Peaks entsprechen den verschiedenen Komponenten im Urin, so ist z.B. der intensive Peak bei 24,37 min Harnstoff, oder der Peak bei 38,53 min Zitronensäure. Methylmalonsäure eluiert mit der Retentionszeit 23,62 min.

Wann soll Methylmalonsäure bestimmt werden?

Nach wie vor gibt es keine Goldstandard-Methode für die Bestätigung eines Vitamin B₁₂-Mangels, und auch die Bestimmung der Methylmalonsäure wird kontrovers diskutiert. So müssen leicht erhöhte Methylmalonsäurewerte nicht unbedingt pathologisch und behandlungsbedürftig sein [1]. Zudem können andere Konditionen wie zum Beispiel eine Niereninsuffizienz oder Hypovolämie [2] zu einer erhöhten Methylmalonsäure in Blut oder Urin führen. Neuerdings wird in der Literatur die Analyse von Holotranscobalamin für die frühe Diagnose propagiert [3]. Holotranscobalamin wird im Gegensatz zur Methylmalonsäure nicht durch eine reduzierte Nierenfunktion beeinflusst.

Bei Verdacht auf Vitamin B₁₂-Mangel steht mit der Methylmalonsäure-Bestimmung ein sehr sensitiver Test zur Verfügung, der frühzeitig zur Sicherung der Diagnose verhilft und mit welchem sich auch ein Ansprechen auf die Therapie überprüfen lässt. So ist die Methylmalonsäure bereits im frühen Stadium eines Vitamin B₁₂-Mangels erhöht, noch bevor die Vitamin B₁₂-Konzentration im Serum messbar sinkt [1]. Handelt es sich andererseits um einen schweren Vitamin B₁₂-Mangel, so sind neben einer über 100-fach erhöhten Methylmalonsäure auch weitere Metabolite (z.B. 3-Hydroxypropionsäure oder Methylzitronensäure) erhöht.

Im Gegensatz zur Bestimmung der Vitamin B₁₂-Konzentration im Serum, die nur beim alimentären Vitamin B₁₂-Mangel sowie bei Störungen der enteralen Resorption von Vitamin B₁₂ tief ist, werden durch die Analyse der Methylmalonsäure auch seltene Störungen im Transport von Vitamin B₁₂ [4], in der intrazellulären Synthese des aktiven C-Faktors Adenosylcobalamin [5] sowie ein Defekt der Methylmalonyl-CoA Mutase selbst erfasst.

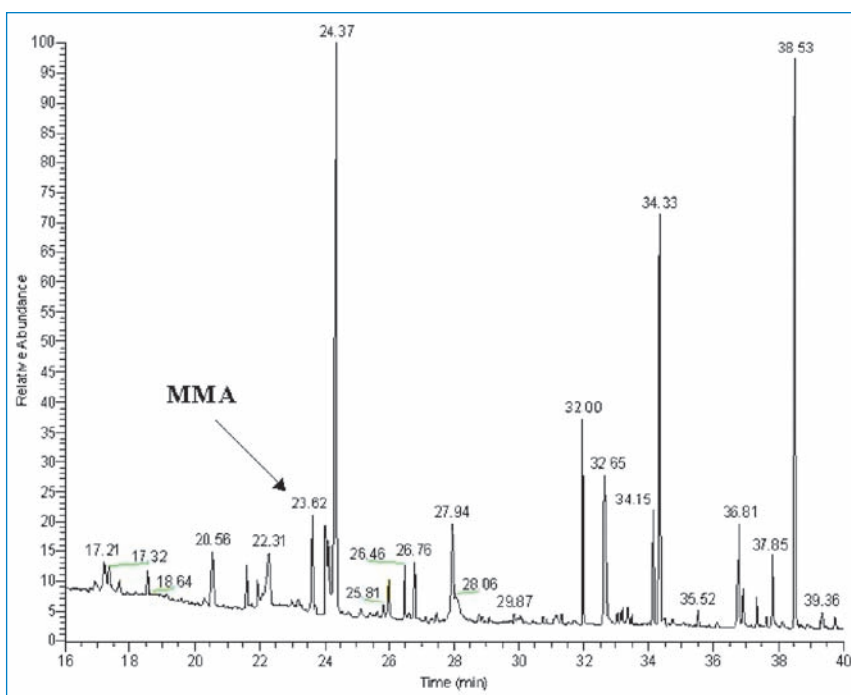


Abbildung 2

Methylmalonsäure-Bestimmung mit GC-MS.

Organisches Säureprofil (Chromatogramm). Methylmalonsäure (MMA) eluiert bei 23,62 min.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der Erfolg einer oralen oder parenteralen Therapie mit Vitamin B₁₂ sich einfach und sicher mittels Analyse von Methylmalonsäure im Urin oder Serum/Plasma

messen lässt. So normalisiert sich die Methylmalonsäure bei einem Vitamin B₁₂-Mangel bereits wenige Tage nach Beginn einer Therapie mit Vitamin B₁₂ vollständig.

Korrespondenz:
Dr. chem. Heinz Troxler
Abteilung für Klinische Chemie
und Biochemie
Kinderspital
CH-8032 Zürich
heinz.troxler@kispi.uzh.ch

Literatur

- 1 Chanarin I, Metz J. Diagnosis of cobalamin deficiency: the old and the new. *Brit J Haematol.* 1997;97:695–700.
- 2 Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B₁₂ and folate. *Clinical Chemistry.* 2000;46(8):1277–83.
- 3 Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN, Green R. Measurement of total vitamin B₁₂ and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B₁₂ deficiency. *Clinical Chemistry.* 2006;52(2):278–85.
- 4 Whitehead VM. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *Brit J Haematology.* 2006;134(2):125–36.
- 5 Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, et al. Gene identification for the cblD defect of vitamin B₁₂ metabolism. *N Engl J Med.* 2008; 358(14):1454–64.