

PROTOKOLL

HOMOCYSTEIN-II UNDERSØKELSEN I HORDALAND: OPPFØLGNING AV HOMOCYSTEINKOHORTEN 1992-93

**Et tilleggsprosjekt ved HUSK
(Hordalandsundersøkelsen)
1997-99**

**Institutt for samfunnsmedisinske fag
Institutt for farmakologi
Universitetet i Bergen**

**Avdeling for kostholdsforskning
Universitetet i Oslo**

Statens helseundersøkelser

Mai 1997

SAMMENDRAG

Bakgrunn:

Homocystein er en aminosyre som kan måles i blodet. Homocystein er en indikator på kroppens B-vitaminstatus og en viktig risikofaktor for hjertekarsykdom som man fremdeles har liten kunnskap om. Homocystein har muligens også betydning for utvikling av kreft.

Homocysteinundersøkelsen i Hordaland ble gjennomført i 1992-93 i samarbeid mellom Statens Helseundersøkelser (SHUS) og Universitetet i Bergen. Denne undersøkelsen har allerede gitt ny viten om sammenhenger mellom homocystein og etablerte risikofaktorer for hjertekarsykdom, blant andre røyking. Undersøkelsen omfatter over 18,000 individer, som ved basisundersøkelsen var i aldersgruppene 40-42 år og 65-67 år, er den største i sitt slag og en viktig kilde til ny viten om homocystein.

Hensikt:

Vinne ytterligere kunnskap om homocystein og B-vitaminers betydning for kroniske sykdommer.

Prosjekt:

Statens helseundersøkelser vil i forbindelse med Hordalandsundersøkelsen (HUSK) 1997-99 invitere alle de eldste kohortmedlemmene samt en tredjedel av de yngste deltakerne fra 1992-93 til ny undersøkelse. Ialt ca. 9000 personer vil bli invitert og deltakelse bygger på skriftlig informert samtykke.

I tillegg til SHUS standardundersøkelse vil vi gjennomføre en detaljert kartlegging av kostholdet ved hjelp av et kostspørreskjema utviklet av Avdeling for kostholdsforskning ved Universitetet i Oslo. Dette er viktig blant annet fordi kostens innhold av folat og vitamin B-12 har betydning for homocystein.

I blodprøver vil vi måle homocystein på nytt, måle andre B-vitaminer og B-vitaminmarkører. Vi vil også måle i gener som koder nøkkelenzymene i homocystein/folat metabolismen.

Personer med sterkt forhøyet homocystein og tegn på alvorlig folat eller vitamin B12 mangel vil få tilbud om etterundersøkelse.

Blodprøvene vil lagres med tanke på fremtidig bestemmelse av faktorer som har sammenheng med B-vitaminomsetningen og betydning for senere sykdomsutvikling.

Deltakerne vil følges opp med tanke på fremtidig sykdom ved hjelp av sykehusenes diagnoseregistre, Kreftregisteret, Dødsårsaksregisteret og andre sykdomsregistre.

Betydning:

Prosjektet er det største i sitt slag og resultatene vedrørende homocystein og B-vitaminers rolle for kroniske sykdommer ventes å få betydning også internasjonalt.

BAKGRUNN

Homocystein er en svovelaminosyre som målt i blodet er en risikofaktor for hjertesykdom, cerebrovaskulær sykdom og perifer karsykdom, både på vene og arterie siden (Boushey et al 1995; Perry et al 1995; Arnesen et al 1995; den Heijer et al 1995, 1996). Forhøyet homocystein er en følsom indikator for mangel på vitaminene B-12 og folat og kan skyldes medfødte enzymdefekter (både alvorlige stoffskiftefeil (inborn errors) som homocystinuri, heterozygote bærertilstander for disse og hyppig forekommende genetiske variasjoner i enzymene i homocysteinmetabolismen, som for eksempel termolabil metylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR)).

I 1992-93 ble den største kohorten som finnes med homocysteinbestemmelser på alle deltakerne - 18043 individer i aldersgruppen 40-67 år (Nygård et al 1995) - etablert i Hordaland, som en del av Hordalandsundersøkelsen. Referanseområder for plasma totalhomocystein (tHcy) ble etablert, og klare sammenhenger også til andre livsstilsfaktorer enn forbruk av vitamintabletter, frukt og grønnsaker (folatrike matvarer) ble funnet: Plasma tHcy var forhøyet blant røykere, og blant individer med høyt kaffeforbruk og liten fysisk aktivitet. I tillegg var homocystein forhøyet ved tilstedeværelse av andre sterke risikofaktorer for hjertekarsykdom, inkludert forhøyet kolesterol og blodtrykk, høy alder, og blant menn (Nygård et al 1995).

Det er nylig påvist hyppig forekommende genetisk variasjon i nøkkelenzymet metylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) i homocystein/folat metabolismen (Kang et al 1991, Frosst et al 1995). En C677T mutasjon i MTHFR-genet forekommer i 10 % av befolkningen i Hordaland og er forbundet med nedsatt aktivitet/termolabilitet i enzymet og lett forhøyet homocystein (Ueland og Refsum 1996; Guttormsen et al 1996). Foreløpige studier har både funnet og ikke funnet sammenheng mellom denne mutasjonen og hjertekarsykdom (Kang et al 1991; Kluijtmans et al 1996; Motulsky 1996). Dagens tenkning går i retning av at kombinasjonen av lavt folatinntak og mutasjonen kan være uheldig med tanke på senere sykdomsutvikling.

Homocysteinkohorten i Hordaland følges nå prospektivt og det er i gang arbeid (med driftsstøtte fra Norges forskningsråd) for å etablere registrering av sykehusinnleggelser for hjertekarsykdom i Hordaland for de aktuelle aldersgruppene.

PROSJEKTFORSLAG

I forbindelse med HUSK 1997-99 vil vi invitere alle mannlige og kvinnelige medlemmer av Homocysteinkohorten i Hordaland som var 65-67 år i 1992-93, samt alle 41-42 årige deltakere av begge kjønn bosatt i kommunene Bergen, Askøy, Fjell og Os (undersøkelsen begrenser seg til disse gruppene av kostnadshensyn). Alle som innkalles vil gjennomgå SHUS standard undersøkelse (spørreskjema, høyde, vekt, blodtrykk, kolesterol, HDL) samt besvare HUSK-spørreskjema-I, avdeling for kostholdsforsknings kostspørreskjema og et eget skjema med spørsmål om sykehusinnleggelse og sykdommer i perioden siden forrige undersøkelse i 1992-93. Det vil bli tatt en blodprøve (fullblod og plasma) som vil fryses ned og lagres.

Tabell 1: Antall deltakere fra Bergen, Askøy, Os, Fjell

Alder	1992-93		Inviteres 1998-99	
	Antall	I live 1997	80% deltakelse	
65-67	4766	4521	3616	
40-41	5016	4978	3982	
SUM		9499	7600	

Formål

1. Registrere sykdomsopptreden av alle slag i siden forrige undersøkelse, og relatere sykdom til plasma totalhomocystein målt i 1992-93.
2. Undersøke kostvaner for å studere sammenhengen mellom kosthold, B-vitaminstatus og plasma totalhomocystein.
3. Undersøke endringer i plasma totalhomocystein over en 5-7 års periode.
4. Bestemme C677T mutasjon i metylentetrahydrofolatreduktase genen og studere dennes relasjon til sykdomsopptreden og interaksjoner med folatinntak, livsstil og vitaminstatus som determinant for forhøyet homocystein.

DATAINNSAMLING

Spørreskjemaer

1. Statens helseundersøkelsers standardskjema (vedlagt).
2. Avdeling for kostholdsforskning ved Universitetet i Oslo har utviklet et kvantitativt spørreskjema for kostholdsregistrering. Dette skjemaet er optisk lesbart og det har vært utviklet og validert fra 1989 (Nes et al 1992, Solvoll et al 1993; Søyland et al 1994; Søyland et al 1993, Andersen et al 1995a; Andersen et al 1995b, Andersen et al 1996). Skjemaet kartlegger deltakernes vanlige kosthold over en viss periode (vanligvis i løpet av det siste året) og inneholder spørsmål om inntak av 180 matvarer. Skjema er vedlagt.
3. For at ikke byrden på deltakerne skal bli for stor, planlegger vi å benytte et kortere skjema 2 blant disse deltakerne. Hovedhensikten er å kartlegge sykdom siden forrige undersøkelse i 1992-93. Dette gjelder i første omgang tilstander der deltakeren ikke har vært innlagt på sykehus, som for eksempel hjerneslag og perifer karsykdom/kirurgi. Vi har tidligere fått tillatelse av Datatilsynet til å registrere retrospektivt sykehusinnleggelses blant deltakerne i homocysteinstudien. I tillegg vil vi bruke en del spørsmål som inngår i skjema 2, inkludert sosial støtte,

depresjon, livskvalitet, søvn, symptomer på Sjögrens syndrom, og hundehold. Den endelige utformingen av dette skjemaet er ikke ferdig.

Biokjemiske og genetiske målinger av folatstatus

Følgende målinger planlegges i blodprøven:

- Plasma total homocystein
- Vitaminene B-6, B-1, B-2, B-12, folat
- MMA (metylmalonsyre), markør for B-12 mangel
- Polymorfisme (variasjon) i MTHFR-genet
- Polymorfismer i andre gener av betydning for B-vitaminomsetningen

Genene som skal studeres er ikke sykdomsgener (ikke direkte årsak til bestemt sykdom), men reflekterer variasjoner i B-vitaminomsetningen og kan være viktige for å finne ut hvorfor de samme miljøfaktorer (her kosthold og inntak av B-vitaminer) har forskjellig betydning og virkning hos forskjellige individer.

Fordi folatnivået i serum og celler ikke nøyaktig reflekterer folatfunksjonen på det cellulære nivå, har andre markører for lavt folatnivå vært brukt. En slik markør på folatfunksjonen er homocystein (Ueland et al 1993). Intracellulær metabolisme av homocystein avhenger av folat og vitamin B12. Mangler, eller lave nivåer, av disse vitaminene inhiberer omsetning av homocystein til metionin, og homocysteinnivået i plasma stiger.

Allelefrekvensen av 677C->T mutasjonen i MTHFR bestemmes ved hjelp av kapillær elektroforese med laserindusert fluoresensdeteksjon (Goyette et al 1995; Frosst et al 1995).

Sykdomsoppfølging

Vi vil ved hjelp av spørreskjema og egenrapportering samle inn opplysninger om sykdomsinsidens mellom Homocysteinundersøkelsen i 1992-93 og HUSK. Det vil spørres om alle sykehusinnleggelser, opptreden av ny alvorlig sykdom med hovedvekt på hjertekarsykdom, cerebrovaskulær sykdom og nevrologiske lidelser.

Vi er også i ferd med å opprette et insidensregister for all hjertekarsykdom og cerebrovaskulær sykdom for medlemmene i Homocysteinkohorten (arbeidet er støttet av Norges forskningsråd og godkjent av Statens helsetilsyn og Datatilsynet). Spørreskjemaopplysningene vil således for visse sykdomsgrupper kunne valideres mot insidensregisteret.

Kohorten vil følges videre med tanke på sykdomsopptreden etter denne undersøkelsen ved hjelp av sykehusenes diagnoseregistrering, kreftregisteret, Dødsårsaksregisteret og andre sykdomsregistre.

Statistiske metoder

Resultatene fra studien vil analyseres med standard teknikker som multippel regresjon (gaussisk og logistisk), enveis variansanalyse (inkludert t-tester). Det vil legges vekt på å supplere parametriske med ikke-parametriske metoder i beskrivelsen av data

(medianer, kvartiler) og for eksempel boksploTT. Programvare som vil bli benyttet er SPSS for Windows og S-Plus.

Forsøksstørrelse

Sammenheng mellom homocystein og insident hjerte-karsykdom. Vi fokuserer her på de eldste medlemmene i Homocysteinkohorten, 4766 i 1992-93. Basert på norske levetidstabeller vil det over en 5 års periode ha vært ca 500 dødsfall i denne gruppen og vi antar et tilsvarende stort antall insident hjertekar/cerebrovaskulær sykdom. I denne studien vil 500 sikre tilfeller av dødsfall eller ny hjertekar/cerebrovaskulær sykdom sammenlignes med populasjonsbaserte kontroller. Vår studie vil være større enn tidligere prospektive studier som har funnet en sammenheng mellom homocystein og koronar hjertesykdom (Arnesen et al 1995: 123 tilfeller og 4 kontroller per tilfelle; Stampfer et al 1992: 271 tilfeller og 271 kontroller) eller slagsykdom (Perry et al 1995: 107 tilfeller og 118 kontroller).

Sammenhenger mellom kosthold og homocystein. Kostholdsskjemaet vil bli gitt til minst 6000 personer. På grunn av økonomiske betraktninger vil biokjemiske markører for homocysteinmetabolisme/B-vitaminstatus bli målt i et utvalg på 250 i hver alders og kjønnsgruppe (45-47 og 72-74, menn og kvinner), totalt 1000 personer. Fra Hordalandsundersøkelsen 1992-93 vet vi at plasma tHcy har et standard avvik på ca. 4 µmol/L (Nygård et al 1995). Forskjeller mellom grupper er klinisk og praktisk relevant fra ca. 1.5-2.0 µmol/L. Ved standard forsøksstørrelseformler (to-sidig signifikansnivå=0.05 og styrke 0.80) trengs det da henholdsvis 112 og 63 personer i hver av to like store grupper for å påvise en forskjell på 1.5 og 2 µmol/L (Armitage & Berry 1994). Vi er derfor godt rustet til å studere forskjeller i tHcy også i mindre undergrupper av materialet. For studier av korrelasjoner gir den foreslåtte studiestørrelsen anledning til å studere sammenhenger som er mindre enn de som er praktisk og klinisk relevant. For eksempel trengs det 193, 346, og 782, og 3137 personer for å kunne detektere korrelasjoner på 0.20, 0.15, 0.10 og 0.05 med en to-sidig test ved signifikansnivå på 0.05 og med en styrke på 80 prosent (Machin og Campbell 1987, side 92).

TILBAKEMELDING

Personer med sterkt forhøyet homocystein (> 40 µmol/L) og tegn på alvorlig folat eller vitamin B12 mangel vil få tilbud om etterundersøkelse. Dette er samme kriterium vi benyttet ved forrige undersøkelse som resulterte i oppfølging av 67 personer av ca. 18,000. Dette betyr at vi vil gi tilbud om etterundersøkelse til 20-30 personen denne gangen.

KONFIDENSIALITET

Spørreskjemaopplysningene vil oppbevares knyttet til deltakernes fødselsnummer ved Statens helseundersøkelser i Oslo. Det vil også genereres et løpenummer for hver enkelt deltaker i undersøkelsen.

Ved Universitetet i Bergen vil vi kun oppbevare datafiler med løpenummer og ikke personidentitet. Resultatene for de genetiske analysene vil bare oppbevares i Bergen knyttet til løpenummeret. Løpenummeret vil aldri benyttes til å knytte resultat fra

genanalyser til den enkelte persons identitet. Koplinger om sykdom som oppstår etter undersøkelsen vil skjje ved hjelp av løpenummeret.

ETISKE ASPEKTER VED PROSJEKTET

Søknader om godkjenning av dette prosjektet vil bli sendt Datatilsynet og Regionaletisk komite. De foreslåtte metodene har tidligere blitt godkjent i andre epidemiologiske prosjekter.

Vi vil studere variasjoner i et gen (MTHFR-genet) som har betydning for B-vitaminomsetningen. De tre mulige genvariantene finnes hos ca. 10, 40 eller 50 prosent av den friske befolkningen. Genvariantene er ikke årsaksfaktorer til sykdom, men de kan kanskje bidra til å forklare hvorfor forskjellige mennesker har ulikt behov for forskjellige B-vitaminer. For eksempel er en mulig bruk å finne ut om en person kan ha særlig nytte av et B-vitaminrikt kosthold eller tilskudd med B-vitaminer.

Blodprøvene vil lagres for senere å kunne undersøke på faktorer (biokjemiske og genetiske) knyttet til B-vitaminomsetningen og som har mulig betydning for senere utvikling av sykdom.

Personer med sterkt forhøyet homocystein og tegn på alvorlig folat eller vitamin B12 mangel vil få tilbud om etterundersøkelse.

Genanalysene vil aldri knyttes til den enkelte deltakers personidentitet og ingen tilbakemelding vil bli gitt.

PROSJEKTMEDARBEIDERE

Professor Per Magne Ueland, Institutt for farmakologi, Universitetet i Bergen

Professor Helga Refsum, Institutt for farmakologi, Universitetet i Bergen

Professor Grethe S. Tell, Institutt for samfunnsmedisinske fag, Universitetet i Bergen

Professor Stein Emil Vollset, Institutt for samfunnsmedisinske fag, Univ. i Bergen

Professor Christian A. Drevon, Inst. for ernæringsforskning, Univ. i Oslo

Overlege Jan Erik Nordrehaug, Hjereteavdelingen, Haukeland sykehus

Forskningsjef Aage Tverdal, Statens helseundersøkelser

Forsker Randi Selmer, Statens helseundersøkelser

BUDSJETT

Prosjektet er bevilget 600,000 kr over en tre-årsperiode av Norges Forskningsråd og 400,000 kr av Den norske kreftforening. Disse midlene vil dekke trykking og lesing av kostholdsskjema, biokjemiske analyser og tilleggsutgifter Statens helseundersøkelser får ved Homocystein-II undersøkelsen (basisundersøkelse dekkes av SHUS).

REFERANSER

- Andersen LF, Nes M, Lillegaard I-T, et al. Evaluation of a quantitative food frequency questionnaire used in a group of Norwegian adolescents. *Eur J Clin Nutr* 1995a;49:543-554.
- Andersen LF, Nes M, Sandstad B, Bjørneboe G-E Aa & Drevon CA. Dietary intake among Norwegian adolescents. *Eur J Clin Nutr* 1995b;49:555-564.
- Andersen LF, Solvoll K & Drevon CA. Evaluation of a quantitative food frequency questionnaire by plasma fatty acid pattern. *Am J Clin Nutr* 1996; in press.
- Armitage P, Berry G. *Statistical Methods in Medical Research*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol*. 1995; 24: 704-9.
- Boushey CJ, Beresford-SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*. 1995; 274: 1049-57.
- den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, Rosendaal FR, Haak HL, Wijermans PW, Bos GM. Is hyperhomocysteinemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet*. 1995 , 345: 882-5.
- den Heijer M, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334: 759-62.
- Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine. Automated determination and sample stability. *Clin chem* 1993;39:263-271.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
- Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, et al. Alcohol, low-methionine--low folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:265-273
- Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995;56:1052-1059.
- Guttormsen AB; Ueland PM; Nesthus I; Nygard O; Schneede J; Vollset SE; Refsum H. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (≥ 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996;98: 2174-83.

Kang SS, Wong PW, 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: 536-45.

Kearney J, Giovannucci E, Rimm EB, et al. Diet, alcohol, and smoking and the occurrence of hyperplastic polyps of the colon and rectum. *Cancer Causes Controls* 1995;6:45-56.

Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am-J-Hum-Genet.* 1996; 58: 35-41.

Machin D, Campbell MJ. *Statistical Tables for the Design of Clinical Trials.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987.

Motulsky AG. Nutritional ecogenetics: homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 17-19.

Nes M, Andersen LF, Solvoll K, et al. Accuracy of a quantitative food frequency questionnaire in elderly Norwegian women. *Europ J Clin Nutr* 1992;46:809-821.

Nygård O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland homocysteine study. *JAMA* 1995;274:1526-1533.

Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle aged British men. *Lancet.* 1995, 346: 1395-8.

Solvoll K, Lund-Larsen K, Søyland E, et al. A quantitative food frequency questionnaire evaluated in a group of dermatological outpatients. *Scand J Nutrition* 1993;37:150-155.

Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA.* 1992; 268: 877-81.

Søyland E, Funk J, Rajka G, et al. Dietary supplement of n-3 fatty acids to patients with atopic dermatitis. A multi-center study. *Br J Dermatol* 1994;130:757-764.

Søyland E, Funk J, Sandberg M, et al. Dietary supplementation of very long chain n-3 fatty acids do not improve the clinical condition of psoriasis. A double-blind multi-center study. *N Engl J Med.* 1993;328:1812-1816.

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and clinical applications. *Clin chem* 1993;39:1764-1779.

Ueland PM, Refsum H. Forhøyet plasma-homocysteinnivå som kardiovaskulær risikofaktor. Tidsskr Nor lægeforen 1996;116:1661-2.