

VITAMINE B₁₂

DEFICIËNTIE

Is het een hype? Een simpel etiket voor patiënten met medisch onverklaarbare klachten? Of heeft Nederland te maken met een gezondheidsmaatschappelijk probleem van onvoorziene omvang?

Dit onderzoek richt zich op het in kaart brengen van de klinische verschijnselen van vitamine B₁₂ deficiëntie, de achterliggende biochemische verklaring en het effect van intramusculaire behandeling op hematologische parameters, klinische manifestaties en kwaliteit van leven

RENEE TIMMERMAN

ONDERZOEKSRAPPORT BACHELOR COMBI STAGE

Gezondheids- en Levenswetenschappen | Vrije Universiteit AMSTERDAM

RENEE TIMMERMAN | 2178702

Dr. J.J.A. Auwerda | Interne Geneeskunde MC Zuiderzee

J.J. Dudok | VU Amsterdam

30 EC

03-'14 – 06-'15

VOORWOORD

Beste lezer,

Voor u ligt een onderzoeksrapport naar vitamine B₁₂ deficiëntie. Specifiek naar de invloed van intramusculaire behandeling met hydroxocobalamine op hematologische parameters en belangrijker nog, de invloed van behandeling op de klinische manifestaties van een vitamine B₁₂ deficiëntie en de kwaliteit van leven. Dit onderzoeksrapport is geschreven naar aanleiding van een Bachelor stage, ter afsluiting van de opleiding Gezondheids- en Levenswetenschappen aan de Vrije Universiteit te Amsterdam.

Gezondheid en Leven, een combinatie studie tussen Gezondheidswetenschappen en Biomedische wetenschappen. De eerlijkheid gebied te zeggen dat het niet mijn eerste keus was, maar de liefde voor de wetenschap ontdekte ik echter heel snel. Gezondheid en Leven veranderde van een alternatief in een heel goed potentieel en urenlang vertelde ik gepassioneerd aan wie het maar wilde horen over de meest interessante colleges, totdat mijn publiek afhaakte omdat ze er niets meer van begrepen of omdat ik al twee uur van hun tijd had opgeslokt. Pas later, zag ik de waarde in van de mogelijkheid om vanuit twee perspectieven naar hetzelfde medische probleem te kijken. Ik had een lichte voorkeur voor het biomedische perspectief ten opzichte van het gezondheidswetenschappelijke perspectief, maar aan geen van beiden had ik écht mijn hart verloren. Ik was hongerig naar het derde perspectief: de kliniek. In mijn derde jaar volgde ik een minor Geneeskunde aan de VU en dat maakte het plaatje compleet: ik realiseerde me dat ik niet voor een van de drie disciplines wilde kiezen, maar dat ik mij, laverend tussen de drie disciplines, het best op mijn plek voelde.

Op mijn pad kwam een klinisch onderzoek naar vitamine B₁₂ deficiëntie, waarin een gezondheidswetenschappelijk aspect, werd gecombineerd met een biomedisch aspect. Het sloot perfect aan bij de drie-eenheid waar ik naar zocht. Ik heb mijn stage met erg veel enthousiasme gevolgd. Dat enthousiasme kwam voort uit de vrijheid die ik kreeg en uit de fascinatie voor het onderwerp. Vitamine B₁₂ is al meer dan honderd jaar onderwerp van onderzoek. Er zijn talloze wetenschappers geweest - onder hen twee Nobelprijs winnaars - die hebben geparticipeerd de zoektocht naar het antwoord op '*nature's most beautiful cofactor*'. Dat ik met dit onderzoek en afgeronde onderzoeksrapport een kleine bijdrage mag leveren aan die rijke geschiedenis, stemt mij trots.

Ik wil graag mijn dank uitspreken naar mijn stagebegeleider, Dr. Auwerda, die met zijn nimmer aflatende enthousiasme voor het onderwerp, zijn vertrouwen in mij heeft gelegd en mij de vrijheid heeft gegeven om dit rapport grotendeels zelfstandig te schrijven. Ook wil de B₁₂ Research Group danken voor het vertrouwen in mij en de prettige samenwerking. Tot slot, al mijn lieve familie, vriendje en vrienden die precies wisten hoe en wanneer ze mij een duwtje in de rug moesten geven.

Er rest mij niets anders dan u veel plezier te wensen bij het lezen van dit onderzoeksrapport.

Met vriendelijke groet,

Renée Timmerman

Gezondheids- en Levenswetenschappen | Vrije Universiteit Amsterdam

INHOUDSOPGAVE

■ <i>Samenvatting</i>	5
■ <i>Introductie</i>	6
▪ <i>Probleemstelling</i>	6
▪ <i>Diagnostiek, kliniek en behandeling in Nederland</i>	7
▪ <i>Werkzaamheid als cofactor</i>	8
▪ <i>B₁₂ metabolisme</i>	12
▪ <i>Klinische manifestaties als gevolg van een ontregeld metabolisme</i>	16
■ <i>Prospectief interventie-onderzoek</i>	19
▪ <i>Methoden</i>	19
▪ <i>Resultaten</i>	23
▪ <i>Discussie</i>	30
▪ <i>Conclusie</i>	33
■ <i>Appendices</i>	34
■ <i>Referenties</i>	37

SAMENVATTING

ACHTERGROND: Dit onderzoek richt zich op het in kaart brengen van de klinische verschijnselen van vitamine B₁₂ deficiëntie, de achterliggende biochemische verklaring en het effect van intramusculaire behandeling op hematologische parameters, klinische verschijnselen en de kwaliteit van leven. Aanleiding vormt de toegenomen aandacht voor vitamine B₁₂ deficiëntie in de Nederlandse samenleving, waarin steeds frequenter patiënten worden gezien met een lage tot laag-normale B₁₂ status, in combinatie met voor B₁₂ deficiëntie kenmerkende symptomen. Veel van deze patiënten vallen tussen wal en schip door onwetendheid in de (Nederlandse gezondheids)zorg**zorginstellingen** of door de beperkende diagnostische grenzen van de huidige NHG richtlijn.

METHODEN: Er is 90 dagen durend prospectief interventie-onderzoek uitgevoerd, waarbij hematologische parameters, klinische symptomen en de kwaliteit van leven van 154 patiënten met een lage tot laag-normale B₁₂ status en symptomen indicatief voor B₁₂ deficiëntie, pre- en post-interventie met parenterale hydroxocobalamine, zijn vergeleken. Daarnaast is onderzocht wat de invloed van de B₁₂-uitgangswaarde is op klinische symptomen, kwaliteit van leven en de mate van herstel na interventie.

RESULTATEN: Hematologische parameters totaal B₁₂ en foliumzuur verbeterden statistisch significant en binnen referentiewaarden na interventie ($P=0.000$). Er werd een statistisch significant verschil gevonden tussen pre-interventie en post-interventie beoordeling van de symptomenvragenlijst ($n=154$, $P=0.000$), dit resultaat werd ook gevonden nadat de onderzoekspopulatie werd uitgesplitst in B₁₂ categorieën ($P=0.012$; $P=0.011$; $P=0.011$). Opgedeeld in klachtencategorieën, werd voor elke categorie (neurologie, psychologie, hart- en vaat, bewegingsapparaat, verteringsstelsel, overig) een statistisch significant verschil gevonden tussen de pre-interventie en post-interventie beoordeling ($n=154$, voor elke categorie gold $P=0.000$). De meest evidente verbetering van klachten werd gezien in de categorie neurologie (21,3%), gevolgd door psychologie (17,1%). De mate van herstel was nagenoeg hetzelfde tussen de drie B₁₂ categorieën, ($P=0.847$). De kwaliteit van leven werd statistisch significant verschillend beoordeeld ($n=154$) post-interventie ten opzichte van pre-interventie ($P=0.000$). Dit resultaat werd ook gevonden voor de B₁₂ categorieën 2 en 3, ($P=0.003$, $P=0.000$) echter niet in categorie 1 ($P=0.075$). De mate van verbetering van kwaliteit van leven was niet statistisch significant verschillend tussen de drie B₁₂ categorieën ($P=0.824$).

CONCLUSIE: Dit onderzoek bevestigt dat B₁₂ suppletie significante verbetering geeft van hematologische parameters en klinische symptomen, ongeacht de B₁₂-uitgangswaarde. Behandeling lijkt een zekere standaard mate van herstel van symptomen teweeg te brengen, echter de uitkomstmaat is afhankelijk van de ernst van klachten pre-interventie. Dit suggereert dat patiënten met een lagere B₁₂-uitgangswaarde langer behandeld moeten worden. Kwaliteit van leven verbetert significant na behandeling voor patiënten met een hogere B₁₂-uitgangswaarde, echter niet voor patiënten met een lagere B₁₂-uitgangswaarde. Vervolgonderzoek moet uitwijzen of dezelfde resultaten worden gevonden in een placebo gecontroleerd studie-design en wat de lange termijn effecten zijn van eenmalige behandeling op symptomen en kwaliteit van leven.

INTRODUCTIE

1 | PROBLEEMSTELLING

Al meer dan honderd jaar participeren wetenschappers in de zoektocht naar het antwoord op vitamine B₁₂. Geïntrigeerd door het mysterie, zijn er in de loop der jaren talloze wetenschappers geweest – onder hen twee Nobelprijs winnaars – die met waardevolle onderzoeken hebben bijgedragen aan die zoektocht.^{1,2} Toch bestaat er nog relatief veel onduidelijkheid omtrent *Nature's most beautiful cofactor*. Het is de complexiteit van het metabolisme van vitamine B₁₂ en de complexiteit van een blokkade in dat metabolisme, dat daarvoor verantwoordelijk mag worden gehouden.

Wellicht is het ook aan de complexiteit te danken dat vitamine B₁₂ deficiëntie, in Nederland althans, nooit veel aandacht heeft genoten, zowel op wetenschappelijk als op maatschappelijk gebied. Echter, sinds een aantal jaar krijgen steeds meer huisartsen te maken met een toenemende stroom aan patiënten die zich presenteren met een scala aan zeer uiteenlopende klachten, al dan niet in combinatie met een vastgesteld lage tot laag-normale vitamine B₁₂ waarde. Dat gegeven lijkt ook de Nederlandse gezondheidszorg te zijn opgevallen, die haar kop nu uit het zand heeft durven te trekken en de toenemende aandacht voor vitamine B₁₂ deficiëntie heeft erkend.³

Helaas wordt vitamine B₁₂ deficiëntie nog te vaak bestempeld als een vitamine probleempje, dat de aandacht die het krijgt, niet waard is. Ongewild en onterecht zit vitamine B₁₂ deficiëntie vast aan dat imago, terwijl deze vitamine een cruciale schakel is in een aantal essentiële metabole processen.⁴⁻⁶ Een blokkade in dergelijke complexe biochemische routes kan leiden tot een volledig ongeregeld metabolisme, met ernstige consequenties en een uitgebreid spectrum aan symptomen tot gevolg.⁷⁻⁹ Vaak wordt B₁₂ deficiëntie gezien als een onschuldige aandoening die eenvoudig te verhelpen is en in essentie ís dat het ook, mits het tijdig gediagnosticeerd en adequaat behandeld wordt.

Precies op die twee punten loopt het spaakt: de diagnose en de behandeling. De eerder genoemde complexiteit van vitamine B₁₂ deficiëntie begint bij het ontbreken van een gouden standaard voor diagnostiek.^{10,3} Er heerst geringe consensus over arbitraire grenswaarden. De discussie gaat dat de huidig geldende ondergrens te laag is en naar boven zou moeten worden bijgesteld, om te voorkomen dat genoom instabiliteit en chromosomale schade ontstaan.¹¹⁻¹³ Bovendien is de bepaling van de vitamine B₁₂ concentratie in het bloed niet erg specifiek noch sensitief en hoeft niet te correleren met de mate van klachten.^{14,15} Inmiddels zijn er nieuwe meetmethoden beschikbaar, maar omdat die methoden nog steeds niet tot gouden standaard worden gerekend, blijven veel patiënten hangen in een grijs spectrum van halve diagnoses en onverklaarbare medische klachten.¹⁶⁻¹⁸ Deze patiënten worden van het kastje naar de muur gestuurd en dolen jarenlang rond in het medische circuit voordat de 'simpele' diagnose B₁₂ deficiëntie wordt gesteld.

Naast onduidelijkheid over de diagnose, heerst er ook onduidelijkheid over de behandeling en de behandelingsduur. Al meer dan 50 jaar proberen wetenschappers de effectiviteit van orale vitamine B₁₂ suppletie, ooit getiteld als *'medicine's best kept secret'* aan te tonen.^{19,20} Hoewel een aantal RCT's de effectiviteit van orale suppletie lijkt aan te tonen, blijft het wetenschappelijke bewijs dun; de reden, dat er nog altijd intramusculair behandeld wordt in veel landen in Europa²⁰ Het grote probleem aangaande de behandeling, betreft echter de behandelingsduur. In veel gevallen wordt de behandeling gestopt zodra het hematologisch beeld van een patiënt is hersteld en de vitamine B₁₂ waarde boven de internationaal geldende ondergrens uit piept. Uit veel onderzoek blijkt dat hematologische parameters zich vrij snel herstellen, maar uit de praktijk blijkt dat patiënten met een ogenschijnlijk gezonde vitamine B₁₂ waarde, blijven zitten met een uitgebreid klachtenspectrum.^{21,22} Deze patiënten hebben het gevoel niet gehoord, niet begrepen of zelfs serieus genomen te worden, waardoor langzaam de roep om snelle diagnostiek en adequate behandeling steeds luider is geworden.

Het doel van deze studie is de schijnwerper richten op de toenemende stroom aan patiënten die zich presenteren met een scala aan zeer uiteenlopende klachten, al dan niet in combinatie met een vastgesteld lage tot laag-normale

vitamine B₁₂ waarde. De onderzoeksvraag waar getracht antwoord op te vinden luidt als volgt: wat is het effect van drie maanden parenterale behandeling met hydroxocobalamine op deze groep patiënten, wat betreft hematologische parameters, klinische verschijnselen en de kwaliteit van leven?

2 | VITAMINE B₁₂ DEFICIENTIE: DIAGNOSTIEK, KLINIEK EN BEHANDELING IN NEDERLAND

Met het ontbreken van een gouden standaard staat de complete vitamine B₁₂ diagnostiek op losse schroeven. Immers, hoe kan er goede diagnostiek verricht worden als onduidelijk is wat er het best gemeten kan worden en als bovendien de bestaande meetmethoden niet altijd evenveel blijken te zeggen? Naast onduidelijkheid over de zeggingskracht van bepaalde meetmethoden, lijkt er zeker in Nederland weinig kennis over de symptomatologie, behorende bij een vitamine B₁₂ deficiëntie. Als klap op de vuurpijl blijkt de symptomatologie in sommige gevallen totaal niet te correleren met het hematologisch beeld, waardoor de uitkomst vaak niet overduidelijk wijst in de richting van een vitamine B₁₂ deficiëntie.

2.1 | INDICATIES VOOR B₁₂ DIAGNOSTIEK IN NEDERLAND

De NHG rapporteert in haar recent verschenen *Standpunt Vitamine B₁₂ Diagnostiek*, dat het aanvragen van diagnostiek geïndiceerd is bij risicofactoren voor een deficiëntie, bij niet-microcytaire anemie en neurologische stoornissen zoals paresthesieën en ataxie.³ Bij klachten die suggestief zijn voor vitamine B₁₂ deficiëntie en er tevens sprake is van een laag-normale vitamine B₁₂ concentratie, kan een additionele bepaling worden gedaan. De voorkeur gaat uit naar een methylmalonzuur bepaling. Verder rapporteert de NHG zeer summier over de klinische verschijnselen die een indicatie kunnen vormen voor B₁₂ diagnostiek. Daarbij wordt geconcludeerd dat klachten zoals duizeligheid, vermoeidheid, problemen met concentratie en cognitie, geen indicatie vormen voor B₁₂ diagnostiek.

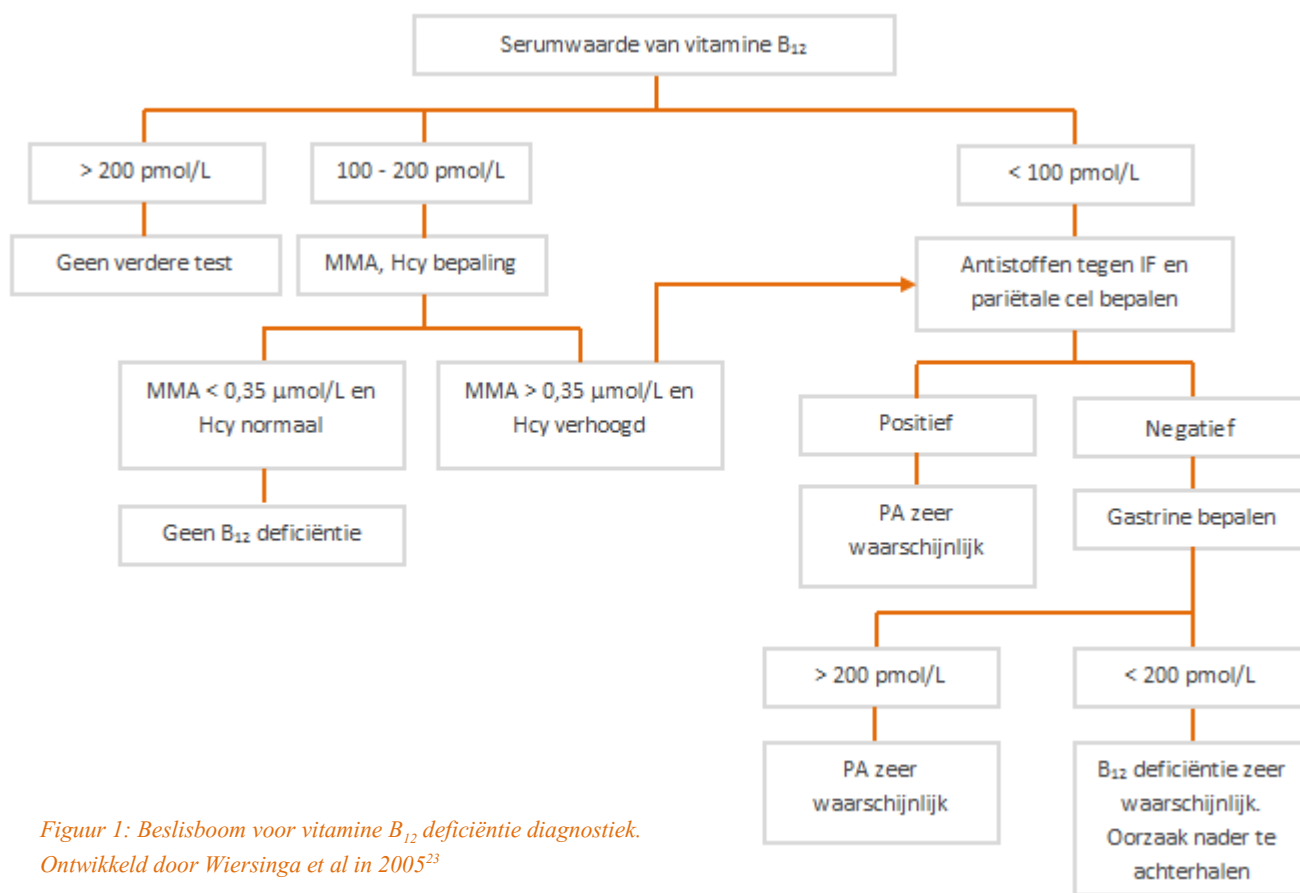
2.2 | DIAGNOSTISCHE MEETMETHODEN

De meest gebruikte diagnostische meetmethode is de bepaling van de totale vitamine B₁₂ status in het plasma of serum. Hoewel in Nederland de referentiewaarden verschillen per laboratorium, wordt doorgaans 148 pmol/L als ondergrens aangehouden en geldt 148-664 pmol/L als normaal referentie-interval.^{3,23} Internationaal geldt dat een vitamine B₁₂ concentratie kleiner dan 150 pmol/L, wijst op een deficiëntie.¹⁰ Een vitamine B₁₂ concentratie tussen de 150 en 221 pmol/L is een indicatie voor verdere diagnostiek en wordt betiteld als subklinische deficiëntie of marginale status. Tot slot wordt een vitamine B₁₂ concentratie boven de 221 pmol/L gezien als een normale waarde. De specificiteit en sensitiviteit van een dergelijk laboratoriumonderzoek voor patiënten met een marginale B₁₂ status zijn echter niet erg hoog. Bovendien leidt een tekort aan co-eiwit haptocorrine tot een vals-positief resultaat.^{24,25} Zelfs een normaalwaarde, blijkt uit onderzoek, sluit een deficiëntie op weefselniveau niet uit.²⁴ Het gebrek aan specificiteit en sensitiviteit heeft geleid tot de ontwikkeling van additionele meetmethoden. Eén daarvan, is de bepalingen van de metabolieten homocysteïne (Hcy) en methylmalonzuur (MMA). Beide metabolieten zijn intermediairen in de metabole reacties waarin vitamine B₁₂ actief is.²⁴ Als gevolg van een tekort aan vitamine B₁₂ kunnen deze reacties zich niet volledig voltrekken en stapelen de intermediairen zich op. Beide metabolieten hebben een hoge sensitiviteit maar de specificiteit is discutabel. Bovendien valt de methylmalonzuur waarde vals-positief uit in geval van nierfalen en is de homocysteïne waarde vals-positief bij een foliumzuur deficiëntie, vitamine B₆ deficiëntie, nierfalen en mogelijk een thiamine deficiëntie.²⁴⁻²⁶ In Nederland gelden 12 µmol/L en 0,35 µmol/L als bovengrenzen voor respectievelijk Hcy en MMA.³ Tot slot wordt recent gebruik gemaakt van een holotranscobalamine-bepaling. Daarbij wordt niet de totale vitamine B₁₂ concentratie in plasma of serum gemeten, maar slechts het deel dat gebonden is aan co-eiwit transcobalamine. Alleen de fractie vitamine B₁₂ die gebonden is aan transcobalamine, is functioneel op weefselniveau en zegt daarom meer over de werkelijke vitamine B₁₂ concentratie, dan de meetmethode waarbij de totale concentratie (inclusief de fractie vitamine B₁₂ die inactief is op weefselniveau) wordt gemeten.²⁶ De in Nederland gehanteerde ondergrens voor holotranscobalamine is 35 pmol/L.³

2.3 | DIAGNOSE B₁₂ DEFICIENTIE

Ondanks de geavanceerdere meetmethoden, concludeert ook de *NHG Anemie* richtlijn, dat met name in het gebied tussen evident verlaagde en subklinisch verlaagde B₁₂ concentraties, moeilijk onderscheid te maken is tussen een

werkelijke deficiëntie op weefselniveau en geen deficiëntie.²⁷ Om het diagnosticeren te vergemakkelijken, zijn veel stroomschema's of zogeheten beslisbomen ontwikkeld. Wiersinga ontwikkelde in 2005 een beslisboom die te zien is in figuur 1.²³



Figuur 1: Beslisboom voor vitamine B₁₂ deficiëntie diagnostiek. Ontwikkeld door Wiersinga et al in 2005²³

2.4 | BEHANDELING

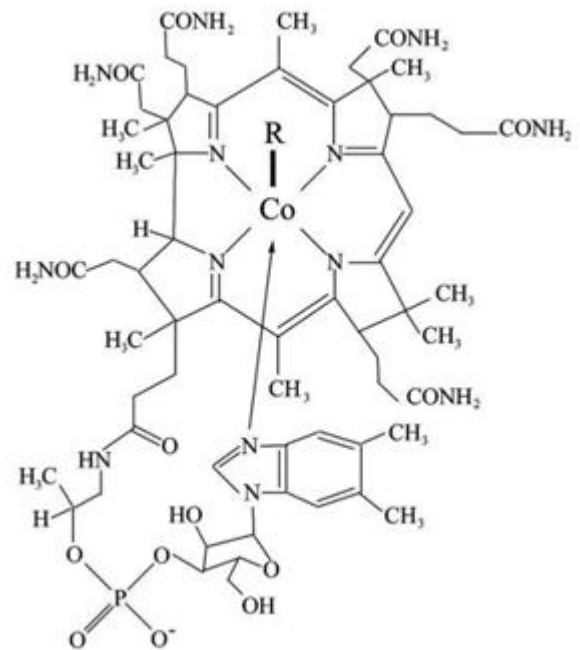
Behandeling van vitamine B₁₂ deficiëntie geschiedt in eerste instantie in orale vorm, 1000 µg, 1dd. Dit geldt ook voor patiënten met opnameproblemen als gevolg van inflammatoire darmziekten of darmresectie en patiënten die als gevolg van medicatiegebruik een B₁₂ deficiënt zijn. Parenterale behandeling is geïndiceerd bij slikproblemen, problemen met therapietrouw, ernstige (neurologische) symptomen of gastro-intestinale bijwerkingen bij orale toediening. Voor de parenterale behandeling met vitamine B₁₂ wordt hydroxocobalamine gebruikt. De huisarts geeft tien intramusculaire injecties van 1 mg, met een interval van drie dagen, gevolgd door één intramusculaire injectie van 1 mg eenmaal per twee maanden.²⁷

3 | VITAMINE B12 EN HAAR WERKZAAMHEID IN HET MENSELIJK LICHAAM

Vitamine B₁₂ deficiëntie gaat gepaard met een breed spectrum aan symptomen, waarvan de pathogenese voor een deel nog onopgehelderd is. Begrip van de pathogenese van symptomen die zich manifesteren bij een vitamine B₁₂ deficiëntie, vereist onderzoek naar de rol van vitamine B₁₂ in het menselijk lichaam. Welbekend zijn de hematologische en neurologische afwijkingen die voor een deel verklaard kunnen worden aan de hand van de twee klassieke enzymatische processen waarin vitamine B₁₂ een rol speelt en de biochemische gevolgen van een blokkade in die processen. Echter, bij veel manifestaties is de klassieke theorie over de rol van vitamine B₁₂ in het menselijk lichaam, niet toereikend. Onderzoek lijkt aan te tonen dat vitamine B₁₂ in meerdere processen een belangrijke rol speelt.

3.1 | EEN COMPLEXE VITAMINE

Cobalamine, beter bekend als vitamine B₁₂, is een grote en complexe vitamine, essentieel voor het metabolisme van de mens. De chemische structuur van cobalamine wordt gekenmerkt door een centraal kobalt atoom met zes mogelijke bindingsposities. Vier van de zes bindingsposities worden bezet door de stikstofatomen van een corrine-ring die het centrale kobalt atoom omgeeft. De bezetting van bindingspositie vijf en zes is afhankelijk van de oxidatietoestand van cobalamine, die dankzij haar centrale C-Co binding de unieke eigenschap bezit om te bestaan in verschillende oxidatietoestanden. Wanneer cobalamine in de +1 oxidatietoestand [cob(I)alamine] verkeert, zijn bindingsposities vijf en zes vrij. Wanneer cobalamine in de +2 oxidatietoestand [cob(II)alamine] verkeert, bindt het stikstof atoom van de α -axiale ligand N-ribosyl-dimethylbenzimidazool via de vijfde bindingspositie met het centrale kobalt atoom en blijft de zesde bindingspositie vrij. Wanneer cobalamine in de +3 oxidatietoestand [cob(III)alamine] verkeert, is naast bindingspositie vijf, ook bindingspositie zes bezet. Deze bindingspositie wordt bezet door een β -axiale ligand en betreft één van de vier mogelijke restgroepen: een methyl-groep, een 5'-deoxyadenosyl-groep, een hydroxyl-groep of een cyano-groep.^{2,28,29} De restgroep bepaalt de functionaliteit van het cobalamine atoom. Slechts methylcobalamine en 5'-deoxyadenosylcobalamine zijn functioneel in het menselijk metabolisme. De andere vormen moeten eerst worden gemodificeerd volgens een intracellulair proces voordat ze actief zijn.³⁰⁻³² De structuur van vitamine B₁₂ is weergegeven in figuur 2.³³



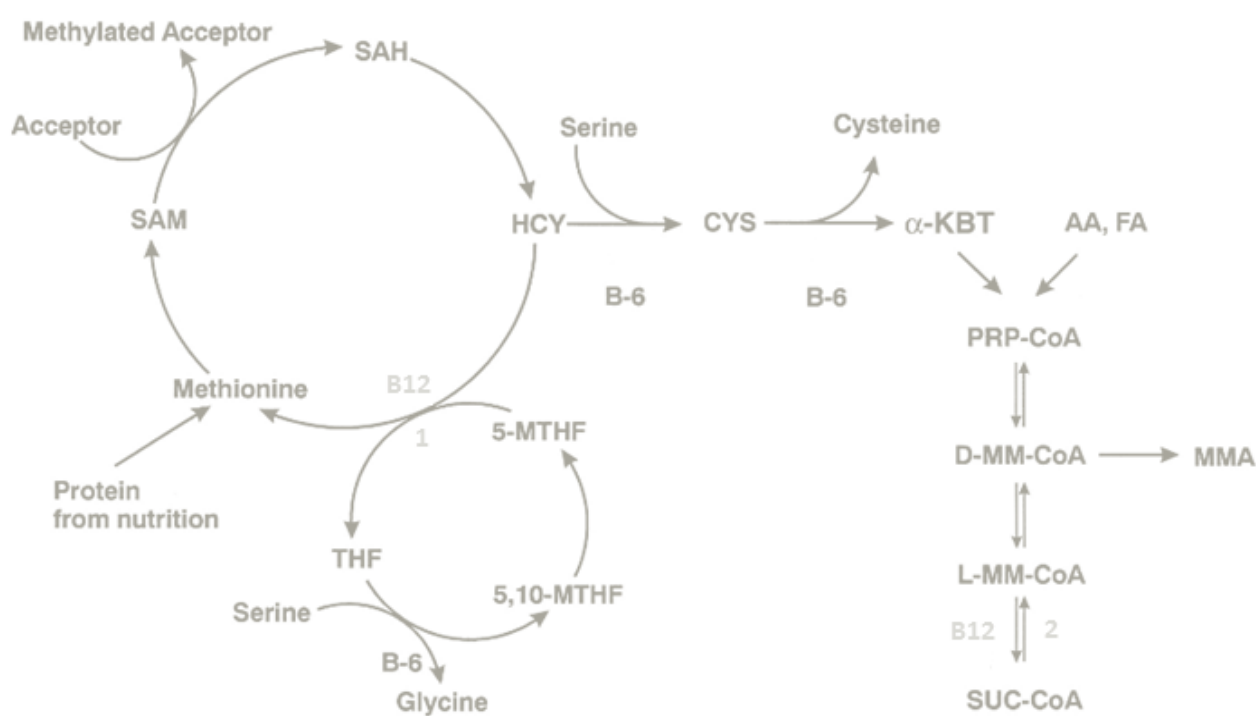
Figuur 2: Structuur van vitamine B₁₂. Bindingspositie R kan worden bezet door een methyl-groep, een 5'-deoxyadenosyl-groep een hydroxyl-groep of een cyano-groep³³

3.2 | KLASSIEKE THEORIE

Cobalamine fungeert als een enzymatische cofactor waarbij het een tweetal enzymen in hun katalyserende activiteiten assisteert.^{4-6,28,30,32} De eerste van deze twee enzymen, methionine synthase genaamd, gebruikt de chemische vorm van cobalamine die een methylgroep heeft gebonden aan het centrale kobalt atoom en wordt methylcobalamine genoemd.^{28,34} Methionine synthase katalyseert de formatie van aminozuur methionine. Methionine wordt tot de essentiële aminozuren gerekend omdat het menselijk lichaam niet in staat is dit aminozuur de novo te produceren. Echter, het lichaam kan methionine wel regenereren en doet dat met de hulp van methionine synthase en cofactor methylcobalamine. Regeneratie van methionine start nadat een derivaat van methionine, S-adenosylmethionine, zijn methylgroep heeft gedoneerd aan een acceptor. Het doneren van een methylgroep resulteert in de formatie van S-adenosyl homocysteïne, dat kan worden gehydrolyseerd tot homocysteïne en adenosine. Vervolgens wordt er een methylgroep van 5-methyltetrahydrofolate overgedragen op homocysteïne. Deze transfer wordt gekatalyseerd door methionine synthase en cofactor methylcobalamine. Eindproducten zijn methionine en tetrahydrofolaat.²⁸ Figuur 3 toont een schematische weergave de methionine cyclus.³⁵ Zowel methionine en S-adenosylmethionine (SAM) zijn sleutelfiguren in genetische en epigenetische processen. Aminozuur methionine is de startcodon (AUG) voor mRNA translatie en is daarom essentieel in het proces van gen transcriptie en translatie.³⁶ S-adenosylmethionine functioneert als de meest belangrijke methyl donor voor DNA en RNA, dat daarmee veranderingen in genactiviteit teweeg kan brengen.^{37,38} Van SAM wordt ook gedacht dat het een essentieel onderdeel is in de myeline formatie rond zenuwcellen.³⁹ Naast de synthese van methionine is ook de synthese van eindproduct tetrahydrofolaat van essentieel belang. Tetrahydrofolaat is nodig voor de novo synthese van DNA bouwblokken zoals de nucleotide purine en de deoxyribonucleoside thymidine.³⁴

Het tweede enzym waarbij cobalamine als cofactor fungeert, is methylmalonyl-CoA mutase (MUT of MCM). Dit enzym gebruikt 5'-deoxyadenosylcobalamine.^{4-6,28,30,32} Methylmalonyl-CoA mutase katalyseert een intermoleculaire

conformatie, waarbij de carbonyl CoA groep van methylmalonyl-CoA migreert naar een volgend koolstofatoom en leidt tot het ontstaan van succinyl-CoA. Figuur 3 geeft dit schematisch weer. De intermoleculaire conformatie reactie begint bij de homolytische scheiding van de C-Co(III) binding van vitamine B₁₂ in haar vorm als cofactor. Na de scheiding wordt het elektronenpaar opgesplitst zodat zowel C als Co elk een eigen elektron ontvangen. Daarmee ontstaat er een deoxyadenosyl radicaal -CH₂· en fluctueert het Co ion tussen twee oxidatietoestanden, Co(II) en Co(III). Het deoxyadenosyl radicaal -CH₂· is vervolgens verantwoordelijk voor de eerste stap in de intermoleculaire conformatie reactie. Het radicaal onttrekt een waterstofatoom van methylmalonyl-CoA en vormt daarmee 5'-deoxyadenosine. 5'-Deoxyadenosine bevat een substraatradicaal dat spontaan naar een andere positie migreert, waardoor tegelijkertijd de carbonyl CoA groep naar een andere positie migreert. Deze positiewisseling leidt tot het ontstaan van een nieuw radicaal dat een opnieuw een waterstofatoom onttrekt, ditmaal van de methylgroep van 5'-deoxyadenosine. Daarmee is de herschikking van methylmalonyl CoA compleet en is succinyl CoA ontstaan.³⁷ Methylmalonyl-CoA speelt een rol in het degradatieproces van vetzuren en andere organische componenten, zoals aminozuren.³⁷ Succinyl-CoA is een intermediair van de citroenzuurcyclus en een precursor van porfyriene (en daarvoor) de heem synthese.³⁷



Figuur 3: Overzicht van pathways waarin vitamine B₁₂ fungeert als cofactor. De linker pathway toont de methionine cyclus met daarin methylcobalamine als cofactor van methionine synthase (1). De rechter pathway toont de intermoleculaire conformatie van propionyl-CoA tot succinyl-CoA, waarin 5'-deoxyadenosylcobalamine als cofactor fungeert voor methylmalonyl-CoA mutase (2). SAM: S-adenosyl methionine; SAH: S-adenosyl homocysteine; 5-MTHF: 5-methyltetrahydrofolate; THF: tetrahydrofolate; 5,10-MTHF: 5,10-methyltetrahydrofolaat; HCY: homocysteine; CYS: cystathionine; α-KBT: α-ketobutyrataat; AA: aminozuren; FA: vetzuren; PRP-CoA: propionyl-CoA; D-MM-CoA: D-methylmalonyl-CoA; MMA: methylmalonzuur; L-MM-CoA: L-methylmalonyl-CoA; SUC-CoA: succinyl-CoA³⁵

3.3 | NIEUWE THEORIEËN

De goed gefundeerde opvatting dat cobalamine in 'slechts' twee biochemische processen een rol van betekenis heeft, is door veel onderzoek gedebateerd en door de jaren heen achterhaald geraakt. Hoewel het wetenschappelijke bewijs vaak dun is en een heel aantal onderliggende biochemische processen voor een deel onopgehelderd blijven, zijn er aanwijzingen dat cobalamine onder andere werkzaam is als antioxidant, als immunomodulator en als antivirale factor. Daarmee wordt het werkveld van cobalamine flink uitgebreid en tevens de impact van een vitamine B₁₂ deficiëntie. De biochemische basis van veel van de gesuggereerde 'nieuwe' functies van

cobalamine, lijkt haar oorsprong te vinden in de relatie tussen cobalamine en nitraat oxide (NO), die opvallend vaak coïncidenteel een rol vervullen in reacties of biochemische pathways.⁴⁰

3.3.1 | ANTIOXIDANT

Antioxidanten beschermen tegen de schadelijke invloeden van vrije radicalen. Vrije radicalen ontstaan bij tal van fysiologische en pathologische processen, waaronder de inflammatoire respons. Ze fungeren als signaalmoleculen, maar kunnen ook schade aanrichten aan vetzuren, nucleïnezuren en eiwitten.^{41,42} In de rol van antioxidant is cobalamine op zowel een directe als een indirecte manier werkzaam. De unieke C-Co binding van cobalamine, stelt het in staat een redox reactie aan te gaan met een vrij radicaal, waarbij het ongepaarde elektron van een vrij radicaal wordt aangevuld met een gedoneerd elektron van cobalamine, dat daarmee voorziet in het stabiliseren van het vrije radicaal en weefselschade tegengaat.^{43,44} In 2009 werd in een onderzoek geconcludeerd dat cobalamine met bijna dezelfde snelheid als het bestaande antioxidant superoxide dismutase, kan reageren met het belangrijke vrije radicaal superoxide.⁴¹ Naast het direct wegvangen van een vrij radicaal door er een binding mee aan te gaan, is aangetoond dat verschillende cobalamines onder bepaalde omstandigheden in staat zijn het enzym nitraatoxide synthase te inhiberen. Nitraatoxide synthase (NOS) katalyseert de omzetting van L-arginine in L-citrulline en het vrije radicaal nitraatoxide.^{40,45} Inhibitie van NOS verloopt via binding van cobalamine (mits cobalamine in de vereiste 'base-off' configuratie verkeerd) aan het substraatbindingsdomein van NOS en voorkomt daarmee de synthese van grote hoeveelheden nitraat oxide.⁴⁵ Een derde werkingsmechanisme berust op de indirecte stimulatie van antioxidant glutathion, waarvan de synthese afhankelijk is van methionine synthase en cofactor methylcobalamine.^{41,46} Tot slot wordt gedacht dat cobalamine middels haar regulerende rol in cytokine en groeifactor productie, een indirecte invloed heeft op oxidatieve stress en de productie van vrije radicalen. Aangetoond is dat oxidatieve stress ten tijde van een inflammatoire respons gepaard gaat met verhoogde productie van transporteiwit transcobalamine en verhoogde synthese van de transcobalamine membraanreceptor door TNF- α .⁴⁷ Andersom moduleert de cobalamine concentratie de TNF- α concentratie in de cerebrospinale vloeistof.⁴⁸ Mogelijk berust dit mechanisme op een driehoeksverhouding tussen cobalamine, NO en TNF- α .^{41,49}

3.3.2 | IMMUNO-MODULATOR

De theorie bestaat dat cobalamine een regulerende invloed heeft op T-lymfocyten. In 1982 bestudeerden Sakane en Takada als een van de eersten het effect van methylcobalamine op het humane immuunsysteem.⁵⁰ Zij concludeerden dat cobalamine onder bepaalde omstandigheden een regulerende invloed had op de T-cel proliferatie en suggereerden dat cobalamine een gunstige therapeutische werking zou kunnen hebben op aandoeningen met een ongecontroleerde T-cel respons.⁵⁰ In 1999 ontdekten Tamura en collega's in het bloed van vitamine B₁₂ deficiënte patiënten een buitengewoon hoge CD4+/CD8+ ratio door een verminderd aantal T-lymfocyten van het subtype CD8+. Daarnaast toonden zij aan dat vitamine B₁₂ deficiënte patiënten een verminderde NK-cel activiteit hadden. Na behandeling met methylcobalamine herstelde de CD4+/CD8+ ratio significant en naar normale waarden, evenals de NK-cel activiteit. Zij concludeerden dat cobalamine mogelijk een rol speelt in anti-tumor immuniteit.⁵¹ In 2008 werd door Turkse wetenschappers een zelfde soort studie gepubliceerd met overeenkomstige resultaten.⁵² Daarnaast wordt gesuggereerd dat cobalamine een regulerende invloed kan uitoefenen op de balans tussen pro- en anti-inflammatoire cytokines. Deze theorie komt voort uit eerder genoemd onderzoek, waarin werd aangetoond dat de inflammatoire respons gepaard gaat met verhoogde productie van transporteiwit transcobalamine en verhoogde synthese van de transcobalamine membraanreceptor door TNF- α .⁴⁷

3.3.3 | ANTIVIRALE FACTOR

Al langer bekend, is de rol van cobalamine als inhibitor van het HIV integrase enzym, dat voorziet in de incorporatie van het humaan immunodeficiëntie virus in het menselijk DNA. HIV integrase katalyseert een aantal knip- en plakreacties tussen viraal en gastheer DNA. Cobalamine blokkeert die reacties door in te grijpen op de katalyserende activiteiten van HIV integrase. Als inhibitor remt het de virulentie van het virus en daarmee verdere progressie van de ziekte.^{53,54} Een onderzoek toonde aan dat de ziekteprogressie van HIV positieve patiënten met een vitamine B₁₂ deficiëntie significant sneller verliep ten opzichte van HIV positieve patiënten zonder vitamine B₁₂ deficiëntie. De B₁₂

deficiënte patiënten hadden gemiddeld vier AIDS vrije jaren en de niet B12 deficiënte patiënten hadden gemiddeld acht AIDS vrije jaren.⁵⁵

Verscheidene studies hebben een verband aangetoond tussen B vitaminen en HPV. In een onderzoek van Piyathilake en collega's, werd een hoge folaat plasma concentratie geassocieerd met een verminderde kans op het ontwikkelen van een (persisterende) High Risk HPV infectie en een verhoogde kans op het klaren van een HPV infectie. Daarnaast werd gevonden dat de onderzoekspopulatie een verminderde kans had op het ontwikkelen van HPV geassocieerde dysplasie (cervicale intra-epitheliale neoplasie graad 2) als voorloper van baarmoederhalskanker.^{56,57} In een vervolgstudie uit 2009 toonde Piyathilake aan dat ook de vitamine B₁₂ concentratie van groot belang is bij het voorkomen van cervicale dysplasie.⁵⁸ Het onderzoek concludeerde dat een voldoende hoge vitamine B12 concentratie significant vaker voorkwam onder vrouwen zonder cervicale dysplasie dan onder vrouwen met cervicale dysplasie graad 2. Daarnaast concludeerde het onderzoek dat een voldoende hoge vitamine B₁₂ concentratie significant werd geassocieerd met een 50% lagere odds op de diagnose cervicale dysplasie graad 2. Vrouwen met een voldoende hoge concentratie van zowel folaat als vitamine B₁₂ hadden een 70% lagere odds op cervicale dysplasie graad 2.⁵⁸ De biochemische verklaring berust mogelijk op een verhoogde methylering van verschillende methylbindingsplaatsen in het HPV genoom.⁵⁸

4 | DE COMPLEXE ROUTE VAN VOEDSELINNAME TOT WERKZAME COFACTOR

Voordat vitamine B₁₂ kan functioneren als cofactor, (en mogelijk een andere rol van betekenis kan spelen) legt het een uitermate complexe route af door het lichaam.³¹ Deze route begint bij voedselinname en eindigt bij een actieve vorm van cobalamine, werkzaam in het cytoplasma of de mitochondrion van de menselijke cel. Omdat er een uitgebreid scala aan eiwitten, transporters en receptoren bij het vitamine B₁₂ metabolisme betrokken is, kan er op veel punten in de pathway een blokkade ontstaan.^{59,60} Elk van de aan vitamine B₁₂ deficiëntie ten grondslag liggende oorzaak, manifesteert zich als een spectrum van specifieke klinische symptomen, waardoor de combinatie tussen biochemie en kliniek een leidraad kan vormen voor diagnostiek en behandeling.

Vitamine B₁₂ kan niet worden aangemaakt door het menselijk lichaam, maar is afhankelijk van slechts een aantal micro-organismen die het vitamine synthetiseert. Deze micro-organismen bevinden zich niet in de mens, maar gedijen goed in het gastro-intestinale klimaat van dieren. Door de consumptie van dierlijke producten zoals vlees, melk en eieren, wordt in de humane behoefte van vitamine B₁₂ voorzien.⁶¹

Wanneer vitamine B₁₂ het lichaam binnenkomt, is het gebonden aan co-eiwitten uit voedsel. Door peptische activiteit van de maag worden deze co-eiwitten van vitamine B₁₂ gescheiden.⁶⁰ De scheiding tussen co-eiwitten en cobalamine is het eerste kritieke punt in het metabolisme van vitamine B₁₂ en een mogelijke oorzaak voor een deficiëntie. Patiënten die als gevolg van een maagresectie, medicatiegebruik of infectie met *H. pylori* onvoldoende peptische activiteit kunnen genereren, zijn niet in staat cobalamine te scheiden van voedsleiwitten. Dit wordt het syndroom van voedsel-cobalamine malabsorptie genoemd en komt vooral voor bij oudere patiënten.^{62,64} Als het lichaam in staat is cobalamine succesvol te scheiden van co-eiwitten, wordt vrij cobalamine vervolgens direct gebonden aan een door de speekselklieren uitgescheiden reeks van glycoproteïnen, die haptocorrinen worden genoemd. Haptocorrinen beschermen vitamine B₁₂ tegen degradatie in het zure klimaat van de maag.^{65,60} De binding aan haptocorrinen vormt een tweede belangrijk punt in de opname van vitamine B₁₂. Speekselklierandoeningen of een defect in het TCN1-gen dat codeert voor haptocorrine, leiden tot een verminderde synthese van haptocorrine en tot verlaagde vitamine B₁₂ concentraties, zonder dat er sprake is van een deficiëntie op weefselniveau.⁶⁶⁻⁶⁸

In het maagepitheel bevindt zich de pariëtale cel, die een belangrijke cofactor uitscheidt, nodig voor het transport van vitamine B₁₂ door de dunne darm en de opname in het terminale ileum.³¹ Deze cofactor wordt intrinsic factor (IF) genoemd en bindt aan vitamine B₁₂ net buiten de maag in het duodenum, nadat pancreasproteases de gebonden haptocorrinen hebben verwijderd.³¹ Het verbreken van het B₁₂-haptocorrine-complex en het daarop volgende ontstaan van het B₁₂-IF-complex, vormt een derde kritiek punt in het B₁₂ metabolisme. Patiënten met afwijkingen in de productie van pancreasproteases of intrinsic factor, zijn niet in staat cobalamine op te nemen in de dunne darm.^{69,31} De aandoening pernicious anemie is het klassieke voorbeeld van een afwijking in de aanmaak van

intrinsic factor, waarbij een auto-immuunreactie tegen de pariëtale cellen van de maag, verantwoordelijk is voor de afwezigheid van intrinsic factor.⁷⁰

Bij adequate aanmaak van intrinsic factor, wordt het B₁₂-IF-complex vervolgens gebonden aan de receptor op het apicale oppervlak van het darmepitheel. De receptor, bestaande uit een heterodimeer van amnionless en cubuline, bindt met 3 CUB bindingsdomeinen aan het B₁₂-IF-complex, waarbij amnionless op een nog onbekende wijze assisteert en daarmee voorziet in de endocytose van het B₁₂-IF-complex.⁷¹ Cubam vormt het vierde kritieke punt in het metabolisme van B₁₂. Genmutaties in de genen die coderen voor Cubam, resulteren in het syndroom van Imlerslund-Gräsbeck, waarbij een disfunctionerende receptor de opname van B₁₂ verhindert.⁷¹

In geval van een normaal functionerende receptor, treedt het B₁₂-IF complex de darmepitheelcel binnen middels endocytose. Intrinsic factor wordt gedegeerd in lysosomen en ongebonden cobalamine wordt vrijgelaten in het cytosol met hulp van de LMBD1 transporter.^{31,73} Vanuit het cytosol wordt cobalamine getransporteerd door de darmepitheelcel en vrijgelaten in de bloedstroom, waarbij het wordt geassisteerd door multidrug resistance protein MRP1.³¹ Recent onderzoek toonde aan dat de plasma cobalamine concentraties van muizen zonder MRP1 met 50% reduceerde ten opzichte van muizen met MRP1. Daarnaast daalden de cobalamine concentraties in zowel de lever als nier met respectievelijk 20% en 75%.⁷⁴ Desondanks stegen de metabolieten Hcy en MMA onvoldoende significant om te kunnen spreken van een ontstane B₁₂ deficiëntie. Tot op heden zijn er geen genetische defecten in het humane MRP1 gen ontdekt en lijkt het onwaarschijnlijk dat dat een dergelijk defect leidt tot een klinische vitamine B₁₂ deficiëntie.⁷⁵

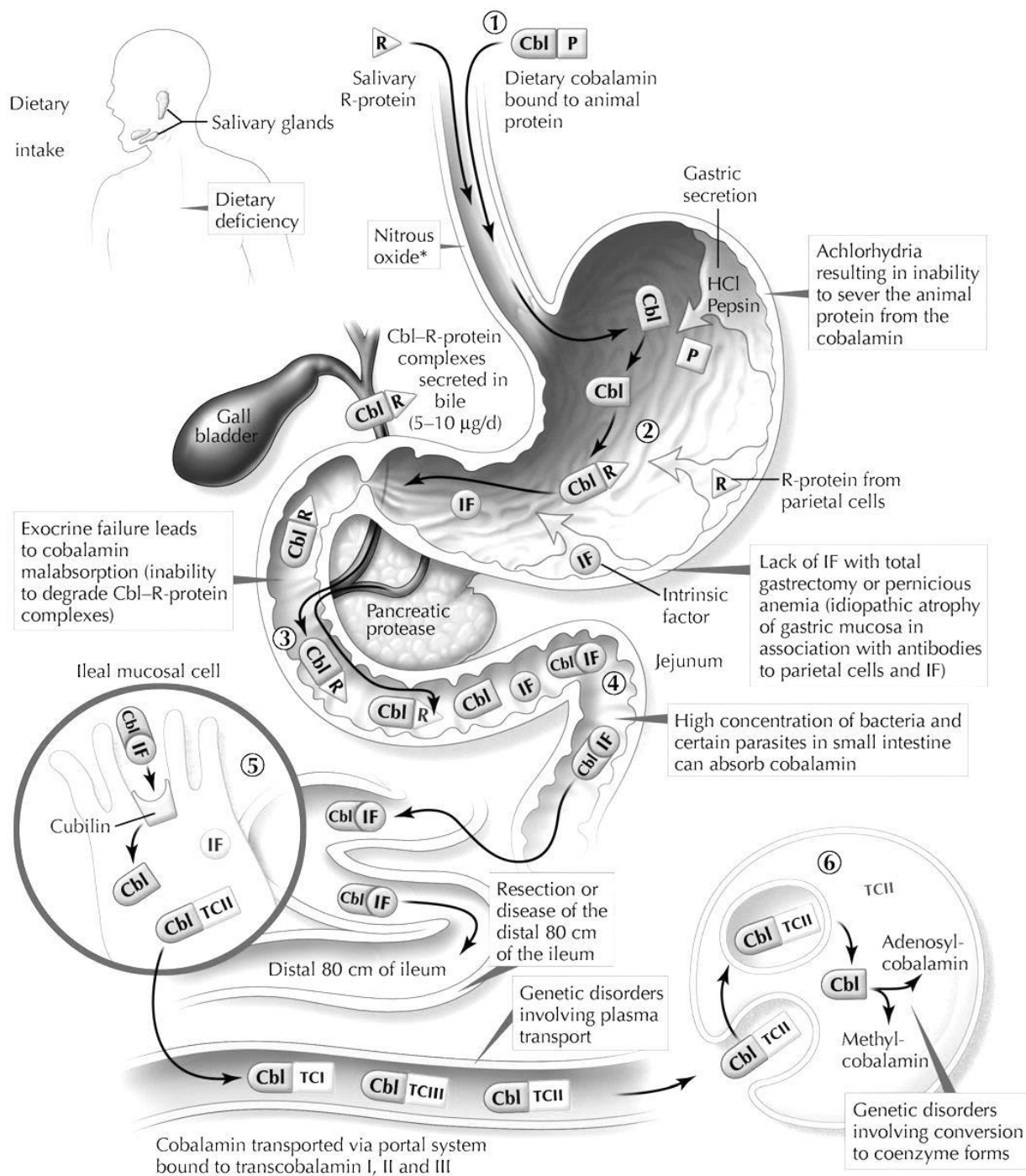
In het bloed kan vitamine B₁₂ worden gebonden aan twee co-eiwitten. Ongeveer 75-90% wordt gebonden aan haptocorrine (HC, ook wel transcobalamine I genoemd). Dit co-eiwit wordt gebruikt voor transport en opslag in de lever maar is niet betrokken bij transport van cobalamine in de cel en de omvorming van cobalamine in functionele cofactoren. Een ruime meerderheid van het in het bloed circulerende vitamine B₁₂ is daarmee inactief.^{28,31,76} Een genetisch defect dat resulteert in een verminderde aanmaak van haptocorrine leidt tot een vals verlaagde serum B₁₂ concentratie, zonder dat er sprake is van een daadwerkelijke deficiëntie op weefselniveau. De resterende 10-25% van het in het bloed circulerende cobalamine wordt gebonden aan co-eiwit transcobalamine (TCII)³¹. Het complex van aan transcobalamine gebonden cobalamine wordt holo-transcobalamine genoemd. Transcobalamine faciliteert in de opname van cobalamine in de cel en is daarmee verantwoordelijk voor de omvorming van cobalamine in functionele cofactoren. Binding aan transcobalamine vormt het vijfde cruciale punt in het vitamine B₁₂ metabolisme. Een genetisch defect in dit co-eiwit leidt tot de onmogelijkheid cobalamine de cel in te transporteren met een vitamine B₁₂ deficiëntie tot gevolg.⁶⁸

Vanuit het bloed wordt holo-TC opgenomen in cellen via TC-receptor gemedieerde endocytose.^{77,31} In 2009 werd het gen ontdekt dat codeert voor de receptor CD320 en in 2010 werd een genmutatie ontdekt die verantwoordelijk is voor een defect in de transcobalamine receptor, als mogelijke oorzaak voor een B₁₂ deficiëntie.⁷⁸ Daarmee vormt TC-receptor gemedieerde endocytose het vijfde kritieke punt in het B₁₂ metabolisme.

Bij een goed functionerende TC-receptor wordt het complex opgenomen in de cel, waarbij co-eiwit transcobalamine wordt afgebroken in lysosomen zodat er vrij cobalamine ontstaat. Op dit punt kan het vrije cobalamine nog niet functioneren als cofactor en wordt daarom volgens een complex intracellulair proces bewerkt door vele eiwitten, wat uiteindelijk leidt tot het ontstaan van cofactoren methylcobalamine en 5'-deoxyaldenosylcobalamine.⁷⁶ Hoewel de biochemische pathway die cobalamine intracellulair aflegt, nog niet volledig is opgehelderd, heeft jarenlange studie van complementatie-analyse wel een inzicht gegeven in hoe het intracellulaire metabolisme in grote lijnen verloopt. Inactief cobalamine wordt in het cytosol bewerkt, waarna het één van de twee intracellulaire pathways kiest die leidt tot de synthese van één van beide cofactoren. Cofactor methylcobalamine wordt gesynthetiseerd middels cytosolische processen en cofactor 5'-deoxyaldenosylcobalamine middels de mitochondriale pathway.^{6,28,31}

Recent werd in een review door Froese en Gravel uitgebreid beschreven hoe complementatie-analyse tot de ontdekking van acht belangrijke complementatie groepen (*cbIA-cbIG en mut*) heeft geleid.⁷⁶ Elke complementatie groep wordt gekenmerkt door genmutaties, die blokkades veroorzaken in de productie of het gebruik van methylcobalamine en/of 5'-deoxyaldenosylcobalamine. De drie complementatie groepen *cbIF*, *cbIC* en *cbID* correleren met blokkades in metabole pathways die leiden tot synthese van beide cofactoren. Complementatie groepen *cbID1*, *cbIE* en *cbIG*, correleren met genmutaties die blokkades opleveren in de cytosolische pathway en de

synthese van methylcobalamine. Tot slot de complementatie groepen *cbiD2*, *cbiA*, *cbiB* en *mut*, die correleren met genmutaties die blokkades opleveren in de mitochondriale pathway en synthese van 5'-deoxyadenosylcobalamine.⁷⁶ Figuur 4 toont een schematisch overzicht van het metabolisme van vitamine B₁₂.



Figuur 4: Overzicht van het metabolisme van vitamine B₁₂; van innake tot werkzame cofactor in de menselijke cel. 1: Innake van aan voedselwitte gebonden vitamine B₁₂. 2: Peptische activiteit in de maag maakt vitamine B₁₂ los van de voedselwitte. 3: Aan haptocorrine gebonden vitamine B₁₂ verlaat de maag en komt in het duodenum terecht. 4: Nadat pancreasproteases haptocorrine hebben gedegradeerd, bindt vrij vitamine B₁₂ aan intrinsic factor. 5: In het terminale ileum bevindt zich de B₁₂-IF receptor (Cubilin), dat het complex bindt en de darmcel in transporteert. 6: Aan transcobalamine gebonden vitamine B₁₂ wordt de cel in getransporteerd en kiest dan wel de cytoplasmatische, dan wel de mitochondriale intracellulaire pathway voor de synthese van respectievelijk methylcobalamine en 5-deoxyadenosylcobalamine.⁸

TABEL 1. Oorzaken van vitamine B₁₂ deficiëntie gelegen in het extracellulaire en intracellulaire metabolisme

27,31,60,66,68,76

ORZAKEN EXTRACELLULAIRE METABOLISME	SPECIFICATIE	GENMUTATIES
Inadequate inname	Veganisme vegetarisme	-
Verminderde peptische activiteit maag, hypochlorhydrie of achloorhydrie	Maagatrofie maagresectie <i>H. pylori</i> infectie gebruik van H2-receptor antagonisten of protonpompremmers Pernicieuze anemie	-
Verminderde werking haptocorrinen	Sjögren genetische afwijking TCN1 gen dat codeert voor haptocorrinen	TCN1 gen
Verminderde werking pancreasproteases	Chronische pancreatitis	-
Verminderde werking/aanmaak intrinsic factor	Maagatrofie maagresectie <i>H. pylori</i> infectie Pernicieuze anemie genetische afwijking in GIF gen dat codeert voor IF gebruik van H2 receptor antagonisten	GIF gen
Defect in receptor Cubam/afwezigheid receptor Cubam/verminderde werking receptor	Immerslund Grasbeck terminale ileumresectie Crohn Coeliakie bacteriële overgroei parasiet metformine	60 mogelijke genmutaties in cubam
Verminderde werking/aanmaak transcobalamine	Genetische afwijking transcobalamine	TCN2 gen
Receptor holo-transcobalamine-complex	Genetische afwijking in receptor	CD320 gen
ORZAKEN INTRACELLULAIRE METABOLISME	SPECIFICATIE	GENMUTATIES
Complementgroep <i>CbIA</i>	Geïsoleerde methylmalonyl acidemie	MMAA
Complementgroep <i>CbIB</i>	Geïsoleerde methylmalonyl acidemie	MMAB
Complementgroep <i>CbIC</i>	Gecombineerde methylmalonyl acidemie en hyperhomocysteinemie	MMACHC
Complementgroep <i>CbID</i>	Gecombineerde methylmalonyl acidemie en hyperhomocysteinemie	MMADHC
Complementgroep <i>CbID variant 1</i>	Geïsoleerde hyperhomocysteinemie	MMADHC
Complementgroep <i>CbID variant 2</i>	Geïsoleerde methylmalonyl acidemie	MMADHC
Complementgroep <i>CbIE</i>	Geïsoleerde hyperhomocysteinemie	MTRR
Complementgroep <i>CbIF</i>	Gecombineerde methylmalonyl acidemie en hyperhomocysteinemie	LMBRD1
Complementgroep <i>CbIG</i>	Geïsoleerde hyperhomocysteinemie	MTR
Complementgroep <i>mut</i>	Geïsoleerde methylmalonyl acidemie	MUT

5 | EEN B12 DEFICIËNTIE INTERFEREERT IN DE BIOCHEMISCHE BALANS VAN ESSENTIELE METABOLE PROCESSEN EN LEIDT TOT KLINISCHE MANIFESTATIES

Bij een onvoldoende hoge concentratie actief vitamine B₁₂, kunnen de metabole processen waarin vitamine B₁₂ als cofactor een rol speelt, zich niet of in mindere mate voltrekken. Als gevolg daarvan ontstaat er een biochemische disbalans waarin tussenproducten zich opstapelen en eindproducten niet worden gevormd. Dit leidt tot een breed spectrum aan klinische symptomen, die zich manifesteren in verschillende orgaansystemen. Tabel 2 toont een overzicht van de meest voorkomende klinische verschijnselen die geassocieerd worden met een vitamine B₁₂ deficiëntie. Mits bekend, wordt de pathogenese per orgaansysteem toegelicht.

5.1 | HAEMATOLOGIE

Een eerste indicatie voor een vitamine B₁₂ deficiëntie wordt vrijwel altijd gevormd door een afwijkend hematologisch beeld. Een verlaagde vitamine B₁₂ waarde en een verhoogde MMA of Hcy concentratie als een direct gevolg van een blokkade in de vitamine B₁₂ pathway, zijn de welbekende bloedparameters. Echter, een vitamine B₁₂ deficiëntie leidt tot veel meer hematologische afwijkingen. Tabel 2 toont de klinische manifestaties van een deficiëntie per orgaansysteem.^{68,79} De hematologische verschijnselen, die gezien worden bij een vitamine B₁₂ deficiëntie, kunnen verklaard worden aan de hand van één onderliggend biochemisch mechanisme. Dat mechanisme start bij een B₁₂ deficiëntie en leidt tot een gecombineerde foliumzuur deficiëntie omdat methionine synthase bij onvoldoende B₁₂, niet in staat is om 5-methyl-tetrahydrofolaat om te zetten in ongemethyleerd tetrahydrofolaat (THF). Zie figuur 3. De combinatie van B₁₂ en foliumzuur deficiëntie, leidt tot verminderde DNA synthese, doordat THF essentieel is voor de synthese van thymidine en purine, bouwstenen van DNA.^{28,34} Als gevolg van een verminderde DNA synthese, stopt de cel cyclus, waarbij de G2 groei fase niet over kan gaan in de mitose (M) fase. RNA gebruikt echter geen thymidine, maar uracil als bouwsteen, wat verklaart waarom de eiwitsynthese niet is aangetast bij een B₁₂ en foliumzuur deficiëntie.⁸⁰ De verstoorde DNA synthese in combinatie met normale eiwitsynthese, heeft ook invloed op de hematopoëse: het proces waarin nieuwe bloedcellen gevormd worden. Door de verstoorde balans tussen DNA en eiwitsynthese, ontstaat er een dissociatie tussen de ontwikkeling van de celkern en de maturatie van het cytoplasma.⁸⁰ Dit verschil leidt tot een vreemde morfologie in alle hematopoëtische cellijnen en heeft onder andere macrocytose (MCV > 100 fL) en hypersegmentatie tot gevolg. De vreemde morfologie ontstaat al in voorlopercellen in het beenmerg en wordt medullaire megaloblastose genoemd. Medullaire megaloblastose leidt tot intramedullaire hemolyse (afbraak van bloedcellen) omdat het lichaam de bloedcellen niet herkent, of beter gezegd, als foutief herkent en zal de cellen daarom afbreken. Verhoogde afbraak van bloedcellen leidt tot een tekort aan trombocyten (trombocytopenie) neutrofielen (neutropenie) of tot een algeheel tekort in alle bloedcellijnen (pancytopenie), evenals verhoogde niveaus LDH en bilirubine.⁸⁰

5.2 | NEURO-PSYCHIATRIE

Neurologische schade aan het centrale en het perifere zenuwstelsel als gevolg van een tekort aan vitamine B₁₂, werd ruim 100 jaar geleden voor het eerst samengevat onder de noemer subacute gecombineerde strengziekte.⁸¹ In de jaren die daarop volgden, werd geprobeerd een biochemische verklaring te vinden voor het enorme scala aan neuro-psychiatrische verschijnselen (zie tabel 2) dat gepaard kan gaan met een deficiëntie. Desondanks blijft het onderliggende biochemische mechanisme onduidelijk. Een van de eerste theorieën over het ontstaan van neuro-psychiatrische verschijnselen, berust op de verminderde werking van S-adenosylmethionine (SAM, zie figuur 3) als gevolg van een vitamine B₁₂ deficiëntie. SAM is een methyl donor en verantwoordelijk voor 80% van de methylatie reacties in het menselijk lichaam. Methylatie reacties zijn onder andere nodig voor de synthese en het behoud van myelineschede om de zenuwcel. Gesuggereerd werd dat een verminderde hoeveelheid SAM leidt tot een verminderde methylatie van de myelineschede, met neuropathie als gevolg.^{82,83} Daarbij komt dat SAM de serotonine, norepinephrine en dopamine synthese beïnvloedt. Dit suggereert dat, naast structurele consequenties van vitamine B₁₂ deficiëntie, ook functionele effecten op de neurotransmitter synthese ten deel vallen aan een vitamine B₁₂ deficiëntie en mogelijk oorzaak zijn van de mentale veranderingen die vaak gezien worden. Mogelijk is er ook een rol weggelegd voor methylmalonzuur (MMA) in het ontstaan van neuropsychiatrische verschijnselen. Een verhoogde MMA waarde resulteert in een abnormale vetzuurdegradatie. Voor de aanmaak van myeline is een adequate

hoeveelheid specifieke vetzuren vereist. De opeenstapeling van bepaalde vetzuren in membranen van zenuwweefsel zou mogelijk resulteren in een verstoorde integriteit van de myelineschede en leiden tot een slecht functionerend zenuwstelsel.^{82,83}

Nieuwe perspectieven in de pathogenese van neuropsychiatrische verschijnselen leggen de oorzaak bij de invloed van vitamine B₁₂ deficiëntie op cytokines en groeifactoren. Gedacht wordt, dat B₁₂ de synthese van cytokines en groeifactoren kan reguleren en dat een door B₁₂ deficiëntie geïnduceerde verstoring van de cytokine en groeifactor synthese voor een groot deel verantwoordelijk is voor de neuropathie die kenmerkend is voor vitamine B₁₂ deficiëntie. Verschillende studies laten zien dat afwijkende concentraties van TNF- α , NGF, CD40 ligand dyad, EGF, IL-6 en NF- $\kappa\beta$ bij zowel ratten als mensen worden waargenomen in de cerebrospinale vloeistof, het serum en het ruggenmerg.^{49,84-88} Daarbij ontstaat er een disregulatie van de balans tussen de hoeveelheid neurotoxinen (TNF- α , NGF, CD40 ligand dyad) en neurotrofinen (EGF en IL-6), die leidt tot een verhoogde synthese van neurotoxinen en neurologische schade.⁴⁹ In 1999 toonde Scalabrino aan dat de EGF concentratie niet alleen verminderd is, maar dat dat EGF mRNA zelfs volledig afwezig is in neuronen en gliacellen.⁸⁵ Vervolgonderzoek wees uit dat de schadelijk hoge concentraties neurotoxinen zich weer herstellen na cobalamine suppletie of intraveneuze behandeling met anti-TNF, EGF of IL-6. De biochemische basis waarop de disregulatie plaatsvindt blijft onduidelijk, hoewel de regulatie van TNF- α synthese middels S-adenosylmethionine (SAM) verloopt en daarmee de klassieke biochemische pathway verbindt met de rol van cytokines in neurologische disfunctie.⁸⁹

5.3 | HART- EN VAATSTELSEL

Als een direct gevolg van een tekort aan vitamine B₁₂, stapelt intermediair in de methionine cyclus, homocysteïne zich op (zie figuur 3). Hyperhomocysteïnemie wordt gezien als risicofactor voor atherosclerose en trombose.⁹⁰ De biochemische verklaring van deze manifestaties berust op een groot aantal complexe mechanismen waarin endotheliale dysfunctie een centrale rol speelt.^{90,91} Hyperhomocysteïnemie verhoogt de endotheliale permeabiliteit, door de adhesiemoleculen ICAM-1, VCAM-1 en E-selectine te inhiberen. Als gevolg daarvan komt onderliggend weefsel bloot te liggen, waardoor zich makkelijk atherosclerotische plaques en trombussen kunnen vormen.⁹² Daarnaast stimuleert homocysteïne de activiteit van bloedstollingseiwitten (factor XII, factor V en tissue factor) en inhijbeert tegelijkertijd de activiteit van anti-bloedstollingseiwitten (proteïne C en trombomoduline).⁹¹ Tot slot wordt gedacht dat homocysteïne de vorming van atherosclerotische plaques initieert, door de productie van vrije radicalen te stimuleren die LDH cholesterol oxideren en door de rol van homocysteïne in monocyt migratie.⁹¹

5.4 | VERTERINGSSTELSEL

Een door B₁₂ patiënten frequent gerapporteerde klacht is het hebben van een branderige tong. Dit symptoom is kenmerkend voor B₁₂ deficiëntie en wordt ook wel Hunter's glossitis genoemd. De pathogenese berust mogelijk op epitheliale atrofie van de tong als gevolg van een verstoorde DNA synthese. Hetzelfde geldt voor patiënten met een verminderde smaak.^{93,94} De verstoorde celdeling als gevolg van een B₁₂ tekort manifesteert zich het eerst in snel delende cellen. Snel delende cellen bevinden zich in het tongepitheel, de papillen, maar bijvoorbeeld ook in de darmen. Dit zou de algemene maag-darm klachten en het ontstaan van aften en zweren kunnen verklaren. De pijn en moeite die een patiënt ondervindt als gevolg van glossitis of zweren in het maag-darmstelsel, leiden tot anorexia en houden daarmee de B₁₂ deficiëntie in stand.⁹⁴ Onderzoek heeft de relatie aangetoond tussen recidiverende aften en zweren en een lage B₁₂ en foliumzuur status.⁹⁵ Daarnaast toont onderzoek aan dat behandeling met B₁₂ de gastro-intestinale symptomen vermindert, dan wel doet verdwijnen.⁹⁶

5.5 | BEWEGINGSAPPARAAT

De pathofysiologie van aan B₁₂ deficiëntie gerelateerde klachten aan het bewegingsapparaat is niet goed onderzocht. Desalniettemin liggen verklaringen als spieratrofie (als gevolg van verminderde DNA synthese), opeenstapeling van schadelijke metaboliëten in spieren en gewrichten (vrije radicalen als gevolg van verminderde antioxidant functie) en verminderde neurologische aansturing voor de hand. Kleinschalig onderzoek suggereert dat er een relatie bestaat tussen myalgie en de B₁₂ status in het bloed.⁹⁷ Een aantal case reports heeft aangetoond dat er sprake kan zijn van paralyse als gevolg van een (ernstige) B₁₂ deficiëntie.^{98,99}

TABEL 2. *Klinische manifestaties van een vitamine B12 deficiëntie per orgaansysteem*

HEMATOLOGIE	NEURO-PSYCHIATRIE	HART- EN VAAT
Verlaagde totaal B12 waarde Verlaagde holo-TC Verhoogde MMA Verhoogde Hcy Macrocytose Hypersegmentatie van neutrofielen Medullaire megaloblastose Geïsoleerde trombocytopenie Pancytopenie Intramedullaire hemolyse LDH en bilirubine verhoging Pseudo trombotische microangiopathie	Ataxie Paresthesieën Verminderde reflexen Verminderde positiezin Abnormale gang Verminderde druk- en pijnperceptie Spasticiteit Incontinentie Gecombineerde strengziekte Concentratie- en geheugenverlies Woordvindstoornissen Dementie Psychose Depressie Stemmingwisselingen Optische zenuw degeneratie Nystagmus	Verhoogde Hcy Atherosclerose Trombose Druk op de borst Kortademig Hartkloppingen Hartritme stoornissen Orthostatische hypotensie
Referenties: 28, 34, 68, 79, 80	Referenties: 41, 81-89	Referenties: 90-92
SPIJSVERTERINGSSTELSEL	BEWEGINGSAPPARAAT	
Glossitis Anorexia Gewichtsverlies Diarree Obstipatie Flatulentie Verlies van smaak en reuk Braken Zweren Aften	Spierzwakte Pijnlijke gewrichten Stijfheid Verlamming	
Referenties: 93-96	Referenties: 97-99	

METHODEN

1 | STUDIE-DESIGN

Een 90-dagen durend prospectief interventie onderzoek naar het effect van hydroxocobalamine op hematologische parameters, klinische verschijnselen en het algemene welbevinden van patiënten met een mogelijke vitamine B₁₂ deficiëntie.

2 | STUDIEPOPULATIE

Benaderd voor onderzoek zijn 344 patiënten die in de periode september 2013 tot en met juni 2014 de internist bezochten op basis van een door de huisarts eerder gemeten laag-normale B₁₂ concentratie én klachten die suggestief waren voor vitamine B₁₂ deficiëntie (zie tabel 5).

Van de 344 patiënten, werd van 286 patiënten schriftelijk informed consent verkregen. De overige 58 patiënten gingen niet akkoord met deelname. Op basis van de pre-interventie inclusiecriteria, werden 230 patiënten geselecteerd voor onderzoek (zie tabel 3 en figuur 5). De overige 56 van de 286 patiënten, voldeden niet aan de criteria. Na drie maanden interventie werden de 230 deelnemende patiënten opnieuw benaderd voor de follow-up. Van 33 patiënten werd geen respons verkregen. Nog eens 43 patiënten voldeden niet aan de post-interventie criteria (zie tabel 4). In totaal voldeden 154 patiënten aan de pre- en post-interventie inclusiecriteria.

TABEL 3 PRE-INTERVENTIE INCLUSIECRITERIA

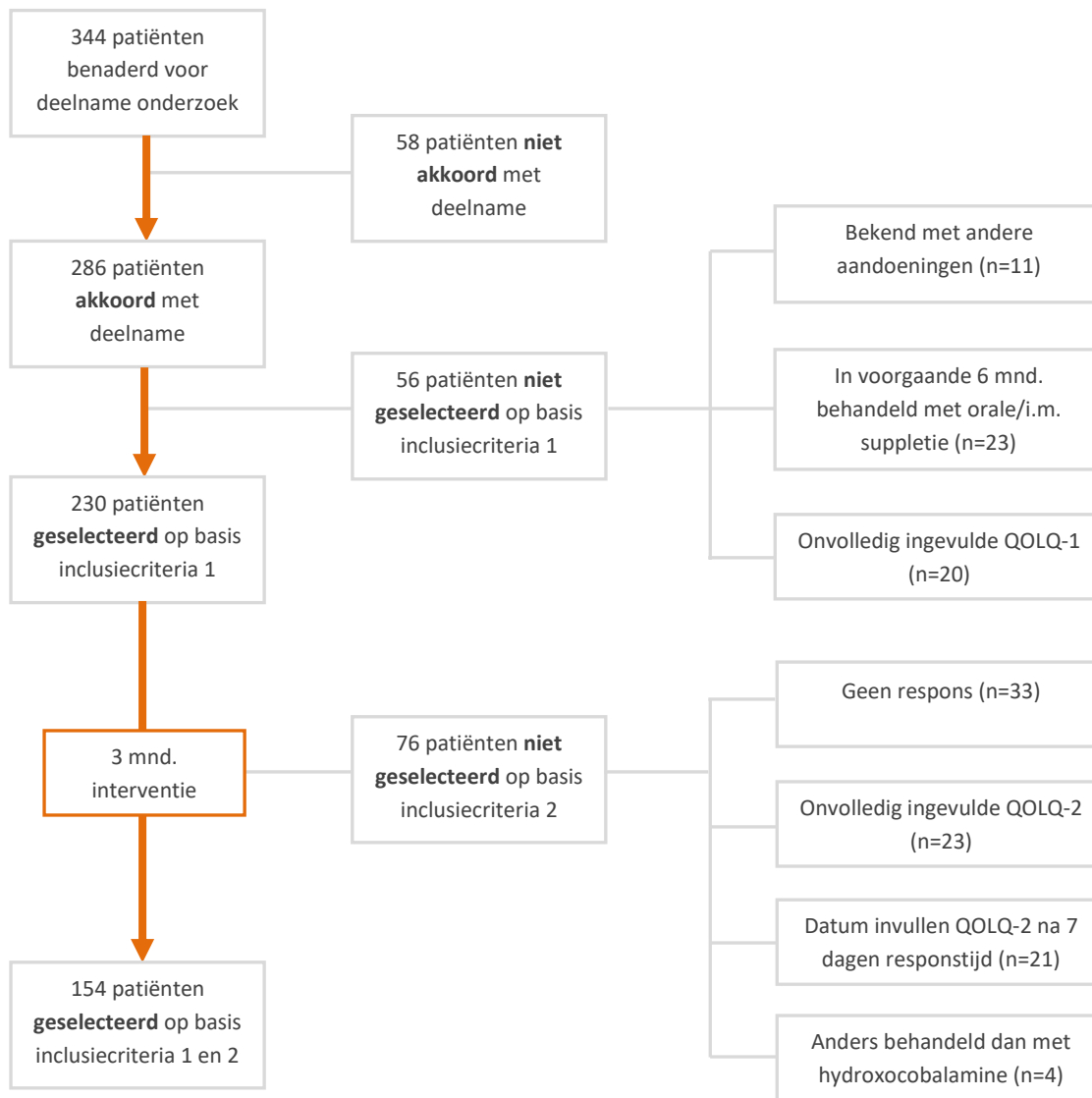
Bij eerste polibezoek een eerder gemeten lage tot laag-normale vitamine B ₁₂ concentratie: <400 pmol/L
Bij eerste polibezoek klachten die suggestief zijn voor een vitamine B ₁₂ deficiëntie (zie tabel)
Bevestiging van lage tot laag-normale vitamine B ₁₂ concentratie <400 pmol/L na eerste polibezoek
Bevestiging van klachten die suggestief zijn voor een vitamine B ₁₂ deficiëntie (zie tabel) na eerste polibezoek
In de voorgaande zes maanden niet behandeld met orale/intramusculaire vitamine B ₁₂ suppletie
Niet bekend met andere aandoeningen
Capabel informed consent te geven (ouder dan 12 jaar)
Volledig ingevulde symptomenvragenlijst en QOLQ-1

TABEL 4 POST-INTERVENTIE INCLUSIECRITERIA

Drie maanden behandeling met hydroxocobalamine
Binnen de 7 dagen responstijd na behandeling symptomenvragenlijst en QOLQ-2 ingevuld
Volledig ingevulde symptomenvragenlijst en QOLQ-2

TABEL 5 KLACHTEN SUGGESTIEF VOOR B₁₂ DEFICIENTIE

Neurologische klachten: paresthesieën, ataxie, duizeligheid, woordvindstoornissen, concentratiegebrek
Klachten van het bewegingsapparaat: verminderde spierkracht, pijnlijke spieren, pijnlijke gewrichten
Psychologische klachten: depressief, emotioneel, prikkelbaar, neerslachtig
Klachten van hart- en vaatstelsel: kortademigheid, druk op de borst, hartkloppingen, hartritmestoornissen
Klachten van verteringsstelsel: gebrek aan eetlust, misselijkheid, obstipatie, diarree
Overige klachten: extreme vermoeidheid, moeite met slapen, kouwelijkheid



Figuur 5: Selectiecriteria studiepopulatie pre-interventie en post-interventie

3 | LABORATORIUM ONDERZOEK

De bloedtesten werden uitgevoerd bij polibezoek 1, voor de start van interventie met hydroxocobalamine (gedefinieerd als uitgangswaarden) en herhaald bij polibezoek 2, drie maanden na de start van interventie. Bloed werd verkregen door medewerkers van de poli bloedafname via een standaard venapunctie in de elleboogsplooi met de patiënt in zittende positie. Voor de analyse van de totaal B₁₂ concentratie en foliumzuur concentratie werd minimaal 150 µL bloed verzameld in Serumbuizen met coagulans. Na bloedafname werden de buizen voor vitamine B₁₂ en foliumzuur analyse 25 minuten bewaard bij kamertemperatuur en gecentrifugeerd (5 min. 3000rpm) alvorens analyse. De bloedmonsters werden maximaal twee uur na afname geanalyseerd. De vitamine B₁₂ en foliumzuur concentratie werden gemeten op basis van een competitieve electrochemiluminiscentie immuno assay (ECLIA). Daartoe werd 15 µL bloed voorbehandeld met een reagens om ongebonden vitamine B₁₂ en foliumzuur te verkrijgen. Bij de bloedmonsters voor vitamine B₁₂ analyse, werd een tweede reagens met ruthenium gelabeld intrinsic factor toegevoegd, waarbij een complex tussen het in het bloedmonster aanwezige B₁₂ en gelabeld intrinsic factor werd gevormd. Bij de bloedmonsters voor foliumzuur analyse, werd een tweede reagens met ruthenium gelabeld foliumzuur bindend eiwit toegevoegd, ook werd hier een complex gevormd. Vervolgens werden aan beide bloedmonsters dan wel gebiotinyleerd vitamine B₁₂, dan wel gebiotinyleerd foliumzuur toegevoegd om competitie aan te gaan met de nog ongebonden plaatsen. Toevoeging van streptavidine-gebonden micropartikels in beide bloedmonsters, bond het gehele complex aan de vaste fase via interactie tussen biotine en streptavidine. In de meetcel werd het complex gevangen door magneten aan de elektrode. Ongebonden fracties werden weggewassen

met buffer. Tot slot werd er een spanningsverschil over de elektrode gezet, waarbij de hoeveelheid afgegeven relatieve light units (RLU's) en gold als maat voor de vitamine B12 en foliumzuur concentratie.¹⁰⁰ Het referentie-interval voor vitamine B12 betrof: 160 – 700 pmol/L. Het referentie-interval voor (erythrocyt) foliumzuur betrof 7 – 40 nmol/L.

Voor de analyse van de erythrocyte mean cell volume (MCV) werd minimaal 150 µl bloed verzameld in EDTA-buizen. Na bloedafname werden de buizen voor MCV analyse bij kamertemperatuur bewaard op een schudmachine om coagulatie te voorkomen. Gebruik werd gemaakt van de standaard methode voor MCV analyse: bloedcellen passeerden een smalle sluis, waarbij verschillen in elektrische weerstand werden gedetecteerd en maat waren voor het MCV. Referentie interval was 85-100 fL.

4 | BEHANDELING MET HYDROXOCOBALAMINE

Patiënten werden intramusculair behandeld met hydroxocobalamine door de eigen huisarts volgens een schema van 10 maal 1mg hydroxocobalamine, met een interval van 3 dagen, gevolgd door 1 intramusculaire injectie van 1 mg eenmaal per 2 maanden. Aan het einde van de 90 dagen interventieperiode hadden de patiënten 11 injecties ontvangen en 1 resterende injectie tegoed.

5 | SYMPTOMEN & QUALITY OF LIFE QUESTIONNAIRE

5.1 | *Symptomenvragenlijst*

Informatie over symptomen werd verkregen via een digitaal interview bestaande uit 29 vragen. Het interview werd tweemaal afgenomen: voor de start van interventie op T=1 en herhaald na 3 maanden interventie op T=90.

De patiënt werd gevraagd naar het bestaan en vervolgens de mate van aanwezigheid van klachten (zie appendices voor vragenlijst). De vragen 1 t/m 29 konden beantwoord worden met A) de klacht is helemaal niet aanwezig; B) de klacht is een beetje aanwezig; C) de klacht is nogal aanwezig; en D) de klacht is heel erg aanwezig, waarvoor respectievelijk 1, 2, 3 en 4 punten konden worden gescoord. De patiënt beoordeelde de mate van aanwezigheid van een klacht naar eigen inzicht, op zowel meetmoment 1 als meetmoment 2.

Primair werd de gemiddelde beoordeling van vragenlijst 1 (pre-interventie), de gemiddelde beoordeling van vragenlijst 2 (post-interventie) en het gemiddelde beoordelingsverschil tussen vragenlijst 1 en 2 geanalyseerd. Daartoe werd het gemiddelde antwoord (n=154) van vraag 1 t/m 29 bij elkaar opgeteld en gedeeld door 29, waarna het gemiddelde beoordelingsverschil berekend door de gemiddelde beoordeling van vragenlijst 2 af te trekken van de gemiddelde beoordeling van vragenlijst 1. Deze analyse werd herhaald, uitgesplitst naar de drie B₁₂ categorieën: B₁₂ < 150; B₁₂ 150 – 221; B₁₂ > 221 pmol/L

Secundair werd de symptomenvragenlijst opgedeeld in klachtencategorieën: neurologie, psychologie, hart- en vaat, bewegingsapparaat, verteringsstelsel en overig. Per klachtencategorie werd de gemiddelde beoordeling (n=154) geanalyseerd voor vragenlijst 1, voor vragenlijst 2 en tot slot werd het gemiddelde beoordelingsverschil tussen vragenlijst 1 en 2 geanalyseerd. Daartoe werd het aantal vragen per klachtencategorie bij elkaar opgeteld en gedeeld door het aantal vragen in de betreffende categorie, waarna het gemiddelde beoordelingsverschil werd berekend door de gemiddelde beoordeling van vragenlijst 2 af te trekken van de gemiddelde beoordeling van vragenlijst 1. Deze analyse werd herhaald, uitgesplitst naar de drie B₁₂ categorieën: B₁₂ < 150; B₁₂ 150 – 221; B₁₂ > 221 pmol/L.

5.2 | *Quality of Life Questionnaire*

Informatie over de kwaliteit van leven werd verkregen via een digitaal interview bestaande uit vijf vragen naar het algemene welbevinden van de patiënt. Het interview werd tweemaal afgenomen, voor de start van interventie op T=1 en herhaald na 3 maanden interventie op T=90. Het QOLQ werd gelijktijdig met de symptomenvragenlijst afgenomen. De vragen 1 t/m 5 van de QOLQ konden beantwoord worden aan de hand van een schaalverdeling, waarbij 1 punt stond voor 'erg slecht' en 7 punten voor 'uitstekend'. De patiënt beoordeelde de vragen naar eigen inzicht, op zowel meetmoment 1 als meetmoment 2. De gemiddelde beoordeling van QOLQ-1 (pre-interventie), de gemiddelde beoordeling van QOLQ-2 (post-interventie) en het gemiddelde beoordelingsverschil tussen vragenlijst 1 en 2 werd geanalyseerd. Daartoe werd het gemiddelde antwoord (n=154) van vraag 1 t/m 5 bij elkaar opgeteld en gedeeld door 5. Vervolgens werd het gemiddelde beoordelingsverschil berekend door de gemiddelde beoordeling

van QOLQ-2 af te trekken van de gemiddelde beoordeling van QOLQ-1. Deze analyse werd herhaald, uitgesplitst naar de drie B₁₂ categorieën: B₁₂ < 150; B₁₂ 150 – 221; B₁₂ > 221 pmol/L

6 | STATISTISCHE ANALYSES

Voor de statistische analyses is gebruik gemaakt van Statistical Package for Social Sciences 22.0 (SPSS). Voor het analyseren van verschillen in de studiepopulatie is gebruik gemaakt van de Independent Student T Test. Voor het vergelijken van de gemiddelde scores (in hematologische parameters, in de symptomenvragenlijst en de QOLQ) voor en na interventie, is gebruik gemaakt van de Paired Student T Test. Elke Paired Student T Test is herhaald met behulp van de Wilcoxon signed-rank test, om te controleren op het voordoende normaal verdeeld zijn van de verschilscores. Voor het vergelijken van de gemiddelde verschilscores (in hematologische parameters, in de symptomenvragenlijst en de QOLQ) tussen de drie B₁₂ categorieën, is gebruik gemaakt van ANOVA analyse en Welch bij ongelijke varianties. Post Hoc werd gebruik gemaakt van Turkey of Games Howell bij ongelijke varianties. Gemiddelden werden gerapporteerd met bijbehorende standaarddeviatie. Het resultaat van de statistische toetsen werd genoteerd in *P*-waarden, met het bijbehorende 95%-BI. *P*-waarden < 0.05 werden beschouwd als statistisch significant.

RESULTATEN

1 | STUDIEPOPULATIE

De studiepopulatie bestond uit 154 patiënten, van wie 20,8% man (n=32) en 79,2% vrouw (n=122). De gemiddelde leeftijd lag op 41,78 jaar ($\pm 13,44$) en verschilde niet significant tussen mannen en vrouwen ($P = 0.802$). Opgesplitst in leeftijdscategorieën (<40; 40-60; >60) bevond 45,5% zich in de jongste leeftijdscategorie; 48,1% bevond zich in de middelste categorie en de resterende 6,5% bevond zich in de hoogste leeftijdscategorie.

2 | HEMATOLOGISCHE PARAMETERS VOOR EN NA INTERVENTIE

Tabel 6 toont een overzicht van hematologische parameters pre- en post-interventie. Pre-interventie was de gemiddelde vitamine B₁₂ waarde 213 pmol/L (70,96) en statistisch significant verschillend tussen mannen en vrouwen ($P=0.024$) maar niet tussen de leeftijdscategorieën ($P=0.140$). Ruim 20% van de patiënten had een B₁₂ waarde lager dan 150 pmol/L. In de categorie marginale status viel 32,5%. De resterende 46,8% had een B₁₂ waarde boven de 221 pmol/L. Na interventie steeg de gemiddelde B₁₂ waarde significant (zowel voor mannen als vrouwen $P=0.000$). Pre-interventie was de gemiddelde foliumzuur waarde 16,49 nmol/L (6,10) en verschilde niet significant tussen mannen en vrouwen, noch tussen leeftijdscategorieën (resultaten niet weergegeven). 9,1% had een foliumzuur deficiëntie. Ruim 90% had een waarde binnen het normale referentie-interval. Na interventie steeg de foliumzuur concentratie significant. ($P=0.000$)

Voor interventie was de gemiddelde MCV waarde 90,14 fL en verschilde niet significant tussen mannen en vrouwen, noch tussen leeftijdscategorieën (resultaten niet weergegeven). 97,4% had een waarde binnen het referentie-interval en 2,6% had macrocytose. Na interventie daalde de gemiddelde MCV waarde naar 89,63 fL ($P=0.307$).

TABEL 6. *Vergelijking van hematologische parameters pre- en post-interventie*

CATEGORIE	PRE-INTERVENTIE	POST-INTERVENTIE	SIGNIFICANTIE (TWEEZIJDIG)	95%-BBI
Gemiddelde B₁₂	213 pmol/L (70,96)	728,21 pmol/L (179,41)	$P = 0.000^a$	-534,33 – -495,21
Mannen	206,83 pmol/L (71,04)	710,30 pmol/L (182,36)	$P = 0.000^a$	-525,60 – -481,32
Vrouwen	238,59 pmol/L (65,81)	796,50 pmol/L (151,57)	$P = 0.000^a$	-598,22 – -517,58
Significantie	$P = 0.024^b$	$P = 0.015^b$		
% B ₁₂ < 150 pmol/L	20,8% (n=32)	0%		
% B ₁₂ 150 – 221 pmol/L	32,5% (n=50)	0%		
% B ₁₂ > 221 pmol/L	46,8% (n=72)	100% (n=154)		
Gemiddeld foliumzuur	16,49 nmol/L (6,10)	19,73 (4,37) nmol/L	$P = 0.000$	-3.83 – -2,43
% foliumzuur < 7 nmol/L	9,1% (n=14)	0%		
% foliumzuur 7 – 40 nmol/L	90,9% (n=140)	100%		
Gemiddelde MCV	90,14 fL.(4,29)	89,68 fL (3,44)	$P = 0.307$	-0.42 – 1,33
% MCV < 80	0%	0%		
% MCV 80-100	97,4% (n=150)	100% (n=154)		
% MCV >100	2,6% (n=4)	0%		

^a Paired Student T Test; ^b Independent Student T Test

3.1 | Vragen 1 tot en met 29 (n=154)

Pre-interventie werd de mate van aanwezigheid van een klacht uit de symptomenvragenlijst met gemiddeld 2,20 punten beoordeeld, post-interventie met gemiddeld 1,84 punten. Het gemiddelde beoordelingsverschil bedroeg 0,36 punten en was significant ($P=0.000$). Zie tabel 7.

TABEL 7. *Vergelijking van de beoordeling pre- en post-interventie (n=154) van de symptomenvragenlijst*

Vragen 1 – 29	GEM. AANTAL PUNTEN PRE-INTERVENTIE	GEM. AANTAL PUNTEN POST-INTERVENTIE	GEMIDDELD PUNTEN-VERSCHIL	95% - BI	SIGNIFICANTIE (TWEEZIJDIG)
Totaal	2,20 (0,59) punten	1,84 (0,51) punten	0,36 punten	0,25 – 0,48	$P = 0.000^a$

^a Paired Student T Test

3.2 | Vragen 1 tot en met 29 uitgesplitst naar de B₁₂ categorie

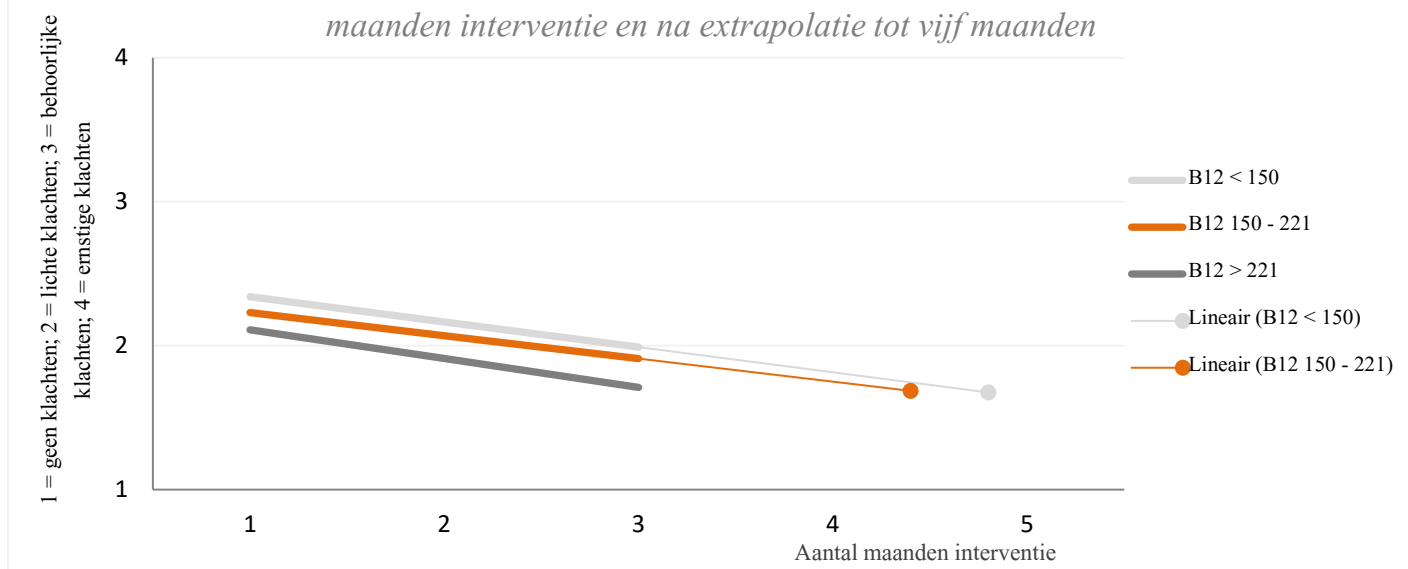
Uitgesplitst naar B₁₂ categorie was het verschil in beoordeling pre-interventie niet significant ($P=0.199$), maar post-interventie wel significant verschillend ($P=0.019$). Post Hoc is de Games Howell analyse uitgevoerd. Het beoordelingsverschil tussen pre- en post-interventie was voor alle drie de B₁₂ categorieën significant, ($P=0.012$; $P=0.011$; $P=0.001$). De beoordelingsverschillen tussen de drie B₁₂ categorieën (0,35 punten; 0,33 punten en 0,40 punten) waren niet significant verschillend. ($P=0.847$). Omdat er geen sprake was van significantie, is geen Post Hoc test uitgevoerd. Voor een overzicht, zie tabel 8 en grafiek 1.

TABEL 8. *Vergelijking van de beoordeling pre- en post-interventie van de symptomenvragenlijst, uitgesplitst naar vitamine B₁₂ categorieën B₁₂ < 150; B₁₂ 150 – 221; B₁₂ > 221*

Vragen 1 – 29	GEM. AANTAL PUNTEN PRE-INTERVENTIE	GEM. AANTAL PUNTEN POST-INTERVENTIE	GEMIDDELD PUNTEN-VERSCHIL	95% - BI	SIGNIFICANTIE (TWEEZIJDIG)
Categorie 1 B ₁₂ < 150	2,34 (0,65) punten	1,99 (0,54) punten	0,35 punten	0,08 – 0,61	$P = 0.012^d$
Categorie 2 B ₁₂ 150-221	2,23 (0,64) punten	1,91 (0,55) punten	0,33 punten	0,08 – 0,57	$P = 0.011^d$
Categorie 3 B ₁₂ > 221	2,11 (0,52) punten	1,71 (0,43) punten	0,40 punten	0,25 – 0,55	$P = 0.001^d$
Significantie (tweezijdig)	$P = 0.199^a$	$P = 0.019^{b,c}$	$P = 0.847^a$	-	-

^a ANOVA analyse; ^b Welch ANOVA analyse; ^c Post Hoc Games Howell analyse; ^d Paired Student T Test

GRAFIEK 1. Vermindering van mate van klachten (factor herstel) na drie maanden interventie en na extrapolatie tot vijf maanden



3.3 | Vragen per klachtencategorie (n=154)

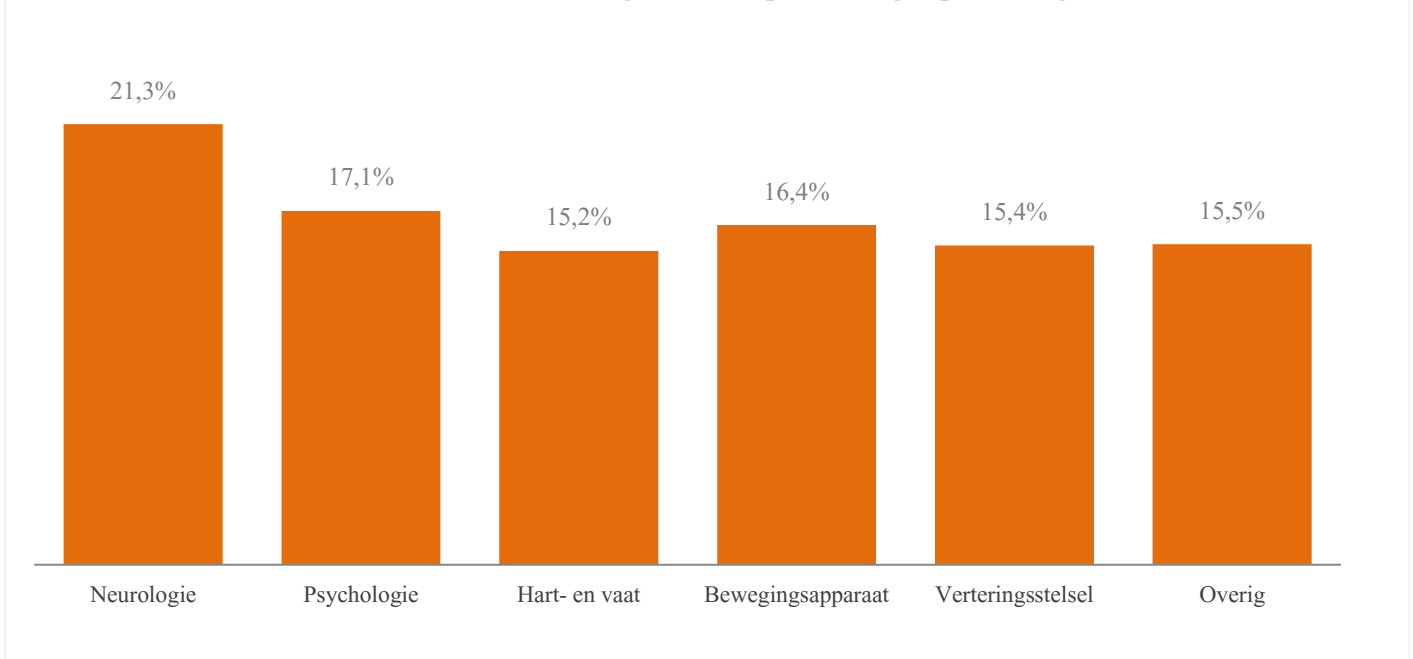
Gemiddeld werd in de categorieën neurologie ($P=0.000$); psychologie ($P=0.000$); hart- en vaat ($P=0.000$); verteringsstelsel ($P=0.000$); bewegingsapparaat ($P=0.000$) en overig ($P=0.000$), een significant beoordelingsverschil gevonden tussen de pre- en post-interventie beoordeling van de mate van aanwezigheid van klachten. Voor een overzicht, zie tabel 9. Grafiek 2 geeft aan in welke categorie de grootste mate van herstel werd waargenomen.

TABEL 9. Vergelijking van de beoordeling pre- en post-interventie (n=154) per klachtencategorie

VRAGEN	GEMIDDELDE SCORE PRE-INTERVENTIE	GEMIDDELDE SCORE POST-INTERVENTIE	GEMIDDELD BEOORDELINGS-VERSCHIL	95% - BI	SIGNIFICANTIE (TWEEZIJDIG) GEM. VERSCHIL
Neurologische klachten	2,30 (0,76) punten	1,81 (0,64) punten	0,49 punten	0,33 – 0,64	P=0.000^a
Psychologische klachten	2,22 (0,73) punten	1,84 (0,66) punten	0,38 punten	0,23 – 0,52	P=0.000^a
Klachten hart- en vaat	2,11 (0,72) punten	1,79 (0,68) punten	0,32 punten	0,17 – 0,47	P=0.000^a
Klachten bewegings-apparaat	2,68 (1,04) punten	2,23 (0,92) punten	0,44 punten	0,26 – 0,63	P=0.000^a
Klachten verteringsstelsel	1,75 (0,61) punten	1,48 (0,40) punten	0,27 punten	0,16 – 0,38	P=0.000^a
Overige klachten	2,26 (0,62) punten	1,91 (0,56) punten	0,35 punten	0,21 – 0,48	P=0.000^a

^a Paired Student T Test

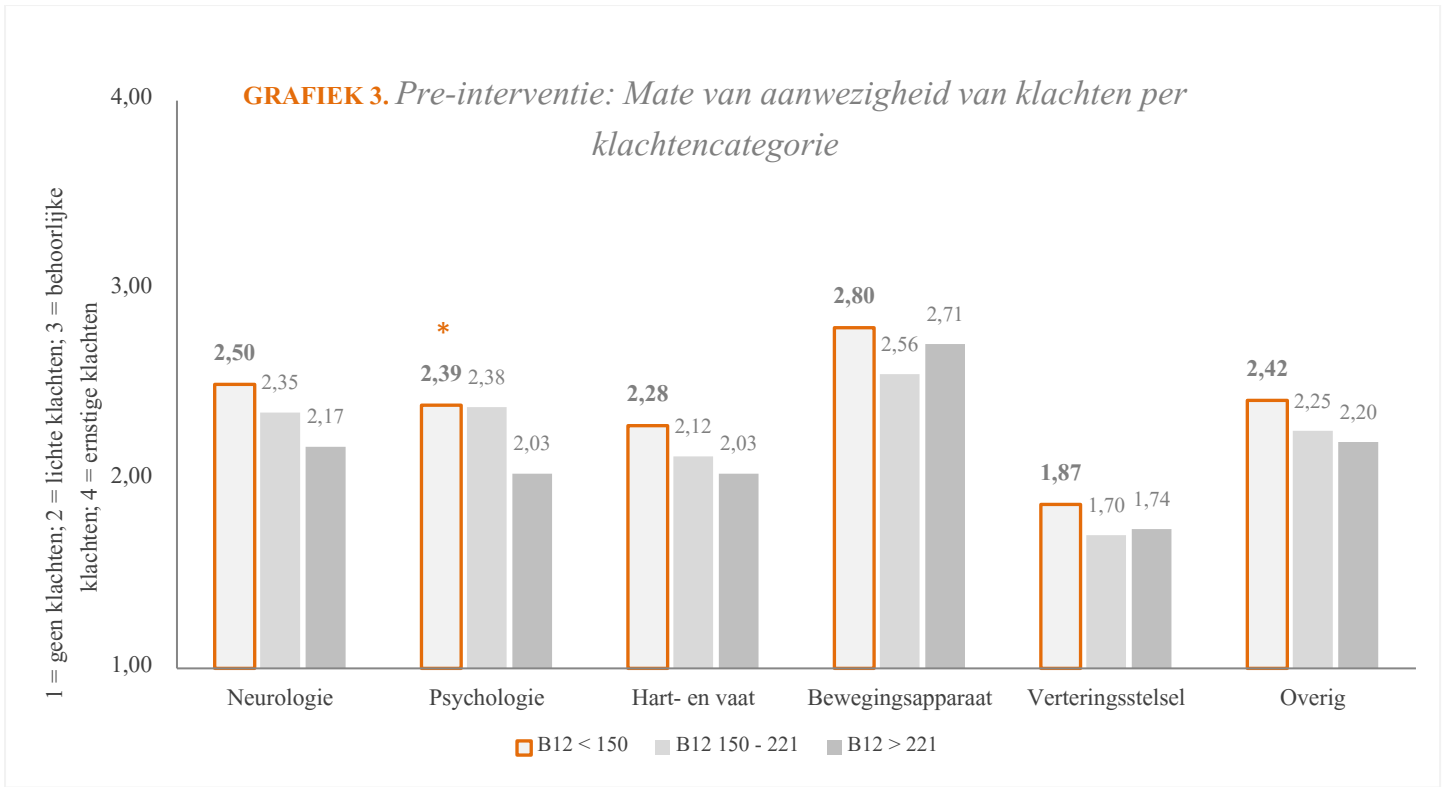
GRAFIEK 2. *Mate van herstel uitgedrukt in percentages per categorie klacht*



3.4 | Vragen per klachtencategorie uitgesplitst naar B₁₂ categorie

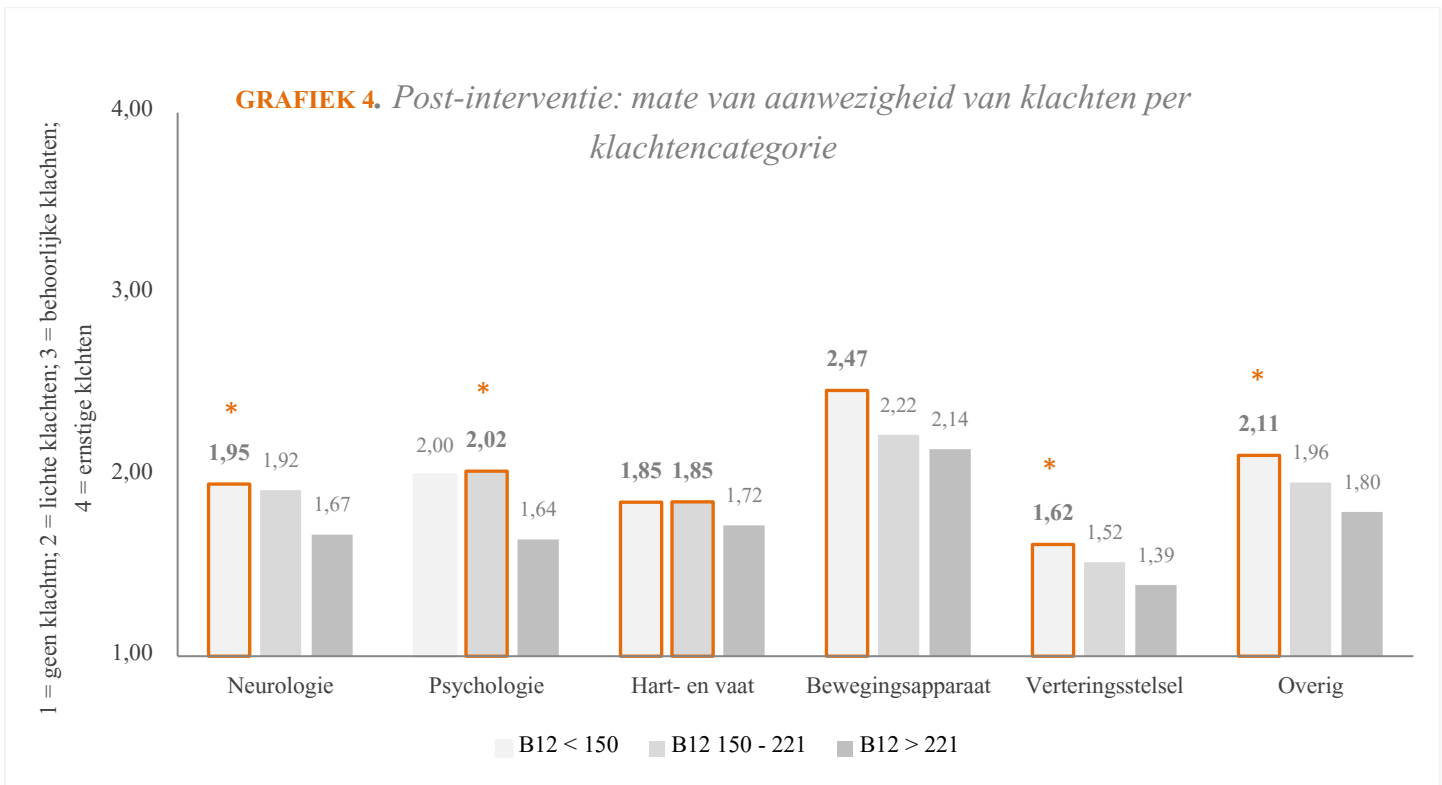
Pre-interventie werd de mate van aanwezigheid van klachten in elke klachtencategorie het hoogst beoordeeld door de groep B₁₂ < 150 pmol/L. Grafiek 3 geeft de resultaten weer en toont de B₁₂ categorie met de hoogste score per klachtencategorie (oranje omlijnd) pre-interventie. Echter, slechts in de klachtencategorie psychologie was er tussen de drie B₁₂ categorieën sprake van een significant pre-interventie beoordelingsverschil ($P=0.011$; ANOVA). Post-interventie werd de mate van aanwezigheid van klachten in vier van de zes klachtencategorieën het hoogst beoordeeld door de groep B₁₂ < 150 pmol/L. Grafiek 4 geeft de resultaten weer en toont de B₁₂ categorie met de hoogste score per klachtencategorie post-interventie. ANOVA analyse wees uit dat het post-interventie beoordelingsverschil tussen de drie B₁₂ categorieën, daadwerkelijk significant was voor neurologie, psychologie, verteringsstelsel en overig, waarvoor respectievelijk ($P=0.044$; Welch ANOVA); ($P=0.002$; Welch ANOVA); ($P=0.025$; Welch ANOVA) ($P=0.028$; Welch ANOVA).

Tabel 10 geeft een overzicht weer van het beoordelingsverschil in klachten per klachtencategorie, uitgesplitst naar B₁₂ categorie. In de groep patiënten met een B₁₂ waarde < 150 pmol/L, werd in vier van de zes klachtencategorieën, een significant puntenverschil gevonden tussen pre- en post-interventie beoordeling (neurologie, psychologie, hart- en vaat en bewegingsapparaat). In de groep patiënten met een B₁₂ waarde tussen 150 en 221 pmol/L, werd in drie van de zes klachtencategorieën een significant puntenverschil gevonden tussen pre- en post-interventie beoordelingen (neurologie, psychologie en overig). In de groep patiënten met een B₁₂ waarde > 221 pmol/L, werd in zes van de zes klachtencategorieën een significant puntenverschil gevonden tussen pre- en post-interventie beoordelingen. Per categorie klacht werd het gemiddelde puntenverschil vergeleken tussen de drie B₁₂ categorieën. Uit de ANOVA analyse of Welch ANOVA (bij ongelijke varianties) bleek dat het gemiddelde puntenverschil in zowel de klachtencategorieën neurologie ($P=0.836$); psychologie ($P=0.987$); hart- en vaat ($P=0.771$); verteringsstelsel ($P=0.353$); bewegingsapparaat ($P=0.421$) en overig ($P=0.759$), niet significant verschillend waren. Omdat er geen sprake was van significantie, is geen post-hoc test uitgevoerd.



De oranje omljnde staven geven aan welke B₁₂ categorie de grootste mate van klachten rapporteerde.

* Significant verschil in pre-interventie beoordeling van betreffende klachtencategorie tussen de drie B₁₂ categorieën.



De oranje omljnde staven geven aan welke B₁₂ categorie de grootste mate van klachten rapporteerde

* Significant verschil in post-interventie beoordeling van betreffende klachtencategorie tussen de drie B₁₂ categorieën.

TABEL 10. Gemiddeld beoordelingsverschil per klachtencategorie, uitgesplitst naar B12 categorie.

VRAGEN	CATEGORIE 1 B12 < 150 (n=30)	CATEGORIE 2 B12 150 – 221 (n=54)	CATEGORIE 3 B12 > 221 (n=70)	
Gemiddeld puntenverschil vraag 1 – 29	P=0.012 ^a (S)	P=0.011 ^a (S)	P=0.001 ^a (S)	P = 0.847^b
Gemiddeld beoordelingsverschil pre- en post-interventie neurologie	0,55 punten P = 0.002 ^a (S)	0,43 punten P = 0.007 ^a (S)	0,50 punten P = 0.002 ^a (S)	P = 0.836^b
Gemiddeld beoordelingsverschil pre- en post-interventie psychologie	0,39 punten P = 0.010 ^a (S)	0,36 punten P = 0.017 ^a (S)	0,38 punten P = 0.000 ^a (S)	P = 0.987^b
Gemiddeld beoordelingsverschil pre- en post-interventie hart- en vaat	0,43 punten P = 0.025 ^a (S)	0,29 punten P = 0.070 ^a (NS)	0,31 punten P = 0.002 ^a (S)	P = 0.771^b
Gemiddeld beoordelingsverschil pre- en post-interventie bewegingsapparaat	0,33 punten P = 0.001 ^a (S)	0,33 punten P = 0.085 ^a (NS)	0,57 punten P = 0.000 ^a (S)	P = 0.353^b
Gemiddeld beoordelingsverschil pre- en post-interventie verteringsstelsel	0,25 punten P = 0.137 ^a (NS)	0,19 punten P = 0.084 ^a (NS)	0,34 punten P = 0.000 ^a (S)	P = 0.421^b
Gemiddeld beoordelingsverschil pre- en post-interventie overig	0,31 punten P = 0.060 ^a (NS)	0,30 punten P = 0.025 ^a (S)	0,40 punten P = 0.000 ^a (S)	P = 0.759^b

^a Paired student T Test; ^b ANOVA

4 | QUALITY OF LIFE QUESTIONNAIRE VOOR EN NA INTERVENTIE

Pre-interventie werd de kwaliteit van leven met gemiddeld 3,88punten beoordeeld. Post-interventie met 4,62 punten. Het gemiddelde beoordelingsverschil bedroeg -0,74 punten en was significant ($P=0.000$, zie tabel 11). Uitgesplitst naar B₁₂ categorie, bedroeg het gemiddelde puntenverschil pre- en post-interventie van patiënten uit de categorie 1 (n=30) -0,61 punten ($P=0.075$). Het gemiddelde puntenverschil van patiënten uit categorie 2 (n=54) bedroeg -0,70 punten ($P=0.003$). Het gemiddelde puntenverschil van patiënten uit categorie 3 (n=70) bedroeg -0,82 punten ($P=0.000$). Pre-interventie werd er geen significant beoordelingsverschil gevonden tussen de drie B₁₂ categorieën ($P=0.506$), post-interventie lag het beoordelingsverschil rond de arbitraire grenswaarde van significantie ($P=0.057$). Het verschil tussen de drie B₁₂ categorieën, in gemiddeld puntenverschil, bleek niet significant ($P=0.824$). Omdat er geen sprake was van significantie, is er geen post-hoc test uitgevoerd. Voor een overzicht, zie tabel 12 en grafiek 5.

TABEL 11. Vergelijking van de kwaliteit van leven pre- en post-interventie

QOLQ	GEM. AANTAL PUNTEN PRE- INTERVENTIE	GEM. AANTAL PUNTEN POST- INTERVENTIE	GEMIDDELD PUNTEN- VERSCHIL	95% - BI	SIGNIFICANTIE (TWEEZIJDIG)
Totaal (n=154)	3,88 (1,34) punten	4,62 (1,08) punten	-0,74 punten	-0,99 – -0,48	P = 0.000^a

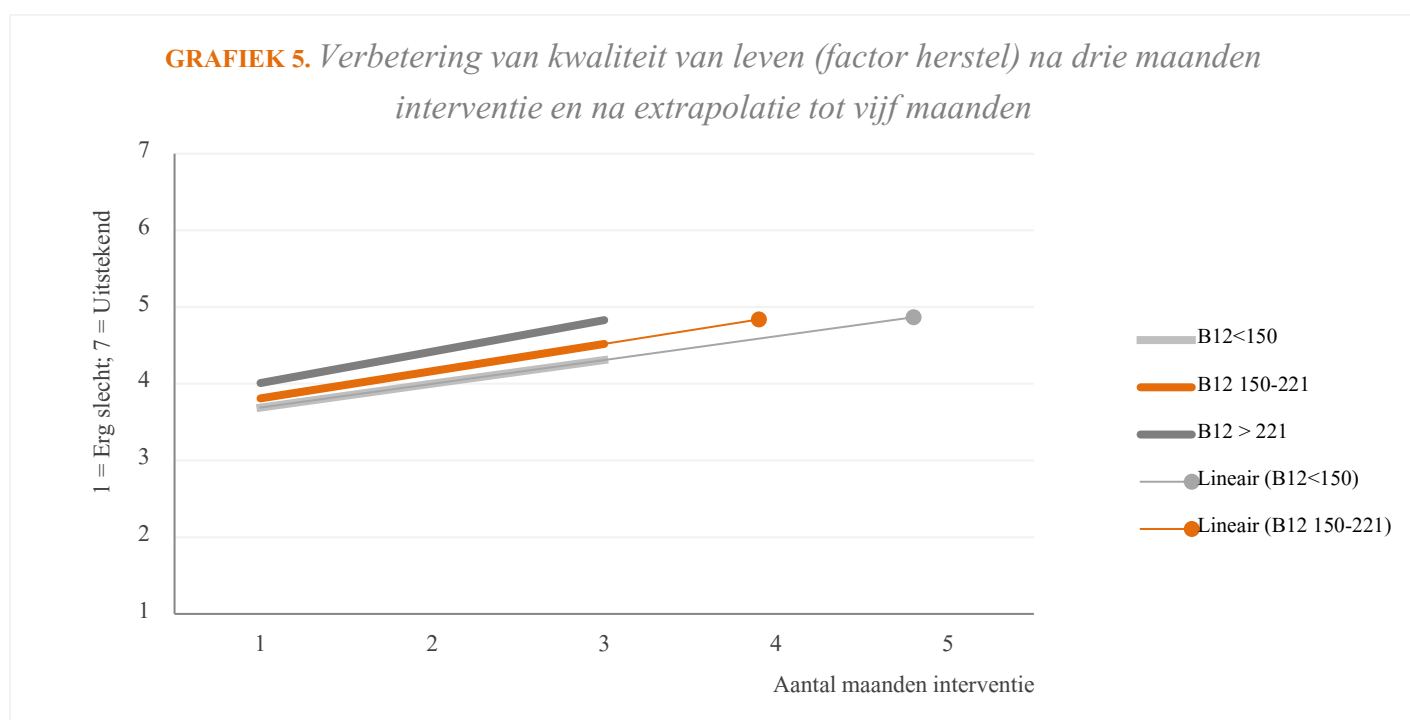
^a Paired Student T Test

TABEL 12. Vergelijking van de kwaliteit van leven pre- en post-interventie, uitgesplitst naar vitamine B12 categorieën $B_{12} < 150$; $B_{12} 150 - 221$; $B_{12} > 221$

QOLQ	GEM. AANTAL PUNTEN PRE-INTERVENTIE	GEM. AANTAL PUNTEN POST-INTERVENTIE	GEMIDDELD PUNTEN-VERSCHIL	95% - BI	SIGNIFICANTIE (TWEEZIJDIG)
Categorie 1 $B_{12} < 150$	3,69 (1,63) punten	4,31 (1,11) punten	-0,61 punten	-1,29 – 0,07	$P = 0.075^d$
Categorie 2 $B_{12} 150-221$	3,81 (1,30) punten	4,52 (1,22) punten	-0,70 punten	-1,16 – -0,24	$P = 0.003^d$
Categorie 3 $B_{12} > 221$	4,01 (1,25) punten	4,83 (0,92) punten	-0,82 punten	-1,18 – -0,47	$P = 0.000^d$
Significantie (tweezijdig)	$P = 0.506^a$	$P = 0.057^{b,c}$	$P = 0.824^a$	-	-

^a ANOVA analyse; ^b Welch ANOVA analyse; ^c Post Hoc Games Howell analyse; ^d Paired Student T Test

GRAFIEK 5. Verbetering van kwaliteit van leven (factor herstel) na drie maanden interventie en na extrapolatie tot vijf maanden



DISCUSSIE

1. ONDERZOEK

1.1 | *Onderzoeksopzet*

Een beperking van de onderzoeksopzet, was het niet dubbelblind gerandomiseerde design. Daarnaast was de onderzoekspopulatie niet voldoende maatschappelijk representatief voor wat betreft verdeling van geslacht en verdeling van leeftijd. Echter, dit onderzoek had niet tot doel een afspiegeling te vormen van de Nederlandse bevolking, maar van de patiëntenpopulatie in een huisartsenpraktijk met klachten indicatief voor een B12 deficiëntie al dan niet met een lage tot laag-normale B12 status. Desalniettemin, is selectiebias ontstaan door patiënten met andere aandoeningen te excluderen van onderzoek. Dit exclusie criterium is echter opgesteld, om te voorkomen dat de mate van klachten of kwaliteit van leven beïnvloed zou worden door andere aandoeningen.

1.2 | *Dataverzameling*

De dataverzameling was over het geheel vrij beperkt. Met de huidig beschikbare MMA, Hcy en Holo-TC bepaling, had er nauwkeuriger onderscheid gemaakt kunnen worden tussen de verschillende niveaus van vitamine B12 deficiëntie. Bovendien is de gebruikte meetmethode niet erg specifiek noch sensitief. Echter, aangevuld met de parameters foliumzuur en MCV is geprobeerd een vollediger beeld te verkrijgen van de vitamine B₁₂ status. De digitale symptomenvragenlijst, met daarin de door de patiënt beoordeelde mate van aanwezigheid van klachten, heeft mogelijk tot informatiebias geleid. De symptomenvragenlijst had daarom beter in interview vorm afgenomen kunnen in combinatie met lichamelijk onderzoek. Getracht is wel de invloed van mogelijke andere aandoeningen op de mate van klachten en kwaliteit van leven te elimineren. Het corrigeren van eventuele informatiebias was niet goed mogelijk doordat de grote van de eventuele meetfout onbekend was. Tot slot had de Quality of Life Questionnaire uitgebreider gekund. Ook hier is mogelijk sprake geweest van informatiebias.

1.3 | *Statistische analyses*

Het onderzoeksdesign heeft verplicht tot de Paired T-test in een aantal statistische analyses. T-testen kunnen als statistisch minder sterk worden beschouwd omdat zij slechts rekening houden met het verschil tussen twee gemiddeldes. Om de *P*-waarden uit de Paired T-tests kracht bij te zetten, zijn deze aangevuld met het 95%-BI en zijn de gemiddeldes aangevuld met de standaarddeviatie. Een tweede statistische beperking van dit onderzoek werd gevonden in de gebruikte ANOVA analyse. Een aantal analyses voldeed niet aan de aanname van gelijke varianties, waardoor noodzakelijkerwijs gebruik is gemaakt van de Welch ANOVA analyse.

2. INTERPRETATIE ONDERZOEKSRESULTATEN

2.1 | *Hematologische parameters*

De gemiddelde cobalamine concentraties, zowel pre- als post-interventie, verschilden statistisch significant tussen mannen en vrouwen. Hoewel statistisch niet significant ($P=0.09$), rapporteerden andere onderzoeken een vergelijkbaar verschil.^{101,102} Een mogelijke verklaring berust op het relatief kleine aandeel mannen in de onderzoekspopulatie. Daarnaast zou de persoonlijke indicatie om een arts te raadplegen verschillend kunnen zijn tussen mannen en vrouwen. Daardoor kan de urgentie van de gezondheidssituatie op het moment van raadplegen verschillend zijn en resulteren in selectiebias. Het percentage patiënten met een macrocytose betrof slechts 2,6% ($n=4$). Onderzoek naar de klinische relevantie van een B₁₂ deficiëntie in de afwezigheid van anemie heeft aangetoond dat macrocytose geen criterium is voor een B₁₂ deficiëntie.^{14,15} Het waargenomen herstel van de hematologische parameters tot binnen de referentiewaarden lag in de lijn der verwachting en kwam overeen met eerder gedaan onderzoek.²¹ Dit herstel was statistisch significant voor de parameters totaal vitamine B₁₂ en foliumzuur, echter niet voor MCV. Het eerder gerapporteerde kleine percentage patiënten met macrocytose verklaart dit niet significante verschil.

2.2 | De symptomenvragenlijst

Er werd een statistisch significant beoordelingsverschil gevonden tussen de pre-interventie en post-interventie beoordeling (n=154) van de gehele symptomenvragenlijst ($P = 0.000$). Dit resultaat was in lijn met de verwachtingen, maar slechts een klein aantal onderzoeken rapporteerde eerder een verbetering van (bepaalde) aan B₁₂ deficiëntie gerelateerde symptomen na interventie met intramusculaire B₁₂ therapie^{7,21,103,104}. Ook uitgesplitst naar B₁₂ waarde, werd voor B₁₂ categorie 1, 2 en 3 een statistisch significant verschil gevonden tussen de pre-interventie en post-interventie beoordeling. Voor zover bekend, zijn er geen eerdere onderzoeken gedaan naar de relatie tussen de B₁₂ waarde en de effectiviteit van intramusculaire behandeling op klinische symptomen. Deze resultaten tonen aan dat patiënten met klinische symptomen, maar een laag-normale tot normale B₁₂ status, een statistisch significante verbetering van symptomen rapporteren na behandeling en baadt hebben bij vitamine B₁₂ suppletie. Tussen de drie B₁₂ categorieën, bleek het pre-interventie/post-interventie beoordelingsverschil, onvoldoende groot om statistisch significant verschillend te zijn ($P=0.847$). Dit suggereert dat de mate van herstel tussen de drie B₁₂ categorieën, redelijk gelijk is. Grafiek 1 ondersteunt deze suggestie visueel, waarin de hellingsgraad van de drie lineaire lijnen vrijwel overeenkomt. Daarmee lijkt B₁₂ behandeling een bepaalde standaard mate van herstel van symptomen teweeg te brengen, die min of meer onafhankelijk is van de B₁₂-uitgangswaarde. Echter, wel werd de trend waargenomen dat patiënten uit de laagste B₁₂ categorie, het hoogst scoorden voor de mate van klachten en patiënten uit de hoogste B₁₂ categorie, het laagst scoorden voor de mate van klachten. Dit impliceert dat de ernst van klachten wel afhankelijk is van de B₁₂-uitgangswaarde: naarmate de B₁₂ status lager is, zijn de klachten heviger. Deze waargenomen trend in ernst van klachten en B₁₂-uitgangswaarde bleek niet statistisch significant in de pre-interventie vragenlijst ($P=0.199$) maar wel statistisch significant in de post-interventie vragenlijst ($P=0.019$). Daaruit volgt de suggestie, dat er langer intramusculair behandeld moet worden bij een lagere B₁₂ status, om hetzelfde niveau van herstel te bereiken als een patiënten met een hogere B₁₂-uitgangswaarde. Grafiek 1 toonde een extrapolatie waarbij patiënten uit categorie B₁₂ 150 – 221 pmol/L gemiddeld na vier maanden en patiënten uit categorie B₁₂ < 150 gemiddeld na vijf maanden op hetzelfde niveau van herstel zijn als patiënten uit de categorie B₁₂ > 221 pmol/L.

Opgedeeld in klachtencategorieën, werd voor alle categorieën (neurologie, psychologie, hart- en vaat, bewegingsapparaat, verteringsstelsel en overig) een statistisch significant beoordelingsverschil gevonden tussen de pre-interventie en post-interventie beoordeling (n=154). In de categorie neurologie werd de grootste mate van herstel waargenomen, overeenkomstig met andere onderzoeken waarin het neurologisch herstel vaak het meest evident is.^{105,106} Ook uitgesplitst naar de B₁₂ categorieën, werd gezien dat de afname van neurologische klachten het meest evident was ($P=0.002$; $P=0.007$; $P=0.002$). Echter, in de groep B₁₂ < 150 pmol/L (n=30) en de groep B₁₂ 150 – 221 (n=54) pmol/L werd in respectievelijk twee van de zes en drie van de zes klachtencategorieën geen statistisch significant beoordelingsverschil gevonden tussen de pre-interventie beoordeling en post-interventie beoordeling. Deze resultaten suggereren dat herstel van neurologische symptomen binnen drie maanden interventie en ongeacht de B₁₂-uitgangswaarde optreedt. Daarnaast suggereren deze resultaten dat of het behandelingseffect op elke klachtencategorie verschillend is per B₁₂ categorie, of dat herstel van elke klachtencategorie afhankelijk is van de therapieduur, waarbij herstel van het gehele klachtenspectrum, eerder wordt geboekt als de B₁₂-uitgangswaarde hoger is bij initiatie van therapie. Per klachtencategorie werd geen statistisch significant beoordelingsverschil gevonden tussen de drie B₁₂ categorieën, wat impliceert dat de mate van herstel en daarmee het effect van behandeling op alle klachtencategorieën, redelijk gelijk is voor de drie B₁₂ categorieën. Wederom lijkt hier te gelden: patiënten met een lagere B₁₂-uitgangswaarde moeten langer worden behandeld om hetzelfde niveau van herstel te bereiken als patiënten met een hogere B₁₂-uitgangswaarde.

2.3 | Quality of Life Questionnaire

Er werd een significant beoordelingsverschil gevonden tussen de pre-interventie en post-interventie beoordeling (n=154) van de QOLQ ($P=0.000$). Niet eerder werd een dergelijk resultaat gerapporteerd in een vergelijkend onderzoek. Zover bekend werd in 2003 één ander onderzoek gepubliceerd dat rapporteerde over de kwaliteit van leven bij vermeende B₁₂ patiënten. Deze patiënten werden geselecteerd, slechts op basis van een verhoogde MMA waarde. De patiënten werden drie maanden ofwel parenteraal behandeld met B₁₂ ofwel met placebo. De

onderzoekers concludeerden dat er een statistisch significant verschil was in algemene gezondheid tussen de onderzoeksgroep en de algemene bevolking. Er werd geen statistisch significant verschil gevonden in kwaliteit van leven tussen de behandelgroep en de placebogroep. Echter, er werd wel een statistisch significant verschil gevonden in subcategorie 'algemene gezondheid' tussen behandelingsgroep en placebogroep.¹⁰⁷

Uitgesplitst naar B₁₂ categorie, werden in categorie 2 en 3 een statistisch significant beoordelingsverschil gevonden tussen pre- en post-interventie (respectievelijk $P=0.003$ en $P=0.000$). In categorie 1 werd net geen statistisch significant beoordelingsverschil gevonden ($P=0.075$). Desondanks was het beoordelingsverschil niet statistisch significant verschillend tussen de drie B₁₂ categorieën ($P=0.824$). Dit suggereert dat de verbetering van kwaliteit van leven tussen de drie B₁₂ categorieën, redelijk gelijk is. Grafiek 5 ondersteunt deze suggestie visueel, waarin de hellingsgraad van de drie lineaire lijnen vrijwel overeenkomt. Opnieuw lijkt hier te gelden: patiënten met een lagere B₁₂-uitgangswaarde moeten langer worden behandeld om hetzelfde niveau van herstel te bereiken als patiënten met een hogere B₁₂-uitgangswaarde.

3. AANBEVELING VOOR VERVOLGONDERZOEK

Aanbevelingen voor vervolgonderzoek volgen hieronder puntsgewijs.

- Gerandomiseerd controle onderzoek (RCT) met een grotere studiepopulatie
- Frequenter meten van hematologische parameters in de eerste periode (meten na een week, twee weken, een maand, twee maanden en drie maanden).
- Langere onderzoeksduur, follow-up na 6 maanden, 9 maanden en een jaar.
- Patiënten met andere aandoeningen includeren in onderzoek en corrigeren voor deze variabele in statistische analyses.
- Uitgebreidere dataverzameling wat betreft hematologische parameters, QOLQ en klinische symptomen, aangevuld met lichamelijk onderzoek
- Dataverzameling van symptomen vragenlijst en QOLQ in interview vorm
- Aandacht besteden aan confounding en effectmodificatie

CONCLUSIE

Er werd een 90-dagen durend prospectief interventie onderzoek uitgevoerd naar de invloed van drie maanden behandeling met hydroxocobalamine op hematologische parameters, klinische verschijnselen en het algemene welbevinden van patiënten met een lage tot laag-normale vitamine B₁₂ waarde. Aanleiding voor het onderzoek vormde het toegenomen aantal patiënten dat zich presenteert met een scala aan zeer uiteenlopende klachten passend bij een vitamine B₁₂ deficiëntie, al dan niet in combinatie met een vastgestelde lage tot laag-normale vitamine B₁₂ waarde. Mede door de huidig geldende vitamine B₁₂ richtlijn, vallen veel patiënten tussen wal en schip, ze voelen zich niet gehoord en worden niet behandeld door de huisarts omdat de hematologische parameters ogenschijnlijk in orde zijn. Dit onderzoek heeft een licht willen schijnen op de klinische verschijnselen en kwaliteit van leven van patiënten met een lage tot laag-normale vitamine B₁₂ waarde. Dit onderzoek heeft willen aantonen dat de hematologische parameters ongeacht de B₁₂-uitgangswaarde significant stijgen na behandeling, maar dat de klinische verschijnselen bij ernstige deficiënties vaak langer blijven bestaan en dus adequatere zorg vereisen en langere behandeling.

Concluderend kan worden gesteld dat dit onderzoek bevestigt dat hematologische parameters van personen met een lage tot laag-normale vitamine B₁₂ waarde, significant verbeteren na behandeling met hydroxocobalamine. Daarnaast toont dit onderzoek aan dat behandeling met hydroxocobalamine effectief is in het verminderen van klinische verschijnselen, waarbij de mate van vermindering van verschijnselen of anders gezegd, de factor herstel, onafhankelijk is van de B₁₂-uitgangswaarde. Daaruit kan worden geconcludeerd dat het suppleren van patiënten met een marginale B₁₂ status of zelfs een normale B₁₂ status (B₁₂ > 221 pmol/L) en met aanwezigheid van symptomen, zinvol is. Het herstel van symptomen was het meest evident in de klachtencategorieën neurologie en psychologie, overeenkomstig met ander onderzoek. Tot slot werd de trend waargenomen dat de mate van klachten ernstiger was, naarmate de B₁₂ status lager was. Deze relatie was niet significant maar suggereerde wel dat het maximaal mogelijke herstel binnen drie maanden interventie afhankelijk was van de mate van klachten pre-interventie. Daaruit volgt de conclusie dat patiënten met een lagere B₁₂ status langer gesuppleerd moeten worden dan patiënten met een marginale of normale B₁₂ status.

Vervolgonderzoek moet uitwijzen of de dezelfde mate van statistisch significantie wordt bereikt in een placebo gecontroleerd studie-design. Daarnaast is vervolgonderzoek gewenst om de lange termijn effecten van eenmalige behandeling (tot herstel hematologische parameters) op het eventueel terugkeren of wegblijven van symptomen te bepalen.

APPENDICES

1 | Symptomenvragenlijst & QOLQ

Algemene gegevens	
lengte	
gewicht	
Kleur haar	
Kleur ogen	

Kruis aan welke vitamine B12 injecties u gebruikt	
Centafarm	
Nycomed	
anders	

Kruis aan hoe vaak u vitamine B12 injecties spuit					
2x per week	1x per week	1x per 2 weken	1x per 3 weken	1x per 4 weken	1x per __ weken

Vragenlijst	Helemaal niet	Een beetje	Nogal	Heel erg
1 Heeft u moeite met het doen van inspannende activiteiten zoals het dragen van een zware boodschappentas of huishoudelijk werk?				
2 Heeft u moeite met het maken van een lange wandeling?				
3 Heeft u moeite met het maken van een korte wandeling buitenshuis?				
4 Moet u overdag in bed of op een stoel blijven?				
5 Heeft u hulp nodig met eten, aankleden, uzelf wassen of naar het toilet gaan?				
Gedurende de afgelopen week				
	Helemaal niet	Een beetje	Nogal	Heel erg
6 Was u beperkt in het uitoefenen van uw hobby's of bij andere bezigheden die u in uw vrije tijd doet?				
7 Was u kortademig?				
8 Had u behoefte om te rusten?				
9 Heeft u moeite met slapen gehad?				
10 Heeft u zich slap gevoeld?				
11 Heeft u gebrek aan eetlust gehad?				
12 Heeft u zich misselijk gevoeld?				

Gedurende de afgelopen week	Helemaal niet	Een beetje	Nogal	Heel erg
13 Had u last van obstipatie? (was u verstopt?)				
14 Had u diarree?				
15 Was u moe?				
16 Voelde u zich prikkelbaar?				
17 Voelde u zich neerslachtig?				
18 Voelde u zich duizelig				
19 Heeft u last van kouwelijkheid				
20 Heeft uw lichamelijke toestand uw familielevens in de weg gestaan?				
21 Heeft uw lichamelijke toestand u belemmerd in uw sociale bezigheden?				
22 Heeft uw lichamelijke toestand financiële moeilijkheden met zich meegebracht?				
23 Heeft u pijn in de gewrichten gehad?				
24 Heeft u pijn in de spieren gehad?				
25 Heeft u last van tintelende handen of voeten of het gevoel op watten te lopen				
26 Kunt u moeilijk uit uw woorden komen?				
27 Maakt u zich zorgen om uw gezondheidstoestand?				
28 Voelt u zich emotioneel?				
29 Voelt u zich depressief?				

QOLQ

Wilt u bij de volgende vragen het getal tussen 1 en 7 omcirkelen dat het meest op u van toepassing is

1 Hoe zou u uw algemene gezondheid gedurende de afgelopen week beoordelen?

Erg slecht

uitstekend

1 2 3 4 5 6 7

2 Hoe zou u uw algemene conditie gedurende de afgelopen week beoordelen?

Erg slecht

uitstekend

1 2 3 4 5 6 7

3 Hoe zou u uw geheugen gedurende de afgelopen week beoordelen?

Erg slecht

uitstekend

1 2 3 4 5 6 7

4 Hoe zou u uw concentratie gedurende de afgelopen week beoordelen?

Erg slecht

uitstekend

1 2 3 4 5 6 7

5 Hoe zou u uw algemene "kwaliteit van leven" gedurende de afgelopen week beoordelen?

Erg slecht

uitstekend

1 2 3 4 5 6 7

35 Welke andere medicijnen gebruikt u op dit moment	Dosering
36 Heeft u bijwerkingen ondervonden van de injecties, Indien "ja", welke	Nee / ja

REFERENTIES

1. G. R. Minot, W.P. Murphy. Treatment of Pernicious Anemia by a special diet. *JAMA* 1926, 87:470-476
2. D.C. Hodgkin, J. Kamper, M. Mackay, J.W. Pickworth, K.N. Trueblood, J.G. White. Structure of vitamin B12. *Nature* 1956, 178:64–66.
3. T. Wiersma, H. Woutersen-Koch. NHG-Standpunt Diagnostiek van vitamine-B12-deficiëntie. *Huisarts en Wetenschap* 2014, 57(9):472-475
4. H.W. Moore, K. Folkers. Vitamin B12. In: W.H. Sebrell, R. S. Harris. *The Vitamins Chemistry, Physiology, Pathology, Methods*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1968. p. 119-212
5. H. Weissbach, R.T. Taylor. Metabolic Role of Vitamin B12. *Vitamins and Hormones* 1968, 28:395-412
6. R. Silver, C. F. Moldow. The biochemistry of vitamin B12 related reactions in men. *Am J of Med* 1970, 48(5):549-554
7. S.P. Stabler, R.H. Allen, D.G. Savage, J Lindenbaum. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990, 76:871-881
8. E. Andrès, N.H. Loukili, E. Noel, G. Kaltenbach, M.B. Abdelgheni, A.E. Perrin et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004, 171(3):251-259
9. L.R. Solomon. Disorders of cobalamin metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood reviews* 2007, 21(3):113-130
10. B. de Benoist. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food and nutrition bulletin* 2008, 29(2):S238-S244
11. M. Fenech, C. Aitken, J. Rinaldi. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 1998, 19(7):1163-1171
12. M. Fenech. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001, 475(1-2):57-67
13. A.D. Smith, H. Refsum. Editorial: Do we need to reconsider the desirable blood level of vitamin B12? *J of Int Med* 2012, 271(2):179-182
14. J. Lindenbaum, E.B. Healton, D.G. Savag, J.C. Brust, T.J. Garrett, E.R. Podell et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988, 318:1720–1728
15. R. Carmel. Pernicious Anemia: The Expected Findings of Very Low Serum Cobalamin Levels, Anemia, and Macrocytosis Are Often Lacking. *Arch Intern Med* 1988, 148(8):1712-1714
16. E. Valente, J.M. Scott, P-M. Ueland, C. Cunningham, M. Casey, A.M. Molloy. Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Methylmalonic Acid, Serum Cobalamin, and Other Indicators of Tissue Vitamin B12 Status in the Elderly. *Clinical chemistry* 2011, 57(6):856-863
17. A-M. Hvas, E. Nexø. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency. An update. *Haematologica* 2006, 91:1506-1512
18. S.G. Heil, R. de Jonge, M.C.F.J. de Rotte, M. van Wijnen, R.M.R Heiner-Fokkema, A.C Muller Kobold. Screening for metabolic vitamin B12 deficiency by holotranscobalamin in patients suspected of vitamin B12 deficiency: a multicentre study. *Ann. Clin. Biochem* 2012, 49(2):184-189
19. F.A. Lederle. Oral cobalamin for pernicious anemia. Medicine's best kept secret? *JAMA* 1991, 265(1):94-95
20. C.C Butler, J. Vidal-Alaball, R. Cannings-John, A. McCaddon, K. Hood, A. Papaioannou. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. *Family Practice* 2006, 23(3):279-285
21. A-M. Hvas, J. Ellegaard, E. Nexø. Vitamin B12 Treatment Normalizes Metabolic Markers But Has Limited Clinical Effect: A Randomized Placebo-controlled Study. *Clinical Chemistry* 2001, 47(8):1396–1404.
22. D. Savage, J. Lindenbaum. Relapses after interruption of cyanocobalamin therapy in patients with pernicious anemia. *The American Journal of Medicine* 1983, 74(5):765–772
23. W.J. Wiersinga, S.E.J.A. de Rooij, J.G.M. Huijmans, J.C. Fischer, J.B.L. Hoekstra. De diagnostiek van vitamine B12 deficiëntie herzien. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005, 149:2789-2794
24. R. Green. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. *Baillière's Clinical Haematology* 1995, 8(3):533-566
25. R. Carmel. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011, 94(1):348S-358S
26. E. Nexø, E. Hoffmann-Lucke. Holotranscobalamin, a marker of vitamine b12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011, 94(1):359-365
27. NHG werkgroep Anemie. NHG Standaard Anemie (eerste herziening). *Huisarts Wet* 2014, 57(10):528-536

28. B. Krautler, S. Ostermann. Structure, Reactions and Functions of B12 and B12 proteins. In: K.M. Kadisch, K.M. Smith, R. Guillard (eds.) *The porphyrin handbook*, volume 11, bioinorganic and bioorganic chemistry. San Diego:Academic Press; 2003. p: 229-269
29. . M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. Fatty Acid Metabolism. In: J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry*. 7th ed. New York: Palgrave MacMillan; 2011. p. 663-696
30. B. Kräutler, D. Arigoni, B.T. Golding, eds. *Vitamin B12 and b12 proteins*. Weinheim: John Wiley and Sons; 1998
31. M.J. Nielsen, M.R. Rasmussen, C.B.F. Andersen, E. Nexø, S. K. Moestrup. Vitamin B12 transport from food to the body's cells— a sophisticated, multistep pathway. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 2012, 9:345-354
32. B. Kräutler. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem Soc Trans* 2005, 33:806–810.
33. D.S. Froese, S. Healy, M. McDonald, G. Kochan, U. Opperman, F.H. Niesen et al. Thermolability of mutant MMACHC protein in the vitamin B12-responsive cblC disorder. *Mol Genet Metab* 2010, 100(1):29-36
34. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. Nucleotide biosynthesis. In: J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry*. 7th ed. New York: Palgrave MacMillan; 2011. p. 761-786
35. W. Herrmann, H. Schorr, K. Purschwitz, F. Rassoul, V. Richter. Total Homocysteine, Vitamin B12, and Total Antioxidant Status in Vegetarians. *Clinical Chemistry* 2001, 47(6):1094-1101
36. B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A.D. Johnson, J. Lewis, M. Raff et al. From DNA to Protein: How cells read the genome. In: B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A.D. Johnson, J. Lewis, M. Raff et al. *Essential Cell Biology*. 3th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2010. p. 231-268
37. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. The biosynthesis of aminoacids. In: J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry*. 7th ed. New York: Palgrave MacMillan. p. 729-760
38. S.C. Lu. S-Adenosylmethionine. *IJBCB* 2000, 32:391-395
39. T. Bottiglieri, K.Hyland, E.H. Reynolds. The clinical potential of ademetionine (S-adenosylmethionine) in neurological disorders. *Drugs* 1994, 48(2):137-152
40. C. Wheatley. The Very Large Gorilla Sitting in the Room? Adenosylcobalamin is the Missing Link: its Radical and Tetrahydrobiopterin are the Principal in vivo Catalysts for Mammalian Nitric Oxide Synthases. *Hypotheses in the Life Sciences* 2012, 2(2):31-54
41. C.S. Birch, N.E. Brasch, A. McCaddon, J.H.H. Williams. A novel role for vitamin B12: cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 2009, 47:184-188
42. E. Suarez-Moreira, J. Yun, C.S. Birch, J.H.H. Williams, A. McCaddon, N.E. Brasch. Vitamin B12 and Redox Homeostasis: Cob(II)alamin Reacts with Superoxide at Rates Approaching Superoxide Dismutase (SOD). *J Am Chem Soc* 2009, 131(42):15078–15079
43. L.G. Rochelle, S.J. Morana, H. Kruzyna, M.A. Russel, D.E Wilcox, R.P. Smith. Interactions between hydroxycobalamin and nitric oxide (NO) – evidence for a redox reaction between NO and reduced cobalamin and reversible NO binding to oxidized cobalamin. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, 275(1):48-52
44. V.S. Sharma, R.B. Pilz, G.R. Boss, D. Magde. Reactions of Nitric Oxide with Vitamin B12 and Its Precursor, Cobinamide. *Biochemistry* 2003, 42:8900-8908
45. J.B. Weinberg, Y. Chen, N. Jiang, B.E. Beasley, J.C. Salerno, D.K. Ghosh. Inhibition of nitric oxide synthase by cobalamins and cobinamides. *Free Radic Biol Med* 2009, 46:1626-1632.
46. A. Pastore, D. Martinelli, F. Piemonte, G. Tozzi, S. Boenzi, G. Di Giovamberardino et al. Glutathione metabolism in cobalamin deficiency type C (cblC). *JIMD* 2014, 37(1):125-129
47. S. Kalra, R. Ahuja, E. Mutti, D. Veber, S. Seetharam, G. Scalabrino, B. Seetharam. Cobalamin-mediated regulation of transcobalamin receptor levels in rat organs. *Arch Biochem Biophys* 2007, 463:128–132
48. G. Scalabrino, M. Carpo, F. Bamonti, S. Pizzinelli, C. D'Avino, N. Bresolin et al. High Tumor Necrosis Factor- α in Levels in Cerebrospinal Fluid of Cobalamin-Deficient Patients. *Ann Neurol* 2004, 56:886–890.
49. G. Scalabrino, D. Veber, E. Mutti. Experimental and clinical evidence of the role of cytokines and growthfactors in the pathogenesis of acquired cobalamin deficient leukoneuropathy. *Brain Research Reviews* 2008, 59(1):42-54
50. T. Sakane, S. Takada, H. Tokani, T. Tsunematsu. Effects of Methyl-B12 on the in vitro immune functions of human T lymphocytes. *J Clin Immunol* 1982, 2:101-109
51. J. Tamura, K. Kubota, H. Murakami, M. Sawamura, T. Matsushima, T. Tamura Immunomodulation by vitamin B12: augmentation of CD8+ T lymphocytes and natural killer (NK) cell activity in vitamin B12-deficient patients by methyl-B12 treatment. *Clinical and Experimental Immunology* 1999, 116(1):28–32
52. M.A. Erkurt, I. Aydogdu, M. Dikilitaş, I. Kuku, E. Kaya, N. Bayraktar et al. Effects of cyanocobalmin on immunity in patients with pernicious anemia. *Med Princ ract* 2008, 17:131–135
53. D.C. Weinberg, P.A. Shugars, D.L. Sherman, A. Sauls, Fyfe. Cobalamin inhibitors of HIV integrase and integration of HIV1-DNA into cellular DNA. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1998, 246: 393–397
54. A.M. Almerico, M. Tutone, M. Ippolito, A. Lauria. Molecular Modelling and QSAR in the Discovery of HIV-1 Integrase Inhibitors. *Current Computer-Aided Drug Design* 2007, 3(3):214-233

55. A.M. Tang, N.M.H. Graham, R.K. Chandra, A.J. Saah. Low serum vitamin B12 concentrations are associated with faster human immunodeficiency type 1 (HIV-1) disease progression. *J Nutr* 1997. 127:345–351
56. C.J. Piyathilake, O.L. Henao, M. Macaluso, P.E. Cornwell, S. Meleth, D.C. Heimbürger et al. Folate is associated with the natural history of high-risk human papillomaviruses. *Cancer Res* 2004, 64:8788–8793
57. C.J. Piyathilake, M. Macaluso, I. Brill, E.E. Partridge, D.C. Heimbürger. Lower red blood cell folate enhances the HPV 16-associated risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition* 2007, 23:203–210
58. C.J. Piyathilake, M. Macaluso, R.D. Alvarez, W.C. Bell, D.C. Heimbürger, E.E. Partridge. Lower risk of cervical intraepithelial neoplasia in women with high plasma folate and sufficient vitamin B12 in the post-folic acid fortification era. *Cancer Prev Res* 2009, 2(7):658-664
59. D. Watkins, D.S. Rosenblatt. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2011, 157(1):33-44
60. R. Kozyraki, O. Cases. Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Ciochimie* 2013, 95:1002-1007
61. J.H. Martens, H. Barg, M.J. Warren, D. Jahn. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 58:275-285
62. R. Carmel. Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin Haematol* 1995, 8(3):639-55
63. E. Andres, B. Goichot, J-L. Schlienger. Food-cobalamin malabsorption: a usual cause of vitamin B12 deficiency. *Arch Intern Med* 2000, 160(3):2061-2067
64. E. Andres, S. Affenberger, S. Vinzio, J. Kurtz, E. Noel, G. Kaltenbach et al. Food-cobalamin malabsorption in elderly patients: clinical manifestations and treatment. *The American Journal of Medicine* 2005. 188(10):1154-1159
65. S.S. Gill, S.M.H. Alibhai, Vitamin B12 deficiency in the Elderly. *Geriatrics and Aging* 2003, 6(4):16-21
66. E. Andres, B. Goichot, A-E. Perrin, S. Vinzio, C. Demangeat, J-L. Schlienger. Sjogren's syndrome: a potential new aetiology of mild cobalamin deficiency. *Rheumatology* 2001, 40(10):1196-1197
67. R. Carmel. Mild transcobalamin I (haptocorrin) deficiency and low serum cobalamin concentrations. *Clinical Chemistry* 2003, 49(8):1367-1374
68. M.R. Baumgartner, B. Fowler. Chapter 13 Vitamin B12 disorders. In: N. Blau, M. Duran, K.M. Gibson, C. Dionisi-Vici, editors. *Physician's guide to the diagnosis, treatment and follow-up of inherited metabolic diseases*. Berlin: Springer-Verlag; 2014. p. 205-218
69. J.L. Gueant, M. Djalali, R. Aouadj, P. Gaucher, B. Monin, J.P. Nicolas. In vitro and in vivo evidences that the malabsorption of cobalamin is related to its binding on haptocorrin (R binder) in chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 1986, 44(2):265-277
70. M. Schwartz. Intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia. *Lancet* 1960, 2:1263–1267
71. J.C. Fyfe, M. Madsen, P. Højrup, E.I. Christensen, S.M. Tanner, A. de la Chapelle et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* 2004, 103:1573–1579.
72. F. Namour, G. Dobrovoljski, C. Chery, S. Audonnet, F. Feillet, W. Sperl et al. Luminal expression of cubilin is impaired in Imerslund-Grasbeck syndrome with compound AMN mutations in intron 3 and exon 7. *Haematologica* 2011, 96:1715–1719
73. F. Rutsch, . Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet* 2009, 41:234–239
74. R. Beedholm-Ebsen, K. van de Wetering, T. Hardlei, E. Nexø, P. Borst, S.K. Moestrup. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 2010, 115(8):1632-1639
75. N.P. Shah, C.M. Beech, A.C. Sturm S.M. Tanner. Investigation of the ABC transporter MRP1 in selected patients with presumed defects in vitamin B12 absorption. *Blood* 2011, 117:4397–4398
76. D.S. Froese, R. A. Gravel. Genetic disorders of vitamin B12 metabolism: eight complementation groups – eight genes. *Expert Rev Mol Med* 2010, 12:e37
77. E.V. Quadros, Y. Nakayama, J.M. Sequeira. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood* 2009, 113:186–192.
78. E.V. Quadros, S-C. Lai, Y. Nakayama, J.M. Sequeira, L. Hannibal, S. Wang et al. Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCbIR/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B₁₂. *Human Mutation* 2010, 31(8): 924–929
79. E. Andrès, J. Vidal-Alaball, L. Federici, N.H. Loukili, J. Zimmer, G. Kaltenbach. Clinical aspects of cobalamin deficiency in elderly patients. Epidemiology, causes, clinical manifestations, and treatment with special focus on oral cobalamin therapy. *European Journal of Internal Medicine* 2007, 18(6):456–462
80. D.M. Townsley, G.P. Rodgers. Deficiencies of vitamin B12 and folate. In: G.P. Rodgers, N.S. Young, editors. *The Bethesda handbook of Clinical Hematology* 3th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2013. p. 11-21
81. J.S. Risien Russel, F.E. Batten, J. Collier. Subacute combined degeneration of the spinal cord. *Brain* 1900, 23(1):39-110
82. J. Metz. Cobalamin deficiency and the pathogenesis of nervous system disease. *Annu Rev Nutr* 1992, 12:59-79
83. Surtees. Biochemical pathogenesis of subacute combined degeneration of the spinal cord and brain. *J Inher Metab Dis* 1993, 16:762-770

84. F.R. Buccellato, M. Miloso, M. Braga, G. Nicolini, A. Morabito, G. Pravettoni et al. Myelinolytic lesions in spinal cord of cobalamin-deficient rats are TNF- α mediated. *FASEB J* 1999, 13:297–304
85. G. Scalabrino, G. Nicolini, F.R. Buccellato, M. Peracchi, G. Tredici, A. Manfredi et al. Epidermal growth factor as a local mediator of the neurotrophic action of vitamin B12 (cobalamin) in the rat central nervous system. *FASEB J* 1999, 13:2083–2090
86. G. Scalabrino, M.M. Corsi, D. Veber, F.R. Buccellato, G. Pravettoni, A. Manfredi et al. Cobalamin (vitamin B12) positively regulates interleukin-6 levels in rat cerebrospinal fluid. *J. Neuroimmunol* 2002, 127:37–43
87. G. Scalabrino, E. Mutti, D. Veber, L. Aloe, M.M. Corsi, S. Galbiati et al. Increased spinal cord NGF levels in rats with cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Neurosci. Lett* 2006, 396:153–158
88. D. Veber, E. Mutti, E. Galmozzi, S. Cedrola, S. Galbiati, A. Morabito et al. Increased levels of the CD40:CD40 ligand dyad in the cerebrospinal fluid of rats with vitamin B12 (cobalamin)-deficient central neuropathy. *J Neuroimmunol* 2006, 176:24–33
89. G. Scalabrino. Cobalamin (vitamin B12) in subacute combined degeneration and beyond: traditional interpretations and novel theories. *Exp Neurol* 2005, 192:463–479
90. A.A Mangoni, S.H.D Jackson. Homocysteine and cardiovascular disease: Current evidence and future prospects. *The American Journal of Medicine* 2002, 112(7):556–565
91. A. Splaver, G.A. Lamas, C.H. Hennekens. Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. *American Heart Journal* 2004, 148(1):34–40
92. Stangl, C Gunther, A Jarrin, et al. Homocysteine inhibits TNF-alpha induced endothelial adhesion molecule expression and monocyte adhesion via nuclear factor-kappaB dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 280 (2001), pp. 1093–1100
93. H.E.R. Pontes, N.C. Neto, K.B. Ferreira, F.P Fonseca, G.M. Vallinoto, F.S.C Pontes et al. Oral manifestation of vitamin B12 deficiency. *JCDA* 2009, 75(7):533-537
94. J.S. Lehman, A.J. Bruce, R.S. Rogers. Atrophic Glossitis From Vitamin B12 Deficiency: A Case Misdiagnosed as Burning Mouth Disorder. *J Periodontol* 2006, 77(12):2090-2092
95. S.T. Kozlak, S.J. Walsh, R. V. Lalla. Reduced dietary intake of vitamin B12 and folate in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2010, 39(5):420–423
96. I. Volkov, I. Rudoy, T. Freud, G. Sardal, S. Naimer, R. Peleg et al. Effectiveness of Vitamin B12 in Treating Recurrent Aphthous Stomatitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *JABFM* 2009, 22(1):9-16
97. M. Okumus, E. Ceceli, F. Tuncay, S. Kocaoglu, N. Palulu, Z.R. Yorgancioglu. The relationship between serum trace elements, vitamin B12, folic acid and clinical parameters in patients with myofascial pain syndrome. *Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation* 2010, 23:187–191
98. T-B. Ahn, J-W. Cho, B. S. Jeon. Unusual neurological presentations of vitamin B12. *Eur J Neurol* 2004, 11(5):339-341.
99. M.R. Mantrana, C. Gauthier, K.M. Lafaye. Paralysis and pernicious anemia in a young woman. *J La State Med Soc* 2009, 161(4):228-232
100. Cobas e601/e602 module Folate III and Vitamin B12
101. R. Carmel, R. Green, D.W. Jacobsen, K. Rasmussen, M. Florea, C. Azen. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1999, 70:904–910
102. K.L. Tucker, S. Rich, I. Rosenberg, P. Jacques, G. Dallal, P.W.F. Wilson et al. Plasma vitamin B-12 concentrations relate to intake source in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr* 2000, 71:514–522
103. E. Andres et al. Food-cobalamin malabsorption in elderly patients: Clinical manifestations and treatment
104. S. Aaron. Clinical and laboratory features and response to treatment in patients presenting with vitamin B12 deficiency-related neurological syndromes. *Neurology India*. 2005. 53(1): 55-58
105. S, Senturk T. Oral Versus Intramuscular Cobalamin Treatment in Megaloblastic Anemia: A Single-Center, Prospective, Randomized, Open-Label Study. *Clinical Therapeutics* 2003, 25(12):3124–3134.
106. A.M. Kuzminski, E.J. Del Giacco, R.H. Allen, S.P. Stabler, J. Lindenbaum. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood* 1998, 92(4):1191–1198
107. Hvas AM1, Juul S, Nexø E, Ellegaard J. Vitamin B-12 treatment has limited effect on health-related quality of life among individuals with elevated plasma methylmalonic acid: a randomized placebo-controlled study. *J Intern Med*. 2003 Feb;253(2):146-52.