

EN EPIDEMIOLOGISK STUDIE AV KOSTHOLD OG ERNÆRING MED SPESELL VEKT PÅ FOLATSTATUS

BAKGRUNN

Fra 30-70% av alle kreftformer i den vestlige verden er forårsaket helt eller delvis av faktorer i vårt miljø - blant disse faktorene står matvarene og kostholdet sentralt, både direkte og ved at effekten av andre risikofaktorer kan modifiseres av kosthold. Blant viktige kostfaktorene er antakelig hovednæringsstoffer som fettstoffer, vitaminer og fiber. Viktige krefttyper forbundet med kosthold er kolorektal kreft, brystkreft og prostata. Med hensyn til forebygging av kreft via kosthold, ligger et stort potensialet antakelig i kolorektal kreft, der det har vært anslått at 90% av variasjonen i forekomst mellom ulike land skyldes kostholdet (1). Denne krefttypen har også vist en økning i Norge i løpet av de siste tiårene, med Hordaland fylke blant de med størst økning (2).

Ingen av de store befolkningsundersøkelsene i Norge (dvs. undersøkelser der en også har innsamlet informasjon om helse- og sykdomstilstand, helsevaner og livsstil, psykososiale og sosioøkonomiske forhold og livskvalitet) har samtidig inkludert et omfattende mål på kosthold. Det finnes derfor ikke gode data om kosthold og ernæring som kan relateres til generell helsetilstand i Norge. Det finnes heller ikke informasjon angående i hvilken grad barn og foreldre har samme spisevaner, og til slutt, kostholdet blant eldre er ikke godt kjent. Det er antakelig to hovedgrunner til at tidligere store befolkningsundersøkelser ikke har inkludert omfattende mål på kosthold og ernæring: 1) det har inntil nylig ikke eksistert et spørreskjema for norske forhold som kunne brukes på store befolkningsgrupper, og 2) kostholdsundersøkelser er kostbare.

Eksperimentelle, kliniske og epidemiologiske studier har funnet at lave folatnivåer er assosiert med celleforandringer og utvikling av kreft, spesielt kolorektal kreft (3). Folat er et vitamin som naturlig forekommer især i lever, frukt og grønnsaker, men som inaktiveres ved koking (4). Et lavt inntak av frukt og grønnsaker er også forbundet med forhøyet risiko for denne krefttypen, selv om de spesifikke ingrediensene som forårsaker redusert risiko ikke er kjent (5,6). Den beskyttende effekten av fiberholdig kost kan delvis skyldes at disse matvarene også vanligvis er folatrike. Et høyt alkoholinntak synes også å øke risikoen for kolorektal kreft, og denne effekten er spesielt sterk når kosten også inneholder lite folat (7).

En kreftfremkallende effekt av lav folatstatus skyldes muligens at folat er nødvendig for å omdanne homocystein til metionin. Ved metioninmangel blir DNA hypometylert, og dette kan i neste omgang endre ekspresjon av gener som er sentrale i regulering av cellevekst (8). Nivået av plasma homocystein er blant annet bestemt av folat og vitamin B12 status fordi disse to vitaminene inngår i den såkalte metioninsyntasereaksjonen der homocystein omsettes til metionin. Plasma homocystein er nå en anerkjent og klinisk anvendt markør for evalueringen av folatfunksjonen. Fordelen ved å bestemme plasma homocystein framfor serum folat eller blodfolat er flere. Homocystein stiger før personen utvikler symptomer på folat (eller B12) mangel og er derfor en meget sensitiv indikator på tidlig eller lavgradig folatmangel. En annen fordel er at homocystein også stiger i de tilfellene der forstyrret folatmetabolisme skyldes legemidler eller defekte enzymer som inngår i folatomsetningen. Et eksempel på sistnevnte er nylig beskrevet der en mutasjon (677C->T) i begge allelene av metyltetrahydrofolatreduktase (MTHFR) fører til at enzymet blir termolabilt ved oppvarming *in vitro* (9). Personer som har den

termolabile varianten av MTHFR har ofte lett forhøyet plasma homocystein. Det er viktig å merke seg at termolabil MTHFR er vanlig. Vi har nylig funnet at nesten 10% av den voksne befolkningen i Hordaland har termolabil MTHFR (Guttormsen et al. upublisert). Personer med termolabil MTHFR er avhengig av et spesielt høyt inntak av folat for å kompensere den defekten de har i enzymet. Disse personene har derfor en stor risiko for å utvikle en funksjonell folatmangel der serum folat vanligvis kan være normalt mens plasma homocystein er forhøyet.

Homocystein kan også omsettes til cystein via to B6-avhengige reaksjoner. Hittil eksisterer det kun begrensede data om B6-mangel er forbundet med høyt plasma homocysteinnivå, men genetiske defekter i de to enzymene eller medikamenter som har B6 antagonistisk effekt fører til betydelig forhøyet plasma homocystein nivå.

Konklusjon

Sammenhengen mellom kosthold og de nye markørene for folatstatus har ikke vært bestemt i befolkningsundersøkelser. Interaksjonen mellom livsstil og genetik har hittil kun vært utført i små studier. Identifikasjon av grupper som har høyere risiko for kreft er viktig med hensyn til målrettet forebygging. Et lavt folatnivå er forholdsvis vanlig forekommende, og lett å forebygge.

FORMÅL

Med bakgrunn i at et ugunstig kosthold er en viktig risikofaktor for kolorektal kreft, og at vi vet lite om dette i Norge, spesielt med hensyn til folatmetabolismen, har det foreslåtte prosjektet to overordnede formål:

- 1) Kartlegging av kreftrelatert kosthold og ernæringsstatus blant en gruppe norske middelaldrende kvinner og menn, blant et utvalg av deres barn mellom 16 og 18 år, samt blant et utvalg av eldre (over 70 år). Dette vil gi svar på følgende spørsmål:
 - i. Hva er distribusjonen av kostholds- og ernæringsvariabler blant ulike grupper av befolkningen definert mht. alder, kjønn, helse og sykdom, trivsel, livsstil, sosioøkonomiske og demografiske forhold?
 - ii. Hva er samvariasjonen mellom kosthold, ernæring og folatstatus mellom foreldre og barn, og er denne variasjonen forskjellig blant ulike grupper av befolkningen definert spesielt mht. sosioøkonomiske og demografiske forhold?
- 2) Å bestemme assosiasjonen mellom kosthold og folatstatus (som mål på folatstatus bestemmes serum folat og homocystein). Dette vil gi svar på følgende spørsmål:
 - i. Hvilke faktorer i kostholdet påvirker folatstatus?
 - ii. Hvilke andre faktorer påvirker folatstatus inkludert serumnivå av vitaminene B12 og B6 og metylenetetrahydrofolatreduktase.

ORGANISASJON

Det foreslåtte prosjekt vil inngå som et delprosjekt i CONOR Hordaland. (CONOR = COhort of NORway). Et notat som beskriver bakgrunnen for CONOR er vedlagt. I hovedsak består CONOR av et kort spørreskjema samt opprettelse av en biobank. CONOR har hittil inngått som en del av Tromsøundersøkelsen, og inngår for tiden (07/95-07/97) som en del av Nord-Trøndelagsundersøkelsen, der Statens Helseundersøkelser (SHUS) står for gjennomføringen.

Som en del av deres fylkesvise screeningsundersøkelser, planlegger SHUS en ny runde i Hordaland fylke med start august 1997. Denne undersøkelsen, som er planlagt å ta to år, vil kalle inn alle i Hordaland som er 40-44 år gamle (fem årskull). CONOR vil inngå som en del av denne undersøkelsen. Ingen av de to tidligere CONOR-undersøkelsene inkluderte detaljert kartlegging av deltakernes kosthold. Flere ulike delprosjekt til CONOR Hordaland er nå underplanlegging, og data fra disse vil være tilgjengelig som tilleggsvariabler til det foreslåtte prosjektet.

METODER

Kosthold

Avdeling for kostholdsforskning ved Universitetet i Oslo har utviklet et kvantitativt spørreskjema for kostholdsregistrering basert på "diet history". Dette skjemaet er optisk lesbart og det har vært utviklet fra 1989. Det optisk lesbare skjemaet har vært validert i forhold til veiing og registrering av matinntaket, 48 timers recall eller biomarkører i ulike befolkningsgrupper inkludert eldre kvinner (10), polikliniske pasienter med atopisk eksem og psoriasis (11-13) og ungdommer i norsk skole (14,15). Skjemaet er validert i forhold til fettsyrer. Vi har funnet at det er en signifikant korrelasjon mellom det registrerte inntaket av de meget langkjedete omega-3 fettsyrene og de tilsvarende fettsyrer i plasma fosfolipider (16). Vi har også sammenlignet energiinntaket, beregnet ved det optisk lesbare kostskjema, med det som kan registreres ved å bruke den biologiske teknikken med dobbelt-merket vann. Disse data viser at skjemaet gir bedre overensstemmelse med energiinntaket målt ved dobbelt-merket vann enn det som oppnås ved veiing og registrering av matinntaket (11,14, Drevon CA, under bearbeidelse).

Skjemaet kartlegger deltakernes vanlige kosthold over en viss periode (vanligvis i løpet av det siste året). Som regel er det langvarige inntaket av næringsstoffer som strekker seg over mange år, det mest interessante i forbindelse med kroniske ikke-inflammatoriske sykdommer. Skjemaet inneholder spørsmål om inntak av 180 matvarer og det tar mellom 30 og 90 minutter å fylle det ut. Vi har i flere studier meget god oppslutning om utfyllingen (65-80%), avhengig av hvordan innsamlingen av skjemaene og motiveringen av deltakerne i studiene gjøres (se avsnittet om rekruttering nedenfor). På bakgrunn av de opplysninger vi får fra de utfylte skjemaene kan vi foreta en fullstendig næringsberegning. Dette gir oss derved mulighet til å sammenligne inntak av matvarer og næringsstoffer på individnivå i forhold til helse og sykdom.

Fordelen med det optisk lesbare skjemaet er at når det først er utviklet med de nødvendige standardiseringer, kan det brukes til store grupper av befolkningen til en rimelig pris. Med dagens teknologi vil prisen (selvkost) være kr. 100.- per kostanalyse per person.

Kvantitative registreringsskjema for kosthold har vært brukt i flere store undersøkelser angående sammenhengen mellom kosthold og kroniske sykdommer, inkludert cancer (17, 18). De er spesielt nyttige med hensyn til å sammenlikne diverse faktorer mellom grupper av befolkningen med høyt versus lavt inntak av visse næringsstoffer eller matvarer. Selv om de absolutte mengdene av enkelte næringsstoffer avhenger av hvor mange forskjellige matvarer spørreskjemaet omfatter, kan dette instrumentet også benyttes til å klassifisere deltakerne i kategorier med økende inntak av de enkelte næringsstoffene vi vil studere.

Biokjemiske målinger av folatstatus

Fordi folatnivået i serum og celler ikke nøyaktig reflekterer folatfunksjonen på det cellulære nivå, har andre markører for lavt folatnivå vært brukt. En slik markør på folatfunksjonen er plasma totalt homocystein (tHcy) (19). Intracellulær metabolisme av homocystein avhenger av folat og vitamin B12. Mangler, eller lave nivåer, av disse vitaminene inhiberer omsetning av homocystein til metionin, og homocysteinnivået i plasma stiger. Vi bestemmer homocystein i plasmaprøver ved hjelp av en helautomatisert HPLC-metode (20). Presisjonen til metoden er meget god (between-day variation < 3%), og laboratoriet har lang erfaring med denne analysen. En stor fordel er at samme laboratorium ble benyttet i alle analysene av blodprøvene som ble innsamlet i Hordalandsstudien i 1992/93. Folat, vitamin B6 og vitamin B12 vil bli utført ved rutinelaboratorier.

Allelefrekvensen av 677C->T mutasjonen i MTHFR bestemmes ved hjelp av kapillær elektroforese med laserindusert fluoresensdeteksjon. DNA blir isolert fra hvite blodceller, og den relevante del av DNA amplifiseres ved hjelp av PCR. I allelene der mutasjonen er til stede finnes det et restriksjonsete for enzymet HinF I, og dette benyttes for å skille mellom normal og mutert alleler for MTHFR (9,21).

Statistiske metoder

Resultatene fra studien vil analyseres med standard teknikker som multippel regresjon (gaussisk og logistisk), enveis variansanalyse (inkludert t-tester). Det vil legges vekt på å supplere parametriske med ikke-parametriske metoder i beskrivelsen av data (medianer, kvartiler) og for eksempel boksplott. Programvare som vil bli benyttet er SPSS for Windows og S-Plus.

Forsøksstørrelse

Kostholdsskjema på 3000 personer, 1000 i tre aldersgrupper. Biokjemiske markører for folatstatus på et utvalg på 300 i hver aldersgruppe, totalt 900.

Hoverformålet med studien er ikke å se på sammenhenger mellom risikofaktorer og forekomst av kreft, men på sammenhenger mellom risikofaktorer for kreft som kostinntak av f.eks. folat, biokjemiske markører og f.eks. andre karakteristika ved personene.

En viktig biokjemisk markør er total plasma homocystein (tHcy). Fra Hordalandsundersøkelsen 1992-93 vet vi at denne har en standard avvik på ca. 4 $\mu\text{mol/L}$ (22). Forskjeller mellom grupper

er klinisk og praktisk relevant fra ca. 1.5-2.0 $\mu\text{mol/L}$. Ved standard forsøksstørrelseformler (to-sidig signifikansnivå=0.05 og styrke 0.80) trengs det da henholdsvis 112 og 63 personer i hver av to like store grupper for å påvise en forskjell på 1.5 og 2 $\mu\text{mol/L}$ (23, side 198). Vi er derfor godt rustet til å studere forskjeller i tHcy også i mindre undergrupper av materialet.

For studier av korrelasjoner gir den foreslåtte studiestørrelsen anledning til å studere sammenhenger som er mindre enn de som er praktisk og klinisk relevant. For eksempel trengs det 193, 346, og 782, og 3137 personer for å kunne detektere korelasjoner på 0.20, 0.15, 0.10 og 0.05 med en to-sidig test ved signifikansnivå på 0.05 og med en styrke på 80 prosent (24, side 92).

Rekruttering

SHUS har sitt eget apparat som brukes til å identifisere og kalle inn potensielle deltakere til sine undersøkelser. Mens deltakerprosenten i disse prosjektene tidligere var imponerende høy, har den gått noe ned i de senere år. Vi er klar over dette i CONOR Hordaland, og vil derfor sette i verk en rekke tiltak med tanke på å gjøre interessen for prosjektet så stor som mulig. Prosjektansvarlig har utbredt erfaring med rekruttering av deltakere til store epidemiologiske prosjekter. Disse erfaringene er diskutert i et manuskript som nylig er blitt innsendt til the Journal of the American Geriatric Society. De fleste av disse erfaringene er direkte relevant for rekruttering til CONOR Hordaland. De inkluderer omtale av prosjektet i diverse media, opprettelse av et råd med representanter fra ulike lag av den befolkningen en vil nå, talskvinner og -menn som uttaler seg offentlig om prosjektet, utarbeidelse av informasjonsmateriale relevant for ulike lag av befolkningen, med videre. En meget viktig del er å overbevise målgruppen om at de vil få noe igjen for sin deltakelse. Deltakerprosenten vil bli monitorert jevnlig, og dersom den ikke er tilfredsstillende (minst 80%) vil spesielle tiltak bli iverksatt, i samarbeid med rådet.

Kostholdsskjemaet tar mellom 30-90 minutter å fylle ut. Det vil derfor være svært viktig at deltakerne motiveres godt, og at det fortrinnsvis fylles ut før deltakerne forlater helseundersøkelsen. Vi planlegger derfor å gjøre *en* medarbeider på helseundersøkelsen hovedansvarlig for denne delen av CONOR Hordaland. Informasjonsmateriale vil bli distribuert, og deltakerne vil få tilbakemelding angående deres kosthold, inkludert antall kalorier per dag, fettprosent osv.

FORDELEN MED Å FORETA DEN FORESLÅTTE KOSTHOLDSSTUDIEN SOM DEL AV CONOR HORDALAND

Som nevnt, planlegger SHUS en helseundersøkelse i Hordaland med start i august 1997. Det vil si at infrastrukturen med hensyn til identifikasjon, innkallelse og gjennomføring av en 'standard' helseundersøkelse er på plass. Denne infrastrukturen er derfor 'gratis' for delprosjektene, hvis ekstra datainnsamling imidlertid må være selvfinansiert. Muligheten til å legge et delprosjekt til denne infrastrukturen, medfører store kostnadsbesparinger for det enkelte delprosjekt, som ellers måtte finansiere hele apparatet i motsetning til bare en del.

I tillegg til en stor kostnadsbesparelse ved å knytte det foreslåtte prosjektet til CONOR

Hordaland, er det også en fordel at mange andre direkte relevante variabler vil bli inkludert i undersøkelsen, inkludert helsetilstand, livsstil, sosiodemografiske variabler, antropometri, yrke og helseadferd inkludert røyking og fysisk aktivitet. Dersom dette prosjektet skulle gjennomføres isolert, ville slike opplysninger enten måtte finansieres i tillegg, eller utelates.

FREMDRIFTSPLAN

SHUS planlegger start av Hordalandsundersøkelsen i august 1997, med varighet to år. Datainnsamlingen for delprosjektet beskrevet her vil begynne i august 1997, og avsluttes innen et år. Rekrutteringen av deltakerne vil foregå over et år. Prosjektsekretæren vil bli ansvarlig for rekruttering av deltakerne i alle tre aldersgruppene til dette delprosjektet, administrering av informert samtykke, administrering av kostholdsskjemaet, og forsendelse av blodprøver til Haukeland sykehus, m.v.. For å få samtykke fra 3000 personer, regner vi med å måtte henvende oss til over 3.500 (forventet deltakerprosent minst 80%), dvs. mellom 70 og 80 personer per uke.

De biokjemiske analysene vil starte høsten 1997 og fortsette i 1998. Alle datapunkter vil bli overført til Statens helseundersøkelser og analysefiler vil bli sendt til søkerne for analyser. Bearbeidingen av resultatene og skriving av artikler vil starte våren 1998 (preliminært).

ETISKE ASPEKTER VED PROSJEKTET

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

ANDRE SØKNADER RELATERT TIL KOSTHOLD I CONOR HORDALAND

I løpet av de siste årene har det blitt klart at flere av de kroniske sykdommene i vårt velstandssamfunn deler kostholds-relaterte risikofaktorer. Dette gjelder for eksempel et høyt inntak av fett og kolesterol som øker risikoen for både kreft og hjerte-karsykdommer og et lavt inntak av fiber og folater som øker risikoen for hjerte-karsykdom og kreft (7,17). Et annet eksempel er et høyt forbruk av alkohol som øker risikoen for kreft og osteoporose (17,25). Med denne bakgrunn vil vi derfor også søke andre instanser med tanke på å finansiere kostholdsdelen av CONOR Hordaland, for å innsamle data fra en større gruppe enn det vi mente var rimelig å inkludere i denne søknaden. Vi planlegger flere forskjellige søknader i år som hver vil finansiere innsamling av kostholdsdata fra noen tusen personer, slik at vi får en kartlagt kostholdet i en større kohorte av norske kvinner og menn som så kan følges prospektivt med tanke på kostholdets betydning for framtidig helse og sykdom.

REFERANSER

1. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1191-1398.
2. Helse- og levekårsatlas for Hordaland og Noreg. Norsk samfunnsvitenskapelig datatjeneste (NSD) 1996.
3. Christensen B. Folatmangel, kreft og medfødte misdannelser. Er det en sammenheng? *Tidsskr Nor*

- Lægeforen 1996;116:250-254.
4. Herbert V. Development of human folate deficiency. I: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory II JF, red. Folic acid metabolism in health and disease. New York: Wiley-Liss, 1989:195-210.
 5. Ferraroni M, LaVeccia C, D'Avanzo B, et al. Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 1994;70:1150-1155.
 6. Sandler RS, Lyles CM, Peipins LA, et al. Diet and risk of colorectal adenomas: macronutrients, cholesterol, and fiber. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:884-891.
 7. Giovannucci E, Willett WC. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 1994;26:443-452.
 8. Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects of DNA methylation and gene expression. *Cancer Res* 1992;52(suppl.):2071s-2077s.
 9. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 1995;56:1052-1059.
 10. Nes M, Andersen LF, Solvoll K, et al. Accuracy of a quantitative food frequency questionnaire in elderly Norwegian women. *Europ J Clin Nutr* 1992;46:809-821.
 11. Solvoll K, Lund-Larsen K, Søyland E, et al. A quantitative food frequency questionnaire evaluated in a group of dermatological outpatients. *Scand J Nutrition* 1993;37:150-155.
 12. Søyland E, Funk J, Rajka G, et al. Dietary supplement of n-3 fatty acids to patients with atopic dermatitis. A multi-center study. *Br J Dermatol* 1994;130:757-764.
 13. Søyland E, Funk J, Sandberg M, et al. Dietary supplementation of very long chain n-3 fatty acids do not improve the clinical condition of psoriasis. A double-blind multi-center study. *N Engl J Med* 1993;328:1812-1816.
 14. Andersen LF, Nes M, Lillegaard I-T, et al. Evaluation of a quantitative food frequency questionnaire used in a group of Norwegian adolescents. *Eur J Clin Nutr* 1995;49:543-554.
 15. Andersen LF, Nes M, Sandstad B, Bjørneboe G-E Aa & Drevon CA. Dietary intake among Norwegian adolescents. *Eur J Clin Nutr* 1995;49:555-564.
 16. Andersen LF, Solvoll K & Drevon CA. Evaluation of a quantitative food frequency questionnaire by plasma fatty acid pattern. Submitted.
 17. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, et al. Alcohol, low-methionine--low folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:265-273.
 18. Kearney J, Giovannucci E, Rimm EB, et al. Diet, alcohol, and smoking and the occurrence of hyperplastic polyps of the colon and rectum. *Cancer Causes Controls* 1995;6:45-56.
 19. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and clinical applications. *Clin chem* 1993;39:1764-1779.
 20. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine. Automated determination and sample stability. *Clin chem* 1993;39:263-271.
 21. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
 22. Nygård O, Vollset SE, Refsum H, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: the Hordaland homocysteine study. *JAMA* 1995;274:1526-1533.
 23. Armitage P, Berry G. *Statistical Methods in Medical Research*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
 24. Machin D, Campbell MJ. *Statistical Tables for the Design of Clinical Trials*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987.
 25. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiologic Reviews* 1985;7:178-208.