

Artikelen

¹H-NMR Spectroscopie in lichaamsvloeistoffen en leucocyten

R. A. WEVERS¹, U. ENGELKE¹, N. G. G. M. ABELING², R. A. de ABREU³, G. B. van den BERG⁴ en A. HEERSCHAP⁵

Met behulp van ¹H-NMR spectroscopie kan een overzicht verkregen worden van geprotoneerde verbindingen die in lichaamsvloeistoffen aanwezig zijn. Bij de diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten is dit een belangrijk voordeel ten opzichte van andere technieken. De monstervoorbereiding is eenvoudig en vereist geen derivatisering of extractie. In principe is iedere metaboliet zichtbaar in het NMR spectrum zodra de concentratie hoger is dan de detectielimiet (laag-micromolaire range). Bij het kwantificeren van diverse stoffen is aangetoond dat goede correlaties worden verkregen met conventionele technieken. NMR spectroscopie kan worden gebruikt om vele erfelijke stofwisselingsziekten te diagnostiseren middels meting in lichaamsvloeistoffen. Voorbeelden worden getoond van spectra van plasma, urine en CSF van een gezonde vrijwilliger en van vier patiënten met een stofwisselingsziekte. Ook in homogenaten van leucocyten kunnen spectra worden opgenomen. ATP kan naast vele andere metabolieten in deze spectra worden aangetoond.

Trefwoorden: ¹H-NMR spectroscopie; erfelijke ziekten; metabolisme

In vitro NMR spectroscopie heeft in klinisch chemische laboratoria nog nauwelijks toepassing gevonden. De hoge kosten van de benodigde apparatuur en infrastructuur vormen een belangrijke drempel. Een andere belangrijke oorzaak werd door Bock in een recent editorial in Clinical Chemistry fraai geformuleerd: "Medical NMR spectroscopy has not yet found a 'killer app' - an application so compelling that it causes wide adoption of the technology in clinical laboratories" (1). Voor wetenschappelijk onderzoek kan de techniek echter belangrijke nieuwe inzichten opleveren. Hieruit vloeiden op deelgebieden van de klinische chemie interessante bevindingen voort. Als voorbeeld kan het werk van Otvos et al dienen die lipoproteïneconcentraties en subspecies van lipoproteïnen met NMR spectroscopie meten (2). Binnen het

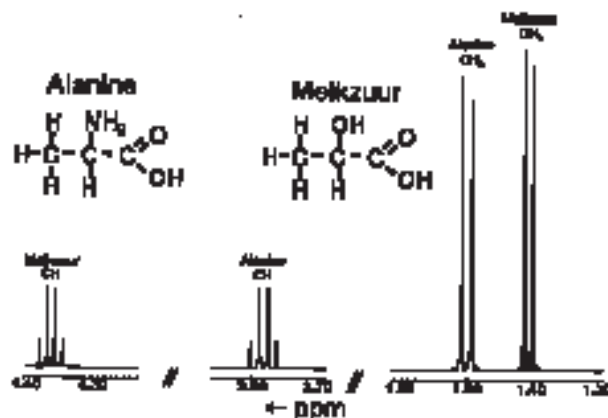
kader van het Klinisch Genetisch Centrum Nijmegen is de afgelopen jaren een start gemaakt met het bestuderen van de mogelijkheden van ¹H-NMR spectroscopie voor de diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten. Dit artikel geeft een indruk van wat de techniek in algemene zin vermag, geïllustreerd aan de hand van enkele voorbeelden uit het veld van erfelijke stofwisselingsziekten. Eerst zal een aantal facetten worden belicht die van belang zijn om een spectrum te registreren en vervolgens te interpreteren. Het is niet de bedoeling van dit artikel om voor de verschillende lichaamsvloeistoffen in detail aan te geven welke stoffen met ¹H-NMR spectroscopie gemeten kunnen worden. Goede overzichtsartikelen zijn voor geïnteresseerden beschikbaar voor serum en plasma (3,4), urine (5), liquor cerebrospinalis (CSF, 6,7) en vruchtwater (8) naast enkele overzichten van algemene aard (9,10).

Uit het spectrum af te leiden structuurinformatie over verbindingen

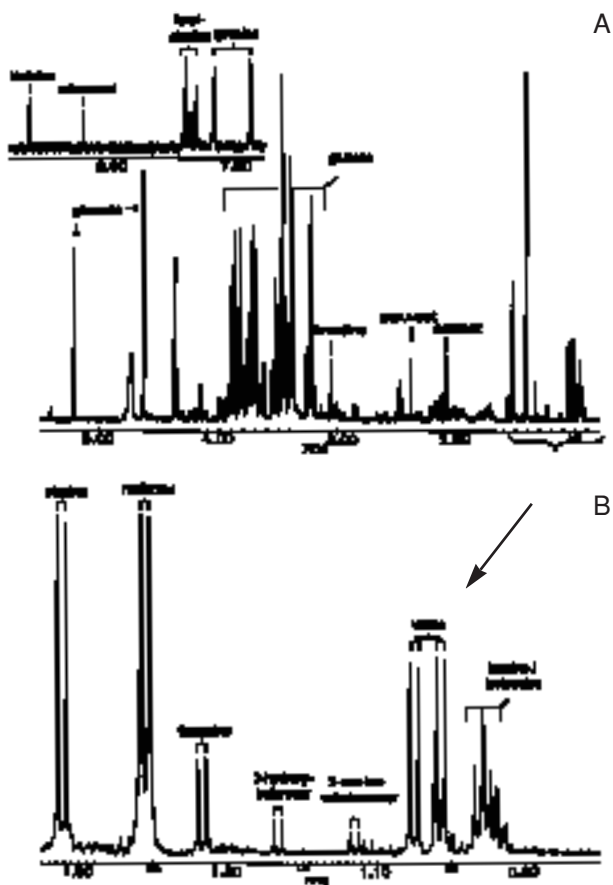
De protonen van een verbinding laten in het ¹H-NMR spectrum een karakteristieke vingerafdruk achter. Van melkzuur bij voorbeeld kunnen signalen voor zowel de methylgroep als de methyleen-groep in het spectrum worden teruggevonden. Het signaal van een proton kan onder invloed van zijn chemische omgeving bestaan uit één of meer pieken. We spreken van singlet-, doublet-, triplet-, kwartet- en multiplet resonanties. Door deze opsplitsingen en doordat niet equivalente protonen uit een molecuul in het spectrum verschillende signalen afgeven bevat een ¹H-NMR spectrum over ieder molecuul een zekere mate

Afdelingen Neurologie¹, Pediatrie³ en Radiologie⁵, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Afdeling Klinische Chemie, AMC Amsterdam², Klinisch Chemisch Laboratorium, De Hondsborg, Oisterwijk⁴

Correspondentie: Dr. R. A. Wevers, Laboratorium Kinderneeskunde en Neurologie, Sint Radboud Ziekenhuis, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.



Figuur 1. Het ¹H-NMR spectrum van melkzuur en alanine.



Figuur 2. 600 MHz ^1H -NMR spectrum van bloedplasma van een gezonde vrijwilliger (2x geconcentreerd) met een overzicht van de belangrijkste delen van het spectrum(A) en uitvergroting van een onderdeel van het spectrum(B).

van structuurinformatie. Zo splitst het signaal van de methylgroep van melkzuur op in tweeën (figuur 1: doublet op 1,41 ppm), terwijl het signaal van de methyleen-groep opsplijt in vier resonanties (figuur 1: kwartet op 4,36 ppm). Een eenvoudige vuistregel voor de opsplitsing van een signaal maakt gebruik van het aantal protonen op het naastliggende C-atom. Door hier één bij op te tellen wordt in vele gevallen de juiste signaalvorm gevonden. De methylgroep van melkzuur splitst dus op in een doublet doordat het naastliggende C-atom (de methyleen-groep) slechts één proton bevat. Evenzo splitst het signaal van het proton uit de methyleen-groep op in een kwartet omdat het naastliggende C-atom (de methylgroep) drie protonen bevat. Bij integreren van de oppervlakte onder deze resonanties blijkt dat de oppervlakten van het doublet en het kwartet zich verhouden als 3:1 omdat immers drie protonen bijdragen aan het signaal van de methylgroep tegenover één proton van de methyleen-groep. Aan de hand van het voorbeeld uit figuur 1 is de invloed van de chemische omgeving van een proton op de resonantiepositie in het spectrum duidelijk te maken. De doubletten afkomstig van de methylprotonen van melkzuur en alanine hebben een verschillende resonantiepositie. Het verschil in chemische omgeving van de methylgroepen in de beide moleculen (NH_2 groep versus OH groep) is verantwoordelijk voor een kleine verschuiving (0,10 ppm) in de resonantiepositie van de be-

treffende doubletten. Dit maakt dat de beide stoffen ondanks hun partiële structuurgelijkenis goed van elkaar te onderscheiden zijn in het spectrum.

Interpretatie van het spectrum

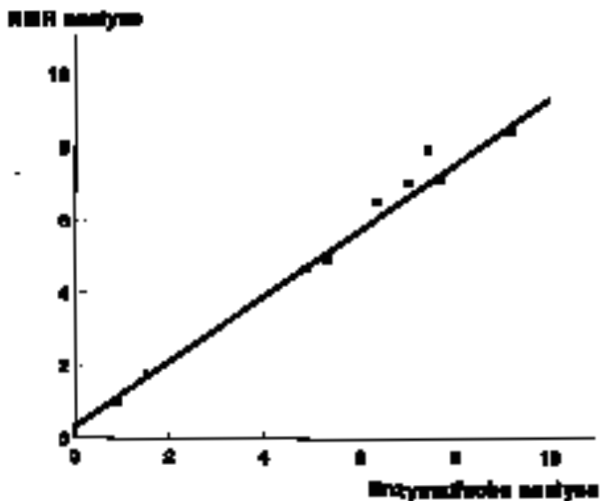
De ppm-schaal waarop de resonanties van een proton NMR spectrum worden weergegeven, de zogenaamde "chemical shift", loopt voor de meeste verbindingen van 0 tot 11. Figuur 2A toont de belangrijkste delen van het spectrum van een bloedplasmamonster van een gezonde vrijwilliger. In zo'n complexe matrix als bloedplasma, maar ook in urine, CSF of vruchtwater, zullen vele resonanties in het spectrum aanwezig zijn. Het gaat er vervolgens om de diverse verbindingen te kunnen herkennen. Een tweetal aspecten is hierbij van belang:

- verschillende resonanties van één verbinding kunnen bijdragen aan de identificatie van de stof. Zo is het doublet op 1,41 ppm van melkzuur afkomstig als op 4,36 ppm in de hierboven besproken verhouding ook het kwartet herkend kan worden
- de resonantiepositie van een verbinding is zeer goed reproduceerbaar, mits de pH en de temperatuur tijdens de meting nauwkeurig gestandaardiseerd zijn. Onder de gestandaardiseerde omstandigheden die in Nijmegen worden gebruikt (3) resonanceert het melkzuur doublet bij voorbeeld bij $1,409 \pm 0,003$ ppm.

Voor identificatie van een bepaalde resonantie is een lijst beschikbaar van resonantieposities van ongeveer 200 relevante verbindingen. Omdat in urine meer dan 200 verbindingen kunnen voorkomen is begrijpelijk dat in vrijwel alle ^1H -NMR studies over lichaamsvloeistoffen melding wordt gemaakt van een aantal tot op heden niet verklaarde resonanties in het spectrum. Ook medicatie en voeding kunnen verantwoordelijk zijn voor bepaalde resonanties in het spectrum. Bij de bewerking van het spectrum kan op een deel van het spectrum worden "ingezoemd" hetgeen voor het gebied tussen 0,80 en 1,55 ppm het beeld oplevert dat in figuur 2B is weergegeven. De diversiteit aan verbindingen die in monsters kan worden waargenomen is groot. In een recente studie aan 49 plasmamonsters konden wij 37 verbindingen onderscheiden terwijl nog 14 resonanties werden waargenomen in het spectrum die tot op heden niet geïdentificeerd zijn (3). In een studie aan 40 CSF monsters konden 48 verbindingen worden geïdentificeerd en resteerden 16 onbekenden (7). In dezelfde studie kon worden aangetoond dat de verbinding 3-hydroxyisovaleriaanzuur een normaal bestanddeel vormt van CSF-monsters. Tot op heden was dit nog onbekend (11). Zo kunnen met ^1H -NMR spectroscopie nieuwe inzichten worden verkregen die voortvloeien uit het totaaloverzicht van geprotoneerde verbindingen dat door de techniek in beeld wordt gebracht.

Kwantificering, gevoeligheid en reproduceerbaarheid

Absolute kwantificering van een metaboliet kan worden uitgevoerd door een interne standaard aan het monster toe te voegen. In bijna alle studies wordt hiervoor de singletresonantie van de 9 protonen van



Figuur 3. Correlatie tussen enzymatisch- en met NMR gemeten melkzuur concentratie (in mmol/l) in bloedplasma. Passing en Bablok (18) regressie analyse: $y = 0,90x$ (95% betrouwbaarheidsinterval 0,85 tot 1,09) + 0,27 (95% betrouwbaarheidsinterval -0,6 tot 0,5).

trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionzuur (=TSP) gebruikt. In de literatuur is veel discussie geweest of een betrouwbare kwantificering van metabolieten met $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie mogelijk is. Binding aan eiwit van ofwel de interne standaard (12) ofwel van de te meten verbinding (13,14) speelden hierbij vaak een rol. Door eiwit-binding kan het betreffende molecuul "NMR-onzichtbaar" worden. Ook de protonen uit de eiwitten zelf waren als storende factor zichtbaar in de spectra. Aanvankelijk werd de oplossing voor dergelijke problemen gezocht in NMR-technische richting (de spin-echo techniek). Later werd duidelijk dat onteiwitten de genoemde problemen doeltreffend kan ondervangen. Door deze simpele monstervoorbewerking is betrouwbare kwantificering mogelijk gebleken (3). Zelfs melkzuur waarvan oorspronkelijk in NMR-studies werd verondersteld dat het voor een belangrijk deel eiwitgebonden in bloed en CSF zou voorkomen kon op deze wijze worden gekwantificeerd (figuur 3). Van wezenlijke interesse is de gevoeligheid die met $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie kan worden gehaald. Veel hangt hierbij af van de sterkte van het magneetveld dat ter beschikking is. Recent werd het sterkste magneetveld dat voor dit doel in Nederland beschikbaar is in Utrecht in gebruik genomen (750 MHz). Helaas is het niet mogelijk om de gevoeligheidsgrens van de techniek met één getal aan te geven. Deze hangt namelijk voor ieder individueel molecuul onder meer af van het aantal protonen dat bijdraagt aan de betreffende resonantie(s) en eveneens van de mate van opsplitsing van de resonantie. Verder spelen nog de veldsterkte en de totale meettijd een rol. Onder de condities die in Nijmegen zijn gebruikt (600 MHz apparatuur en 30 minuten meettijd per monster) bij het onderzoek van patiënten met erfelijke stofwisselingsziekten ligt, bij wijze van voorbeeld, de gevoeligheid voor betaïne (singlet, 9 protonen) op 2 $\mu\text{mol/l}$, voor melkzuur (doublet, 3 protonen) op 10 $\mu\text{mol/l}$ en voor glucose (doublet, één proton) op 30 $\mu\text{mol/l}$. In 10 metingen werd voor de kwantificering van alanine als

variatiecoëfficiënt bij een concentratie van 1,2 mmol/l een waarde van 2,5% gevonden (alanine methyl groep: 1,50 ppm doublet).

MATERIAAL EN METHODEN

Infrastructuur

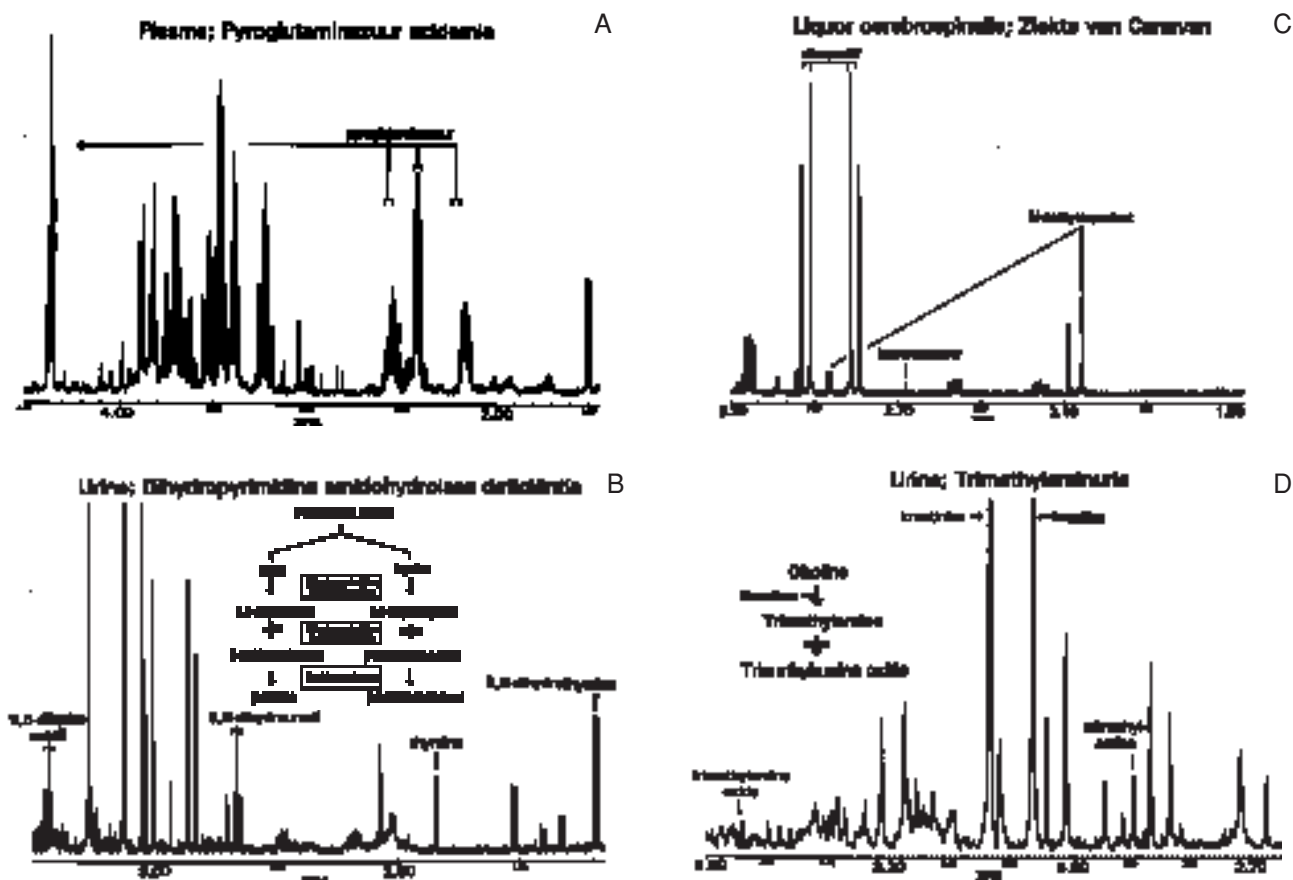
Ofschoon zeer afhankelijk van de magnetische veldsterkte is NMR apparatuur voor spectroscopische doeleinden duur in aanschaf en onderhoud. Recent bedroeg de kostprijs van een 600 MHz (14,1 Tesla) machine nog ongeveer 2,5 miljoen gulden. Een machine met een lagere veldsterkte is goedkoper en eenvoudiger in een laboratorium in te passen maar heeft natuurlijk wat minder mogelijkheden. In Nijmegen wordt gebruik gemaakt van de hoge resolutie NMR faciliteit, een landelijke faciliteit aanwezig op de afdeling biofysische chemie (Hoofd: Prof. Dr. C. W. Hilbers) opgezet met subsidiegelden van de SON (Scheikundig Onderzoek Nederland). Bediening van het apparaat is bij een analist met HLO analytische chemie als vooropleiding in goede handen. Het technisch onderhoud vereist de aanwezigheid van een fysisch technicus. Het laboratorium dat een dergelijk apparaat wil plaatsen moet rekening houden met een aanzienlijk ruimtebeslag niet alleen door de omvang van de apparatuur maar ook door het magnetisch veld om het apparaat.

Monstervoorbereiding

Met behulp van NMR spectroscopie is het mogelijk om zonder ingrijpende monstervoorbewerking een overzicht te krijgen van alle verbindingen in een monster die één of meer protonen bevatten mits de concentratie van de verbinding in het monster hoog genoeg is. Theoretisch kan het monster zelfs zonder enige voorbewerking gemeten worden. Hierdoor is vaak als voordeel van NMR spectroscopie gesteld dat de techniek potentieel niet destructief is, zodat het monster nadien nog voor andere bepalingen kan worden gebruikt. In praktijk echter is het bij analyse van lichaamsvloeistoffen zinvol om enkele eenvoudige monstervoorbereidingsstappen te doen (3). Het gaat hierbij met name voor plasmamonsters om onteiwiting over een 10 kD filter om storende signalen veroorzaakt door protonen in het eiwit te elimineren. Verder dient de pH gestandaardiseerd te worden. Door ons is voor de metingen een standaard pH van 2,50 gekozen. Tenslotte storen protonen van water het spectrum. De eenvoudigste manier om dit te verhelpen is door het H_2O te vervangen door D_2O . Indien gewenst kan bij deze stap van de monstervoorbewerking het monster nog in zekere mate geconcentreerd worden. $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie vereist geen voorafgaande derivatiserings- of extractiestap. Het uiteindelijke vloeistofvolume dat in de spectrometer wordt gebracht bedraagt ongeveer 0,5 ml.

Meting en de bewerking van de spectra

De meting zelf vereist per monster enige bijstelling van het magnetisch veld teneinde dit goed homogeen te krijgen (het "shimmen"). Automatische monstervisselaars en automatische shim-programma's begin-



Figuur 4. 600 MHz ^1H -NMR spectra van patiënten met erfelijke ziekten: A: 5-oxoprolinurie: bloedplasma; B: dihydropyrimidine amidohydrolyase deficiëntie: urine. De resonantie van uracil was in de urine aanwezig, maar is in het hier getoonde deel van het spectrum niet aanwezig; C: ziekte van Canavan of aspartoacylase deficiëntie: CSF; D: "fish odour" syndroom of trimethylaminurie: urine.

nen langzamerhand hun intrede te doen. De eigenlijke meting neemt ongeveer 30 minuten in beslag. Het gemeten signaal wordt door de computer geregistreerd en kan later met behulp van hiertoe speciaal ontworpen software pakketten nader geanalyseerd worden. De software die nodig is om een spectrum van een lichaamsvloeistof te interpreteren en te kwantificeren is nog niet uitontwikkeld tot het niveau van volledige automatisering. Per spectrum neemt de kwantificering van relevante metabolieten en de interpretatie per monster een half uur tot een uur in beslag.

RESULTATEN

Aan de hand van een viertal voorbeelden zal worden toegelicht welke informatie aan het ^1H -NMR spectrum kan worden ontleend. De voorbeelden zijn zo gekozen dat spectra ontleend aan verschillende lichaamsvloeistoffen kunnen worden getoond. Voor lezers die zich in individuele stofwisselingsziekten nader willen verdiepen zijn goede overzichtsartikelen beschikbaar (16,17).

Diagnostiek van erfelijke ziekten

Figuur 4A laat een spectrum zien van bloedplasma van een patiënt met 5-oxoprolinurie, ook wel pyroglutaminezuuracidurie genoemd. Bij dit enzymatische defect in de biosynthese van glutathion stapelt

zich het pyroglutaminezuur. Deze verbinding heeft een betrekkelijk ingewikkeld NMR spectrum zoals kan worden gedemonstreerd aan de hand van een waterige standaard (3). Toch is het niet moeilijk om in het spectrum alle resonanties van deze verbinding terug te vinden (multiplet resonanties bij 2,20, 2,43, 2,55 en 4,36 ppm). De concentratie pyroglutaminezuur met NMR vastgesteld bedroeg in dit plasma monster 3,5 mmol/l. Op vergelijkbare wijze is voor veel stofwisselingsziekten de diagnose te stellen met NMR spectroscopie.

Conclusies op basis van het overzicht over alle metabolieten in het NMR spectrum

Het doel van de biochemische basisscreening op erfelijke stofwisselingsziekten is om door meting van intermediären uit de stofwisseling een enzymdefect op te sporen. De exacte lokalisatie van zo'n defect is echter niet altijd even gemakkelijk vast te stellen. Soms is het noodzakelijk hiervoor een biopsie uit te voeren hetgeen, bijvoorbeeld voor enzymen die alleen in het centrale zenuwstelsel tot expressie komen, een probleem kan zijn. Dat de gevonden metabolietafwijkingen niet altijd uitsluitend geven over de exacte plaats van het enzymdefect wordt geïllustreerd door het voorbeeld van een éénjarig geretardeerd patiëntje met epilepsie en dysmorphe kenmerken. In het urineonderzoek bleek middels HPLC en GC-MS dat er sprake was van verhoogde concentraties van ura-

cil, thymine, 5,6-dihydrouracil en 5,6-dihydrothymine (concentraties van deze vier verbindingen met NMR spectroscopie gemeten lagen tussen 100 en 800 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinine; figuur 4B). β -Alanine en β -aminoisoboterzuur waren niet aantoonbaar in urine. Hierdoor kwam vast te staan dat patiënt een defect heeft in de afbraak van pyrimidines (figuur 4B). Uit de figuur blijkt dat het dus ofwel om een dihydropyrimidine amidohydrolase deficiëntie ofwel om een ureïdopropionase deficiëntie moest gaan. De β -ureïdo-verbindingen konden met standaardtechnieken als GC-MS of HPLC niet in lichaamsvloeistoffen worden bepaald. Het β -ureïdopropionzuur kon commercieel verkregen worden als standaard. Hierdoor werd het mogelijk om met NMR spectroscopie deze verbinding te kwantificeren in urine, bloed en CSF van de patiënt. De stof bleek niet detecteerbaar in de NMR spectra van deze lichaamsvloeistoffen zodat de concentratie ervan onder de detectiegrens ($<15 \mu\text{mol}/\text{l}$) moet zijn geweest. Er was dus geen sprake van stapeling van deze verbinding bij patiënt. Dit maakte waarschijnlijk dat het defect bij deze patiënt moet liggen op het niveau van het dihydropyrimidine amidohydrolase. Het opzetten van de enzymbepaling zal terzijner tijd de mogelijkheid bieden deze veronderstelling te bevestigen.

Een nieuw facet bij een bekende erfelijke ziekte

De ziekte van Canavan berust op een deficiëntie van het enzym aspartoacylase. Hierdoor stapelt zich het N-acetylaspartaat, het substraat van dit enzym. Het centrale zenuwstelsel is bij deze ziekte in belangrijke mate aangedaan. De diagnose wordt meestal gesteld op basis van de verhoogde concentratie van N-acetylaspartaat in diverse lichaamsvloeistoffen. Figuur 4C laat het CSF-NMR-spectrum zien van een patiënt met deze ziekte. Het gehalte aan N-acetylaspartaat bedroeg $384 \mu\text{mol}/\text{l}$ (referentierange $<5 \mu\text{mol}/\text{l}$). Daarnaast viel in het spectrum de hoge concentratie van citroenzuur ($2,4 \text{ mmol}/\text{l}$; referentierange $0,1-0,6 \text{ mmol}/\text{l}$) en barnsteenzuur ($42 \mu\text{mol}/\text{l}$; referentierange $<5 \mu\text{mol}/\text{l}$) op. Omdat de drie verbindingen die in verhoogde concentratie voorkomen di- of tricarbonzuren zijn was deze bevinding aanleiding te veronderstellen dat zij via een gemeenschappelijk mechanisme het CSF compartiment verlaten. Mogelijk loopt dit via een gemeenschappelijk transporteiwit voor di- of tricarbonzuren op het niveau van de plexus chorioideus. Tot op heden was daar alleen een transporteiwit voor monocarbonzuren bekend. Een dergelijk carriërmechanisme kan bij patiënten met de ziekte van Canavan verzadigd raken door het verhoogde aanbod aan N-acetylaspartaat, waardoor citroenzuur en barnsteenzuur onvoldoende getransporteerd kunnen worden. Tengevolge hiervan worden in de CSF verhoogde concentraties van de genoemde di- en tricarbonzuren gevonden. Vooralsnog wacht deze bevinding op bevestiging bij andere patiënten met de ziekte.

Nieuwe bepalmogelijkheden

Trimethylaminurie, ook wel "fish odour syndrome" genoemd, is een erfelijke ziekte berustend op een en-

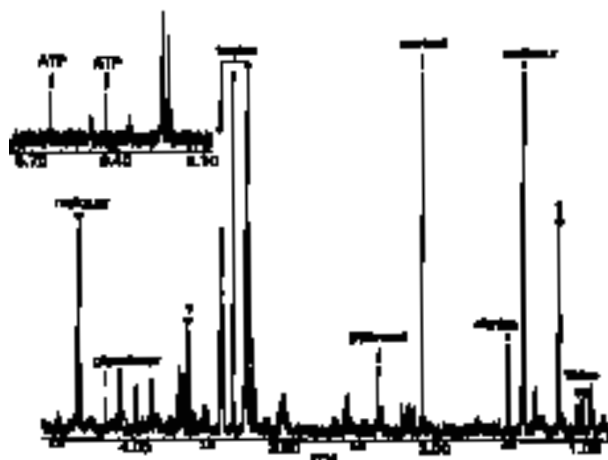
zymdefect in de lever. Trimethylamine ontstaat door bacteriële omzetting van onder meer choline afkomstig uit de voeding. Normaal is in de lever een enzym aanwezig dat trimethylamine (=TMA) efficiënt oxideert. TMA en trimethylamineoxide (=TMAO) worden beiden met de urine uitgescheiden. Omdat ons reukorgaan enorm gevoelig is voor de rotte vislucht van het TMA, terwijl het TMAO in veel mindere mate wordt opgemerkt, ontstaat voor de patiënt een sociaal probleem. Er was tot heden geen techniek beschikbaar om dit defect op metabolietniveau eenvoudig aan te tonen. Figuur 4D illustreert dat dit met NMR spectroscopie wel goed mogelijk is en laat duidelijk zien dat de resonantie van TMA (singlet bij $2,89 \text{ ppm}$) aanzienlijk hoger is dan de vrijwel afwezige resonantie van het TMAO (singlet bij $3,54 \text{ ppm}$). Uitgedrukt als ratio TMA/TMAO werd bij een patiënt in urine een waarde >10 (referentiewaarden $<0,05$) gevonden, hetgeen aangeeft dat bijna geen TMA wordt geoxideerd.

Metingen in leucocyten

Met ^1H -NMR spectroscopie kunnen ook metingen aan cellulaire systemen of homogenaten ervan worden uitgevoerd. Figuur 5 toont delen van een ^1H -NMR spectrum van een leucocytenhomogenaat van een gezonde vrijwilliger. Het metabole profiel is geheel anders dan in lichaamsvloeistoffen. Taurine als osmoregulator komt bijvoorbeeld in hoge concentratie voor. Resonanties van ATP, melkzuur en alanine zijn zichtbaar in het spectrum en deze stoffen kunnen gekwantificeerd worden. Dit verschaft belangrijke informatie over het energiegenererend systeem. Met name de meting van de ATP concentratie kan van belang zijn omdat tot op heden informatie over erfelijke aandoeningen in de ademhalingsketen slechts indirect uit de meting van melkzuur in plasma, urine of CSF kon worden verkregen.

DISCUSSIE

De hierboven gegeven voorbeelden illustreren dat NMR spectroscopie van lichaamsvloeistoffen waardevolle informatie kan opleveren op het terrein van de diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten.



Figuur 5. 600 MHz ^1H -NMR spectrum van een homogenaat van leucocyten van een gezonde vrijwilliger.

Het $^1\text{H-NMR}$ spectrum draagt structuurinformatie in zich van vele in het monster aanwezige verbindingen en terzelfdertijd kunnen ook kwantitatieve gegevens aan het spectrum worden ontleend. Vele van de ons bekende erfelijke stofwisselingsziekten kunnen met de techniek gediagnostiseerd worden. Dit lukt in feite in bijna alle gevallen waarin het voor het stellen van de diagnose relevante stofwisselingsproduct in micromolaire- of millimolaire concentratie in een lichaamsvloeistof voorkomt. Een belangrijk voordeel van NMR spectroscopie boven conventionele technieken die worden gebruikt bij de basisscreening op erfelijke ziekten is het niet-selectieve karakter van de techniek. Er wordt bij NMR spectroscopie geen gebruik gemaakt van derivatisering of extractie. Hierdoor ontstaat in het NMR-spectrum een totaaloverzicht van metabolieten die in de lichaamsvloeistof aanwezig zijn.

Voor een kinderarts of kinderneuroloog staat bij sommige patiënten vrijwel vast dat zij een erfelijke ziekte hebben, bijvoorbeeld doordat twee kinderen uit één gezin eenzelfde klinisch beeld hebben. In dergelijke gevallen wordt in de basisscreening op erfelijke ziekten, zoals die in Nederland wordt uitgevoerd door de laboratoria van de Klinisch Genetische Centra, bij een hoog percentage van deze patiënten (> 90%) geen diagnose gesteld. Voorzichtig geschat gaat het in Nijmegen om 50-100 patiënten op jaarbasis. Deze constatering was destijds drijfveer voor onze groep om met NMR spectroscopie te beginnen. Doel van het lopend onderzoek is om vast te stellen of NMR spectroscopie een rol kan spelen in de diagnostiek van ziektebeelden waarbij het met conventionele screenings-technieken nooit gelukt is om een diagnostische bijdrage te leveren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het feit dat met NMR spectroscopie een overzicht wordt verkregen van vrijwel alle geprotoneerde verbindingen die in het monster aanwezig zijn. Zo bevat het spectrum bijvoorbeeld een aantal resonanties van metabool belangrijke stoffen als betaïne en creatine die in de basisscreening op erfelijke ziekten nooit gemeten worden. Ook als door een nog onbekend defect, ergens in het metabolisme, zich een metaboliet in lichaamsvloeistoffen zou ophopen zullen resonanties van deze verbinding in het spectrum zichtbaar zijn. Voor dergelijke gevallen is het voor het identificeren van de verbinding van belang om over een zo breed mogelijk samengesteld scala van referentiespectra van zuivere verbindingen te beschikken. Ofschoon als techniek niet besproken in dit artikel kan twee dimensionale NMR spectroscopie nog een additioneel hulpmiddel zijn bij structuuropheldering van een onbekend metaboliet. Complicerende factor bij het beoordelen van de spectra is soms dat een medicament dat patiënt gebruikt ook in het spectrum zichtbaar is. Kennis van de gebruikte medicatie is dus voor een juiste interpretatie van belang en ook kennis van de NMR spectra van de meest gebruikte medicamenten of hun metabolieten is onmisbaar.

In het toekomstig onderzoek van de groep te Nijmegen zal worden gekeken of intracellulaire metabolietmetingen een verdere verfijning van de diagnostiek van erfelijke ziekten kunnen opleveren. In de basis-

screening op erfelijke ziekten wordt tot op heden nauwelijks gebruik gemaakt van intracellulaire metingen van metabolieten. Wel is bekend dat de intracellulaire concentratie van een verbinding bij enkele ziektebeelden evident afwijkend is (e.g. cystinosis (17)). Vele intracellulair voorkomende verbindingen, zoals b.v. gefosforyleerde verbindingen, zullen bij een intact celmembraan de cel niet kunnen verlaten. Daardoor komen ze dus niet of nauwelijks terecht in de lichaamsvloeistoffen waarin de screening op erfelijke ziekten van oudsher wordt uitgevoerd. Een erfelijk metabool defect in dergelijke delen van de stofwisseling zal hierdoor onopgemerkt kunnen blijven en er zal bij deze patiënten geen diagnose gesteld kunnen worden. Met behulp van $^1\text{H-NMR}$ zal het mogelijk zijn een overzicht te krijgen welke metabolieten in de cel voorkomen (kwalitatief) waarbij tevens de concentratie kan worden berekend (kwantitatief). Hierdoor kunnen erfelijke metabole ziekten worden opgespoord waarbij de intracellulaire metabolietconcentratie duidelijk afwijkend is. Het ligt voor de hand om als belangrijkste te bestuderen celtype de leucocyt te kiezen. In deze cellen komt een veelheid van eiwit- en enzymsystemen tot expressie en menige erfelijke ziekte kan middels enzym- of eiwitmetingen in dit celtype bevestigd worden. Een pilotstudie naar de technische haalbaarheid van dit type metingen heeft laten zien dat het mogelijk is om in een homogenaat van leucocyten verkregen uit één buisje bloed een $^1\text{H-NMR}$ spectrum op te nemen (figuur 5). Onze resultaten op dit punt zijn in overeenstemming met de studie van Sze et al (18). Omdat proton NMR spectroscopie zicht geeft op vrijwel alle geprotoneerde verbindingen vanaf de lage micromolaire range lijkt de techniek bij uitstek geschikt om de bijdrage die intracellulaire meting van metabolieten aan de diagnostiek van erfelijke stofwisselingsziekten zou kunnen leveren op de juiste waarde te schatten.

De auteurs bedanken Prof. Dr. C. W. Hilbers, Dr. S. S. Wijmenga, J. Joordens en G. Nachtegaal voor hun adviezen en ondersteuning bij het onderzoek en Prof. Dr. J. M. F. Trijbels voor het kritisch doorlezen van het manuscript. Ook willen wij de medewerkers van het Laboratorium voor Kindergeneeskunde en Neurologie (Hoofd: Prof. Dr. J. M. F. Trijbels) bedanken voor hun adviezen en voor het beschikbaar stellen van de monsters. Het werk werd mogelijk gemaakt door een subsidie van "Het fonds academische profilering Nijmegen".

Literatuur

1. Bock JL. NMR in clinical chemistry - where do we stand? Clin Chem 1994; 40: 1215-1217.
2. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single rapid measurement. Clin Chem 1992; 38: 1632-1638.
3. Wevers RA, Engelke U, Heerschap A. High-resolution $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy of blood plasma for metabolic studies. Clin Chem 1994; 40: 1245-1250.
4. Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon LC, Neild GH, Nicholson JK. 750 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy of human blood plasma. J Pharmaceut Biomed Anal 1993; 11: 267-276.
5. Lehnert W, Hunkler D. Possibilities of selective screening

- for inborn errors of metabolism using high-resolution ^1H -FT-NMR. *Eur J Pediatr* 1986; 145: 260-266.
6. Sweatman BC, Farrant RD, Holmes E, Ghauri FY, Nicholson JK, Lindon JC. 600 MHz ^1H -NMR spectroscopy of human cerebrospinal fluid: effect of sample manipulation and assignment of resonances. *J Pharmaceut Biomed Anal* 1993; 11: 651-664.
 7. Wevers RA, Engelke U, Wendel U, Gabreëls FJM, Heerschap A. A standardized method for high resolution ^1H -NMR spectroscopy of cerebrospinal fluid for neurometabolic diseases. *Clin Chem* 1994 (submitted).
 8. Bock JL. Metabolic profiling of amniotic fluid by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy: correlation with fetal maturation and other clinical variables. *Clin Chem* 1994; 40: 56-61.
 9. Nicholson JK, Wilson ID. High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog NMR Spectrosc* 1989; 21: 449-501.
 10. Bell JD, Brown JCC, Sadler PJ. NMR studies of body fluids [Review]. *NMR Biomed* 1989; 2: 246-256.
 11. Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D, Nyhan WL. Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 648-669.
 12. Kriat M, Confort-Gouny S, Vion-Dury J, Sciaky M, Viout P, Cozzone PJ. Quantitation of metabolites in human blood serum by proton magnetic resonance spectroscopy. A comparative study of the use of formate and TSP as concentration standards. *NMR Biomed* 1992; 5: 179-184.
 13. Bell JD, Brown JCC, Kubal G, Sadler PJ. NMR-invisible lactate in blood plasma. *FEBS Lett* 1988; 235: 81-86.
 14. Nicholson JK, Gartland KPR. ^1H -NMR studies on protein binding of histidine, tyrosine and phenylalanine in blood plasma. *NMR Biomed* 1989; 2: 77-82.
 15. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-720.
 16. Ayesh R, Mitchell SC, Zhang A, Smith RL. The fish odour syndrome: biochemical, familial and clinical aspects. *Br Med J* 1993; 307: 655-657.
 17. Scriver, Beaudet AL, Sly WS et al editors. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill 1989.
 18. Sze DY, Jardetzky O. Determination of metabolite and nucleotide concentrations in proliferating lymphocytes by ^1H -NMR of acid extracts. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1054: 181-197.

Summary

^1H -NMR spectroscopy in body fluids and leucocytes. Wevers RA, Engelke U, Abeling NGGM, Abreu RA de, Berg GB van den en Heerschap A. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 3-9.

^1H -NMR spectroscopy offers an overview of the majority of proton-containing metabolites in body fluids. For the diagnosis of inborn errors of metabolism this is an important advantage over conventional techniques that are used in the screening for these diseases. Sample pretreatment is simple and requires no derivatisation or extraction. Every metabolite present in a body fluid in amounts surpassing the detection limit will be visible in the spectrum. The sensitivity for various metabolites is in the low micromolar range. For several metabolites quantitative results correlated well with conventional techniques. NMR spectroscopy can be used for the diagnosis of inborn errors of metabolism in body fluids. Examples are shown for spectra of bloodplasma, urine and cerebrospinal fluid of a healthy volunteer and of four patients with an inborn error of metabolism. It is also possible to obtain spectra from homogenates of leucocytes. ATP and many other metabolites can be demonstrated in these spectra.

Key-words: ^1H -NMR spectroscopy; metabolic diseases; inborn errors of metabolism.

Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 9-13

Ontwikkelingen in het onderzoek van het ijzermetabolisme

J.P. van DIJK en H.G. van EIJK

De foetale ijzerbehoefte neemt gedurende de zwangerschap sterk toe. De placenta regelt het ijzertransport naar de foetus. Het ijzer wordt door de microvillieuze plasmamembraan opgenomen middels receptor gemedieerde endocytose. Hoe vervolgens het ijzer, dat de zo gevormde endosomen verlaat, over de basale plasmamembraan wordt getransporteerd is onbekend. Dit geldt ook voor de rol van de basolaterale transferrine receptor en de verschuiving in het heterogeniteits- patroon van het transferrine veroorzaakt door een veranderende complexiteit van de glycaanketens in de loop van de zwangerschap. Met behulp

van gekweekte cytotrophoblast cellen zal worden onderzocht of de verschillende iso-transferrines op de microvillieuze- en de basolaterale membraan op dezelfde manier worden behandeld. Het ijzertransport van moeder naar foetus verloopt in één richting. Indien ijzer zowel via de microvillieuze- als de basolaterale membraan wordt opgenomen dan moeten we een transportmechanisme postulieren dat het endosomale ijzer bij voorkeur over de basolaterale membraan transporteert in de richting van de foetale circulatie. Met behulp van geïsoleerde microvillieuze- en basolaterale membranen zullen we proberen het vectoriële transportmechanisme te identificeren en eventueel te karakteriseren.

Chemische Pathologie, Erasmus Universiteit Rotterdam

Correspondentie: Prof. Dr. H.G. van Eyk, Afdeling Chemische Pathologie, Erasmus Universiteit, Postbus 1738, 3000 DR Rotterdam.

Het menselijk lichaam bevat ongeveer 3-5 g ijzer. Hiervan is ongeveer 71% ingebouwd in heem en 26% aanwezig als voorraadijzer in de vorm van ferritine