

De diagnostiek van erfelijke metabole ziekten als onderdeel van de klinische chemie

M. DURAN, N.G.G.M. ABELING, H.R. WATERHAM en R.J.A. WANDERS

Het vakgebied klinische chemie van erfelijke metabole ziekten (EMZ) is voortgekomen uit de algemene klinische chemie. Al in de vijftiger jaren van de vorige eeuw werd door enkele Nederlandse klinisch chemici pionierswerk op dit terrein verricht, toen er nog maar een handvol ziekten bekend was. Eén en ander werd mogelijk gemaakt door vorderingen in de analytische chemie, met name de ontwikkeling van chromatografische scheidingsmethoden. De zeer vroege beschikbaarheid van aminozuuranalyse (vanaf ongeveer 1960) en suikeranalyse maakte het opsporen van fenyketonurie (PKU) en galactosemie, beide goed behandelbare aandoeningen, mogelijk. Dieetbehandeling was het terrein van enthousiaste kinderartsen, die in de verschillende universitaire kinderklinieken sub-afdelingen Metabole Ziekten oprichtten. Anno 2003 is het vakgebied erfelijke metabole ziekten tot volle wasdom gekomen; internationale congressen trekken gemakkelijk 500 - 1000 deelnemers. Algemeen wordt gerekend met ongeveer 400 bekende erfelijke stofwisselingsziekten, waarvoor diagnostiek mogelijk is. Maandelijks worden hieraan nieuwe defecten toegevoegd.

Trefwoorden: erfelijke metabole ziekte; stofwisselingsziekte; diagnostiek; algemene klinische chemie

In Nederland wordt het vak klinische chemie van erfelijke metabole ziekten (EMZ) fulltime in alle acht academische ziekenhuizen beoefend (met 4 hoogleraren) en op parttime basis in een toenemend aantal algemene ziekenhuizen. Naast inbedding in de NVKC zijn de beroepsbeoefenaren verenigd in de Vereniging Erfelijke Stofwisselingsziekten Nederland (ESN), die nauw gelieerd is aan de internationale Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM, www.ssiem.org.uk).

De diagnostiek van erfelijke metabole ziekten is als onderdeel van de klinisch-genetische diagnostiek een zogenaamde artikel-2-voorziening, waarvoor een vergunning nodig is van het ministerie van VWS. Grosso modo zijn alle academische ziekenhuizen momenteel vergunninghouder. Een deel van dit diagnos-

tische onderzoek mag gedaan worden in klinisch-chemische laboratoria van perifere ziekenhuizen, maar alleen in nauwe samenwerking met een academisch ziekenhuis. Er zijn anno 2003 drie klinisch chemici in opleiding in het aandachtsgebied EMZ en er is één vacante opleidingsplaats.

Iedere chemicus of bioloog kent de wandkaart "Metabolic Pathways", waarop een nagenoeg onontwarbare kluwen van enzymreacties is weergegeven, die samen het humane metabolisme van laagmoleculaire stoffen verzorgen. Alle enzymen hebben een functie in de biotransformatie van organische substraten, die zowel van biosynthetische aard als van katabole aard kan zijn. In theorie kan ieder enzym onwerkzaam zijn als gevolg van mutaties in het coderende gen. Hiermee is de zogenaamde 'inborn error of metabolism' gedefinieerd. Als gevolg van de 'inborn error of metabolism' zal een substraat voor een enzymreactie onvolgende worden omgezet en zich veelal ophopen in lichaamsvloeistoffen zoals plasma, liquor en urine. Secundair kan een ernstig tekort aan het product van de enzymreactie optreden.

De voornaamste groepen van substraten in het humane metabolisme zijn:

- aminozuren (en hun afbraakproducten organische zuren)
- suikers
- vetzuren
- nucleotiden (en de samenstellende purine- en pyrimidinebasen)

Hieruit kunnen de meeste belangrijke macromoleculen gemaakt worden, zoals eiwitten, glycoproteïnen, (glyco-)lipiden, glycanen, DNA en RNA. Synthese en afbraak van bio-actieve componenten vereist de actieve participatie van alle celorganellen zoals mitochondriën, lysosomen, peroxisomen, het endoplasmatisch reticulum en het Golgi-apparaat. Daarnaast vinden veel reacties plaats in het cytoplasma. Tenslotte mag niet uit het oog verloren worden dat er een voortdurend transport van substraten plaatsvindt van het ene celcompartiment naar het andere, dus ook tussen orgaansystemen. Als voorbeeld van het laatstgenoemde transport moge genoemd worden het transport van glucose over de bloed-hersenbarrière, gemedieerd door de Glut 1-transporter. Het niet functioneren van deze transporter leidt tot een ernstig tekort aan glucose in de hersenen met ernstige convulsies als gevolg. De klinisch-chemische diagnostiek hiernaar omvat alleen de meting van glucose in liquor en bloed: de normale ratio liquor- /bloedglucose is groter dan 0,5. Bij patiënten is deze veel lager.

Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, Amsterdam, Nederland

Correspondentie: Dr. M. Duran. Academisch Medisch Centrum, Laboratorium Genetische Metabole Ziekten, F0-224, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam
E-mail: M.Duran@amc.uva.nl

Tabel 1. Diagnostische niveaus bij de selectieve screening op erfelijke metabole ziekten

1. Klinische selectie
2. Algemene klinisch-chemische laboratoriumverrichtingen
3. Chromatografische / massaspectrometrische analyses
4. Enzymactiviteitsmetingen
5. DNA-mutatiescreening

Uitvoering

Er zijn diverse aspecten aan het vakgebied erfelijke metabole ziekten, waarvan de belangrijkste zijn het diagnostische, het behandelings- en het genetische aspect. Vanzelfsprekend zijn alle processen binnen dit geheel geborgd met interne en externe kwaliteitscontroles. Achtereenvolgens zullen de verschillende aspecten hieronder worden behandeld.

Diagnostiek

In Nederland wordt bevolkingsscreening op erfelijke metabole ziekten maar zeer beperkt verricht door middel van het hielprikonderzoek bij pasgeborenen op fenylketonurie, congenitale hypothyreoïdie en adrenogenitaal syndroom. Alle andere defecten worden daarom na klinische voorselectie via zogenaamde selectieve screening opgespoord. Het geheel van selectieve screening kent een aantal niveaus (tabel 1). Een adequaat volbrengen van ieder niveau vereist specifieke deskundigheid en overleg tussen specialisten.

Niveau 1: Klinische selectie

De snelle groei van het jonge kind brengt een intensief metabolisme met zich mee. De meeste metabole ziekten komen daarom al op de kinderleeftijd tot expressie en de kinderarts of de kinderneuroloog zal in veel gevallen de eerste klinische selectie verrichten. Op dit niveau kan een erfelijke metabole ziekte niet worden uitgesloten, maar er zijn wel enkele algemene richtlijnen. Zo zal bij een evidente koortsconvulsie vrijwel nooit metabool onderzoek worden ingezet en ook neurologische schade als gevolg van geboortetrauma vereist geen ander onderzoek. Bij patiënten met een duidelijke maar onverklaarde psychomotorische achterstand zal in veel gevallen gelijktijdig zowel metabool onderzoek als chromosoomdiagnostiek worden ingezet.

Niveau 2: Algemene klinisch-chemische laboratoriumverrichtingen

De klinische presentatie van patiënten met erfelijke metabole ziekten kent vele verschijningsvormen, waarvan de belangrijkste zijn de aanwezigheid van mentale en/of neurologische symptomen. Bij het ontbreken van voorafgaande mentale verschijnselen en ernstige, onverklaarde 'metabole' ziekte zal een snelle, algemene klinisch-chemische inventarisatie richtinggevend kunnen zijn. Een aantal bepalingen komt hiervoor in aanmerking (tabel 2).

Met name de patiënt die comateus wordt opgenomen, kan veel baat hebben bij snelle initiële diagnostiek. Ruwweg wordt een drietal typen 'metabool coma'

Tabel 2. Klinisch-chemische bepalingen t.b.v. snelle diagnostiek van het acuut zieke kind

Bloedgassen	Elektrolyten
Glucose	Ureum
Lactaat	Creatinine
Ammoniak	Leverenzymen
Hb / Ht	Spierenzymen
Bloedbeeld	Urinezuur

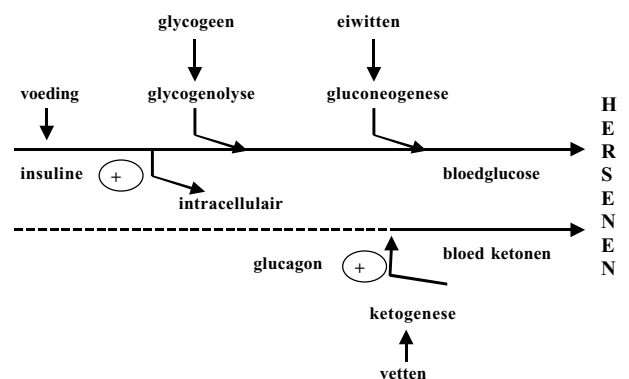
onderscheiden, te weten die met hypoglykemie, met hyperammonieëmie en met ketoacidose.

Hypoglykemie ontstaat door of een te hoog verbruik van glucose als gevolg van hormonale imbalance (hyperinsulinisme), of door onvoldoende aanmaak van glucose bij vasten (glycogenolyse en gluconeogenese), of door onvoldoende productie van ketonen, die naast glucose het alternatieve energiesubstraat voor de hersenen zijn.

Schematisch kan dit worden voorgesteld zoals aangegeven in figuur 1. Al naar gelang het tijdstip van de hypoglykemie en de aan- of afwezigheid van ketonen en verhoogd lactaat valt de verdenking op een van de gemelde groepen. Immers:

- hyperinsulinisme treedt onvoorspelbaar op, meestal kort na voeding
- glycogenolyse- en gluconeogenesedefecten ziet men iets later na inname van voeding, of in ongevoede, vastende toestand, meestal met verhoogd lactaat en ketonen
- vetzuuroxidatiedefecten komen tot uitgang het langst na de voeding, of in ongevoede, vastende toestand; zij hebben per definitie hypoketonemie en hypoketonurie; eenvoudig in urine vast te stellen.

Het hyperammonemisch coma (bloedammoniak > 500 µmol/l) is meestal een gevolg van een stoornis in de ureumcyclus met bijbehorend laag ureum en een alkalose (ammoniak is een base). Dit kan uitgelegd worden aan de hand van figuur 2. De belangrijkste defecten liggen in de in de figuren met 1 tot en met 5 aangegeven reacties, respectievelijk carbamoylfosfaat-synthetase (1), ornithinetranscarbamylyase (2), argininosuccinaatsynthetase (3), argininosuccinaatlyase (4)



Figuur 1. Tijdsverloop van de beschikbaarheid van energie-substraten voor de hersenen. Het samenspel van insuline en glucagon zorgt ervoor dat in alle omstandigheden voldoende glucose en (zo nodig) ketonen geleverd kunnen worden.

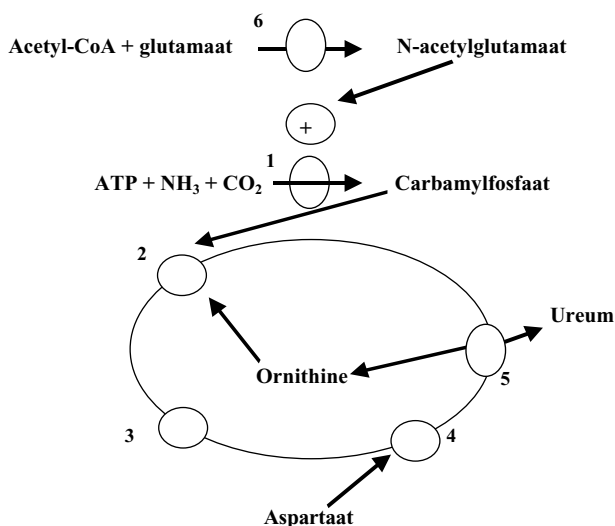
en arginase (5). De analyse van aminozuren in plasma maakt een differentiatie van de meeste ureumcyclus-defecten mogelijk, waarbij men niet mag vergeten dat ophoping van organische zuren reactie 1 negatief kan beïnvloeden en dus ernstige hyperammonieëmie tot gevolg kan hebben.

Het keto-acidotisch coma ziet men niet alleen bij diabetes, maar ook bij organo-acidemieën, zoals propionacidemie of isovaleriaanacidemie -eenvoudig aan te tonen door analyse van organische zuren in urine. De keto-acidose is een gevolg van katabolisme bij langdurig vasten en wordt verergerd door ophoping van organisch zuur, dat niet kan worden gemetaboliseerd.

Niveau 3: De chromatografische / massaspectrometrische analyse

Dit onderzoek is ook wel bekend als de biochemische basisdiagnostiek. Multicomponentanalyses zijn krachtige methoden om veranderingen in het metabolisme van laagmoleculaire stofwisselingsintermediären aan te tonen. Naast de klassieke HPLC en gaschromatografie / massaspectrometrie is de electrospray-tandemmassaspectrometrie sterk in opkomst. Deze techniek maakt het mogelijk om polaire, niet-vluchtige verbindingen zeer snel, specifiek en kwantitatief te analyseren. Het belang van deze analysetechniek moge blijken uit het overzicht van Chace et al. (1), dat aan de toepassing van tandem-MS binnen de klinische chemie is gewijd.

Een van de grote voordelen van tandem-MS-analyse is de analysesnelheid, waardoor het mogelijk wordt om zeer grote aantallen monsters te analyseren. In een aantal landen om ons heen is daarom de neonatale screening ('hielprik') op PKU uitgebreid met een massaspectrometrische analyse van acylcarnitines.



Figuur 2. Reactieketen van de ureumcyclus, die in de periportale hepatocyten de ontgiftiging van ammoniak door vorming van ureum verzorgt. De aangegeven reacties zijn: 1. carbamylfosfaatsynthetase, 2. ornithinetranscarbamylase (vorming van citrulline), 3. argininosuccinaatsynthetase, 4. argininosuccinaatlyase (vorming van arginine) en 5. arginase (= recycling van ornithine). Reactie 6, onder invloed van N-acetylglutamaat-synthetase, zorgt voor aanvoer van de activator N-acetylglutamaat.

Op die manier kunnen gelijktijdig enkele tientallen organo-acidemieën en vetzuuroxidatiestoornissen worden opgespoord. Mede gezien de gunstige behandel mogelijkheden zijn hieraan grote voordelen verbonden. Zie ook de bijdrage van Hessels in dit tijdschrift (2). Deze analytische benadering was tot voor kort uitsluitend in gespecialiseerde laboratoria aanwezig, maar heeft zijn weg naar de algemene klinisch-chemische laboratoria -ook in Nederland en België- al gevonden. Een tweede vakgebied dat profiteert van de tandem-MS-ontwikkelingen is de toxicologie.

Niveau 4: Enzymdiagnostiek

Bevestiging van het vermoede metabole defect bij een patiënt wordt verkregen door het aantonen van verminderde activiteit van het betreffende enzym in cellen of weefsels van de patiënt. Mede gezien de zeldzaamheid van de ziekten zullen enzymbepalingen vrijwel altijd in gespecialiseerde laboratoria gedaan worden. Ook draagt de complexiteit van deze metingen ertoe bij dat geen enkel laboratorium erin slaagt om enzymmetingen over het gehele metabole veld operationeel te hebben. De noodzaak van enzymbepalingen wordt geïllustreerd aan galactosemie. Zowel primaire patiënten als patiënten met secundaire leverziekte tonen een ophoping van galactose. Alleen de meting van de galactose-1-fosfaat-uridyltransferaseactiviteit in erythrocyten spoort de primaire patiënt op. Zie hiertoe bijvoorbeeld het artikel van Bosch in dit tijdschrift (3).

De beschikbaarheid van enzymbepalingen is vaak gekoppeld aan onderzoekslijnen van het desbetreffende laboratorium. Dit illustreert de wederzijdse bevruchting van diagnostiek en research op het terrein van de erfelijke metabole ziekten. De beoefenaren van de enzymdiagnostiek komen niet alleen voort uit de klinische chemie; een groot aantal van hen is biochemicus. Deze collegae zijn sinds kort verenigd als klinisch-biochemisch genetici in de Nederlandse Vereniging voor Klinisch Genetische Laboratoriumdiagnostiek (NVKGL), die nauw gelieerd is aan de Nederlandse Antropogenetische Vereniging (NAV, www.nav-vkgn.nl).

De enzymdiagnostiek biedt naast de bevestiging van het defect ook de mogelijkheid om bij volgende zwangerschappen prenatale diagnostiek te verrichten. Het geheel van enzymdiagnostiek is voorbehouden aan de metabole laboratoria van de academische ziekenhuizen.

Niveau 5: Moleculaire diagnostiek

Het vijfde diagnostische niveau omvat de mutatiescreening van het aangedane gen. In Nederland gebeurt dit bij voorkeur in de moleculair-genetische laboratoria van de vroegere klinisch-genetische centra. De coördinatie van de DNA-diagnostiek binnen Nederland ('wie doet wat') wordt verzorgd door het Landelijk Overleg DNA-diagnostiek (LOD, www.fdg.unimaas.nl/lod). Bij veel erfelijke metabole ziekten is mede vanwege de zeldzaamheid sprake van met name zogenaamde private mutaties, hetgeen inhoudt dat in veel gevallen het gen over de volle

lengte moet worden gesequenced om een veronderstelde mutatie te kunnen vinden. Momenteel heeft de moleculaire diagnostiek regelmatig al een sterke voorkeur boven enzymdiagnostiek, bijvoorbeeld wanneer het defect alleen in de lever en niet in perifere cellen tot expressie komt, zoals bij glucose-6-fosfatasedeficiëntie (glycogenose type 1), ornithinetranscarbamylosedeficiëntie en PKU. Ook de prenatale diagnostiek van erfelijke metabole ziekten wordt indien mogelijk met moleculaire technieken verricht.

De beroepsbeoefenaren in dit gebied zijn als klinisch-moleculair genetici verenigd in de NVKGL.

Behandeling van patiënten

Wanneer het diagnostische traject is afgerond en een éénduidige diagnose is gesteld, komt het aspect van behandeling aan bod. Dit gebeurt in nauwe samenspraak met de metabole kinderartsen en internisten. Therapiemonitoring is een zuiver klinisch-chemische aangelegenheid, waarbij dezelfde technieken als bij de diagnostiek worden toegepast. Behandeling bestaat klassiek uit de dieetbeperking van substraten (aminozuren, suikers) en/of de toevoeging van cofactoren/vitaminen. De optimale behandeling streeft naar een volledige normalisering van het metabole profiel in plasma en urine; in de praktijk wordt dit zelden of nooit gehaald. Als voorbeeld moge PKU dienen. Het normale plasmafenylalanineniveau ligt op 70 $\mu\text{mol/l}$, bij jonge PKU-patiënten is de streefwaarde 120-360 $\mu\text{mol/l}$.

Gezien de noodzaak om in veel gevallen levenslange behandeling vol te houden betekent dit een voortdurende groei van de werkbelasting voor de laboratoria voor metabole ziekten.

Tenslotte

De diagnostiek van erfelijke metabole ziekten was oorspronkelijk voorbehouden aan de klinisch-genetische centra. Nu deze centra vrijwel overal zijn geïntegreerd in de academische ziekenhuizen, zijn deze werkzaamheden tastbaar deel gaan uitmaken van het klinisch-chemische handwerk. Ook de toename van de participatie van de laboratoria in algemene ziekenhuizen draagt hieraan bij. Uit de diversiteit van de bij-

dragen in dit tijdschrift moge blijken dat er legio mogelijkheden zijn om zich te verdiepen in deelaspecten van het vakgebied van de erfelijke metabole ziekten. Hopelijk zal het tijdschrift bijdragen aan een sterkere betrokkenheid van algemeen klinisch chemici bij dit vakgebied. Voor verder lezen over erfelijke metabole ziekten kan worden verwezen naar uiteenlopende handboeken (4-6).

Literatuur

1. Chace DH. Mass spectrometry-based diagnostics: the upcoming revolution in disease detection has already arrived. *Clin Chem* 2003; 49: 1227-1228.
2. Hessels J, Voortman G, Holtus F, Poll The BT, Duran M. Ernstige hypoglycemische crisis met fatale afloop bij een twee jarig kind. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2003; 28: 328-332.
3. Bosch AM, Waterham HR, Duran M, Bakker HD. Een premature tweeling met icterus, stollingsstoornissen en een E. coli sepsis. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2003; 28: 341-343.
4. Fernandes J, Saudubray J-M, van den Berghe G (eds), Inborn metabolic diseases, *Springer Verlag* Berlin Heidelberg New York; 2000.
5. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, *Mc Graw-Hill*, 8th ed. New York; 2001.
6. Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM (eds), *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*, *Springer Verlag* Berlin Heidelberg Duitsland; 2002.

Summary

Diagnosis of inherited metabolic diseases as challenge in clinical chemistry. M. Duran, N.G.G.M. Abeling, H.R. Waterham en R.J.A. Wanders. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 305-308.

The diagnostic work-up of inherited metabolic disease can be regarded as an essential part of clinical biochemistry. Five diagnostic levels can be distinguished, i.e., 1. the clinical preselection of patients, 2. the general clinical chemistry approach, 3. the system of multi-component analysers, 4. the set of enzyme assays and 5. the molecular-genetic approach. Each level requires its own specialists. The role of the general clinical chemist in the initial diagnosis of critically ill patients is outlined.

Key words: inborn error of metabolism; metabolic inherited disease; diagnosis; general clinical chemistry