

Laboratoriumdiagnostiek bij hyperammoniamie en hepato(spleno)megalie

Dr. Mirjam Wamelink

Laboratoriumspecialist Klinische Genetica, Amsterdam UMC

ESN nascholing, 31-03-2023

m.Wamelink@amsterdamumc.nl



Disclosure slide

(potentiële) belangenverstrengeling	Geen
Voor bijeenkomst mogelijk relevante relaties met bedrijven	Geen
<ul style="list-style-type: none">• Sponsoring of onderzoeksgeld• Honorarium of andere (financiële) vergoeding• Aandeelhouder• Andere relatie, namelijk ...	Geen



Metabole functies van de lever

- Zeer breed, voorbeelden:
 - Koolhydraatstofwisseling, glycogenolyse, gluconeogenese
 - Vetstofwisseling, cholesterol, β -oxidatie, keton vorming
 - Eiwitstofwisseling, ureumcyclus
 - Detoxificatie van stoffen, bilirubine
 - Galproductie
 - Hormoonmetabolisme
 - Regulering van de bloedstolling

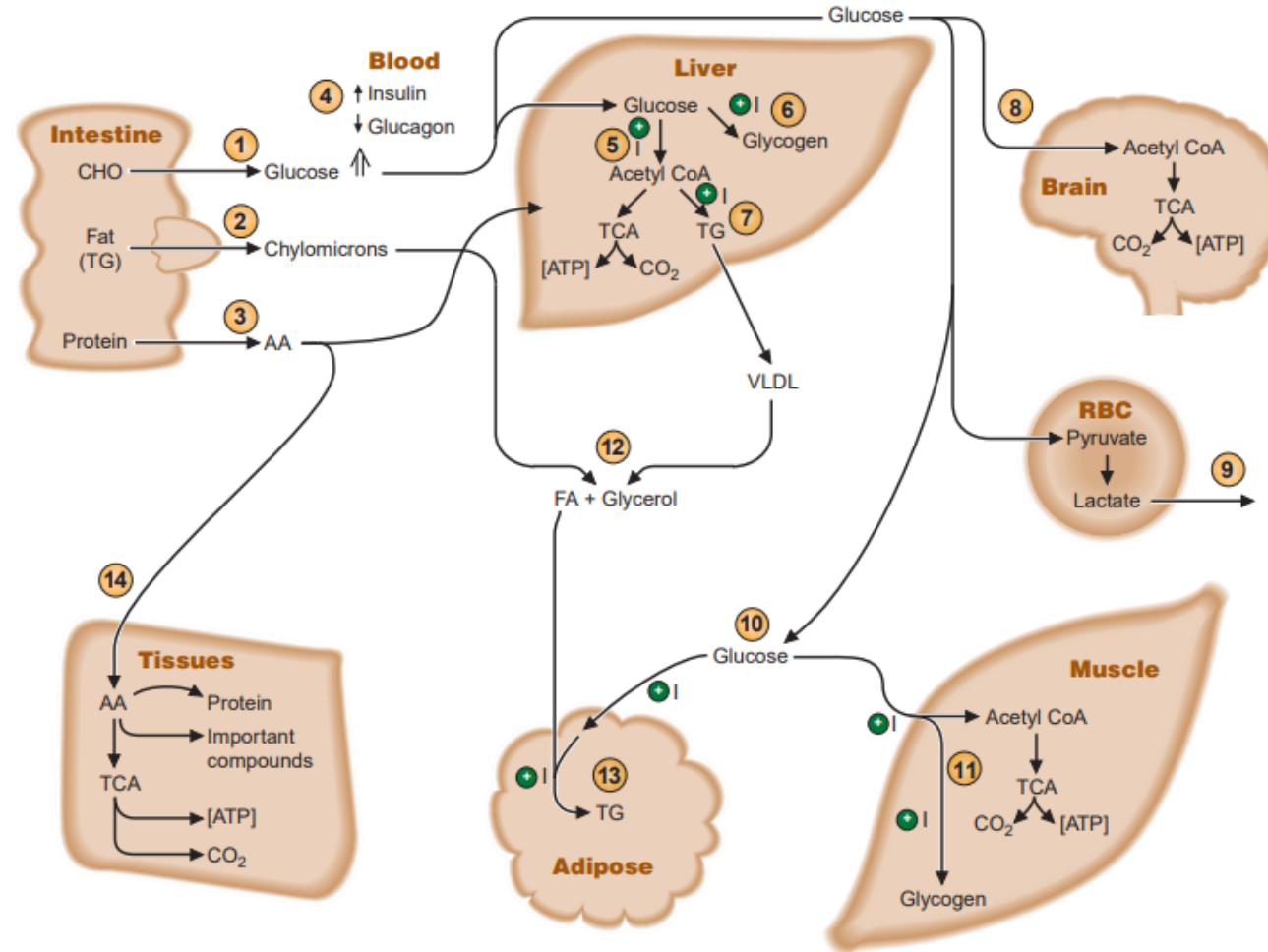


Lever als opslag en synthese

- De lever is een reservoir voor een verzameling stoffen:
 - Glycogeen;
 - Vitamine A, D, B12, K
 - IJzer, koper
- Synthese:
 - Stollingsfactoren, plasma eiwitten (bv albumine), primaire galzuren en lipoproteïnen

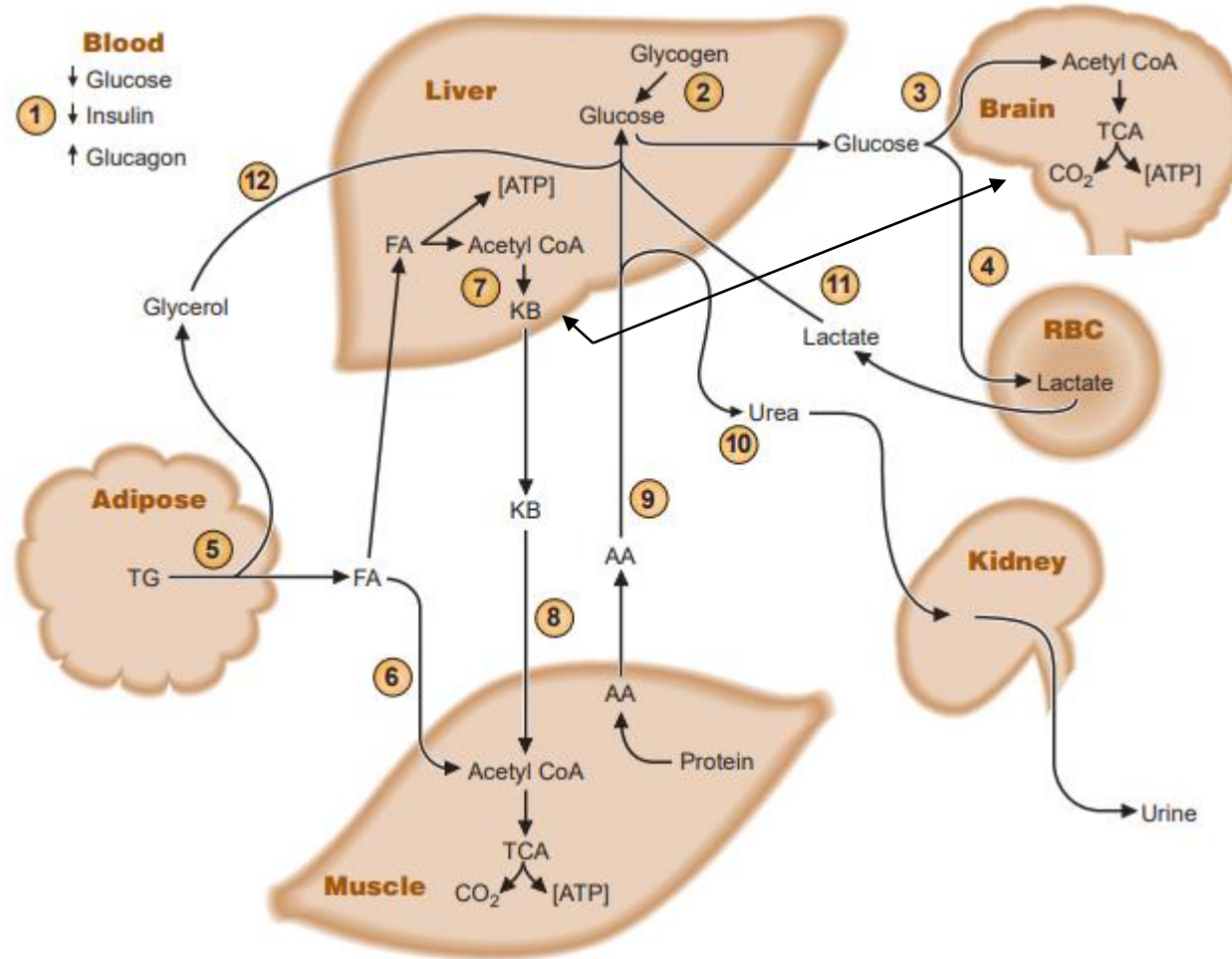


Rol van de lever in gevoede toestand





Rol van de lever tijdens vasten





Biochemische testen voor leverziekte (1)

- Test voor cholestase (intra/extra hepatisch)
 - ALP
 - γ -GT
 - Bilirubine, geconjugeerd & ongeconjugeerd
 - Galzuren
 - Urine: Kleur, urobilinogeen/ geconjugeerd bilirubine
 - Feces: Kleur
- Test voor acute lever schade
 - ASAT, ALAT
 - Bilirubine



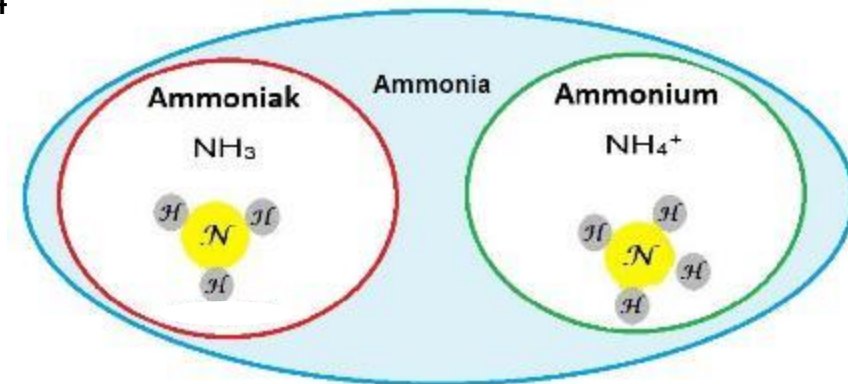
Biochemische testen voor leverziekte (2)

- Test voor synthetische functies, bij langdurige leverziekte/cirrhose
 - Coagulation studies (vitamine K (cholestase)/ernstige verminderde synthese)
 - Albumine (minder specifiek)
 - Ammoniak
- Verdenking metabole aandoening:
 - Glucose
 - Ammonia
 - Lactaat
 - Bloed gas
 - Ureum, kreatinine, urinezuur, CK
 - Koper, ferritine
 - A-1-antitrypsine



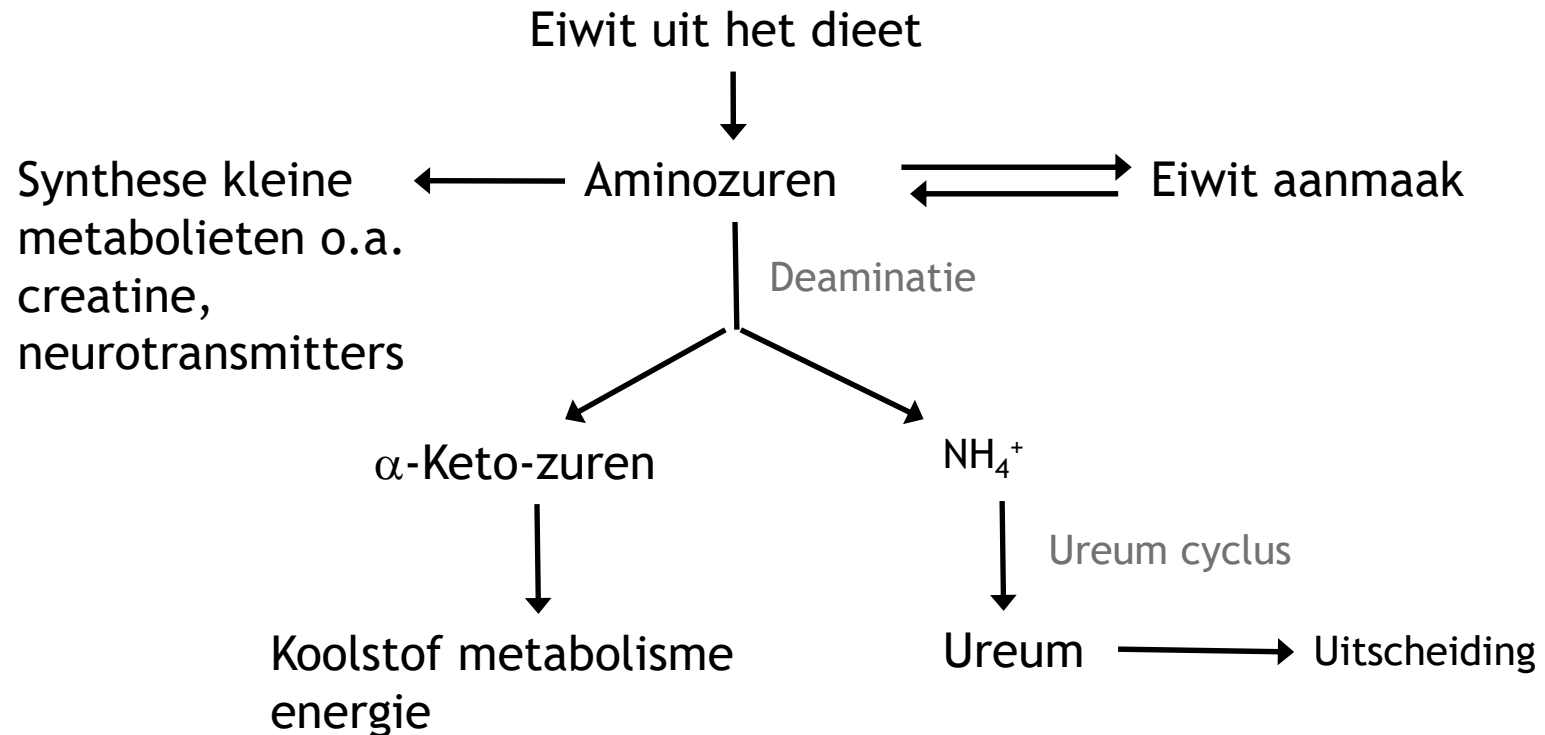
Ammoniak + Ammonium = Ammonia (in water)

- Ammoniak (NH_3) is een zwakke base die in evenwicht staat met ammonium (NH_4^+)
- Bij fysiologische pH is 95% in de vorm NH_4^+
- Klinisch chemische methodes meten totaal $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$
- Vorming, door deaminatie aminozuren, bacterieel darm metabolisme, deaminatie van AMP in spier



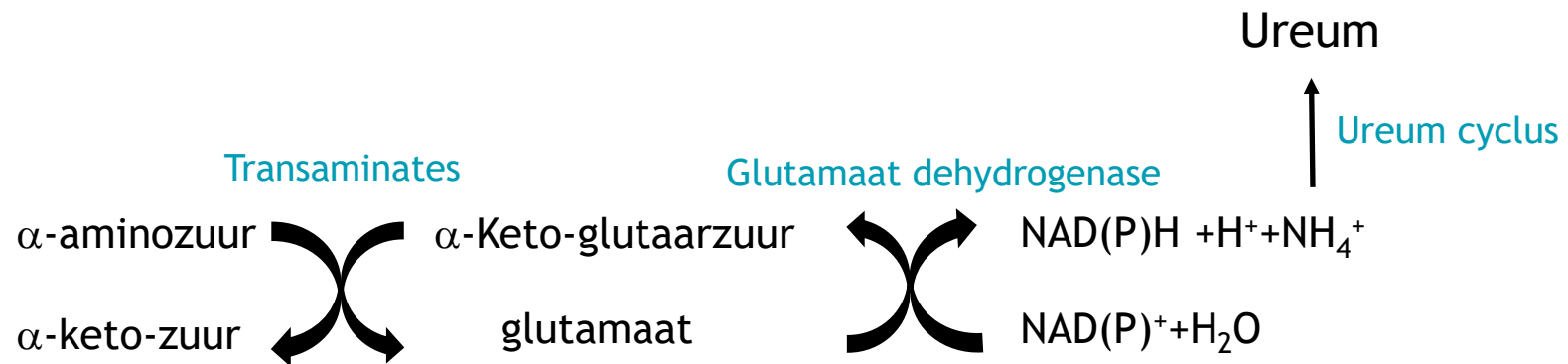


Eiwit metabolisme





Transaminatie & oxidatieve deaminatie



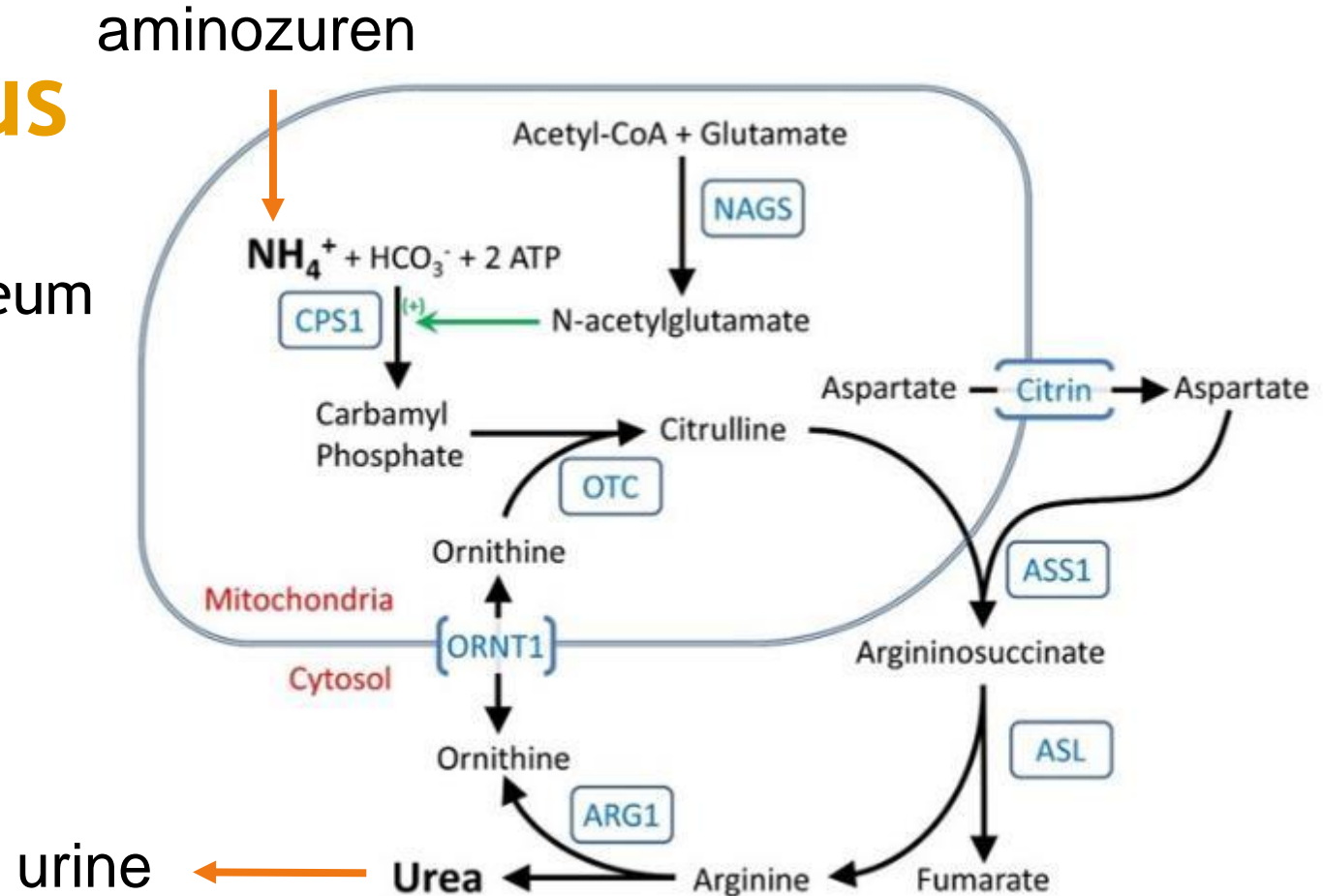
Classificatie van IEM met neurologische presentatie in de neonatale periode en jonge kinderleeftijd met hyperammoniamie

IV	With Hyperammonaemia				
	Hyperammonaemia, without ketoacidosis “Intoxication” type, 0–3 days “well” period Moderate liver findings High blood pressure	Alkalosis Ketone urine test 0/+	NH ₃ ↑ +/++++ lactate N↑/ + Blood count N Glucose N (low in CAVAS) Calcium N	UCD, CAVA, HHH (▶ Chap. 19), LPI (▶ Chap. 25), GS deficiency (▶ Chap. 24)	AAC, OAC Orotic acid Carbaglu test DNA tests
	Hyperammonaemia with ketoacidosis “Intoxication” type, 0–3 days “well” period, dehydration.	Acidosis +/++++ Ketone urine test +/++++	NH ₃ ↑ +/++++ Lactate +/ ++ Blood count: BMS	OA (▶ Chap. 18), PC (▶ Chap. 11), MCD (▶ Chap. 27)	AAC, OAC Carbaglu test + (OA) Biotin test + (MCD)
	Hyperammonaemia with hypoketotic hypoglycaemia Moderate liver findings Cardiac failure, cardiac arrhythmias, muscle involvement	Acidosis 0/++ Ketone urine test 0/+/-	NH ₃ ↑ +/++++ Lactate N or ↑ + Blood count N Glucose ↓ +/++++	FAO defects HI/HH syndrome (▶ Chap. 12)	OAC carnitine Acylcarnitine FAO studies DNA tests Insulin
	Hyperammonaemia with elevated lactate Cardiomyopathy (TMEM 70)	Acidosis 0/++ Ketone urine test ++/0	NH ₃ ↑ +/+++ Lactate ↑ +/++++ Citrulline ↑ +	PC, MCD, MAS TMEM70, (with high citrulline PDH, Krebs cycle defects)	L/Pyr (P) OAC (U) Enzyme test DNA tests



Functies ureumcyclus

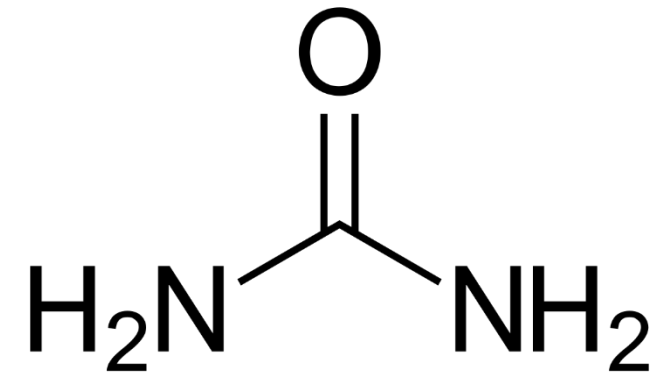
- Ontgifting ammonium (NH_4^+) \rightarrow ureum
- Synthese arginine





Eigenschappen ureum

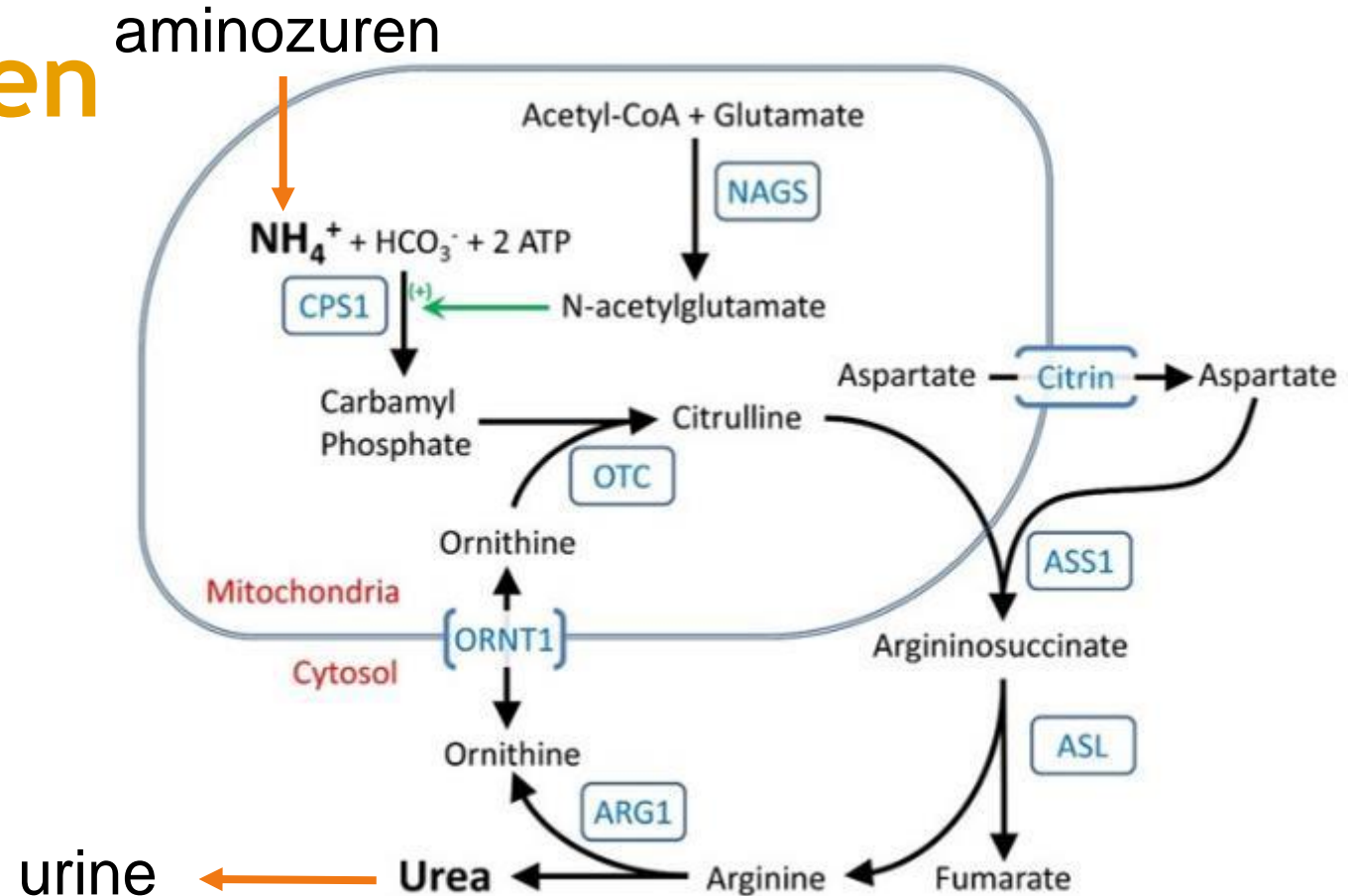
- Ongeladen, goed wateroplosbaar
- Zeer efficiënte N-drager (50% gewicht is N)





Ureumcyclus defecten

- 5 core enzymen
- 1 activerend enzym
- 2 transporters (orn/cit en asp/glu)
- Autosomaal recessieve overerving
m.u.v. OTC





Ureumcyclusdefecten - kliniek

Acuut

- Lethargie, coma
- Alkalose
- Temperatuur instabiliteit
- Sepsis-achtig beeld
- Epileptische aanvallen
- Overgeven
- Hersenoedeem
- Leverfalen
- Psychose

Chronisch

- Eiwitaversie
- Hoofdpijn, migraine
- Bewegingsstoornissen
- Cognitieve stoornissen
- Failure to thrive
- Overgeven, buikpijn
- Psychiatrische symptomen
- Verhoogde leverenzymen



Ureumcyclusdefecten - routine lab

- (Sterk) verhoogd ammoniak
- Bloedbeeld en CRP normaal (klinisch lijkt neonatale sepsis)
- Bloedgas: respiratoire alkalose
- Verhoogde leverparameters



Hyperammoniëmie

NH₃ waarden (μmol/L):

Neonaten:	gezond	<110
	ziek	tot 180
	metabool	>200

Na neonatale fase:

normaal	50-80
metabool	>100

Ongestuwd veneus, op ijs afnemen en direct bepalen

NB. Vals verhoogde waarden bij hemolyse (conc. in ery 3x hoger dan in plasma) en stuwings



DD hyperammoniëmie

Primair

- Ureumcyclusdefecten (alkalose)

Secundair (inhibitie ureumcyclus)

- Organische zuursyndromen (metabole acidose)
- Vetzuuroxidatiestoornissen, carnitine deficiëntie
- Ademhalingsketen defecten (verhoogd lactaat)
- Valproaat
- Ondervoeding
- Leverinsufficiëntie

• Structureel

- Vasculaire malformaties → shunting
- Open ductus venosus

• Verhoogd aanbod

- Verhoogde spieractiviteit (epileptisch insult)
- Infectie met urease producerende bacteriën

• Overig

- Transient hyperammonemia of newborn



Hyperammonieëmie

AANGEBOREN

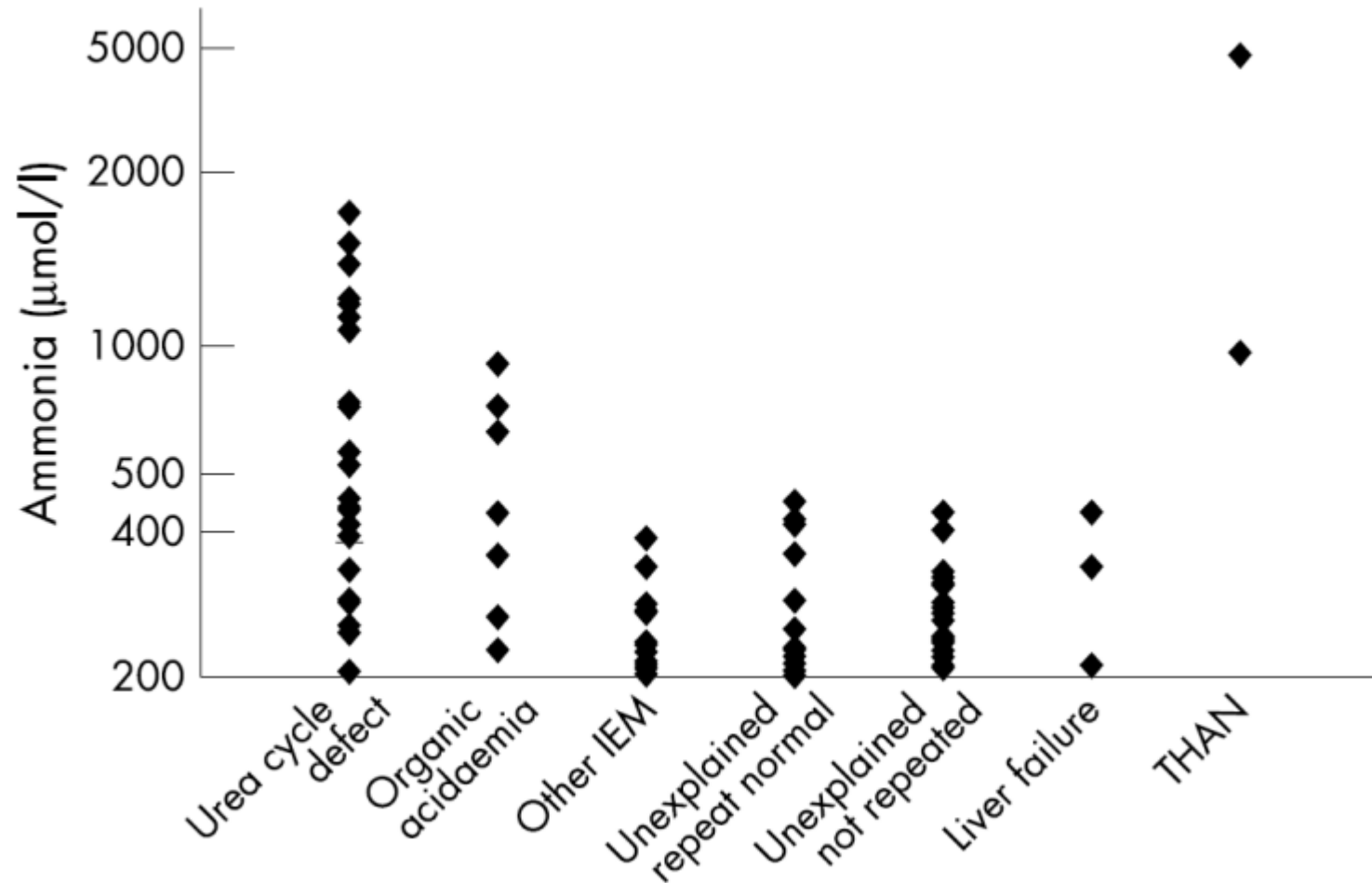
- Ureumcyclusdefecten / transport defecten(alkalose)
- Organoacidurieën (metabole acidose)
- Vetzuuroxidatie defecten / carnitine deficiëntie
- Hyperinsulinisme-hyperammonieëmie syndroom (HIHA) (hypoglycemie/hyperinsulinisme)
- Defecten pyruvaat metabolisme, citroenzuurcyclus, CAVA deficiëntie (lactaat acidose)

VERWORVEN

- Transient hyperammonieëmie van de neonat (respiratoire stress?)
- Reye's syndroom
- Leverfalen
- Valproaat-behandeling
- Vasculaire malformaties → shunting
- Open ductus venosus
- Infectie urease-positieve bacteriën
- Verhoogde spieractiviteit (epileptisch insult)
- Ernstig ziek zijn/ondervoeding

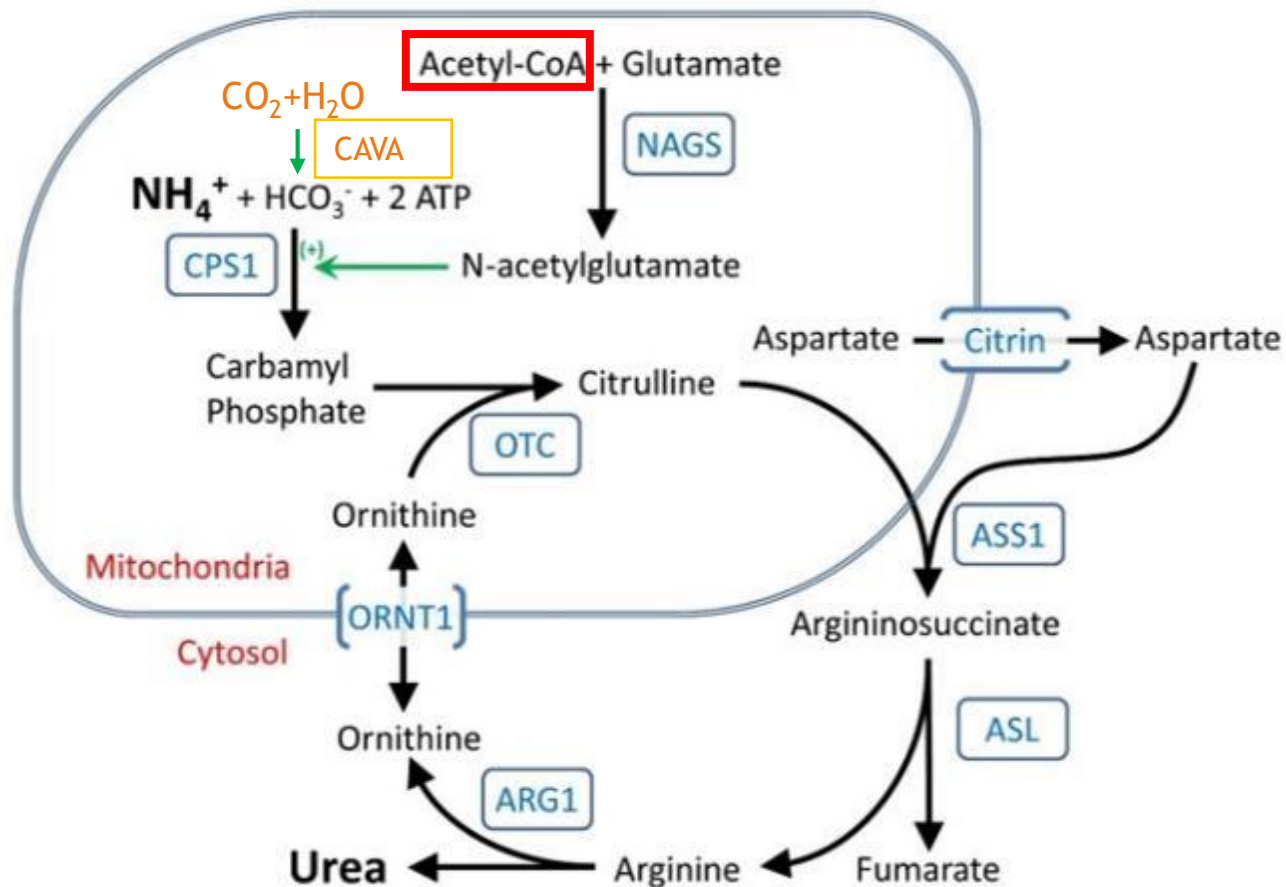


Hoogte hyperammoniëmie en oorzaken





Secundaire hyperammoniëmie



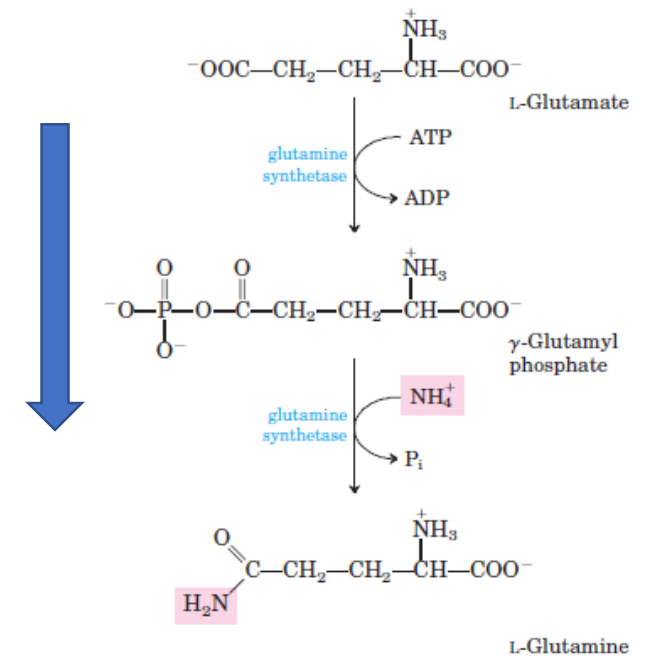
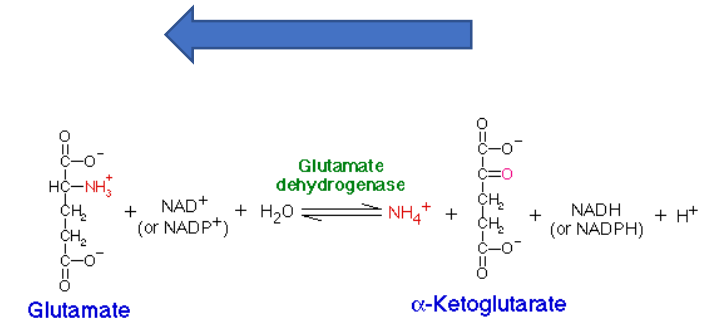
- Vetzuuroxidatiestoornis: tekort acetyl-CoA
- Organoacidurieën: substraat inhibitie van propionyl-CoA, methylmalonyl-CoA en isovaleryl-CoA met acetyl-CoA

CAVA deficiëntie: tekort bicarbonaat



Pathofysiologie symptomen

- Vanwege ophopende ammonium wordt glutamaat en vervolgens glutamine gevormd
- Glutamine werkt als osmoliet in astrocyten → water opname → zwelling → hersenoedeem
- Depletie glutamaat (en secundair GABA), belangrijke neurotransmitters in CZS
- Ammonium verstoort ook functie ionkanalen → zwelling astrocyten
- Verhoogd ammonium stimuleert het medullaire ademhalingscentrum van de hersenen -> hyperventilatie-> Respiratoire alkalose.





Hyperammoniëmie

Diagnostiek: spoed

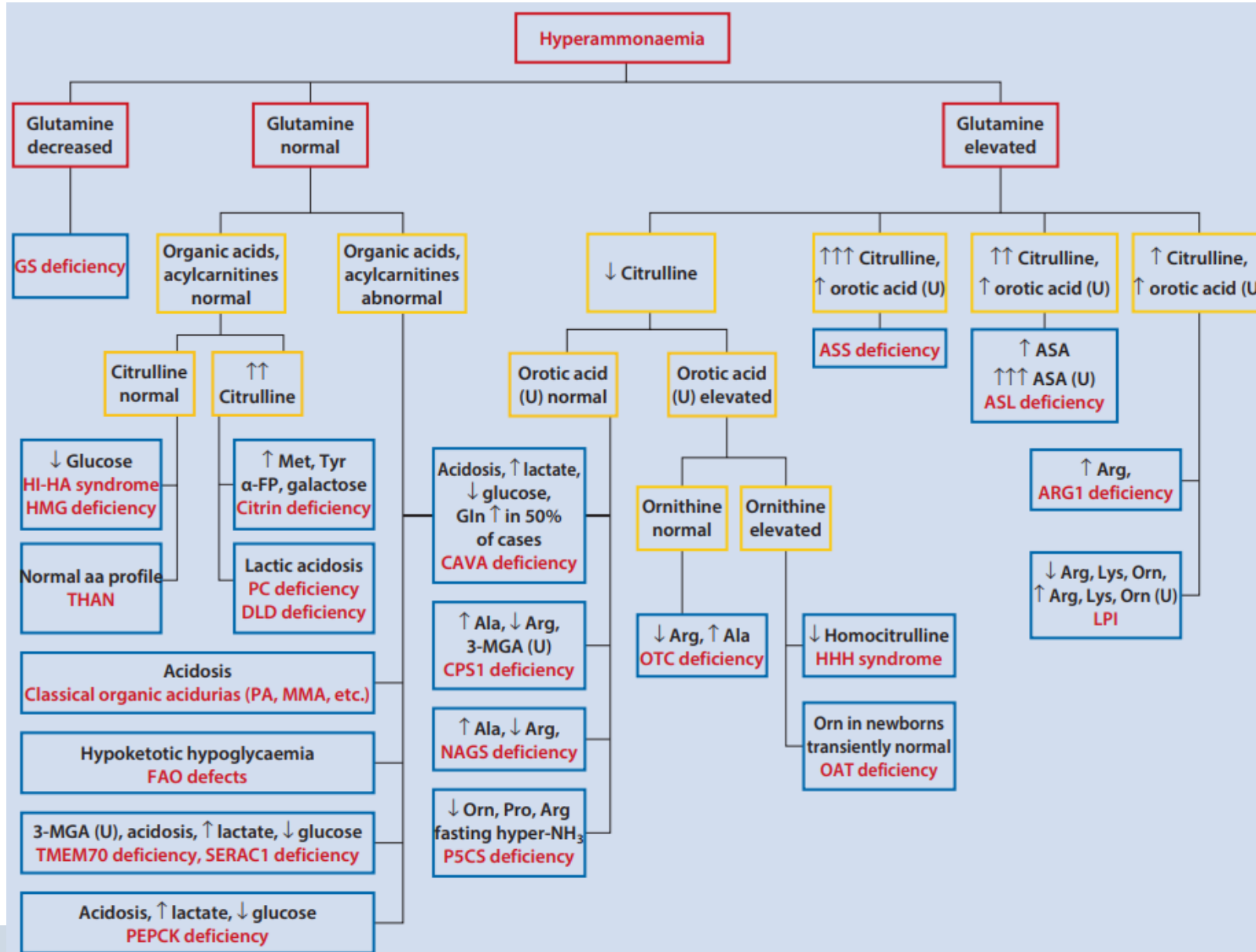
- 1 ml plasma (heparine of EDTA) -> Aminozenen, acylcarnitines
- 10 ml urine -> Aminozenen, organische zuren en orootzuur

Start behandeling:

- Stop eiwit intake, stop catabolisme
- Verwijder ammonia
- Arginine, citrulline
- Carnitine

Als afname niet in UMC: bevroren verzenden

DD hyperamoniemie



ARG1: arginase
 ASA: arginine succinaat
 ASL: arginine succinaat lyase
 ASS: arginine succinaat synthetase
 CAVA: carbonic anhydrase Va
 CPS1: carbamoyl fosfatase synthetase
 DLD: dihydrolipoamide dehydrogenase
 FAO: vetzuur oxidatie
 GS: glutamine synthetase
 HHH: hyperornithinemie-hyperammoniamie-homocitrullinemie
 HI-HA: hyperinsulinisme-hyperammoniamie
 HMG: 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase
 LPI: lysine eiwit intolerantie
 NAGS: N-acetylglutamine synthase
 OAT: ornithine aminotransferase
 OTC: ornithine transcarbamylase
 P5CS: Δ1-pyrroline-5-carboxylaatsynthetase
 PC: pyruvaat carboxylase
 PEPCK:
 SERAC1: serine active site-containing protein 1
 THAN: transient hyperammonaemia of the newborn
 TMEM70: transmembrane protein 70



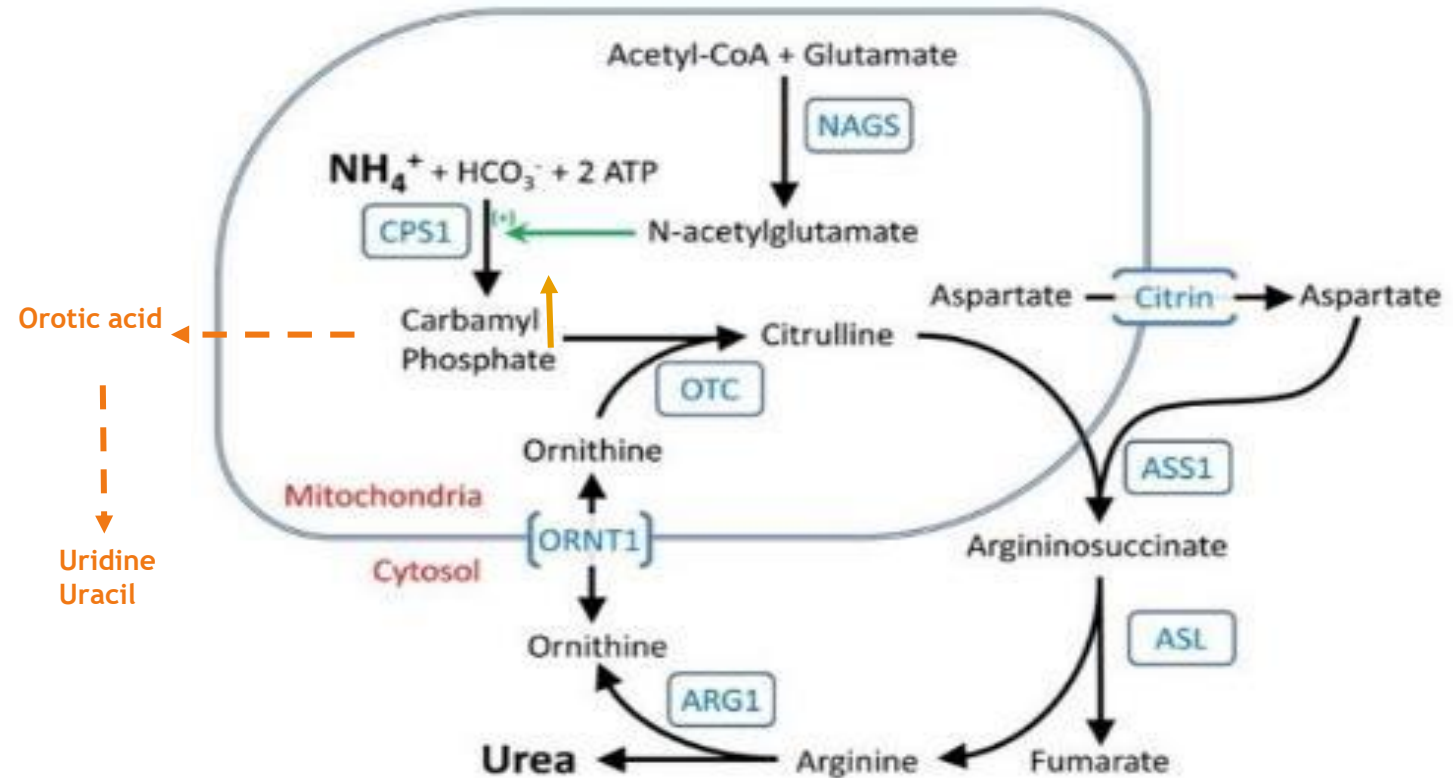
Ureumcyclusdefecten: metabool onderzoek

	glutamine	<u>citrulline</u>	<u>argininosuccinaat</u>	arginine	<u>ornithine</u>	<u>orootzuur</u>
CPS/NAGS	↑					
OTC*	↑	(↓)				↑-↑↑
ASS	↑	↑↑↑				(↑)
ASL	↑	↑	↑↑↑			(↑)
ARG	↑			↑↑		(↑)
ORNT1 (HHH)	↑				↑	(↑)
CITRIN	↑	↑				

* Bij jongens/mannen

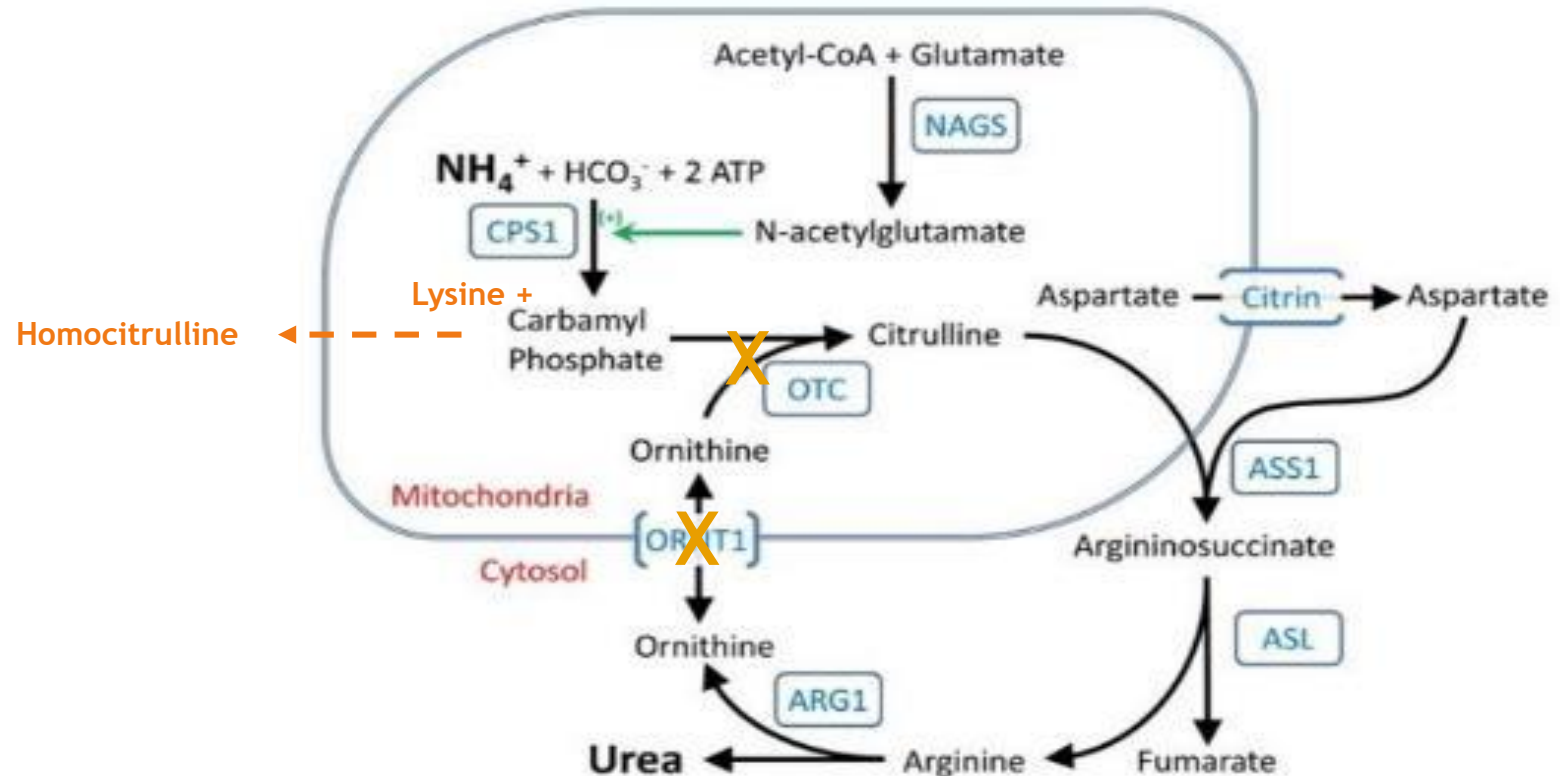


Orootzuur





Hyperornithinemie, hyperammoniamie, homocitrullinurie syndroom (HHH) en homocitrulline



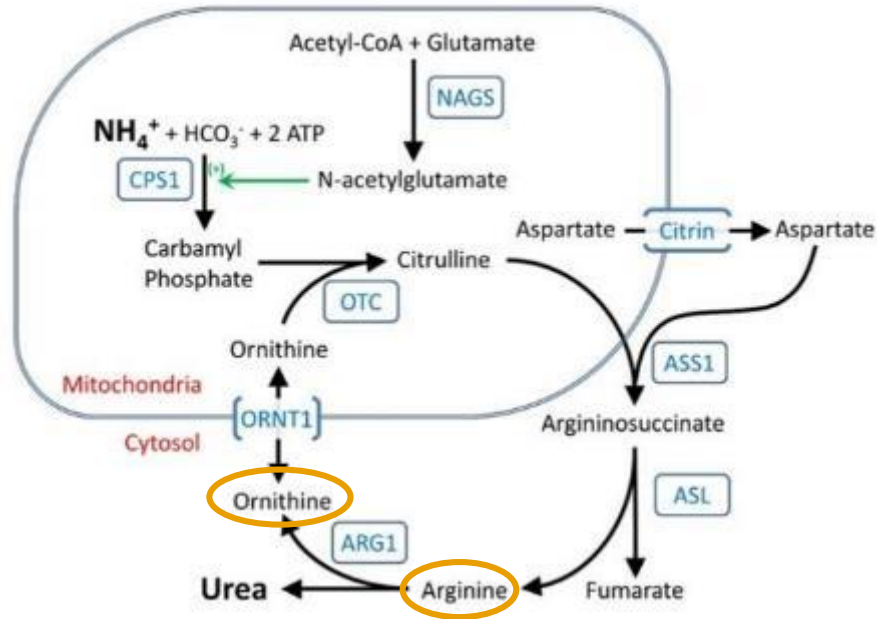


Citrin deficiëntie

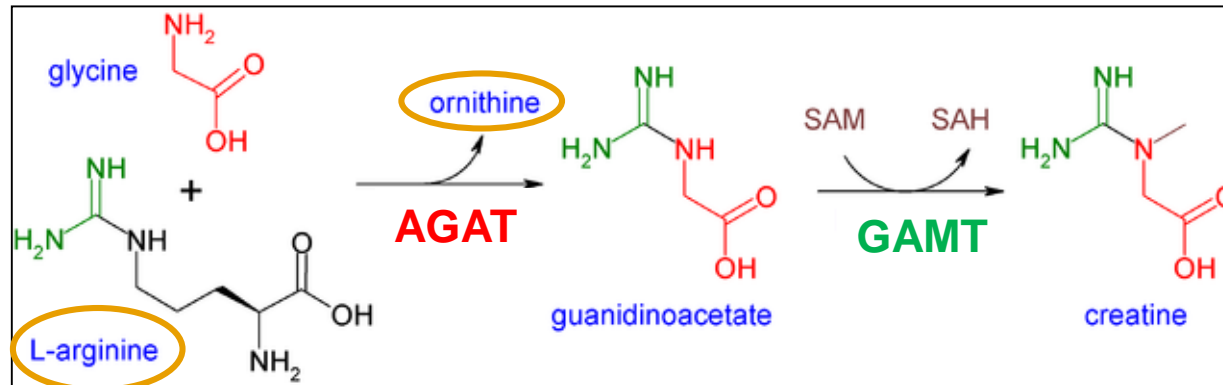
3 klinische en biochemische presentaties

	Onset	Klinisch	Biochemisch
NICCD	Neonataal, hersteld voor leeftijd 1 jaar.	Neonatale intrahepatische cholestase	Citrulline verhoogd 100-500 umol/l, anemie, hypoalbuminemie, galactosemie. Normaal ammonia, glutamine en orootzuur, verhoogd alfa-1-antitrypsine
FTTDCD	Kinderleeftijd	Failure to thrive en dyslipidemie	Normaal-hoog citrulline, verhoogd lactaat/pyruvaat ratio
CTLN2	Adolescent/volwassen	Neuropsychiatrische symptomen, hyperammoniamie	Hyperammoniamie, verhoogd citrulline, normaal glutamine en orootzuur

Creatine/guanidino-acetaat in UCD



Arias et al MGM 2004	ASL, ASS, OTC, (HHH) (before)	ASL, ASS, OTC, (HHH) (after)
Urine creatine	↓-N	N
Urine guanidino-acetaat	↓	N
Plasma creatine	↓-N	↓-N
Plasma guanidino-acetaat	↓-N	N





Artefacten bij monsterverwerking:

- Hemolyse (serum!)/
(bloed niet invriezen):

Glutamine -> glutamaat

Arginine -> ornithine

Verhogingen lange keten acylcarnitines

- Bloed te lang bij kt:

Arginine -> ornithine

Alanine ↑

Verhogingen lange keten acylcarnitines

- Opslag:

Glutamine -> glutamaat



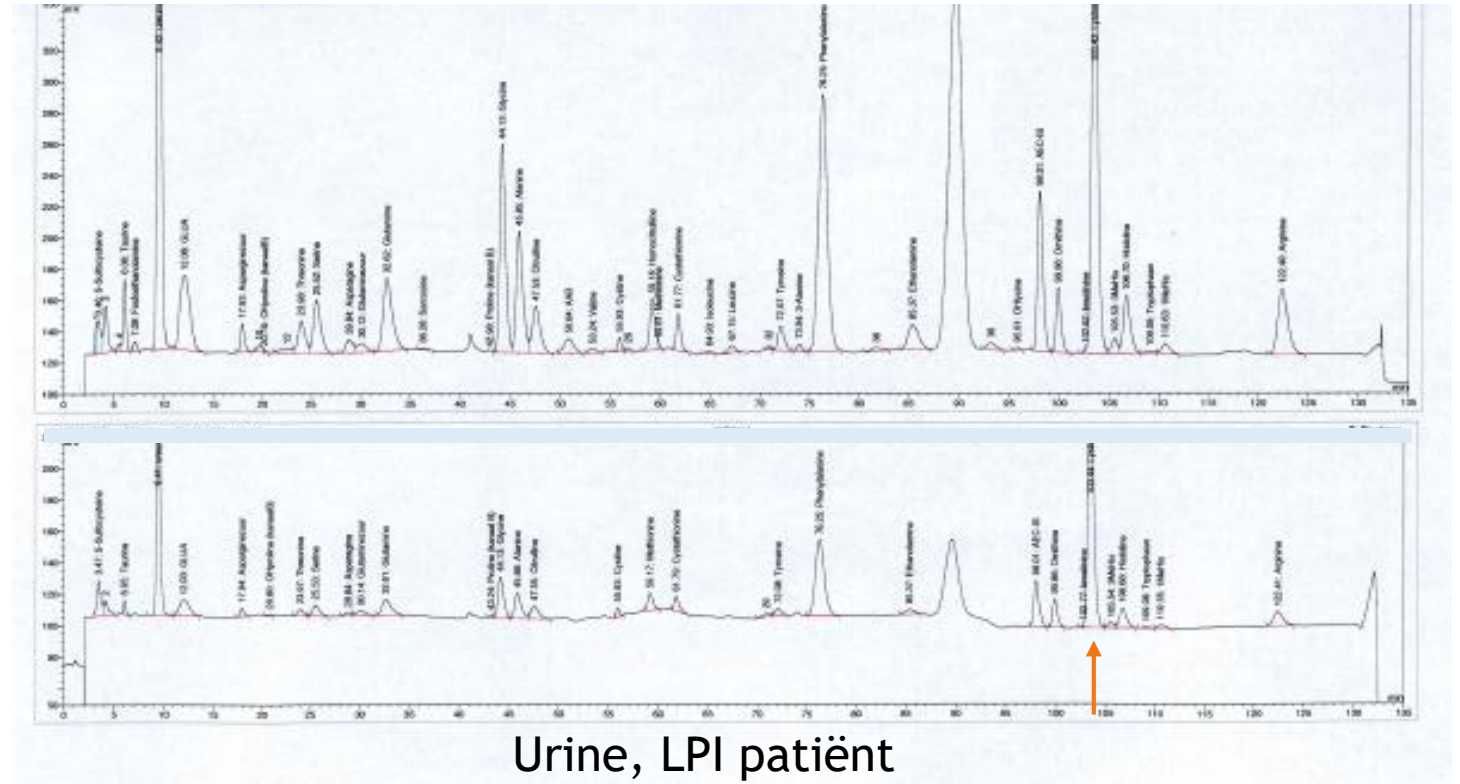
Techniek: Aminozuur analyse

- Aminozuuranalysator



- LC-tandem MS

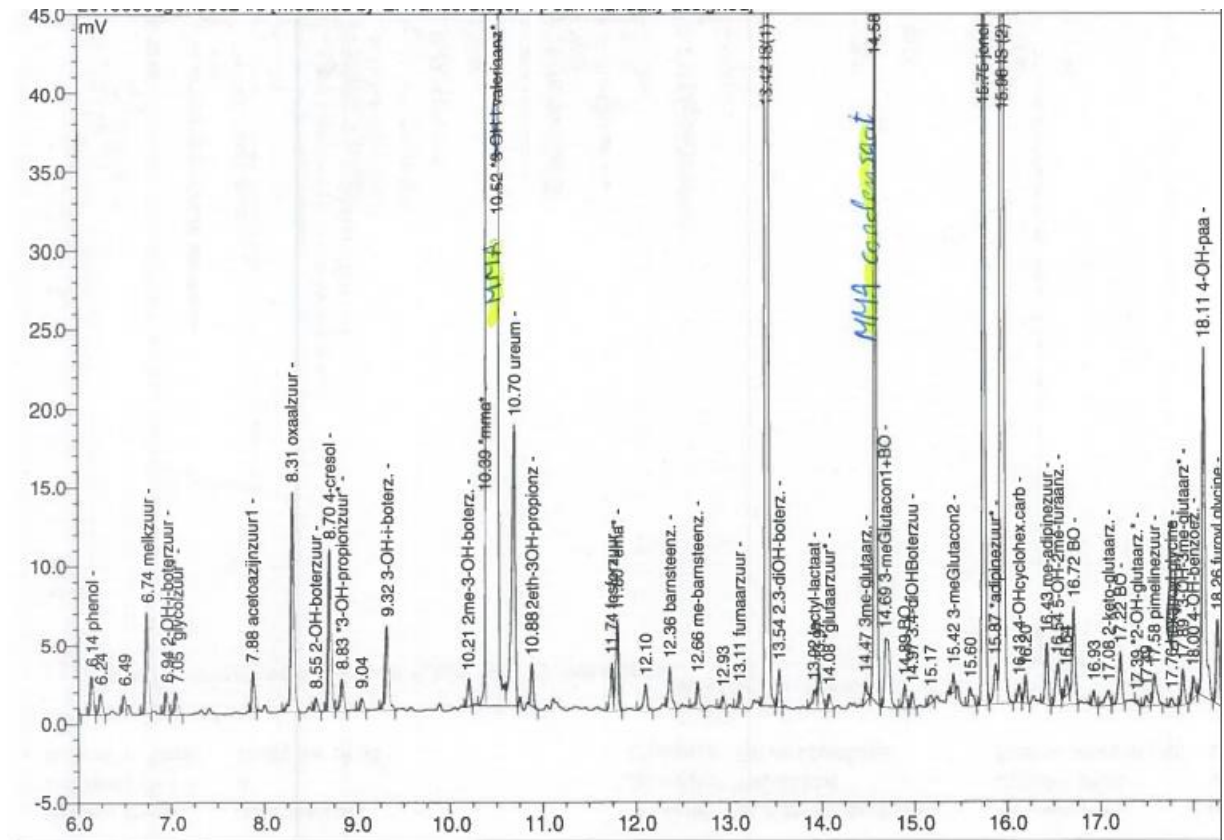
Lysine





Techniek: Organische zuren analyse

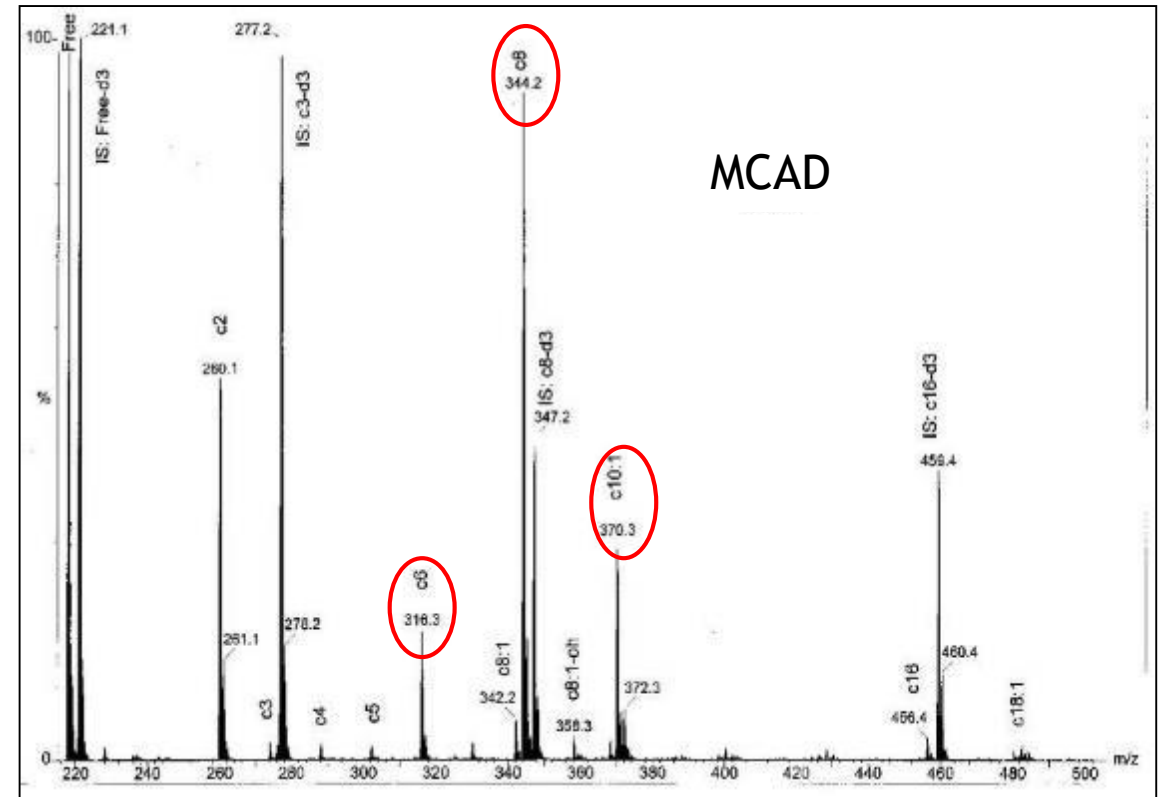
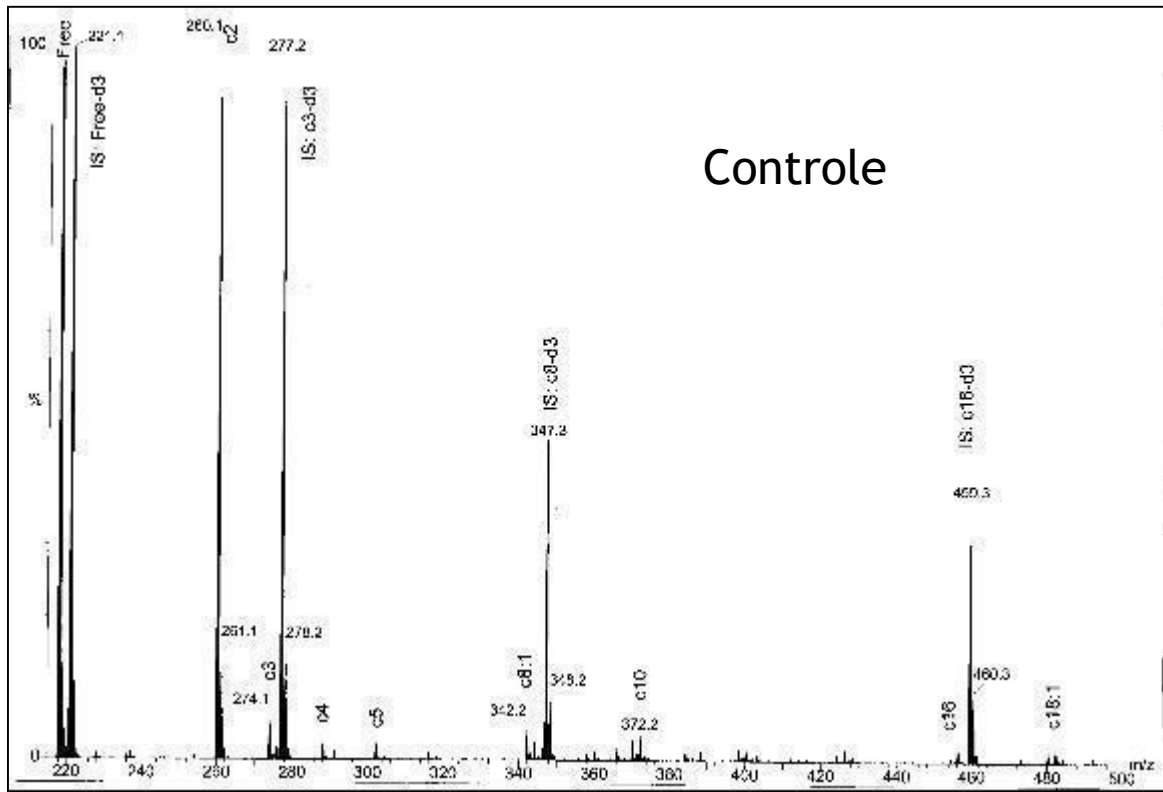
- Klassieke analyse: GC-MS
- Scheiding vluchtige metabolieten (TMS (trimethylsilyl-)derivaten) m.b.v. GC.
- Nieuwe methode: QTOF-MS analyse





Techniek: Acylcarnitine analyse

Tandem MS





Hepatomegalie

+ hypoglycemie	+leverfalen	+neurologie	+tubulopathie	+splenomegalie
Glycogeen stapelingsdef (GSD) (type I, III, VI, IX)	Galactosemie, fructosemie	Peroxisomale defecten	Fanconi-Bickel syndroom (FBS)	Lysosomale defecten
Fructose-1,6-biP def. (FDP)	Tyrosinemie type I	Mitochondriële defecten	Mitochondriële defecten	Transaldolase def.
Vetzuur oxidatie defecten	Mitochondriële defecten	Lysosomale defecten	Transaldolase def.	Lysine eiwit intolerantie
Fanconi-Bickel syndroom (FBS)	Ureum cyclus defecten	Complex lipiden synthese defecten	Galactosemie, fructosemie	Mevalonacidurie
	Transaldolase def.	Ureum cyclus defecten		CDG
	Ziekte van Wilson	CDG		Ziekte van Wilson
	CDG	Ziekte van Wilson		Lipoproteïn lipase def.



Hepatomegalie + hypoglycaemie

Keton-lichamen
in urine $\leq +$

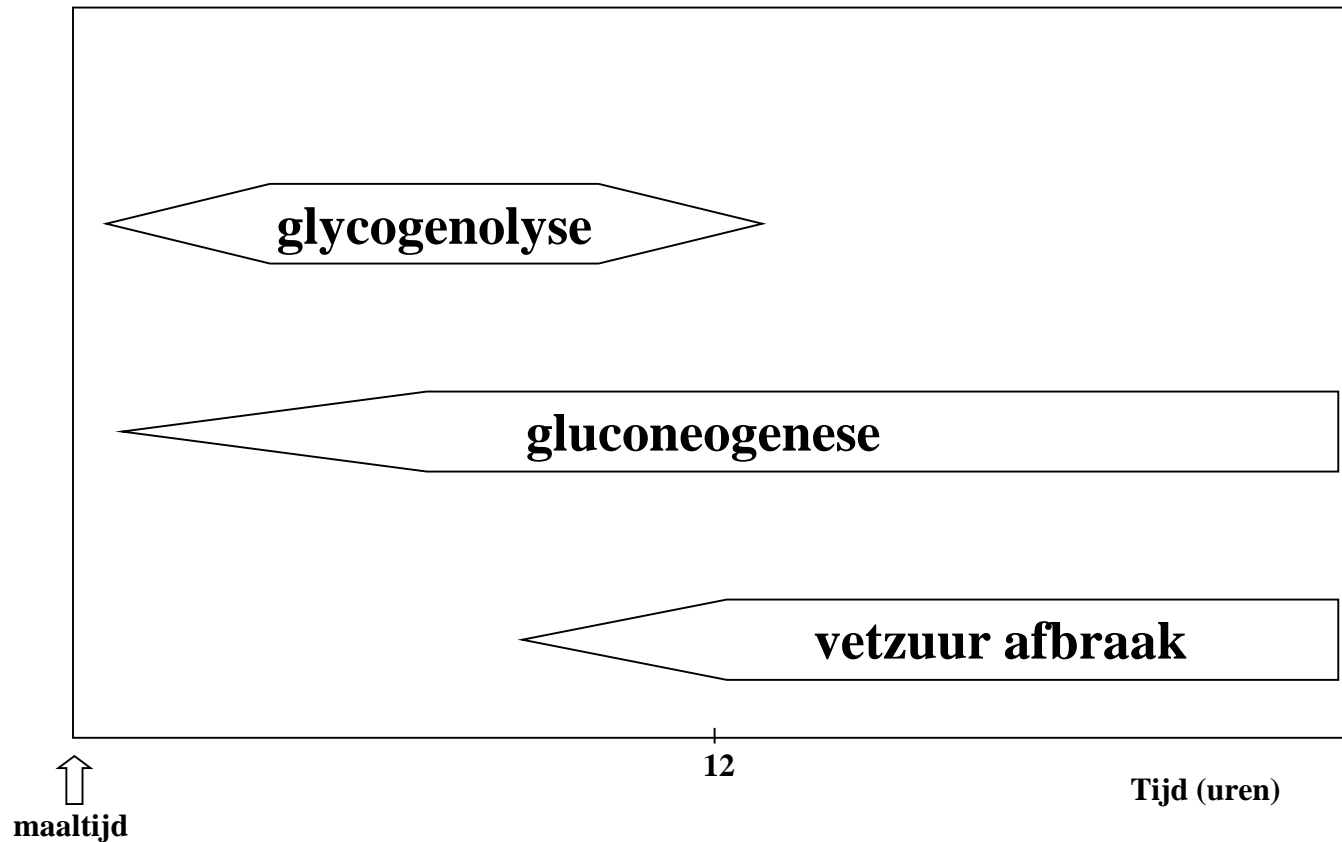
Keton-lichamen
in urine $> +$

Vetzuuroxidatie defect
Fructose-1,6-biP-ase
GSD1
HMG CoA lyase def.

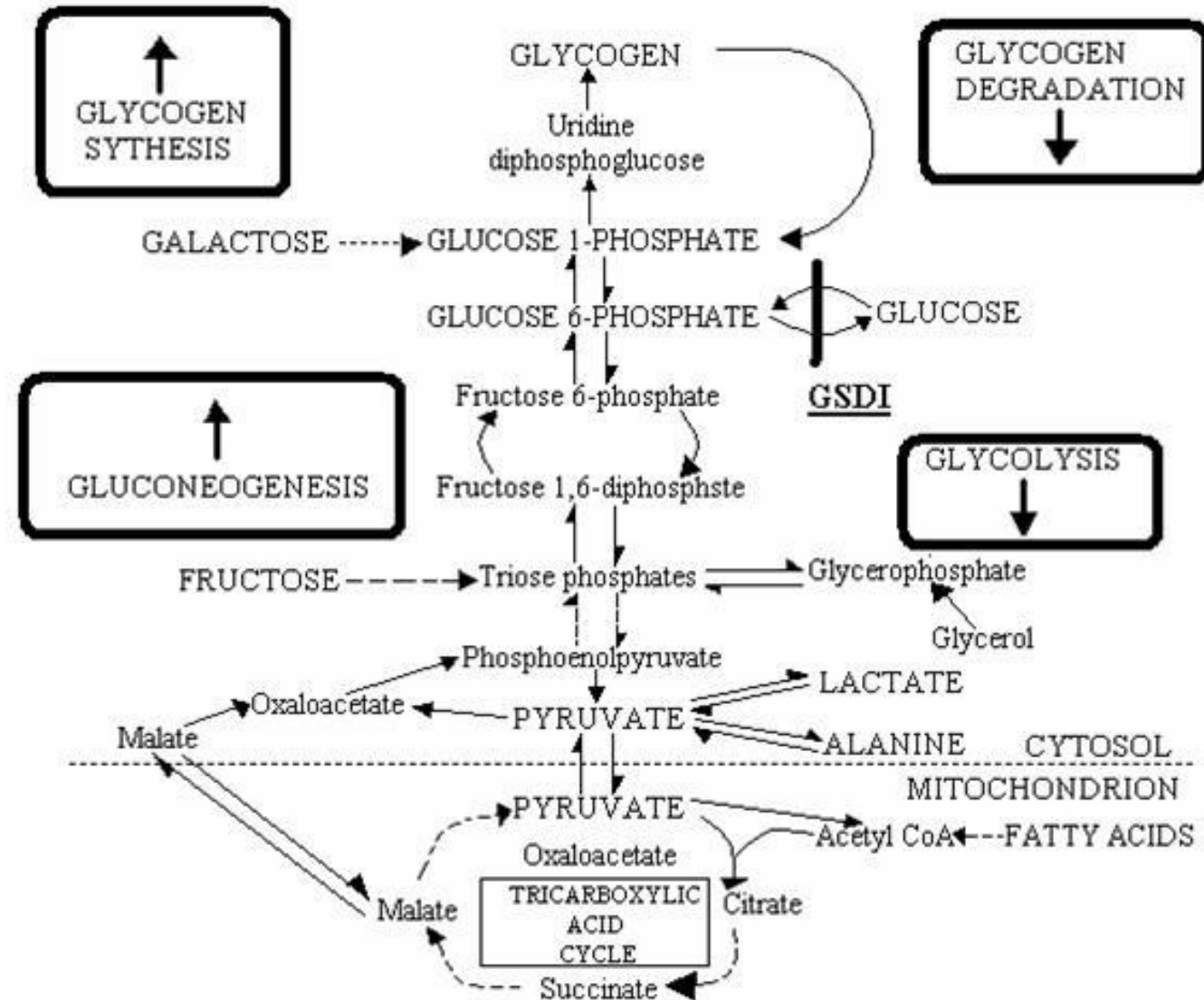
Fanconi-Bickel syndroom
GSD1, III, VI en IX
Citrin def.



Glucose homeostase tijdens vasten



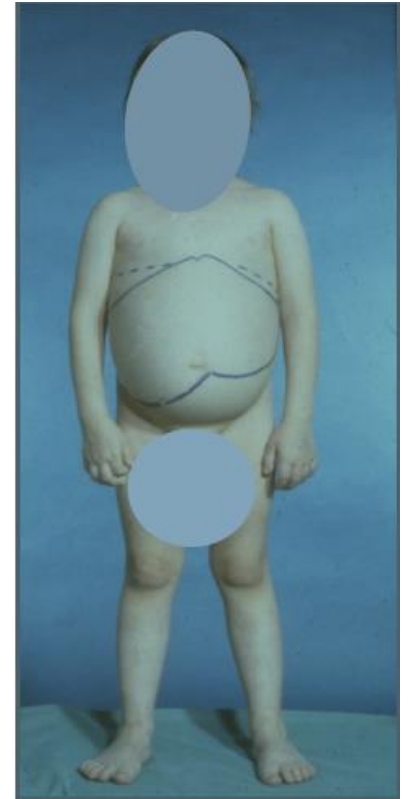
Glucose metabolism





Glycogeenstapelingsziekte Ia

- Hepatomegalie
- Kleine gestalte
- Hypoglycaemie (vasten)
- Laktaatacidose (vasten)
- Hyperlipidaemie
- Nierinsufficiëntie
- Jicht (hyperuricemie)





	Type I	Type III	Type VI, IX	FBS
Hypoglycemia	+++ - ++	++ - (+)	(+)	+
Lactic Acidosis	++	∅	∅	(+)
Fasting Ketosis	∅	++	+	++
Hyperlipidemia	++	++	+	++
Liver enzymes	∅ - +	++	+	+
CK elevation	∅	∅ - +	∅ - (+)	∅
Hyperurcemia	+	∅	∅	(+)
Renal tubular dysfunction	(+)	∅	∅	+++
Enlarged kidneys	++	∅	∅	+



Screenend metabool onderzoek bij leverziekte

Urine (minimaal 10 ml, bewaar in vriezer)

- urine stick
- organisch zuren, orootzuur
- suikers/polyolen
- MPS(E) (hepatosplenomegalie)
- mono-, di- en oligosacchariden (hepatosplenomegalie)
- urinezuur (hepatomegalie, hypoglycemie)
- galalcoholen (cholestase)

Plasma (1 ml)

- aminozuren
- transferrines
- acylcarnitines
- VLCFA + phyt/pris (cholestase/cirrhose)
- sphingolipiden
- SAM/SAH (cirrhose)

Bloed op ijs (1 ml)

- lactaat/pyruvaat + ketonen (lactaat acidose/hypoglycemie)



Fase II:

- Lysosomale enzymdiagnostiek (cirrhose/hepato(spleno)megalie)
- WES/genpanel
- (mt)DNA/Mitochondrieel spierbiopt



Secundaire afwijkingen bij leverfalen

- Hypoglycemie
- Hyperammoniamie
- Verhoogd galactose
- Verhoogd plasma aminozuren (o.a. tyrosine, phenylalanine, methionine)
- Afwijkend urine organische zuren profiel (4-hydroxyfenyl-lactaat/pyruvaat, (hydroxy)-dicarbonzuren)
- Afwijkend urine galzuur profiel (primaire galzuren en delta 4-3-oxo-galzuren)
- Verhoogd bloed lactaat
- Plasma koper, ASAT, ALAT, kan normaliseren



Take-home message

- Denk ook aan metabole aandoeningen als oorzaak voor leverziekte.
- Algemeen lab, screenend metabool onderzoek en specifieke testen.
- Er is goed overleg nodig tussen de clinicus en het laboratorium.
- Soms behandelbare aandoeningen.
- Veel zit (nog) niet in de neonatale hielprikscreening.
- Dit overzicht is zeker niet compleet.



Scriver OMMBID — The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.

Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment

(Fernandes J.), Saudubray J.M., Baumgartner M., Walter J.H. (Eds.) 6th Edition, 2022

Inherited Metabolic Diseases: A clinical approach

Published: 2017

Hoffmann G.F., Zschocke J., Nyhan W. L. (Eds.)

Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases

Published: 2022

Blau N, Dionisi Vici C, Ferreira C.R., C. Vianey-Saban, C.D.M. van Karnebeek (Eds.)

Vademecum Metabolicum (App of web versie: [Vademecum Metabolicum \(vademetab.org\)](http://vademecum.org))

Zschocke J. and Hoffmann G.F. (Eds.)

