

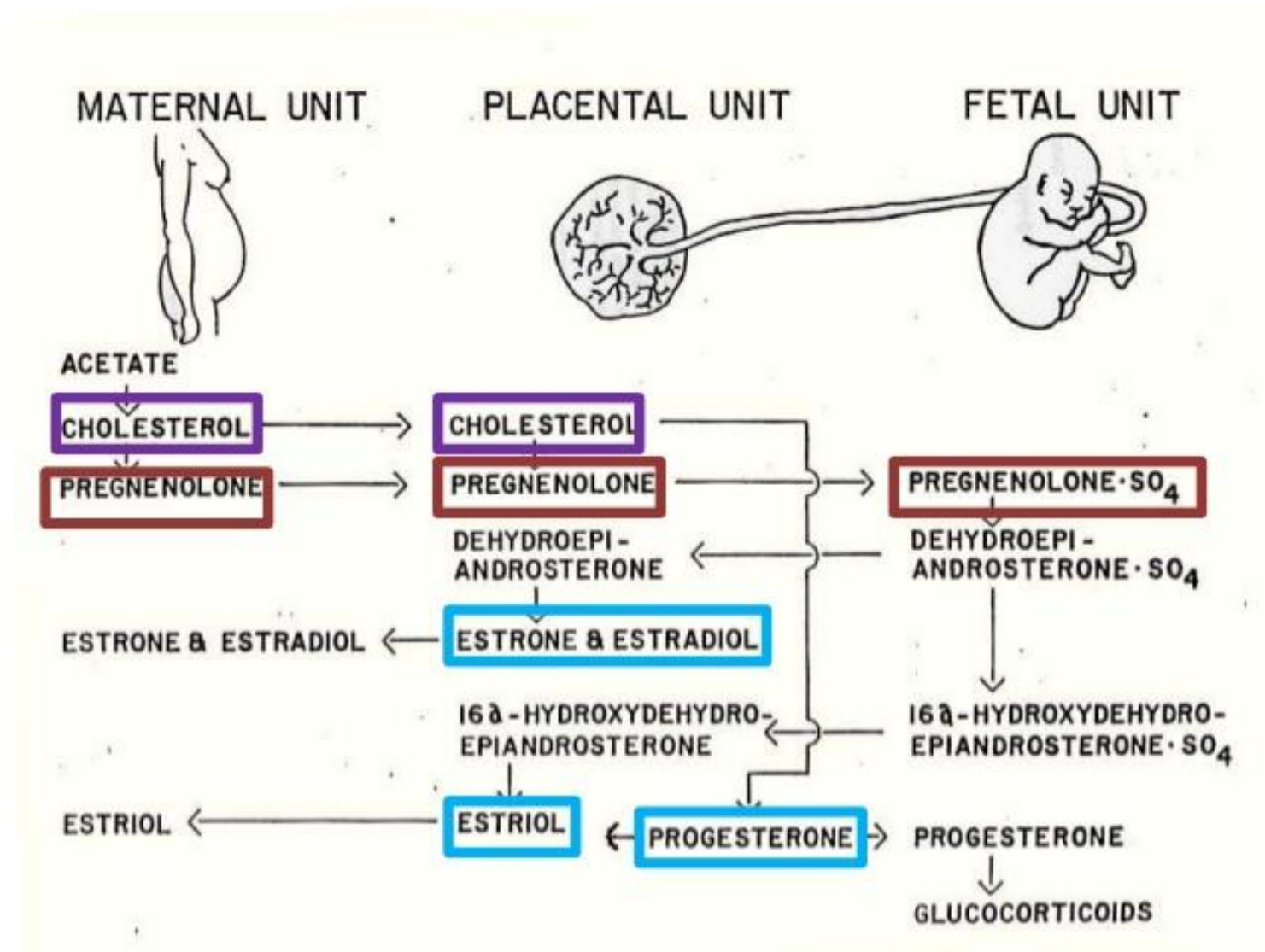
Szteroid hormonok multiplexált vizsgálata folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrométerrel

Karvaly Gellért Balázs

SE Laboratóriumi Medicina Intézet

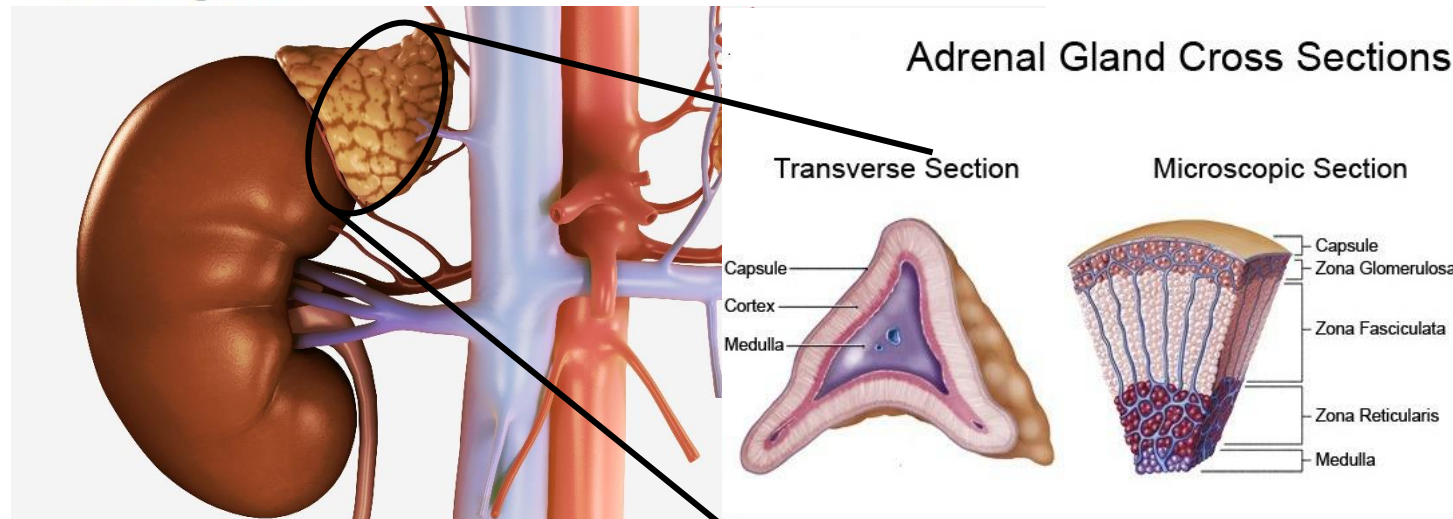
Tömegspektrometriai és Elválasztástechnikai Laboratórium

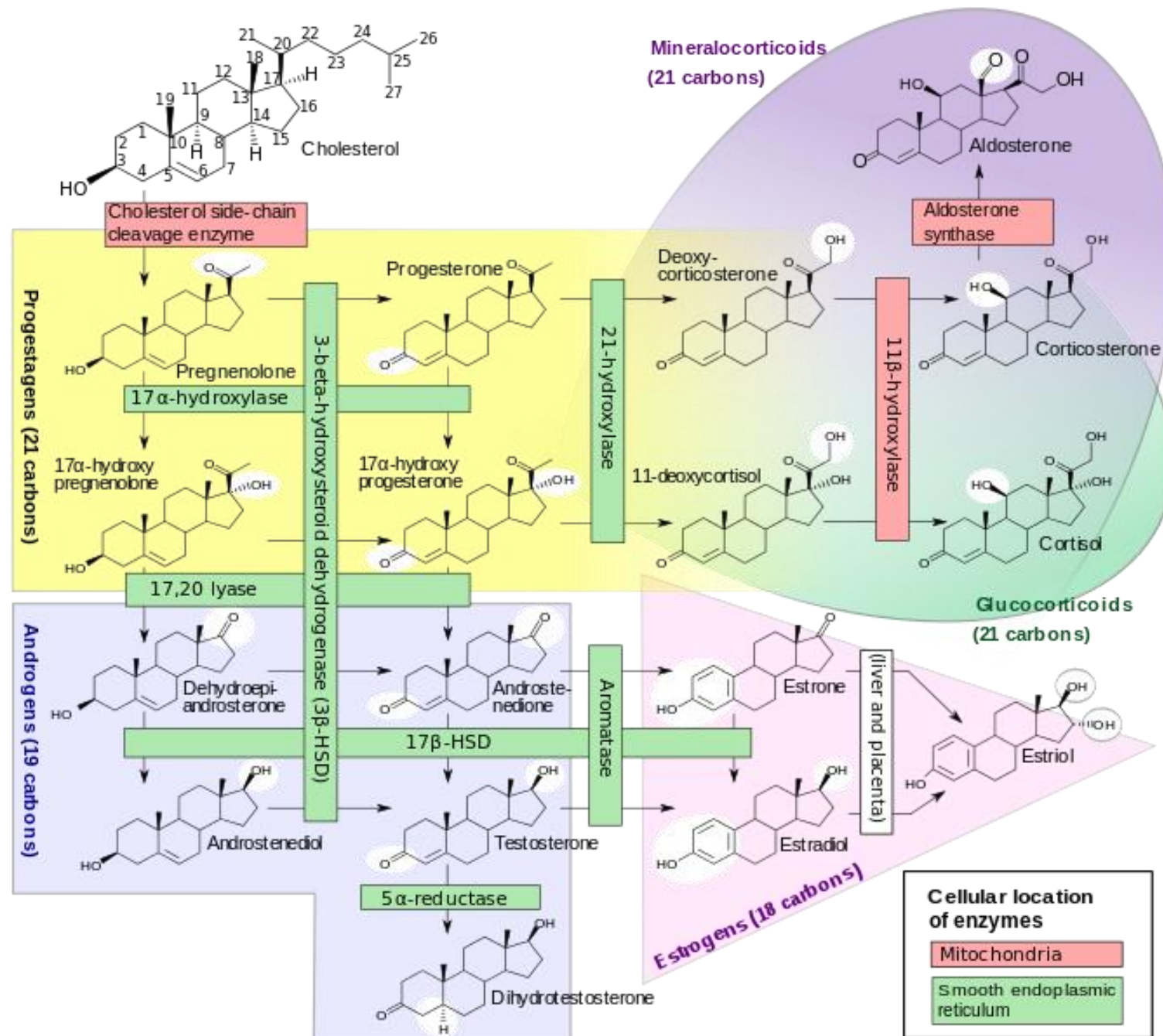
A mellékvesekéreg szteroidok termelése magzati korban megkezdődik





Here are normal adrenal glands. Each adult adrenal gland weighs from 4 to 6 grams.

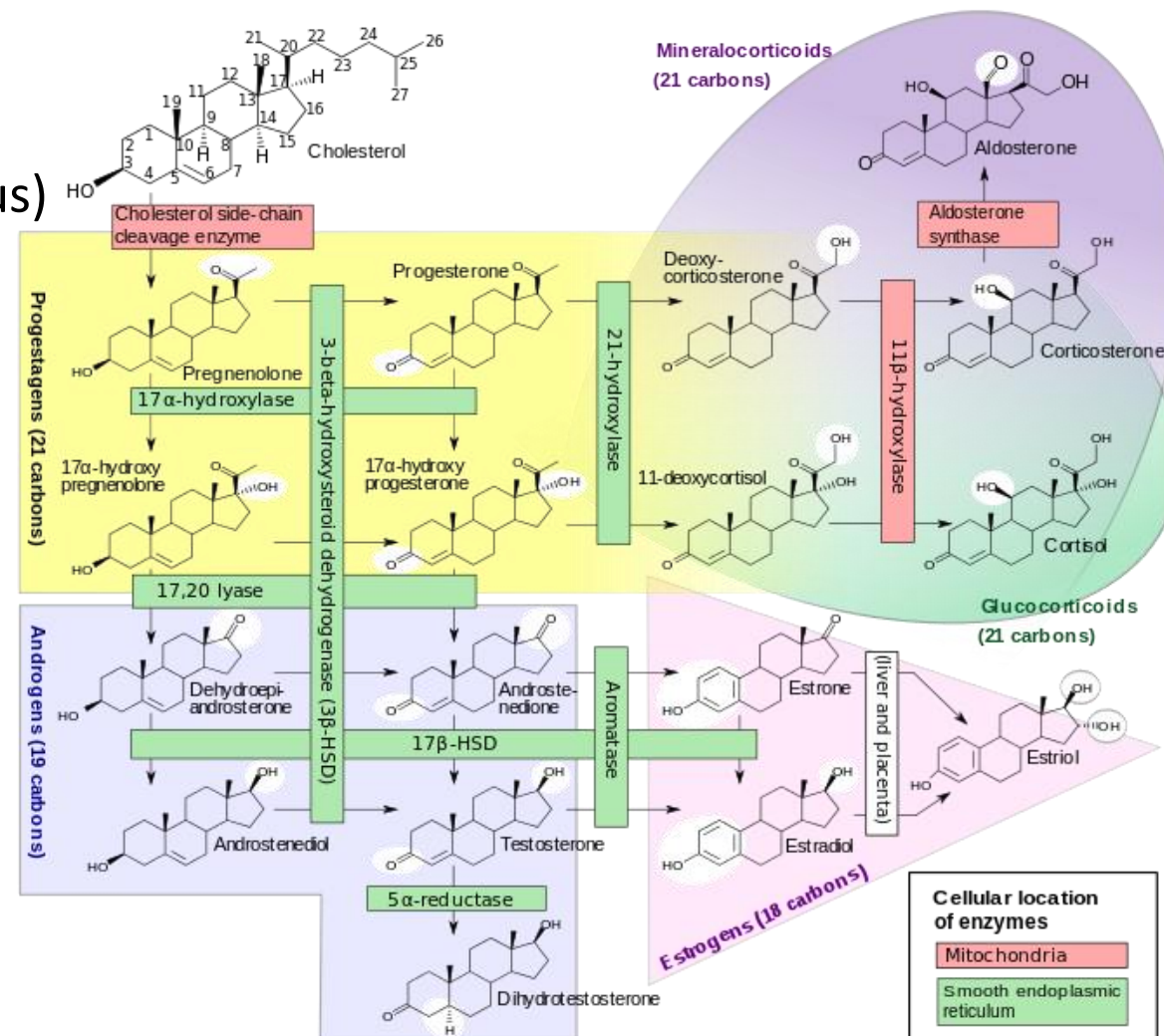


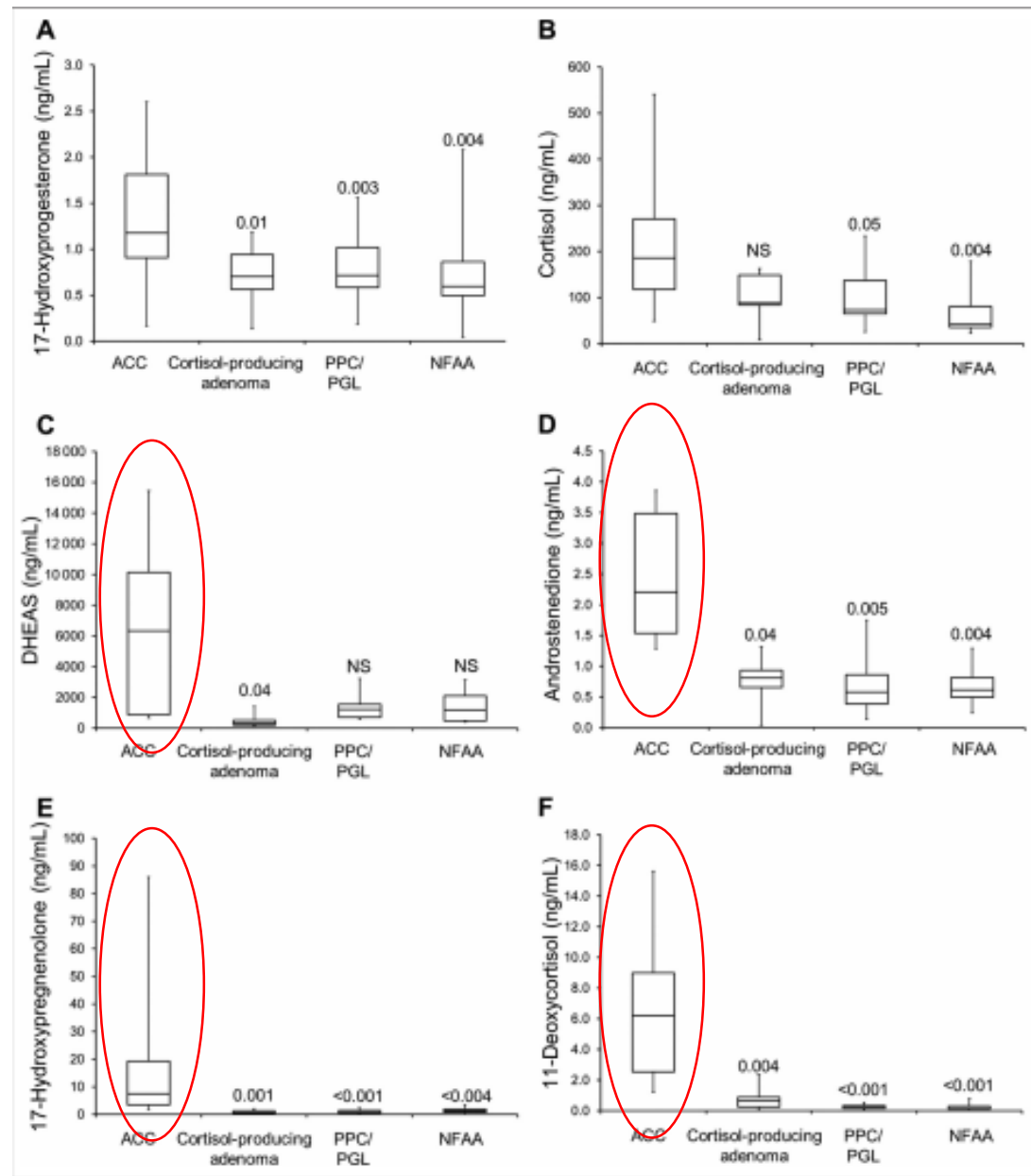


A szérum szteroid profil vizsgálat helye a laboratóriumi diagnosztikában

- szűrés, diagnózis és az állapot, illetve a terápia nyomon követése:

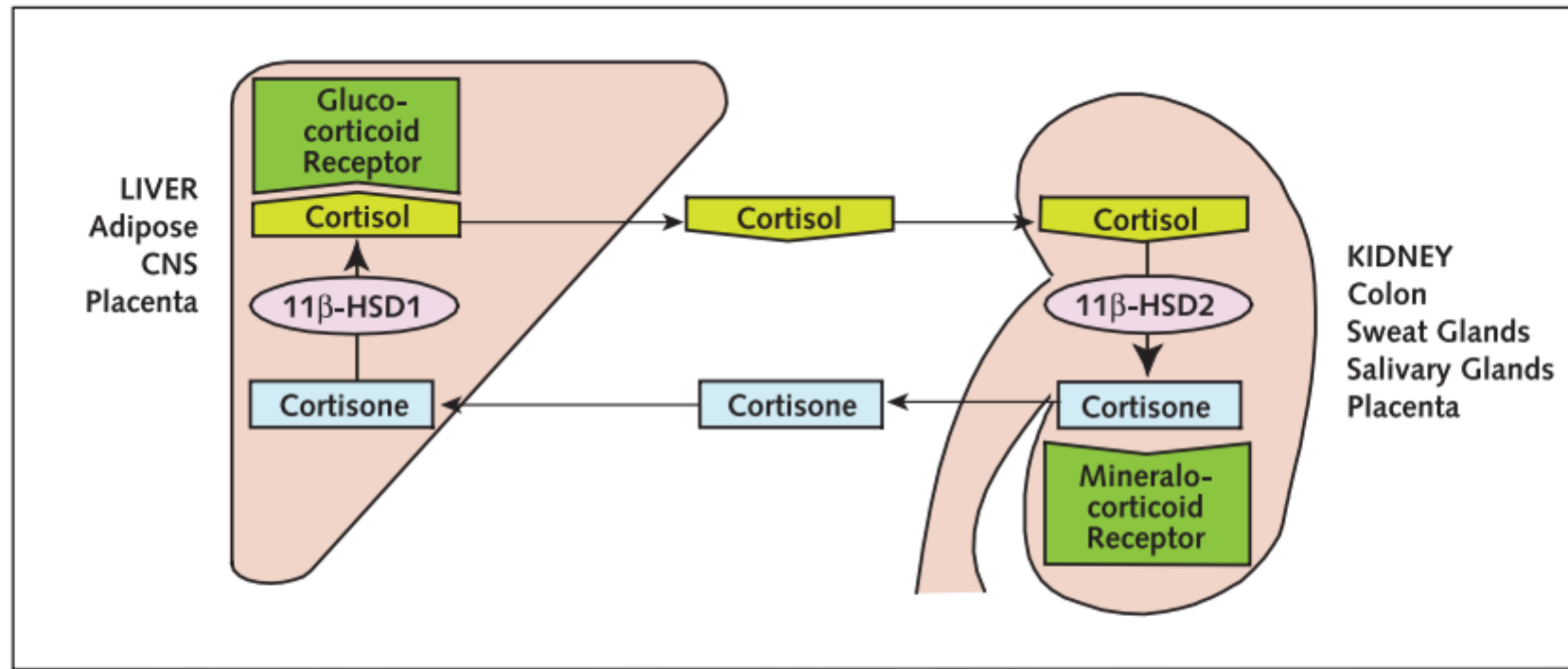
- kongenitális adrenális hiperplázia
 - 21-hidroxiláz hiány (CYP21A2)
 - 11 β -hidroxiláz hiány
 - 17 α -hidroxiláz/17-20 liáz hiány (CYP17A defektus)
 - 3 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz hiány
 - kongenitális lipoid mellékvese hiperplázia
 - P450 oxidoreduktáz hiány
- Cushing-kór
- mellékvesekéreg elégtelenség (primer/szekunder)
- hiperaldosztionizmus
- mellékvesekéreg tumorok
- a HPA tengely és a gonádok egyéb funkciózavarai
- gyógyszeres kezelések mellékhatásai
- policisztás ovárium szindróma





Taylor DR et al. Clin Chem 2017;63:1836.

Figure 3. The cortisol–cortisone shuttle.

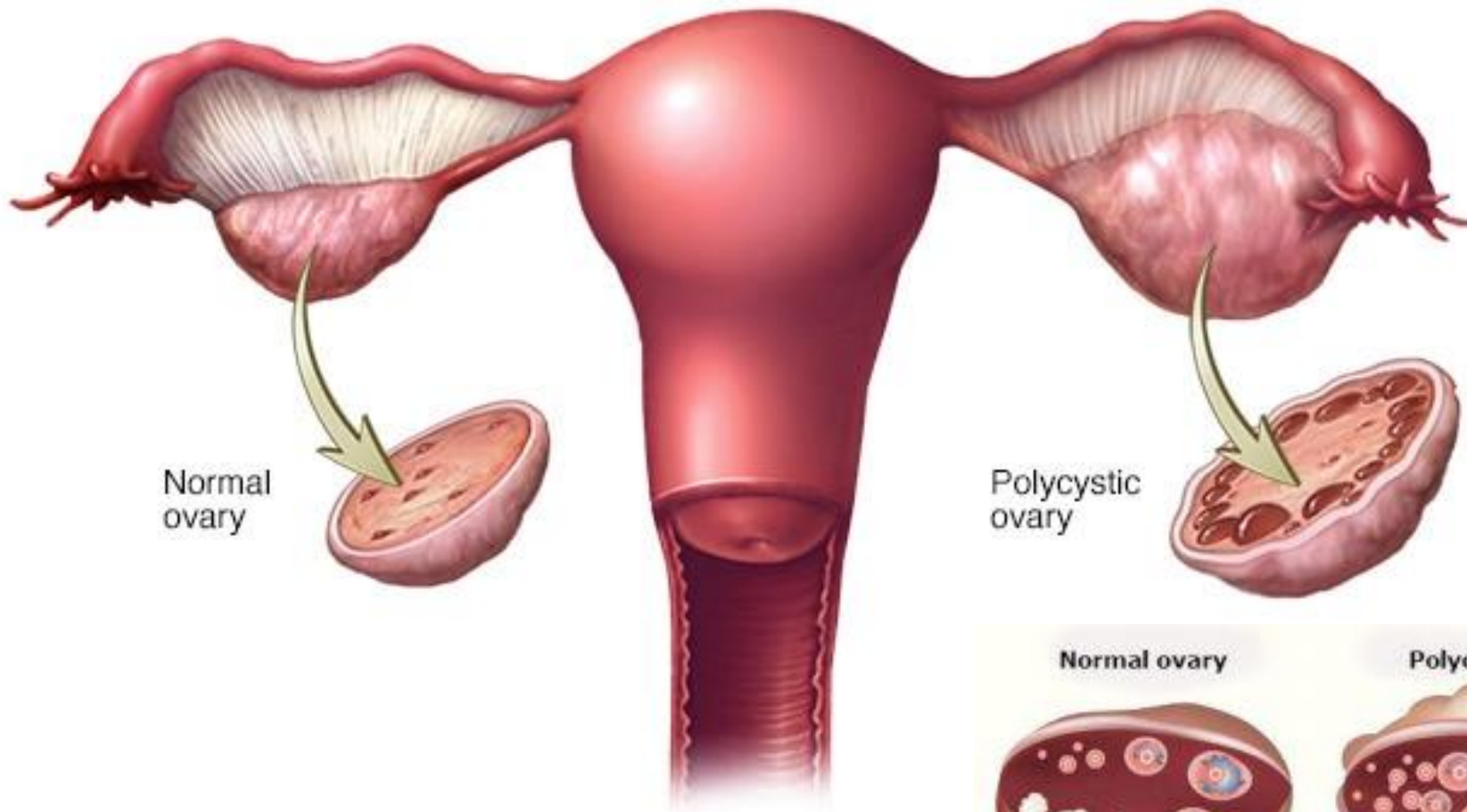


The effect of cortisol on the mineralocorticoid receptor (for example, in the kidney) is prevented by metabolism to inactive cortisone by the enzyme 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β -HSD2). Cortisone can be reactivated to cortisol by the enzyme 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β -HSD1). When cortisol level is very high (as in the Cushing syndrome), not all of the excess cortisol can be inactivated to cortisone, and the effects of mineralocorticoid excess (for example, hypertension and hypokalemia) can occur. Modified from Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1—a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*. 2001;142(4):1371-6, with permission from The Endocrine Society (19). CNS = central nervous system.

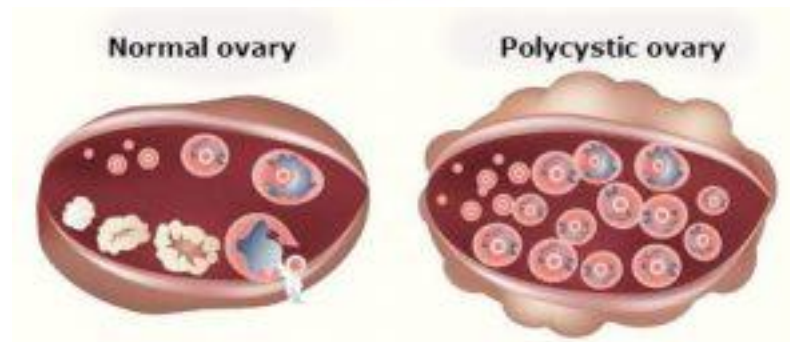
Androgén termelés - a mellékvesekéregben is

- a keringő tesztoszteron 1%-a (férfiak), illetve 30-50%-a (nők)
- az androsztendion kb. 50%-a
- DHEA, DHEAS és egyéb előandrogének

Policisztás ovárium szindróma



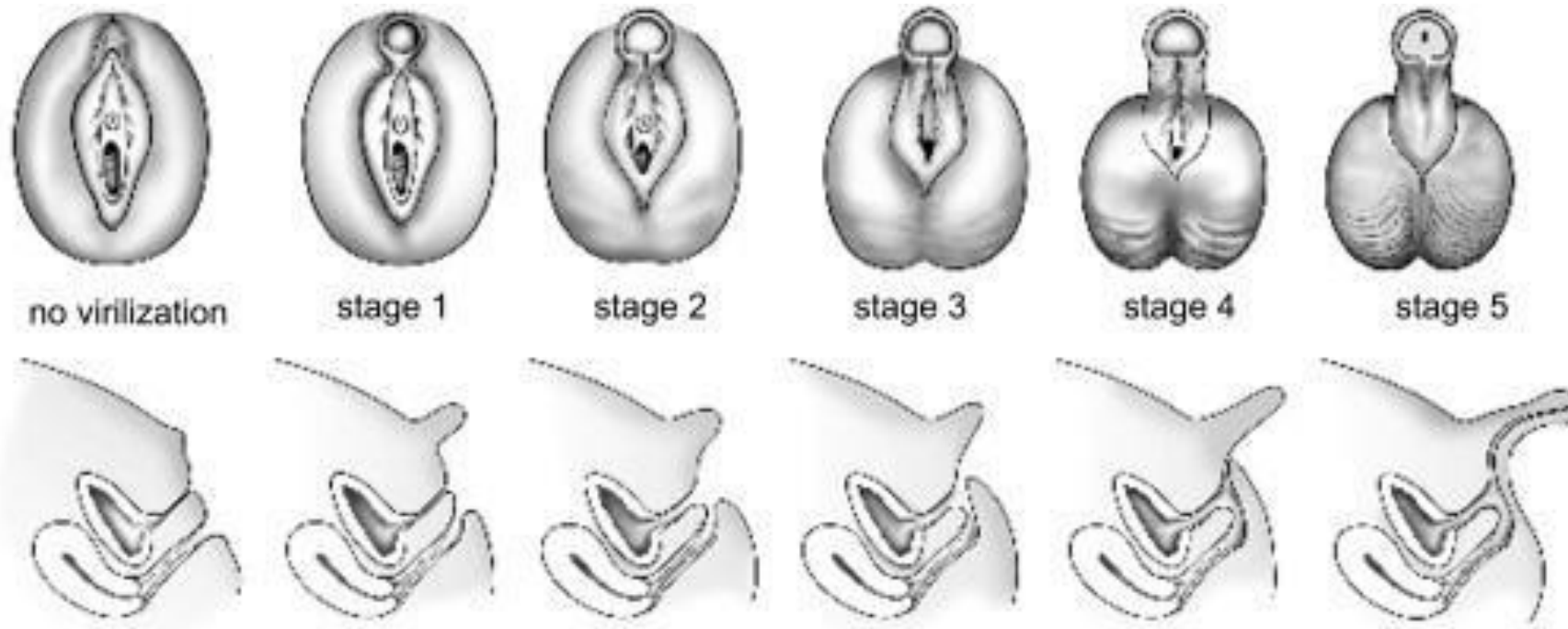
- rendszertelen menstruáció
- androgén túlsúlyból eredő tünetek: hirsutismus, kopaszodás, acnek
- petefészek működési rendellenesség



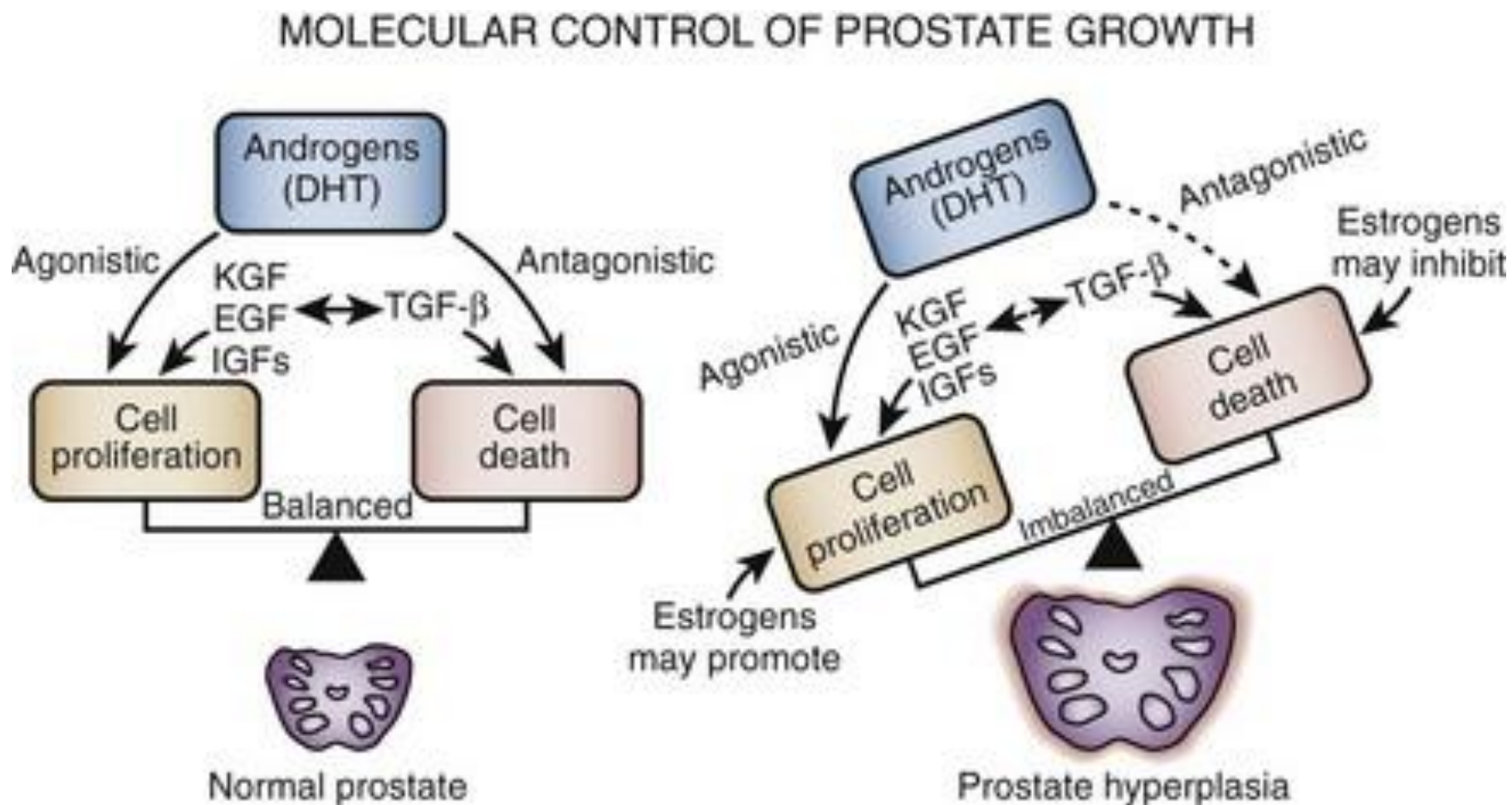
A PCOS-sel járó komplikációk

- terméketlenség
- gesztációs diabétesz, terhesség alatti magas vérnyomás
- vetélés, koraszülés
- steatohepatitis
- metabolikus szindróma
- diabétesz
- alvási apnoe
- depresszió, szorongás
- vizeletürítési zavarok
- malignus elváltozás az endometriumban

5 α -reduktáz hiány: a gyermek neme nem egyértelmű

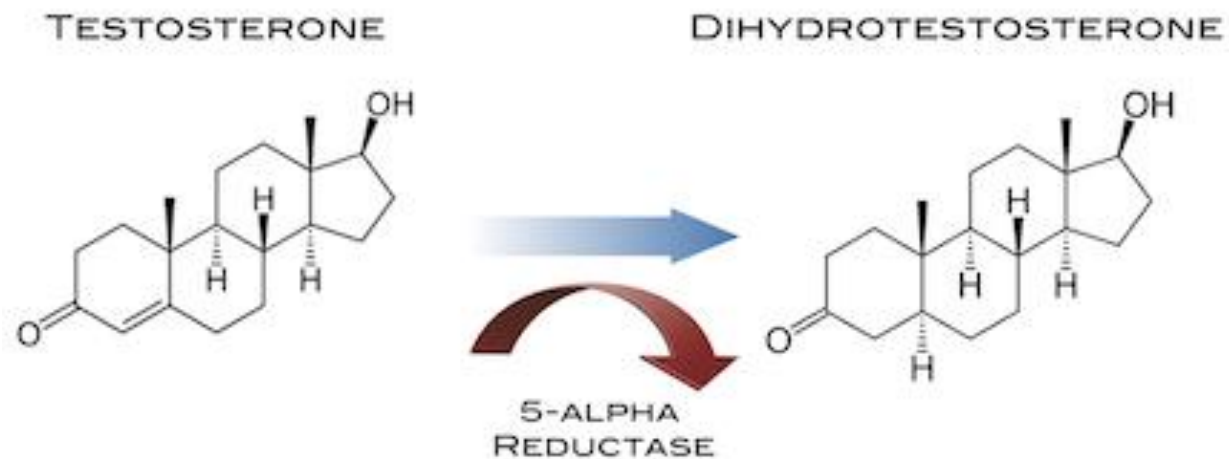


A dihidrotesztoszteron a prosztatata hiperplázia kialakulásában kulcsszerepet játszik



5 α -reduktáz inhibitor gyógyszerek

- finasteride
 - dutasteride
 - alfatradiol
- indikációk:
 - benignus prosztata hiperplázia
 - kopaszodás, hajhullás



Requirement for Mass Spectrometry Sex Steroid Assays in the *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*

D. J. Handelsman and L. Wartofsky

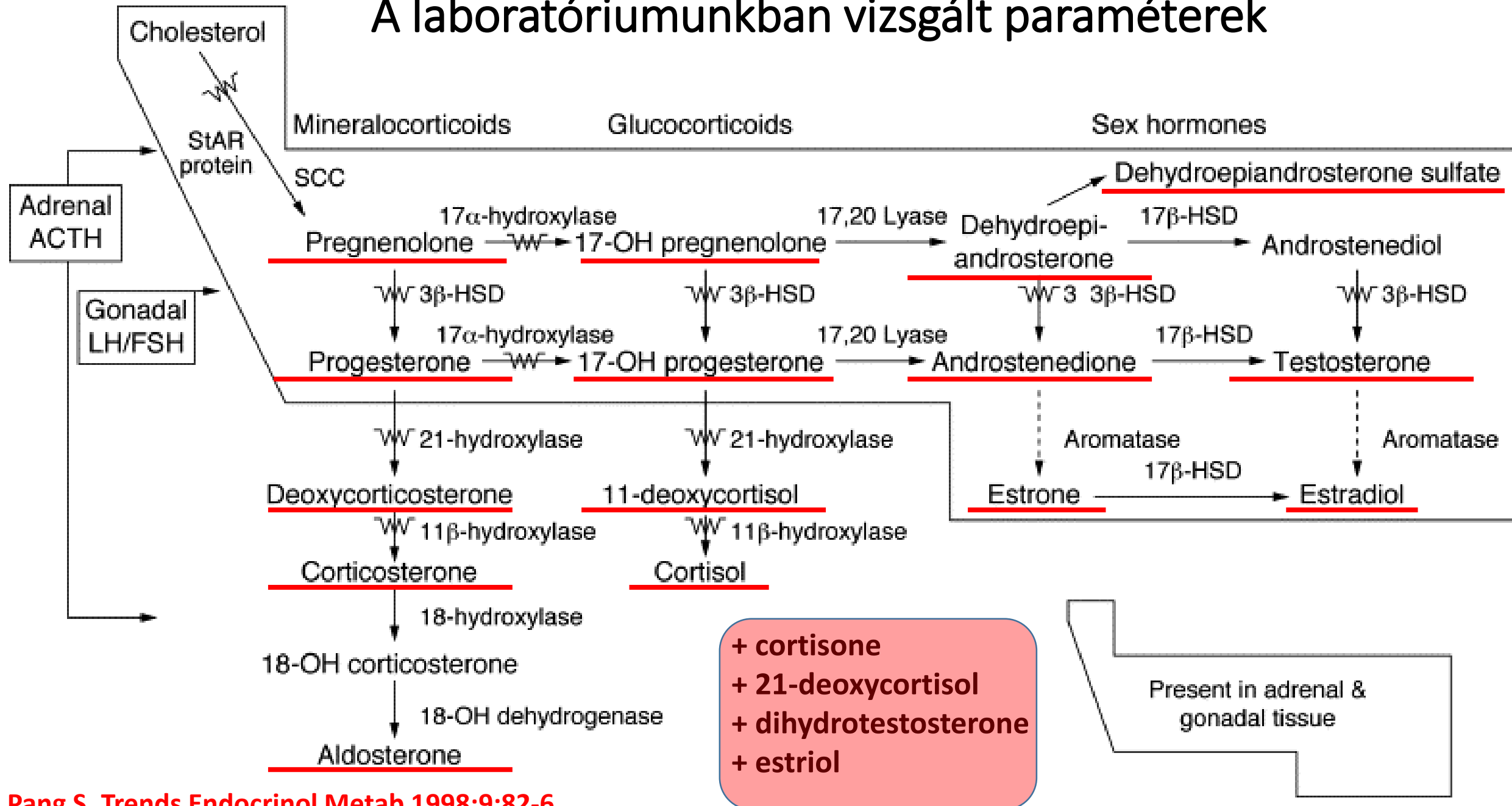
ANZAC Research Institute (D.J.H.), Concord Hospital, University of Sydney, Sydney, NSW 2139, Australia; and Department of Medicine, Washington Hospital Center (L.W.), Washington, DC 20010

assays, The Endocrine Society commissioned two Position Papers written by experienced immunoassayists on the challenges to T (18) and estradiol (19) measurement and supported a renewed effort to standardize T assays (20). Although all assays require rigorous quality control to minimize random errors, additional methodological limitations of steroid immunoassay technology constituting systematic errors are impervious to such performance-based standardization. For example, the method-specific bias of immunoassays, a function of antibody epitope, allows for cross-reactivity in all steroid assays with steroid precursors, metabolites, and/or conjugates as well as matrix effects for unextracted direct assays. These limitations are aggravated by regular changes in proprietary assay reagents, especially, but not only, primary antibodies causing changed assay cross-reactivity profiles. Typically, validation of such modified assays via correlation of new with old assays (rather than with the reference method) allows for subtle, gradual “drift” in assay performance from reference standards. The net effect of method-specific bias is that steroid immunoassays do not constitute durable, definitive chemical measurements, independent of method, like hemoglobin, cholesterol, urea, and creatinine for which measurements are comparable in studies separated widely in time, place, and/or laboratory. Such long-term assay “drift” and inaccuracy is troublesome in epidemiology (19) and in evaluating temporal trends in population-based studies (21, 22) where the noncompa-

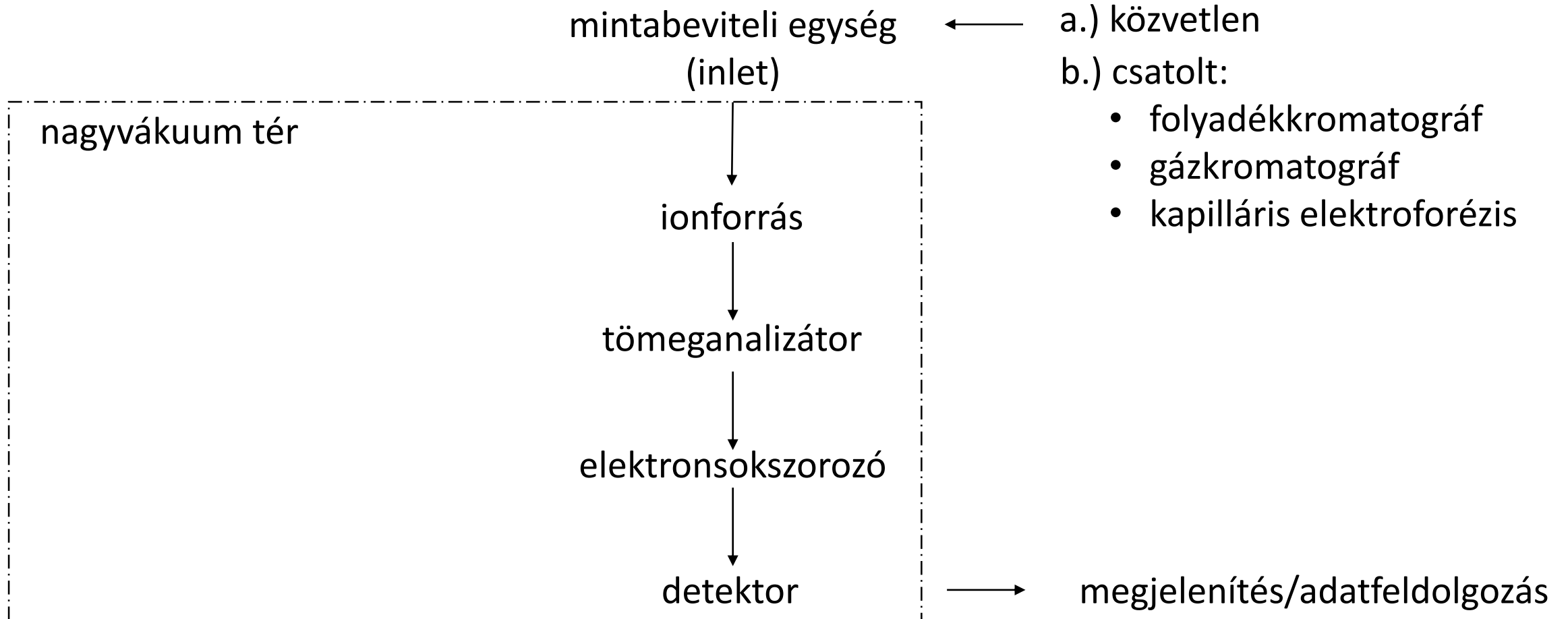
over. Over recent years an increasing number of manuscripts submitted to the *JCEM* have been rejected, largely for their reliance on direct steroid immunoassays as major endpoints. Because the *JCEM* remains a leader in publishing clinical endocrinology research, reflected in consistently high bibliometrics (total citations, Eigenfactor score), the *Journal* is taking the next step (24) in setting acceptable assay standards for the field in upgrading its submission requirements for publication of studies using sex steroid measurements. **Effective January 1, 2015, manuscripts reporting sex steroid assays as important endpoints must use MS-based assays including reporting or citing their methods with sufficient detail to allow them to be reproduced together with standard quality control, specificity, and reproducibility metrics.** Some limited editorial discretion may be exercised for rare circumstances, such as where a study reports hormone measurements made long ago and where samples no longer exist; however, that would not extend to the sort of high-quality, well-designed clinical studies that the *JCEM* expects to publish where it is expected that extra serum samples would be stored for key endpoints. **It is anticipated that this requirement for MS-based assays will extend to adrenal steroids and vitamin D in the near future.**

In introducing the new standard, the *Journal* makes provision for a realistic timescale for the switchover. This allows for changes in planning or conduct of clinical research to comply with the new requirement. Although re-

A laboratóriumunkban vizsgált paraméterek



A tömegspektrométer felépítése



F. W. Aston: az első tömegspektrográf (1912)



The Nobel Prize in Chemistry 1922 was awarded to Francis W. Aston *"for his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule"*.

Ionforrások	Tömeganalizátorok
<i>Elektroporlasztásos ionizáció (ESI)</i>	<i>Kvadrupol</i>
Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció	Ioncsapda
Atmoszférikus nyomású fotoionizáció	Lineáris ioncsapda
Elektron ionizáció	Quadrupole-ioncsapda
Kémiai ionizáció	<i>Repülési idő analizátor</i>
Nanospray ionizáció	Mágneses kettős fókuszálású analizátor
Szíkra ionizáció	Radiofrekvenciás tömeganalizátor
Termospray ionizáció	Fourier transzformációs tömeganaizátor
Field ionizáció	Mágneses szektor analizátor
Field deszorpció	Ion ciklotron rezonancia analizátor
Gyors atom bombázás	Fordított geometriájú analizátor
Multifoton ionizáció	Hibrid
Plazma deszorpció	Elektronikus szektor
Lézer deszorpció (<i>MALDI</i> , SELDI, infravörös)	Orbitrap
Korona kisülés ionizáció	

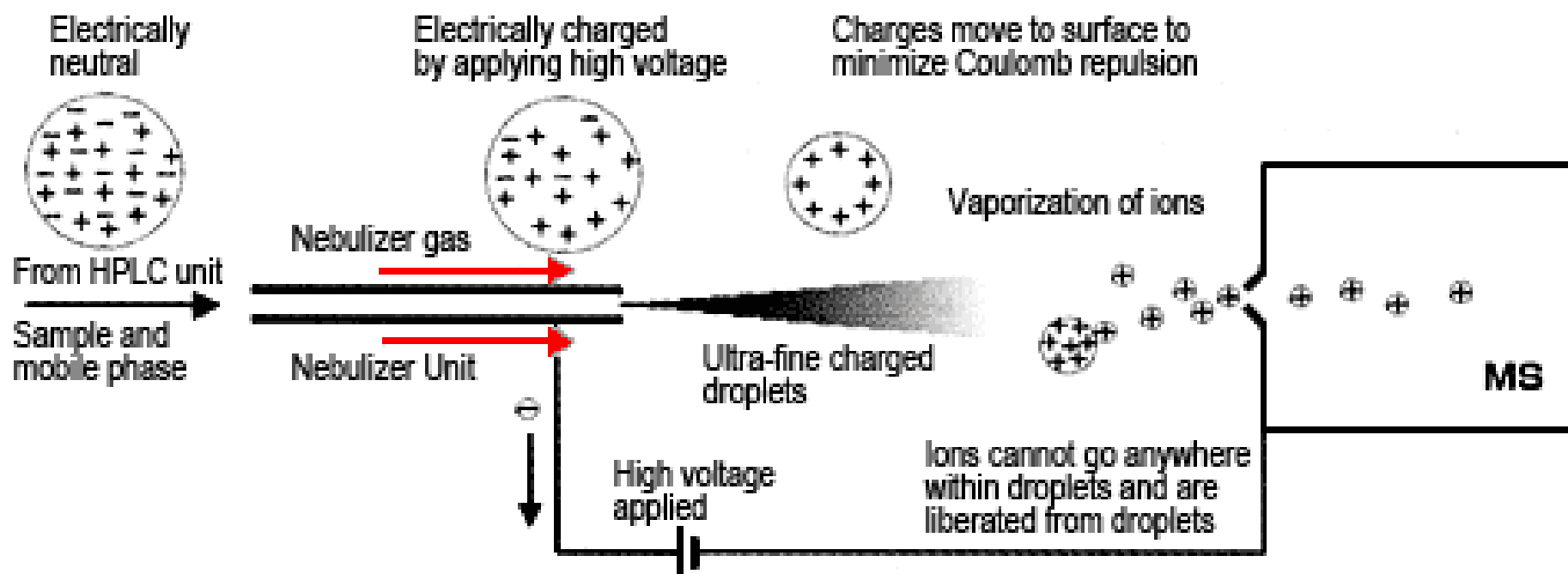
Mikor jó ötlet MS alapú vizsgálati módszereket használni?

- ha olyan diagnosztikai információhoz jutunk, amely más technológiával nem elérhető,
- ha nagy érzékenységű vizsgálatokat kell megfelelő teljesítmény jellemzőkkel végezni (elsősorban nagy pontossággal, precizitással és reprodukálhatósággal),
- ha több olyan vegyület egymás melletti meghatározására van szükség, amelyek egyidejű jelenléte analitikai szempontból zavaró,
- rugalmas módszerre van szükség, amely a későbbiekben módosítható, szűkíthető, vagy bővíthető,
- nagyszámú minta esetén költséghatékonysági céllal.

Tömegspektrometria vs immunoassay

szempont	tömegspektrometria	immunoassay
érzékenység	<1 nmol/l	<1 nmol/l
specifikusság	kontrollálható	nem kontrollálható
módszer testreszabása	lehetséges	nem lehetséges
gyári reagenskészlet	nem jellemző	jellemző
mátrix	változatos	nem kontrollálható
megbízhatóság	megfelelő, kontrollálható	nem kontrollálható
üzemben tartási költség	magas	közepes
egy paraméterre eső költség	0,5 – 50 USD	széles tartományban változó
a vizsgálatok elvégzése szakembert igényel	igen	nem
bekerülési költség	magas	alacsony vagy nincs

Elektroporlasztásos ionizáció (ESI)



<https://www.youtube.com/watch?v=paKlu1-ChA>

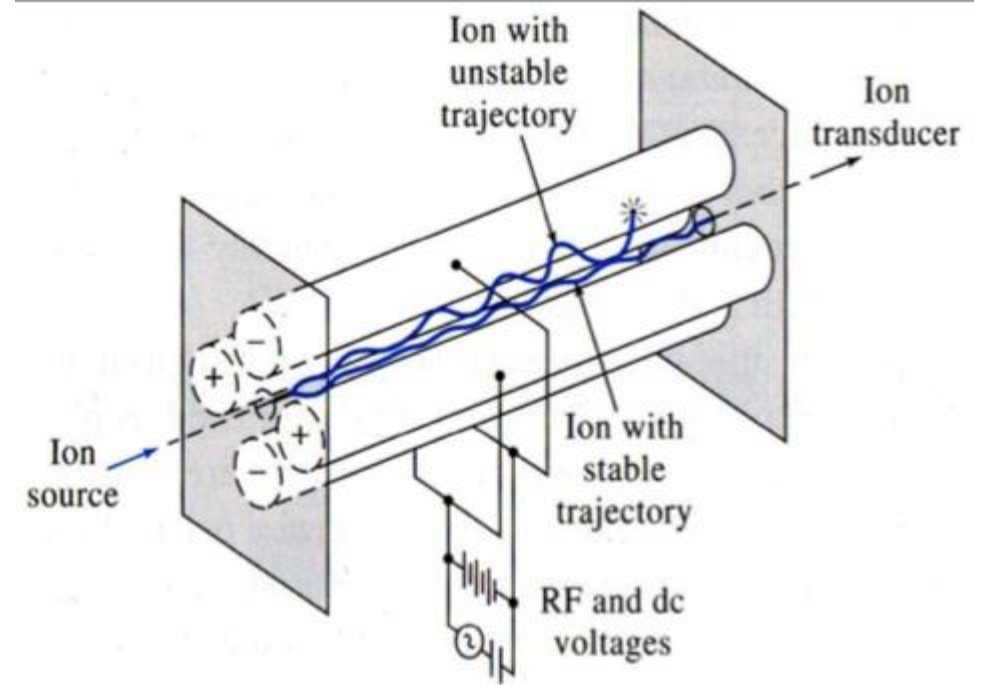
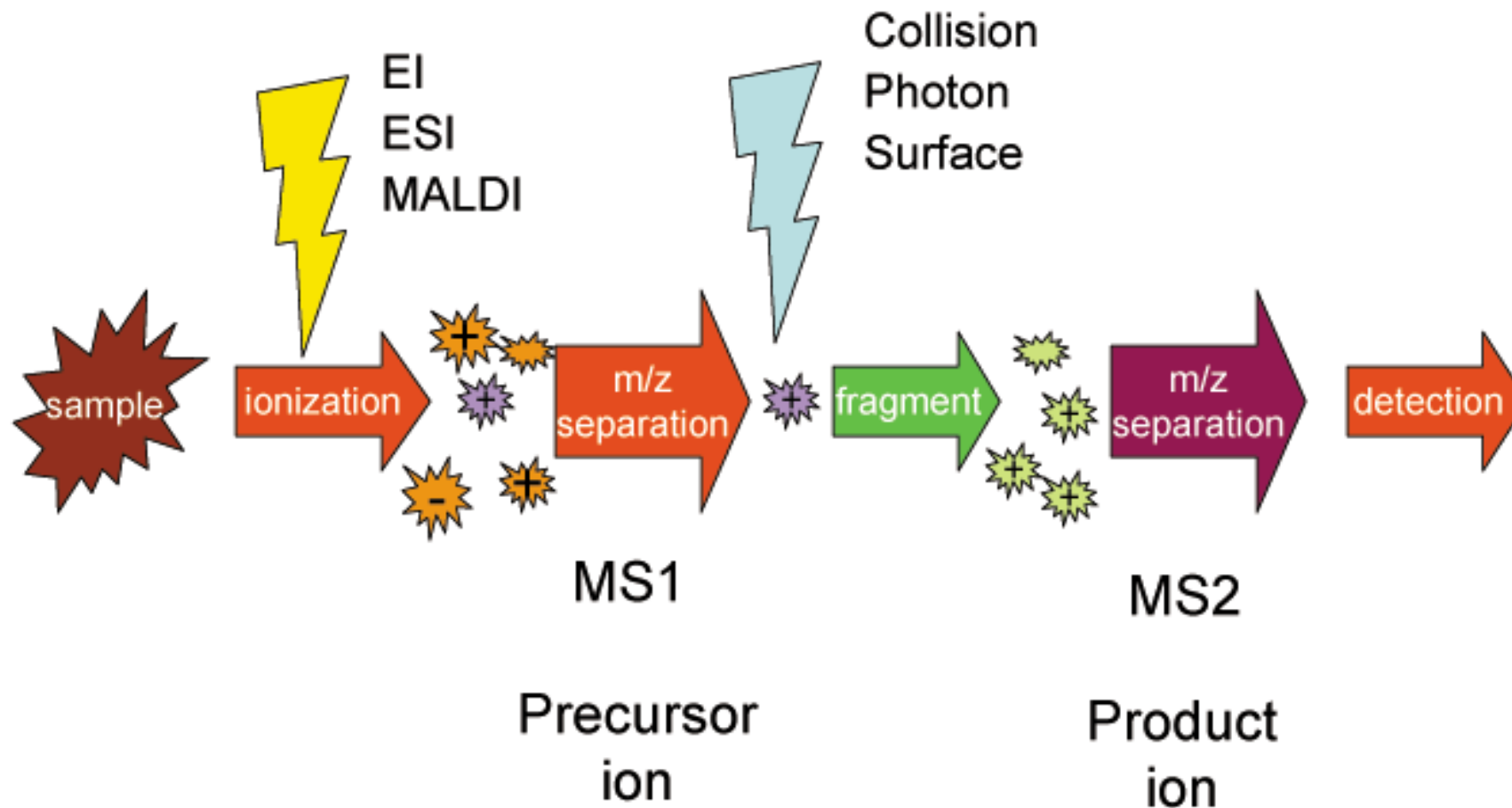


FIGURE 11-6 A quadrupole mass spectrometer.

Tandem tömegspektrometria



A hármas kvadrupol rendszer belülről

<https://www.youtube.com/watch?v=Jc1uC6EbMCs>

Az LC-MS/MS vizsgálat folyamata

a minta komponenseit folyadékkromatográfiával elválasztjuk



a komponenseket ionizáljuk: a molekulaion jellemző a szerkezetre



a molekulaiont fragmentáljuk: kiválaszthatóak a szerkezetre
nagymértékben vagy egészében specifikus ionok



elvégezzük a mennyiségi analízist

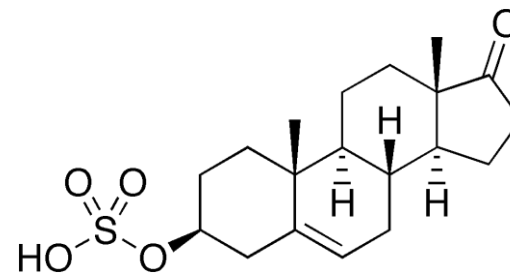
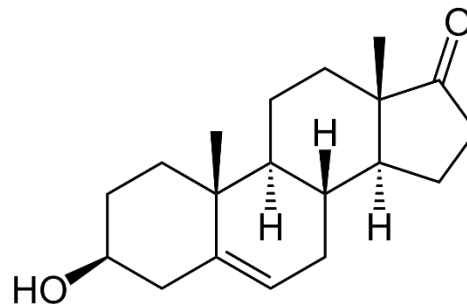
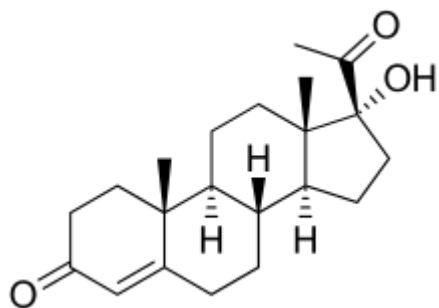
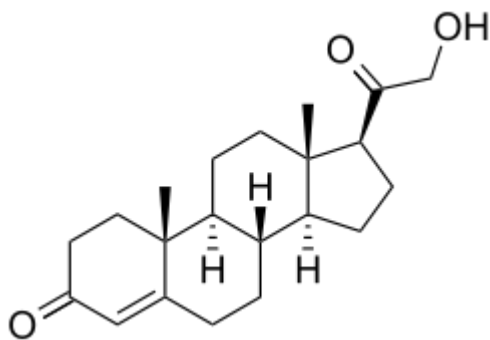
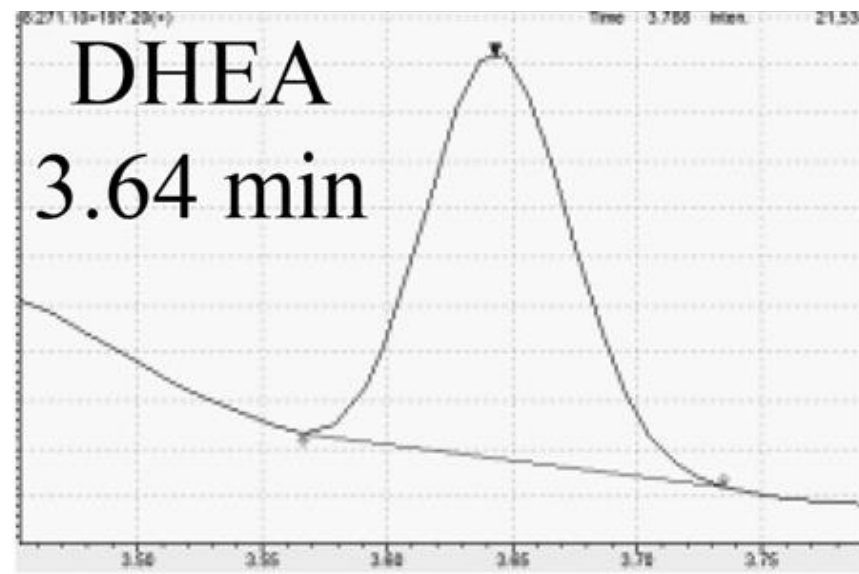
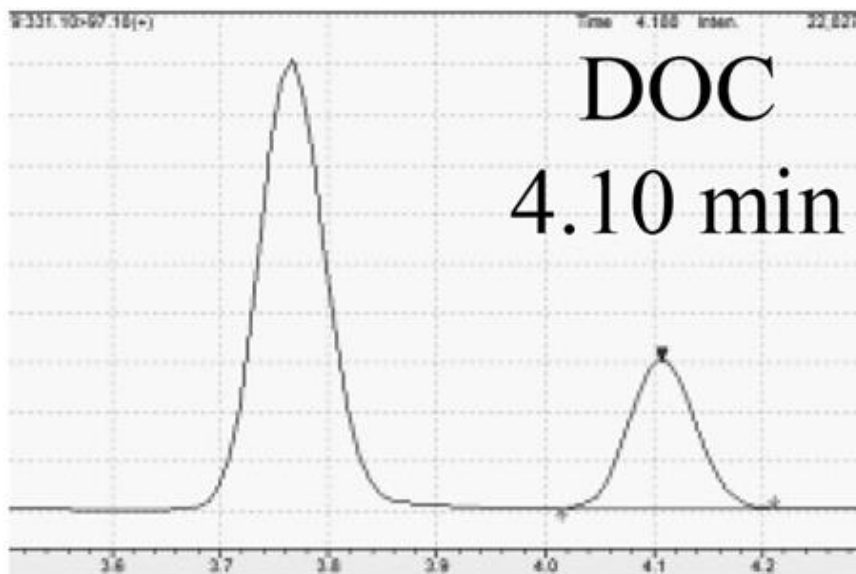
Vizsgálati stratégia

- vizsgálati minta: natív szérum, legalább 0,25 ml
- független kalibrátorokat és kontrollokat használunk (kivéve: pregnenolon, 17α -hidroxipregnenolon)
- minta-előkészítés: fehérje mentesítés, szilárd fázisú extrakció, oldószercsere
- mérés (5,5 min):
 - elválasztás: ultrahatékonyaságú folyadékkromatográf; fordított fázisú, két dimenziós kromatográfia
 - detektálás: elektropray ionizáció, hármass kvadrupol tandem tömegspektrométer

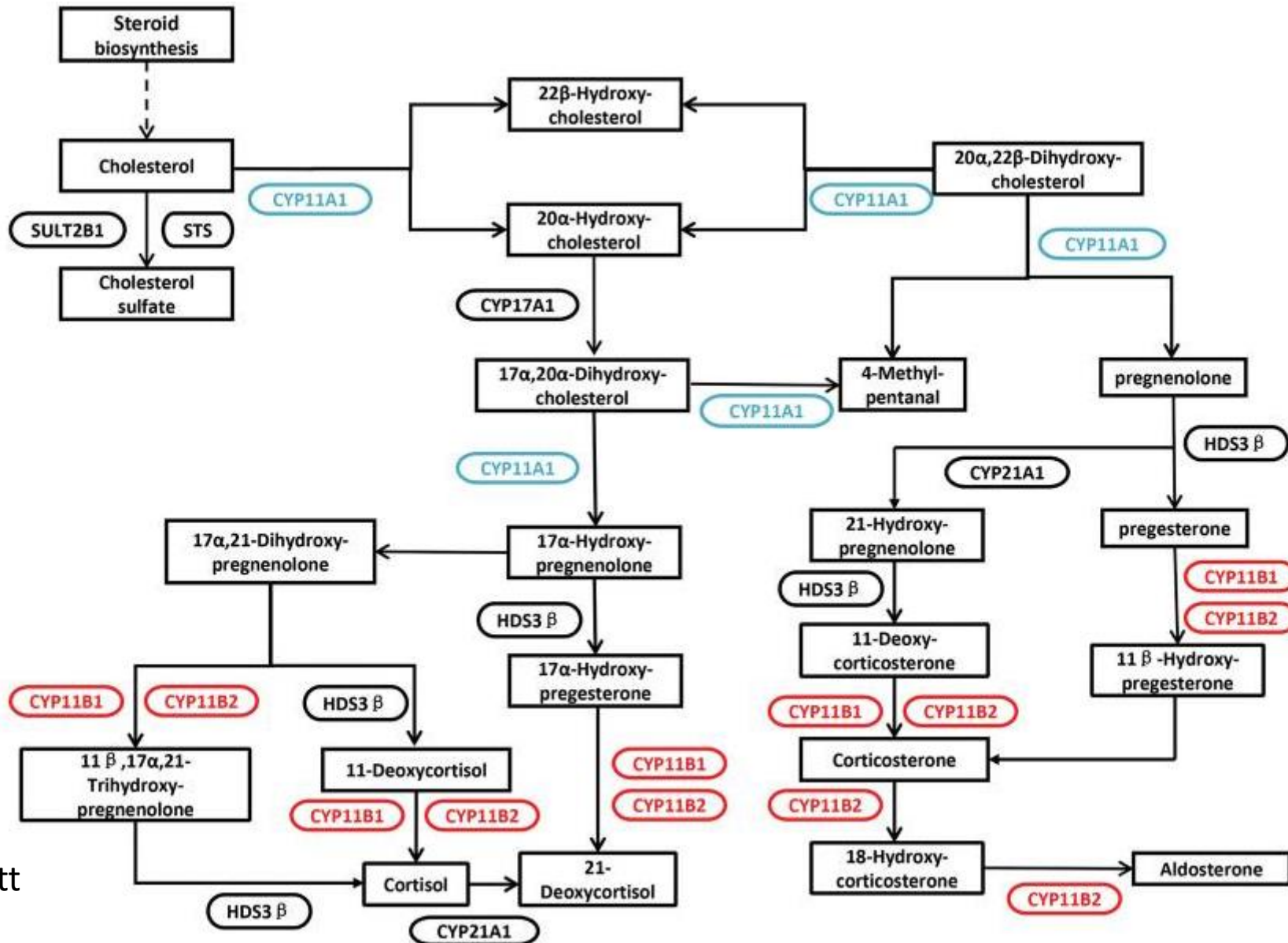
Kihívások: jelentős koncentrációbeli különbségek és széles mérési tartományok

Alacsony koncentrációban vannak jelen	Közepesen magas koncentrációban vannak jelen	Magas koncentrációban vannak jelen
aldoszteron (0,02-3 ng/ml)	DHEA (1-60 ng/ml)	DHEAS (115-6000 ng/ml)
androsztendion (0,2-15 ng/ml)	17 α -hidroxipregnenolon (0,3-60 ng/ml)	kortizol (10-300 ng/ml)
11-deoxikortikoszteron (0,05-3 ng/ml)	17 α -hidroxiprogeszteron (0,1-25 ng/ml)	
11-deoxikortizol (0,09-14 ng/ml)	kortikoszteron (0,5-50 ng/ml)	
21-deoxikortizol (0,07-5 ng/ml)	kortizon (1-40 ng/ml)	
dihidrotesztoszteron (0,05-1 ng/ml)	pregnenolon (0,3-60 ng/ml)	
progeszteron (0,15-25 ng/ml)		
tesztoszteron (0,05-12 ng/ml)		

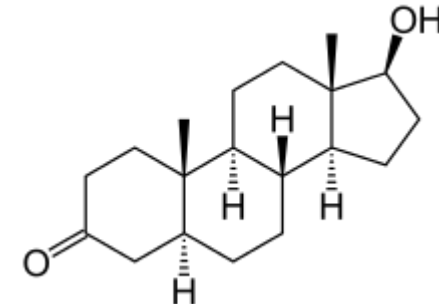
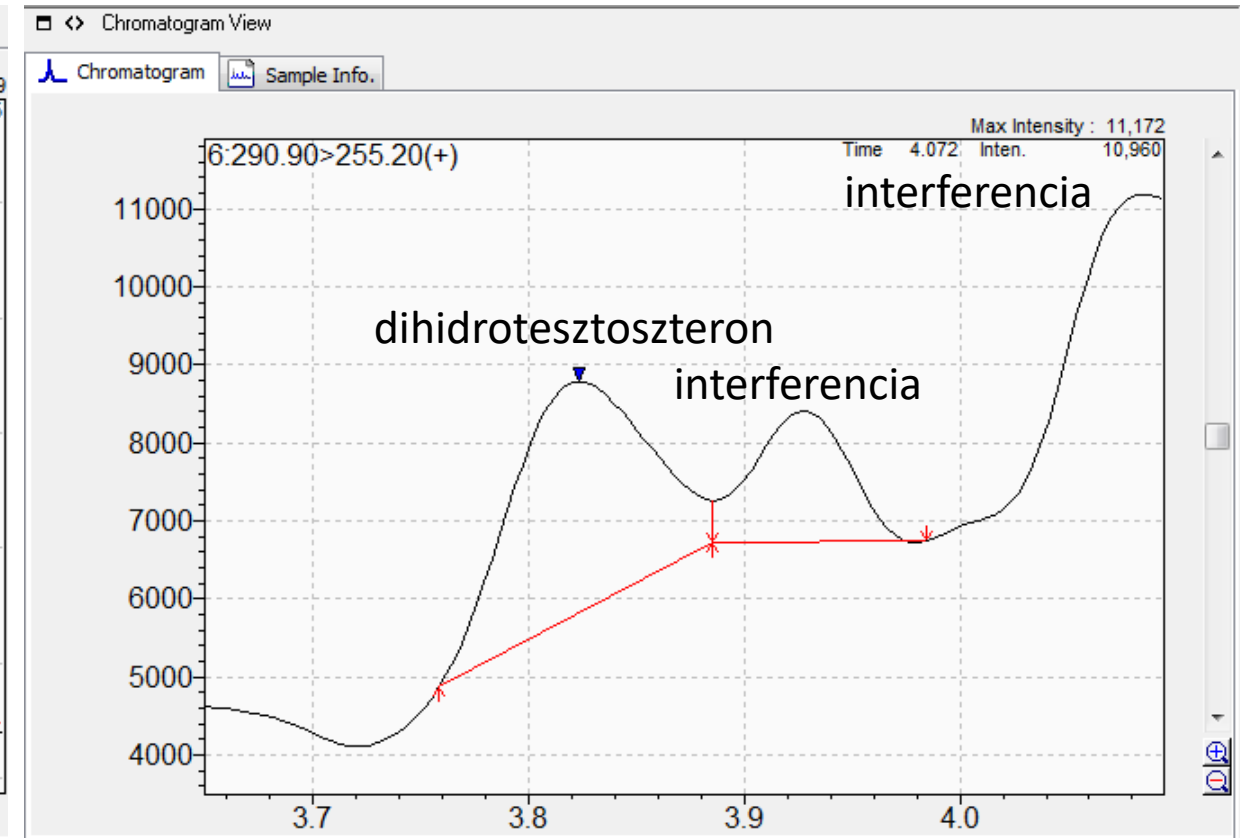
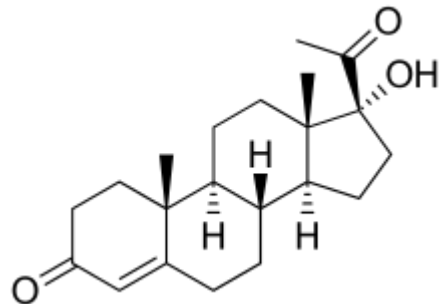
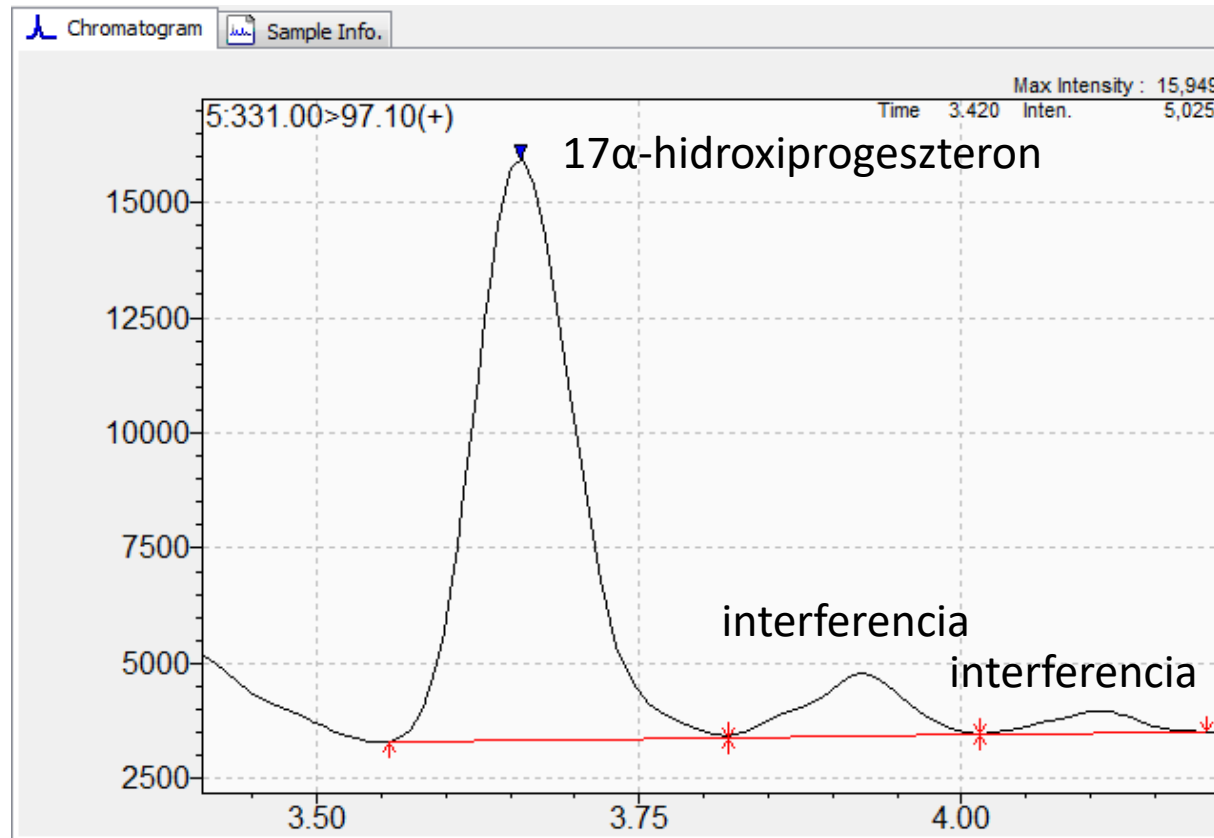
Kihívások: azonos molekulatömegű és hasonló szerkezetű
(izobárikus) komponensek



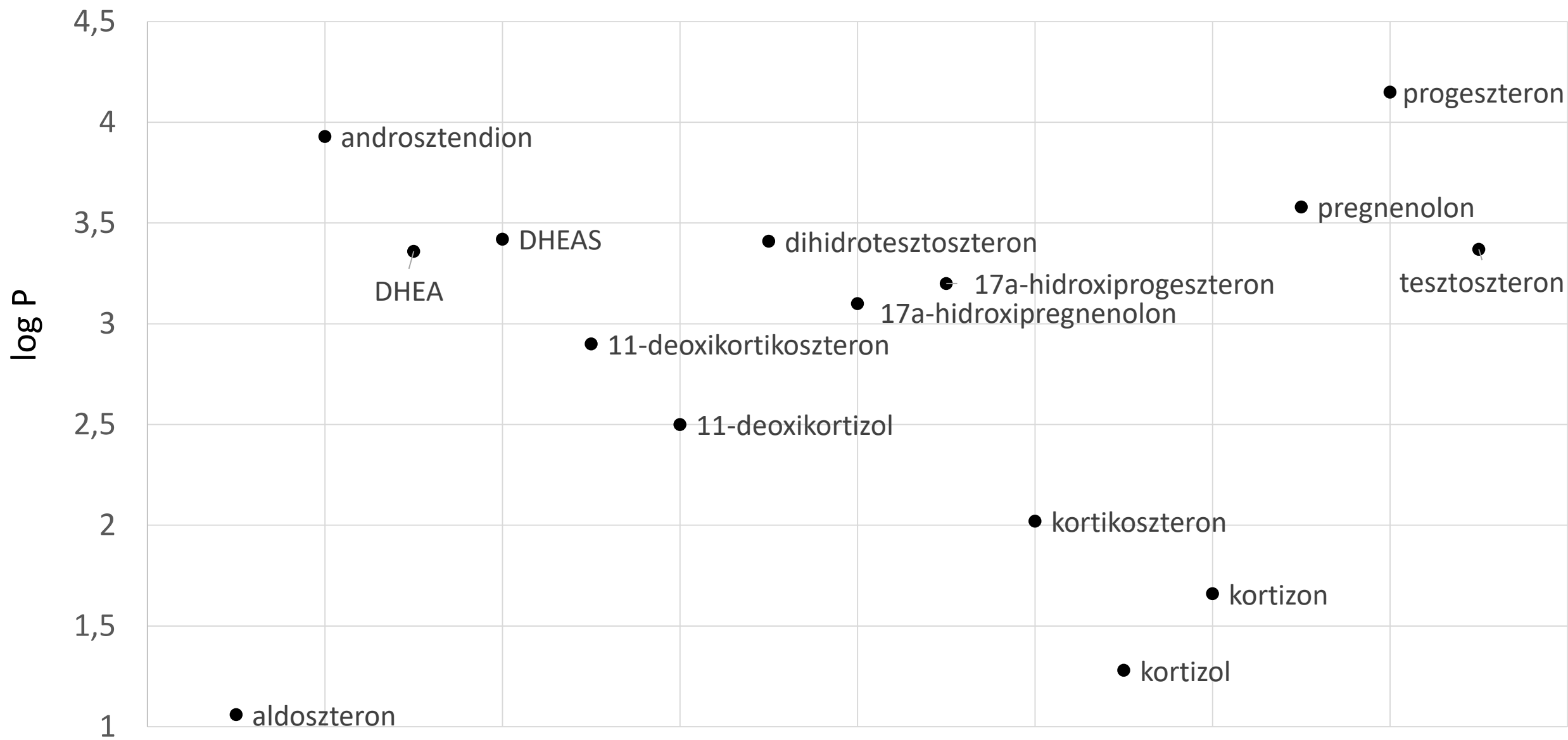
Kihívások: interferenciák

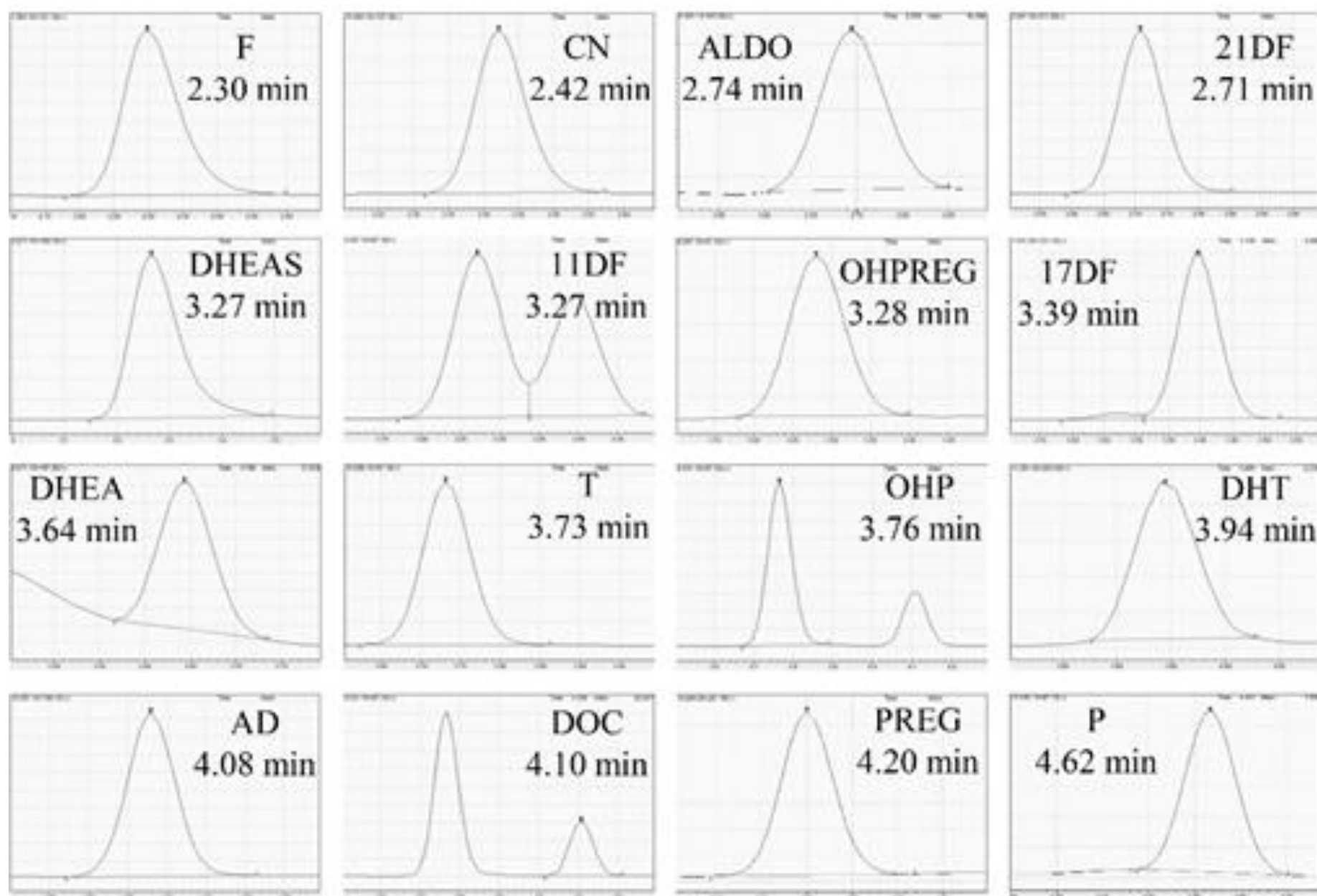


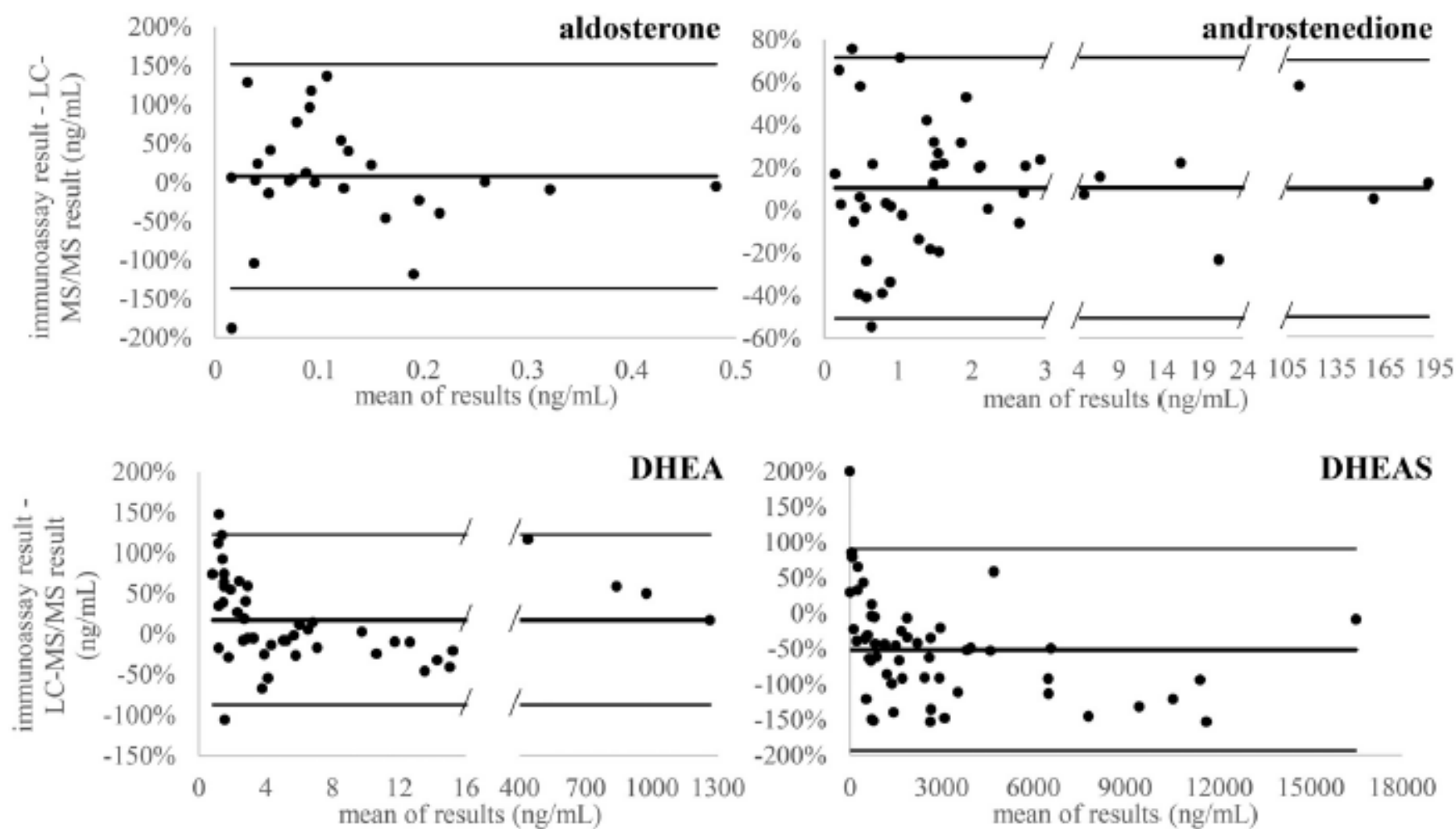
Kihívások: interferenciák

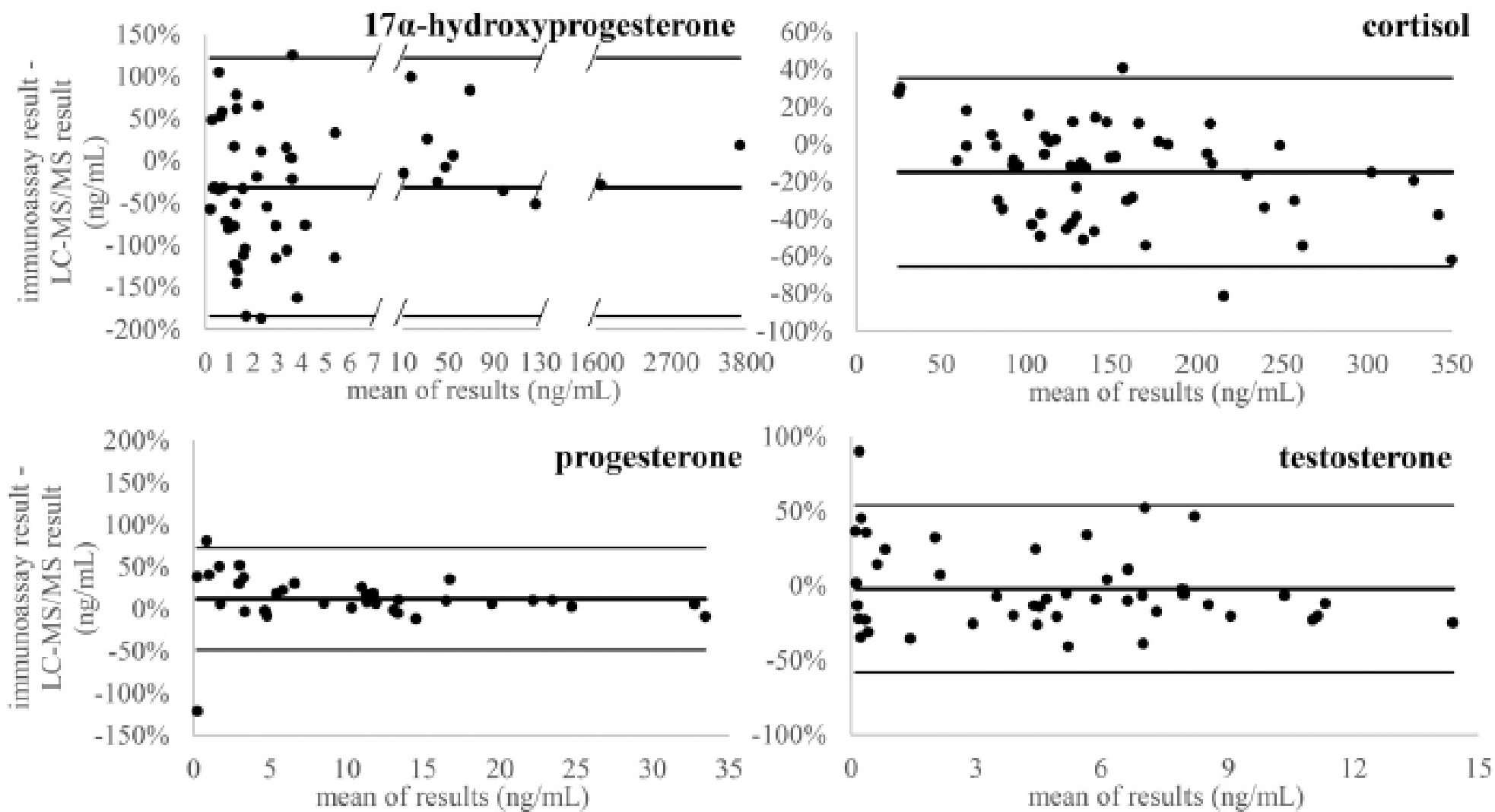


Kihívások: oldhatósági különbségek









17 α -hidroxiprogeszteron javasolt referencia tartományai (példa)

Reference Values

Children

Preterm infants

Preterm infants may exceed 630 ng/dL, however, it is uncommon to see levels reach 1,000 ng/dL.

Term infants

0-28 days: <630 ng/dL

Levels fall from newborn (<630 ng/dL) to prepubertal gradually within 6 months.

Prepubertal males: <110 ng/dL

Prepubertal females: <100 ng/dL

Adults

Males: <220 ng/dL

Females

Follicular: <80 ng/dL

Luteal: <285 ng/dL

Postmenopausal: <51 ng/dL

Note: For pregnancy reference ranges, see: Soldin OP, Guo T, Weiderpass E, et al: Steroid hormone levels in pregnancy and 1 year postpartum using isotope dilution tandem mass spectrometry. Fertil Steril 2005 Sept;84(3):701-710

DHEAS javasolt referencia tartományai (példa)

MALES

1-14 days: DHEA-S levels in newborns are very elevated at birth but will fall to prepubertal levels within a few days.

Tanner Stages*

Mean	Age	Reference Range (mcg/dL)
Stage I	>14 days	11-120
Stage II	11.5 years	14-323
Stage III	13.6 years	5.5-312
Stage IV	15.1 years	29-412
Stage V	18.0 years	104-468

*Puberty onset (transition from Tanner stage I to Tanner stage II) occurs for boys at a median age of 11.5 years. For boys, there is no proven relationship between puberty onset and body weight or ethnicity. Progression through Tanner stages is variable. Tanner stage V (adult) is usually reached by age 18.

18-30 years: 105-728 mcg/dL

31-40 years: 57-522 mcg/dL

41-50 years: 34-395 mcg/dL

51-60 years: 20-299 mcg/dL

61-70 years: 12-227 mcg/dL

≥71 years: 6.6-162 mcg/dL

FEMALES

1-14 days: DHEA-S levels in newborns are very elevated at birth but fall to prepubertal levels within a few days.

Tanner Stages*

Mean	Age	Reference Range (mcg/dL)
Stage I	>14 days	16-96
Stage II	10.5 years	22-184
Stage III	11.6 years	11-296
Stage IV	12.3 years	17-343
Stage V	14.5 years	57-395

*Puberty onset (transition from Tanner stage I to Tanner stage II) occurs for girls at a median age of 10.5 (±) 2 years. There is evidence that it may occur up to 1 year earlier in obese girls and in African American girls.

Progression through Tanner stages is variable. Tanner stage V (adult) is usually reached by age 18.

18-30 years: 83-377 mcg/dL

31-40 years: 45-295 mcg/dL

41-50 years: 27-240 mcg/dL

51-60 years: 16-195 mcg/dL

61-70 years: 9.7-159

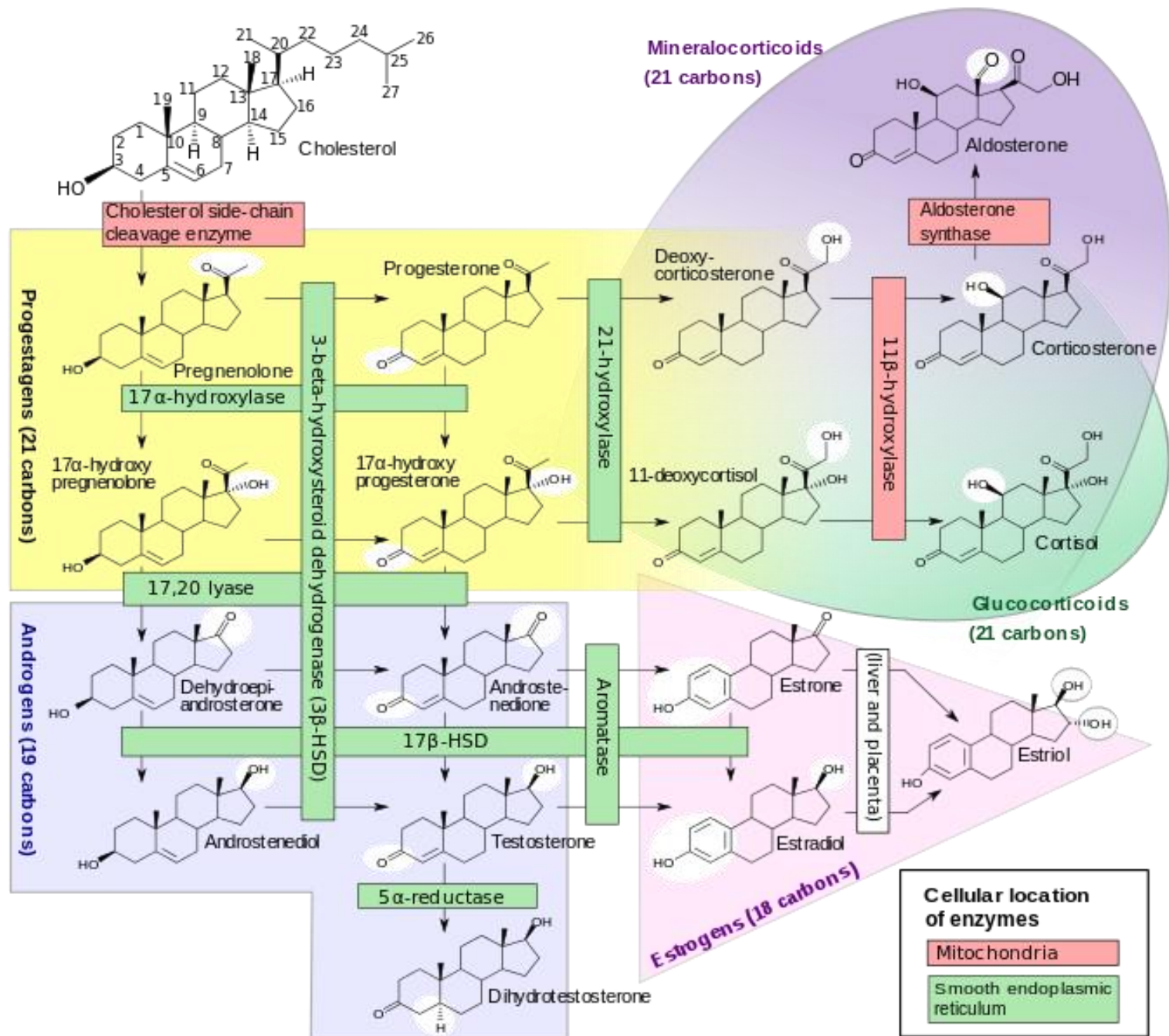
≥71 years: 5.3-124 mcg/dL

Referencia tartományok mellékelése helyett szakorvosi leletezéssel adjuk ki az eredményeket

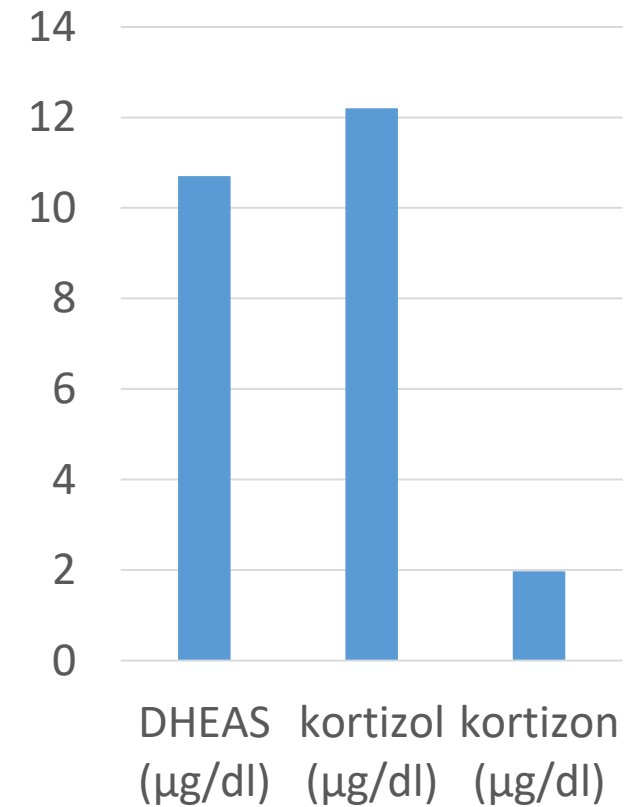
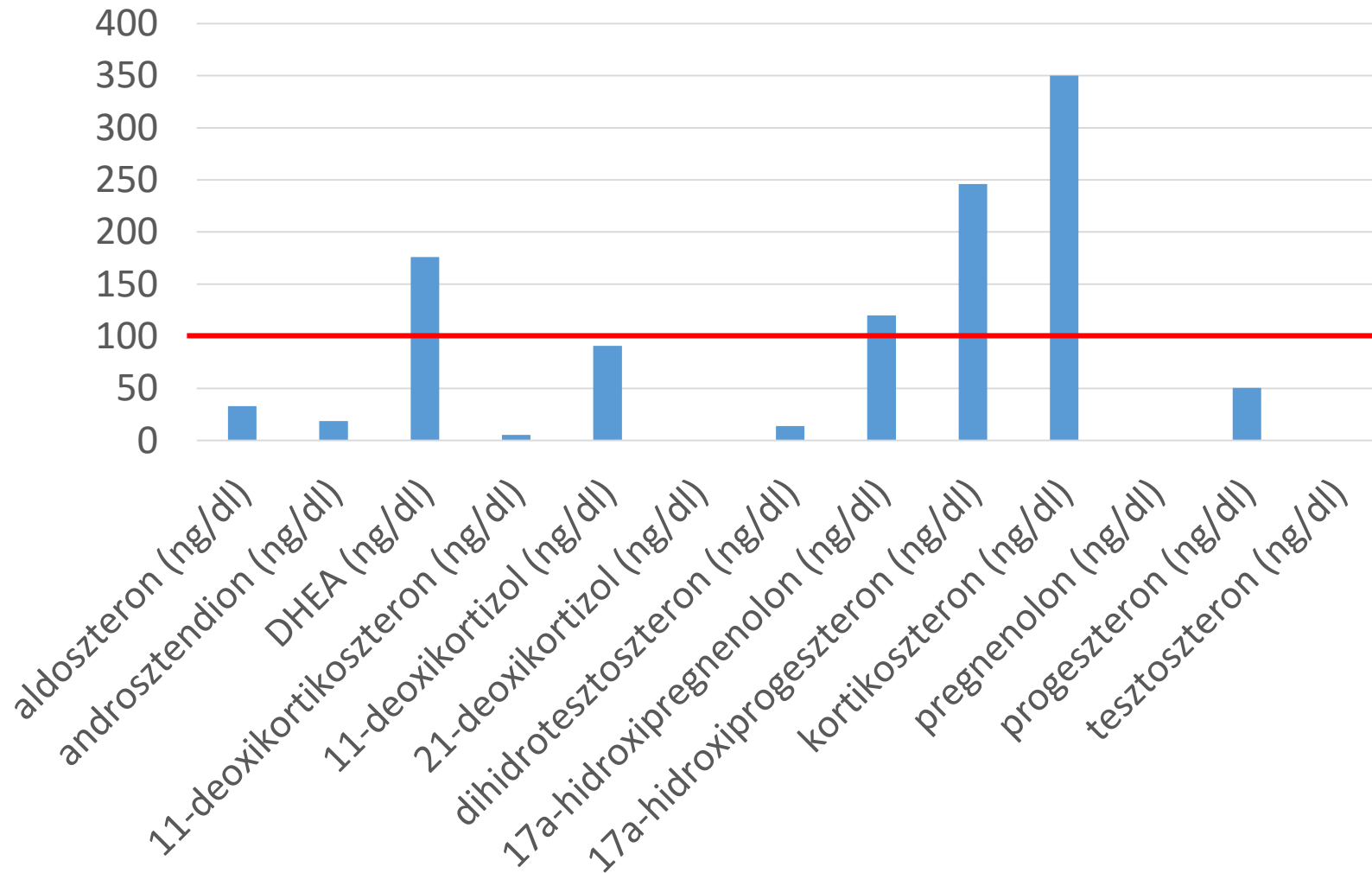
Leletkészítés : 2019.04.11 19:34
Kért időpont : 20190314 09:55
Osztály : G1E (014023016) Anyagcsere, Endokrinológia,
Beküldő orvos :

Vizsgálat	Eredmény	Egység Ref. tart.
Kortizon	2,41	ug/dL
17-OH-progeszteron	72,6	ng/dl
Androsztendion	110	ng/dl
Aldoszteron	4,0	ng/dl
Dehidroepiandroszteron	<50	ng/dl
Dehidroepiandroszteron-szul@	<10	ug/dL
Progeszteron	90,2	ng/dl
Dihidrotesztoszteron	75,0	ng/dl
Kortizol	(1) 4,8	ug/dL
11-dezoxikortizol	<5,0	ng/dl
Dezoxi-kortikoszteron	<5,0	ng/dl
21-dezoxikortizol	7,25	ng/dl
17-OH-pregnenolon	<30	ng/dl
Kortikoszteron	<10	ng/dl
Pregnenolon	212	ng/dl
Tesztoszteron	9,25	ng/dl

(1) Előzménye és a jelen eredmények alapján jól kontrollált 21-hidroxiláz defektus. A hormonok referencia tartományon belüliek



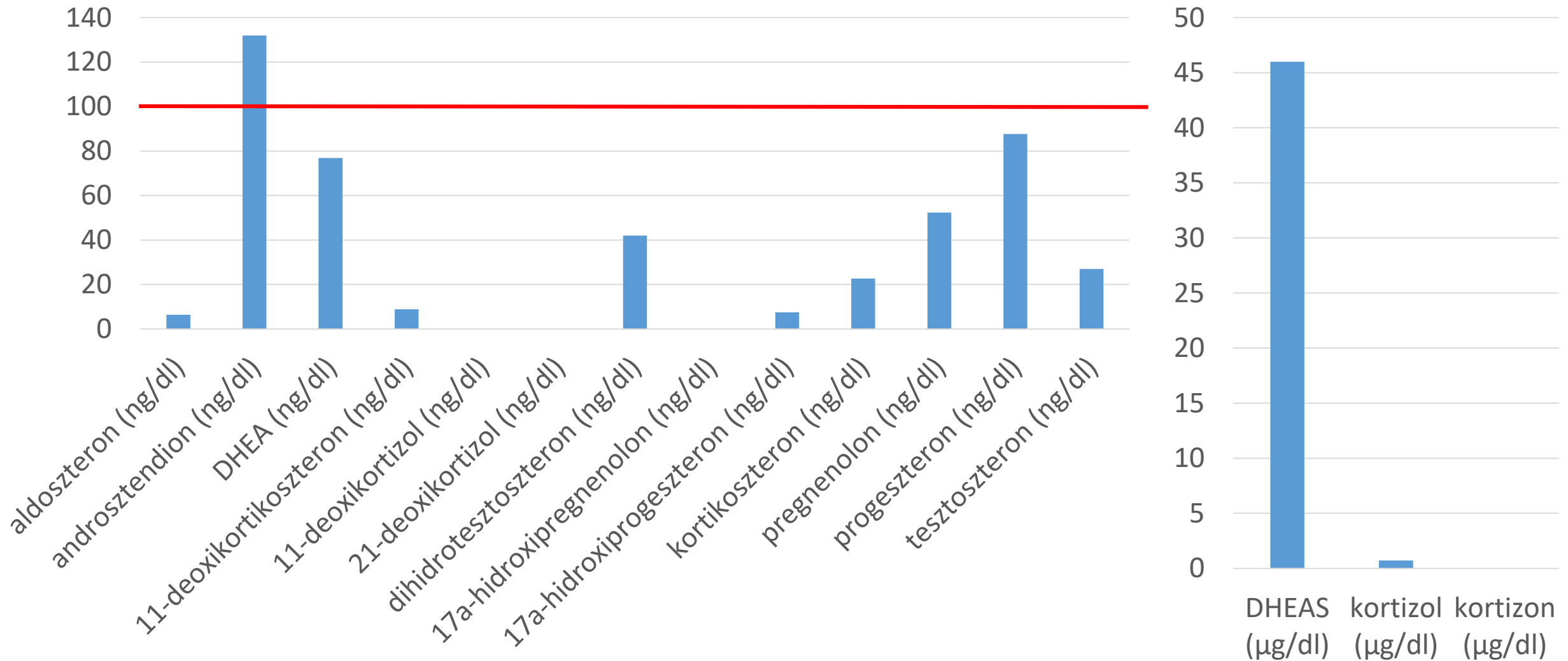
0. eset: egészséges mellékvesekéreg működés (6 éves fiú)



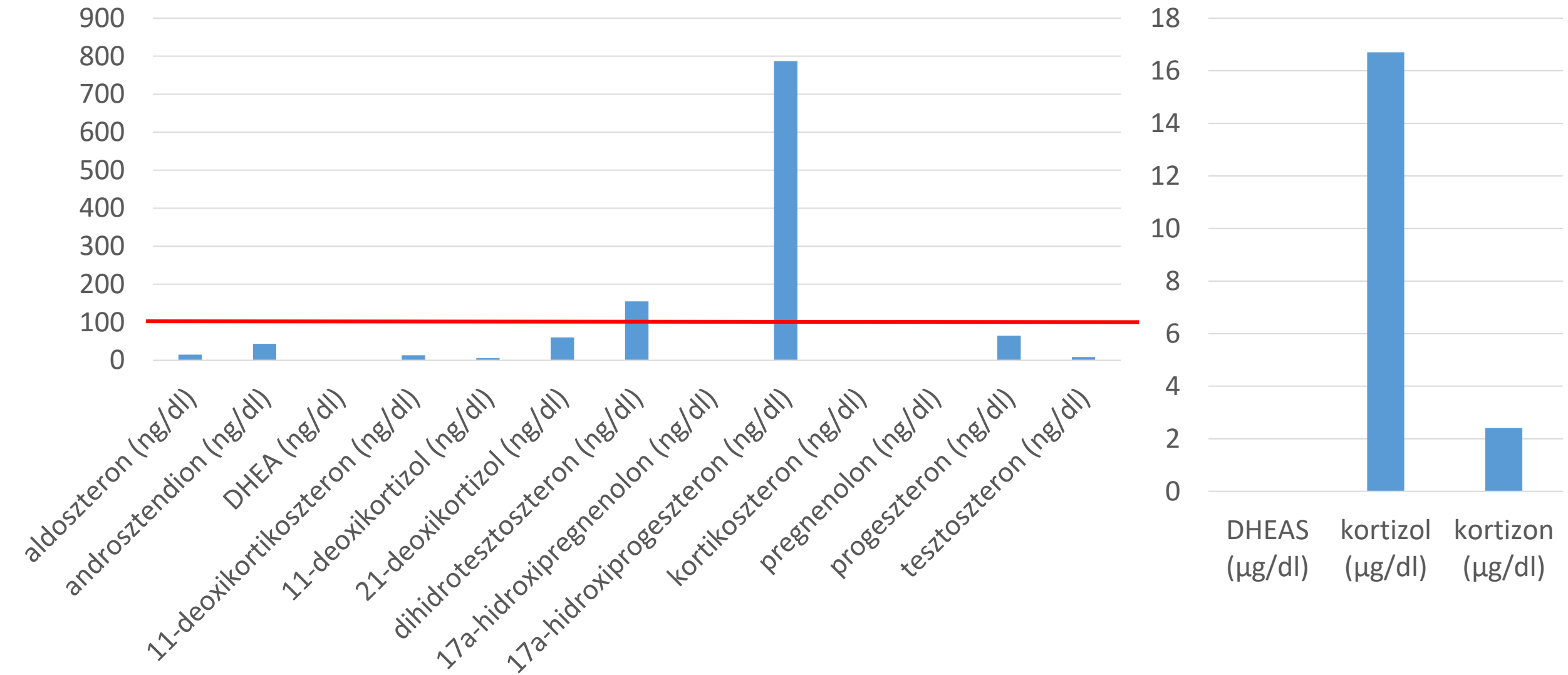
1. eset: ACTH terhelés során észlelt változások (11 éves lány)

Paraméter	Koncentráció ACTH stimuláció előtt	Koncentráció ACTH stimuláció után
aldoszteron (ng/dl)	<2,0	7,85
androsztendion (ng/dl)	120	120
DHEA (ng/dl)	315	483
DHEAS (µg/dl)	<10	14
11-deoxikortikoszteron (ng/dl)	6,4	24,7
11-deoxikortizol (ng/dl)	33,9	151
21-deoxikortizol (ng/dl)	9,7	48,2
dihidrotesztoszteron (ng/dl)	10,9	13,1
17α-hidroxipregnenolon (ng/dl)	<30	103
17α-hidroxiprogeszteron (ng/dl)	191	484
kortikoszteron (ng/dl)	100	1687
kortizol (ng/dl)	18,4	23,6
kortizon (ng/dl)	2,83	2,72
pregnenolon (ng/dl)	<30	<30
progeszteron (ng/dl)	56,7	127
tesztoszteron (ng/dl)	45,4	33

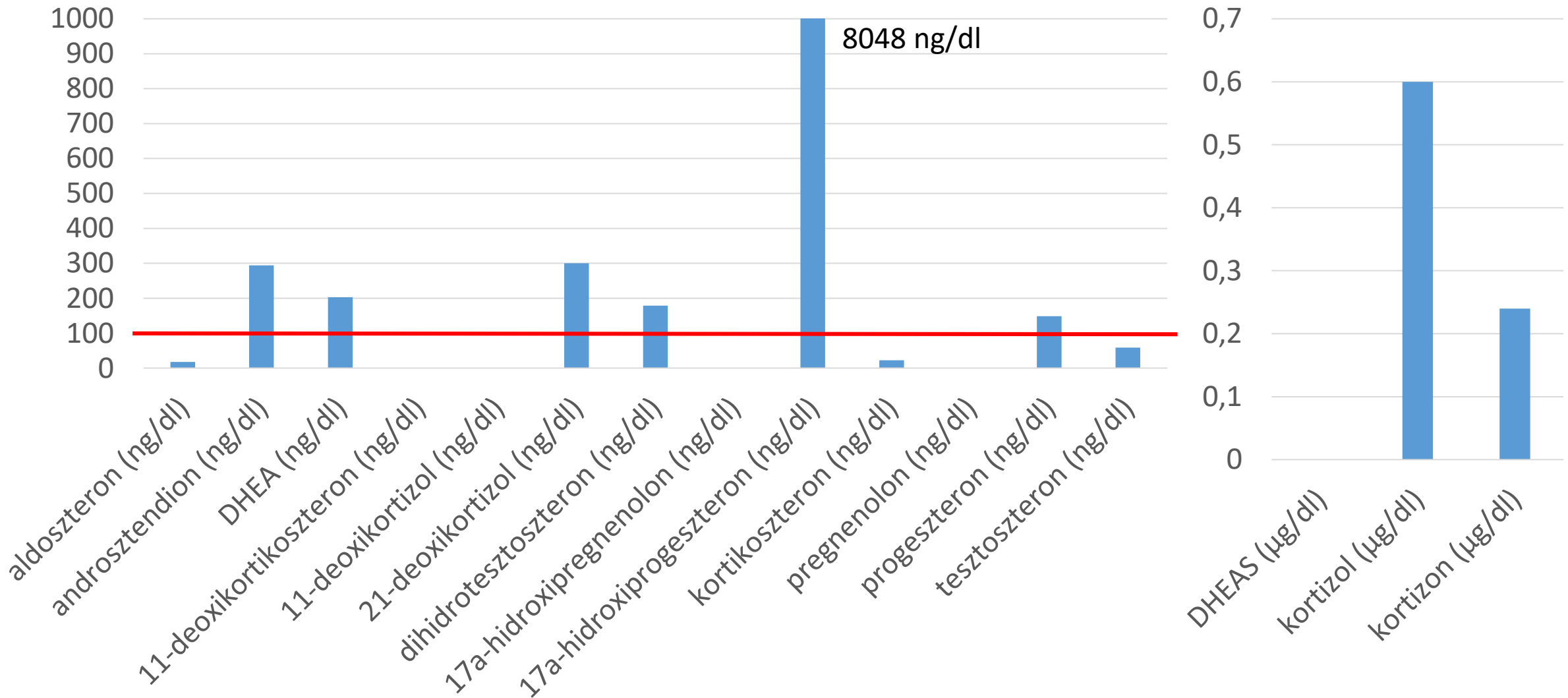
2. eset: dexametazon teszt utáni eredmények (16 éves lány)



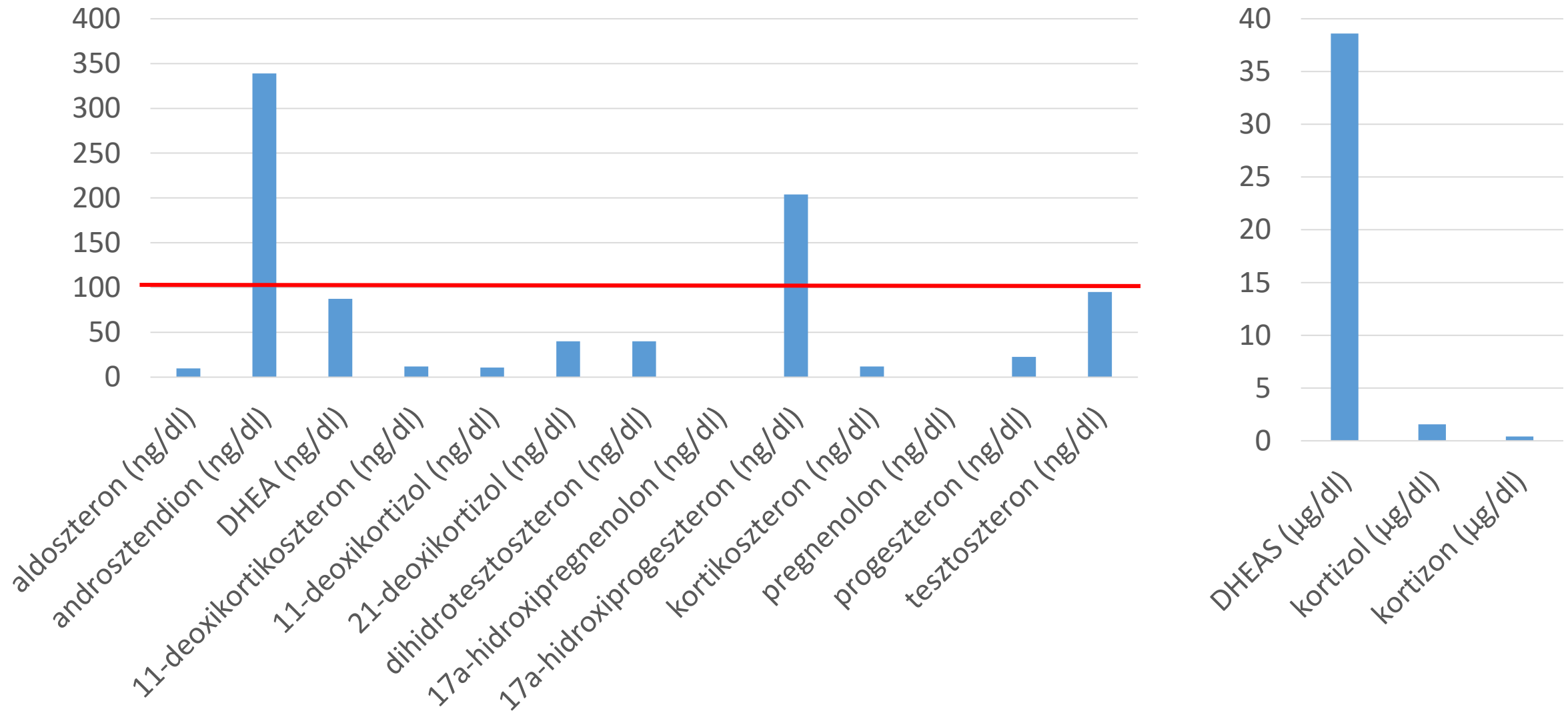
3. eset: klasszikus kongenitális adrenális hiperplázia (21-hidroxiláz defektus): 11 éves fiú



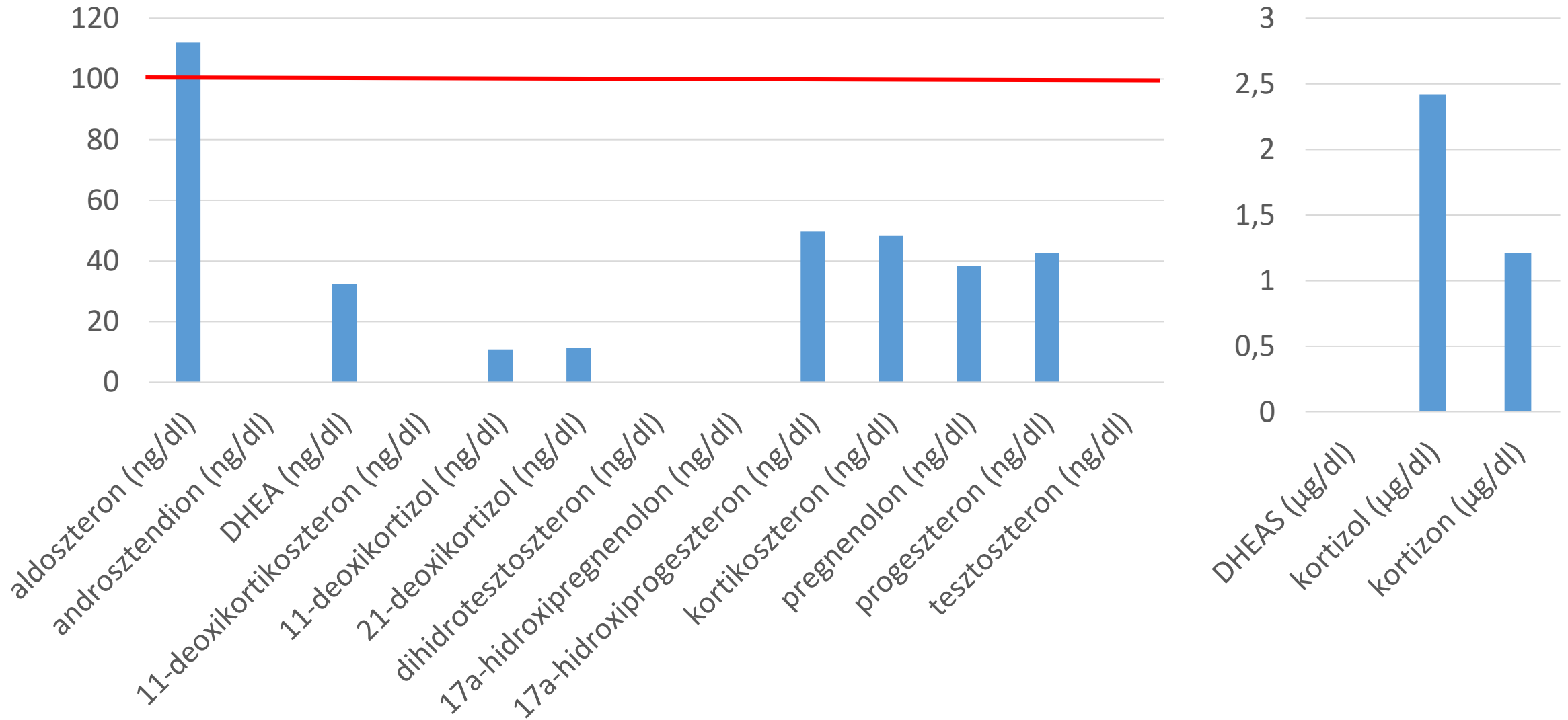
4. eset: klasszikus kongenitális adrenális hiperplázia (21-hidroxiláz defektus): 9 éves lány



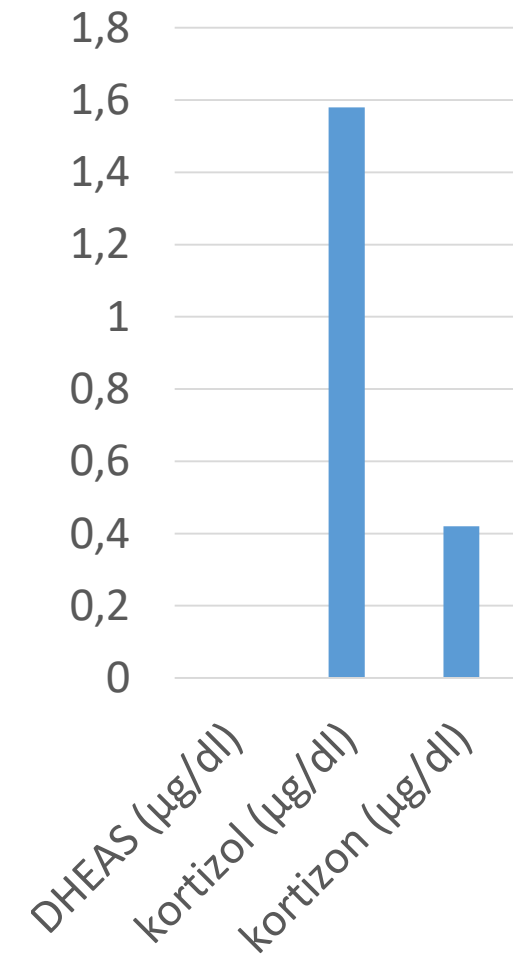
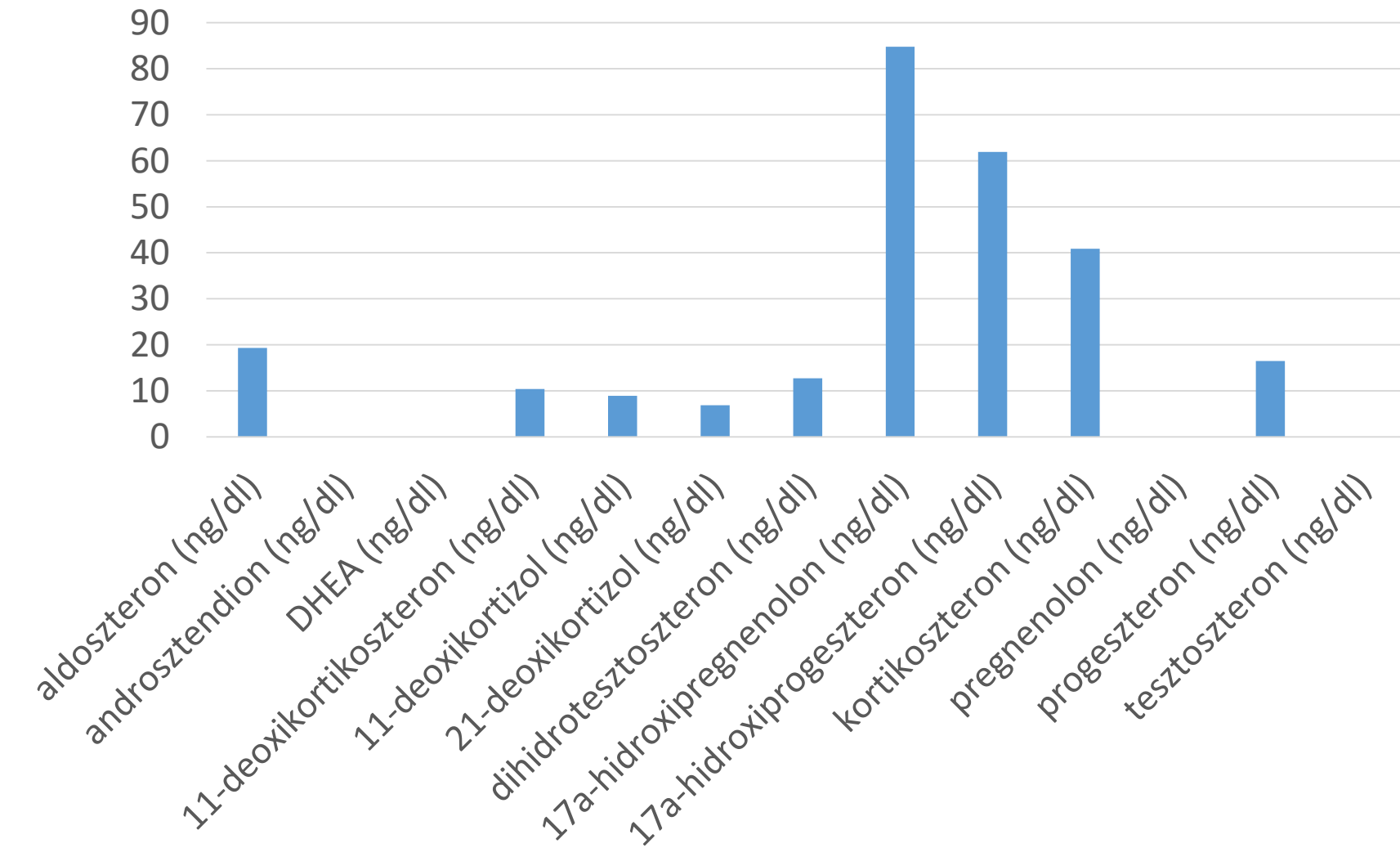
5. eset: kontrollált klasszikus kongenitális adrenális hiperplázia (21-hidroxiláz defektus): 12 éves fiú



6. eset: CYP17A defektus (6 hónapos fiú, lány fenotípussal)



7. eset: DAX gén defektus (2 éves fiú)



Köszönöm a figyelmet!