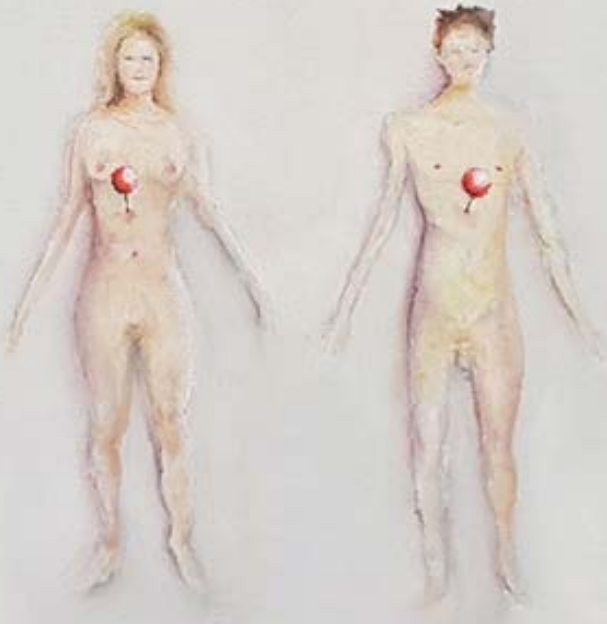


Contributions to clinical applications of LC/MSMS for the assessment of sex steroids and free fractions thereof in blood and saliva

Tom Fiers, MD

Thesis submitted to fulfil the requirements to obtain the degree of

DOCTOR IN MEDICAL SCIENCES



Samenvatting

Hormonale blootstelling is een belangrijke determinant van seksuele differentiatie en van de lichaamssamenstelling. Androgenen (zoals testosteron (T), dehydroepiandrosteron (DHEA), androstenedion (A4) en dihydrotestosteron (DHT)) en oestrogenen (zoals oestron (E1) en oestradiol (E2)) zijn belangrijke en zorgvuldig gecontroleerde raderen in de complexe en delicate menselijke machine. Bij mannen is T grotendeels van testiculaire oorsprong, met een kleine bijdrage van de bijnierschors via metabolisatie van DHEA en A4. Een kleine maar belangrijke fractie van T wordt gearomatiseerd tot E2 in perifere weefsels. Vrouwen produceren meer androgenen dan oestrogenen. De meeste vrouwelijke oestrogenen zijn van ovariële oorsprong. De bijnierschors en ovaria produceren androgenen die vervolgens partieel worden gearomatiseerd en zo bijdragen aan de totale circulerende oestrogeenpool en oestrogenen in de perifere weefsels.

In circulatie zijn de meeste androgenen en oestrogenen gebonden aan dragereiwitten, voornamelijk albumine en geslachtshormoon bindend globuline (SHBG). De "vrije hormoonhypothese" stelt dat de biologische activiteit van steroïdhormonen wordt beïnvloed door hun ongebonden (vrije) concentratie eerder dan de eiwitgebonden concentratie in het plasma. Gebaseerd op de aannames van deze hypothese kunnen metingen van vrije steroïd-concentraties in de kliniek worden gebruikt worden als surrogaat voor de biologische activiteit van plasmasteroïden. Helaas is de directe meting van vrij hormoonfracties voor de meeste laboratoria onhaalbaar, wat leidt tot het wijdverspreid toepassen van diverse berekende schattingen van de vrije hormoonconcentratie.

Hoewel onderzoek over steroïden bezwaarlijk als nieuw onderzoeksgebied kan worden bestempeld en er in de loop van de decennia zeer veel werk is vergaard, is een groot deel van nog blijvende verwarring in het veld het gevolg van vaak onnauwkeurige conclusies of interpretaties als gevolg van een gebrek aan nauwkeurige, reproduceerbare en goed gevalideerde hormonale analyses.

In dit werk was het eerste doel het opzetten van nauwkeurige, gevoelige LC-MS/MS-analyses voor de bepaling van geslachtssteroïden met een focus op E2 en T. Ons tweede doel was het gebruik van state-of-the-art methodologie om direct vrij testosterone (FT) concentraties te meten en de validiteit van algemeen toegepaste of recent voorgestelde FT-berekeningen te herevalueren. We ontwikkelden een evenwichtsdialyse-LC-MS/MS methode die gevoelige directe meting van FT in het dialysaat mogelijk maakt. De experimenten hielpen om de validiteit van de 'vrije hormoonhypothese' in vivo te ondersteunen. We hebben verder aangetoond dat de door Vermeulen voorgestelde berekening op basis van de massa-actiewet een goede benadering is voor FT bij mannen en vrouwen ongeacht de T, SHBG en albumine bloedconcentraties, voor zover ervan kan worden uitgegaan dat de bindingsvoorwaarden niet extreem afwijkend zijn. Tegelijkertijd hebben we zwakke punten blootgelegd in enkele andere gepubliceerde berekeningsmethoden voor FT-schatting.

Ook hebben we steroïden in andere matrices bepaald. Speeksel wordt in toenemende mate gebruikt in de klinische praktijk en in onderzoek als een interessante matrix voor steroïdenmetingen. Hoewel vaak wordt aangenomen dat speeksel een matrix is waarin alleen de vrije fractie van de steroïden aanwezig is, was

voldoend gedocumenteerd bewijs voor deze veronderstelling, gebaseerd op 'state-of-the-art' methodologie, op zijn best schaars. We hebben aangetoond dat speeksel inderdaad kan worden gebruikt als een surrogaatmarker voor de vrije hormoonfractie, maar tegelijkertijd is het een aparte en complexe matrix wat waargenomen verschillen met serum vrije hormoon concentraties verklaart. We hebben de opgezette methodologie ook uitgebreid naar steroïdanalyse in haar, een nuttige matrix voor lange termijn observaties.

Publicaties

Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization.

Fiers T, Casetta B, Bernaert B, Vandersypt E, Debock M, Kaufman JM.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012 Apr 15;893-894:57-62. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.034. + supplemental data

Implications of androgen assay accuracy in the phenotyping of women with polycystic ovary syndrome.

Tosi F, Fiers T, Kaufman JM, Dall'Aida M, Moretta R, Giagulli VA, Bonora E, Moghetti P.

J Clin Endocrinol Metab. 2015 + supplemental data

Harmonized Reference Ranges for Circulating Testosterone Levels in Men of Four Cohort Studies in the USA and Europe. Trivison TG, Vesper HW, Orwoll E, Wu F, Kaufman JM, Wang Y, Lapauw B, Fiers T, Matsumoto AM, Bhasin S.

J Clin Endocrinol Metab. 2017 Jan 10. doi: 10.1210/jc.2016-2935 +supplemental data

Sex steroids in relation to sexual and skeletal maturation in obese male adolescents

Vandewalle S, Taes Y, Fiers T, Van Helvoirt M, Debode P, Herregods N, Ernst C, Van Caenegem E, Roggen I, Verhelle F, De Schepper J, Kaufman JM.

J Clin Endocrinol Metab. 2014 Aug;99(8):2977-85. doi: 10.1210/jc.2014-1452. +supplemental data

A critical evaluation of salivary testosterone as a method for the assessment of serum testosterone.

Fiers T, Delanghe J, T'Sjoen G, Van Caenegem E, Wierckx K, Kaufman JM.

Steroids. 2014 Aug;86:5-9. doi: 10.1016/j.steroids.2014.04.013. PMID:24793565 + supplemental data

Salivary estradiol as a surrogate marker for serum estradiol in assisted reproduction treatment.

Fiers T, Dielen C, Somers S, Kaufman JM, Gerris J.

Clin Biochem. 2016 Sep 23. pii: S0009-9120(16)30325-3. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.09.016. PMID: 27668549 +supplemental data

Correlation between saliva and serum concentrations of estradiol in women undergoing ovarian hyperstimulation with gonadotropins for IVF/ICSI

Dielen C, Fiers T, Somers S, Deschepper E, Gerris J.

Facts Views Vis Obgyn. 2017 Jun;9(2):85-91.

Hair cortisol in relation to job stress and depressive symptoms.

Janssens H, Clays E, Fiers T, Verstraete AG, de Bacquer D, Braeckman L.

Occup Med (Lond). 2017 Mar 1;67(2):114-120. doi: 10.1093/occmed/kqw114.

The free androgen index is inaccurate in women when the SHBG concentration is low

Keevil BG, Adaway J, Fiers T, Moghetti P, Kaufman JM.

Clin Endocrinol (Oxf). 2018 Feb 5. doi: 10.1111/cen.13561

Reassessing Free-Testosterone Calculation by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Direct Equilibrium Dialysis

Tom Fiers, Frederick Wu, Paolo Moghetti, Dirk

Vanderschueren, Bruno Lapauw, Jean-Marc Kaufman

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 103, Issue 6, 1 June 2018, Pages 2167–

2174, <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02360> + supplemental data + validation summary

Promotor

Prof. Dr. Bruno Lapauw

Universiteit Gent

Co-promotor

Prof. Dr. Jean-Marc Kaufman

Universiteit Gent

Examencommissie

Prof. Dr. Ir. Peter Van Eenoo (voorzitter)

Prof. Dr. Leen Antonio

Prof. Dr. Etienne Cavalier

Prof. Dr. Martine Cools

Prof. Dr. Veronique Stove

Prof. Dr. Guy T'Sjoen

Dr. Katleen Van Uytvanghe

Faculty of Medicine and Health Sciences

Ghent University Hospital

Ghent University, Belgium

2020

