

# Fact Sheet: hormonen

## Waarom willen we effecten t.h.v. hormonen vaststellen?

---

Veel van de bestudeerde pollutanten (o.a. PCB's, dioxines, zware metalen) kunnen hormoonverstorende effecten hebben. Daarom worden in de humane biomonitoringscampagnes hormoongehalten gemeten in het bloed. Schildklierhormonen worden gemeten bij alle deelnemers; geslachtshormonen worden enkel gemeten bij de jongens. Bij meisjes worden geen geslachtshormonen gemeten, omdat de hormonenconcentraties afhankelijk zijn van het moment in de menstruatiecyclus (dit zou de studie-opzet aanzienlijk bemoeilijken). Bovendien kunnen we bij meisjes een zeer objectieve en gevoelige parameter voor puberteitsontwikkeling via de vragenlijsten bevragen (nl. de leeftijd van de eerste maandstonden).

## Welke hormonen worden geanalyseerd?

---

### A. Schildklierhormonen:

De schildklierhormonen triiodothyronine (T3) en thyroxine (T4) zijn belangrijk voor heel wat fysiologische processen zoals groei, ontwikkeling en metabolisme. Hun productie staat onder invloed van het thyroid stimulerend hormoon dat door de hypofyse wordt aangemaakt. T3 ontstaat uit T4 via verwijdering van één jodium atoom. De schildklierhormonen worden getransporteerd in het bloed, gebonden aan eiwitten. De vrije hormonen (fT3 en fT4) zijn de actieve vormen van het hormoon waarbij fT3 meer actief is dan fT4. Als de niveaus van het vrije T3 en T4 (fT3 en fT4) in het bloed dalen stijgt de productie van thyroid stimulerend hormoon (TSH).

### B. Geslachtshormonen bij de jongens:

- Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)  
= dit glycoproteïne bindt aan testosteron en oestradiol, enkel het vrije testosteron en het vrije oestradiol (d.i. niet gebonden aan SHBG) zijn biologisch actief
  - Totaal testosteron (T) en vrij testosteron (fT)  
= belangrijkste mannelijke geslachtshormoon, zorgt o.a. voor de ontwikkeling van de primaire en secundaire geslachtkenmerken, productie van sperma, libido, ...
  - Totaal oestradiol (O) en vrij oestradiol (O)  
= staat bij de vrouw in voor de ontwikkeling van primaire en secundaire geslachtskenmerken, ontwikkeling baarmoederslijmvlies, ...  
= oestradiolconcentraties zijn zeer laag bij mannen. Ongeveer 30% wordt geproduceerd door de testis en de rest is afkomstig van de omzetting in de lever en het vetweefsel.  
= oestradiol beïnvloedt de botstructuur (bij mannen en vrouwen).
  - Luteïniserend Hormoon (LH)  
= zorgt bij de vrouw voor eirijping en de eisprong  
= bij mannen werkt het in op de Leydigcellen in de teelballen.
  - Follikel Stimulerend Hormoon (FSH)  
= regelt de productie van andere geslachtshormonen
-

## **Methodologie**

---

### **A. Bepaling van TSH**

De basis voor deze test is het sandwich principe. In een eerste fase wordt 50  $\mu$ l serumstaal geïncubeerd met twee verschillende TSH-specifieke antilichamen: één ervan gelabeld met biotine, het andere met een rutheniumcomplex. Vervolgens worden micropartikels gecoat met streptavidine toegevoegd. De TSH-antilichaam-biotine fractie wordt aan de vaste fase gebonden via de interactie biotine-streptavidine. Het reactiemengsel wordt afgezogen naar de meetcel waar de partikels magnetisch worden vastgehouden op de oppervlakte van een electrode. De ongebonden fracties worden verwijderd met ProCell (tripropylamine in fosfaatbuffer). Door het aanleggen van een spanning op de electrode wordt de chemiluminescentie geïnduceerd. De lichtemissie wordt gemeten in een fotomultiplier. Vervolgens wordt de meetcel nagespoeld met CleanCell (KOH + detergentoplossing). De resultaten worden bekomen via een calibratiecurve (calibratie t.o.v. mastercurve).

De praktische implementatie hiervan gebeurt op een autoanalyser: Modular E170 (T0470)

De aantoonbaarheids grens (LOD) = 0,02 mU/mL.

Kwaliteitscontroles: Bio-RAD Laboratories EQAS.

### **B. Bepaling van fT4**

Het basisprincipe voor deze methode is een 2-stappen competitieve immuno-assay techniek. Eerst wordt 15  $\mu$ l staal geïncubeerd met een T4 - antilichaam gemerkt met een rutheniumcomplex. Vervolgens wordt aan biotine gekoppeld T4 en micropartikels gecoat met streptavidine toegevoegd. De nog vrije bindingsplaatsen op het antilichaam worden nu bezet en er wordt een antilichaam-hapteencomplex gevormd. Het ganse complex wordt aan de vaste fase gebonden via de interactie biotine-streptavidine. Het reactiemengsel wordt afgezogen naar de meetcel waar de partikels magnetisch worden vastgehouden op de oppervlakte van een electrode. De ongebonden fracties worden verwijderd met ProCell (tripropylamine in fosfaatbuffer). Door het aanleggen van een spanning op de electrode wordt de chemiluminescentie geïnduceerd. De lichtemissie wordt gemeten in een fotomultiplier. Vervolgens wordt de meetcel nagespoeld met CleanCell (KOH + detergentoplossing). De resultaten worden bekomen via een calibratiecurve (calibratie t.o.v. mastervurve).

De praktische implementatie hiervan gebeurt op een autoanalyser: Modular E170 (T0470).

De aantoonbaarheids grens (LOD) = 0,1 ng/dL.

Kwaliteitscontroles: Bio-RAD Laboratories EQAS.

### **C. Bepaling van fT3**

Het basisprincipe voor deze methode is een 2-stappen competitieve immuno-assay techniek. Eerst wordt 15  $\mu$ l staal geïncubeerd met een T3 - antilichaam gemerkt met een rutheniumcomplex. Vervolgens wordt aan biotine gekoppeld T3 en micropartikels gecoat met streptavidine toegevoegd. De nog vrije bindingsplaatsen op het antilichaam worden nu bezet en er wordt een antilichaam-hapteencomplex gevormd. Het ganse complex wordt aan de vaste fase gebonden via de interactie biotine-streptavidine. Het reactiemengsel wordt afgezogen naar de meetcel waar de partikels magnetisch worden vastgehouden op de oppervlakte van een electrode. De ongebonden fracties worden verwijderd met ProCell (tripropylamine in fosfaatbuffer). Door het aanleggen van een spanning op de electrode wordt de

chemiluminescentie geïnduceerd. De lichtemissie wordt gemeten in een fotomultiplier. Vervolgens wordt de meetcel nagespoeld met CleanCell (KOH + detergentoplossing) De resultaten worden bekomen via een calibratiecurve (calibratie t.o.v. mastercurve)

De praktische implementatie hiervan gebeurt op een autoanalyser Modular E170 (T0470).

De aantoonbaarheidsgrens (LOD) = 1 pg/mL

Kwaliteitscontroles: Bio-RAD Laboratories EQAS.

#### D. Bepaling van totaal testosteron en vrij testosteron

**Totaal testosteron.** Het principe van de test, een radioimmuno-assay van Orion Diagnostics, is gebaseerd op een competitie tussen het ongemerkt product (onbekende of standaard) en een bepaalde hoeveelheid gemerkt  $I^{125}$ testosteron voor een beperkt aantal bindingsplaatsen van het antilichaam (gecoate buizen). Na incubatie wordt de vrije fractie van de gebonden fractie gescheiden door afgieten van de vloeistof, de gebonden fractie wordt gemeten. De competitie veroorzaakt door onbekende concentraties in de stalen, zal vergeleken worden met deze veroorzaakt door standaarden met gekende concentraties. De gemeten radioactiviteit kan uitgezet worden tegenover de concentratie standaard; met behulp van deze standaardcurve worden de concentraties van de onbekende stalen afgeleid uit de hoeveelheid gemeten radioactiviteit voor die onbekende stalen.

Aantoonbaarheidsgrens (LOD) = 10 ng/dL.

Kwaliteitscontroles: bindingsanalyse SKML (LWBA) / Bio-RAD Laboratories EQAS.

**Vrij testosteron:** evenwichtsberekening aan de hand van SHBG en testosteron waarden.

Referentie: Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM (1999) A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (10): 3666-3672.

#### E. Bepaling van totaal oestradiol en vrij oestradiol

**Totaal oestradiol.** Het basisprincipe voor deze methode is een 2-stappen competitieve immuno-assay techniek. Eerst wordt 35  $\mu$ L staal geïncubeerd met een aan biotine gebonden oestradiol-specifiek antilichaam. Hierbij wordt een immuuncomplex gevormd waarvan de hoeveelheid afhankelijk is van de concentratie analyt in het staal. Vervolgens worden micropartikels gecoat met streptavidine en een ruthenium gelabeld oestradiolderivaat complex toegevoegd. De nog beschikbare plaatsen op de biotine gebonden antilichamen worden ingenomen met vorming van een antilichaam-hapteen complex. Dit complex wordt gebonden aan een vaste fase via de interactie biotine-streptavidine. Het reactiemengsel wordt afgezogen naar de meetcel waar de partikels magnetisch worden vastgehouden op de oppervlakte van een electrode. De ongebonden fracties worden verwijderd met ProCell (tripropylamine in fosfaatbuffer). Door het aanleggen van een spanning op de electrode wordt de chemiluminescentie geïnduceerd. De lichtemissie wordt gemeten in een fotomultiplier. Vervolgens wordt de meetcel nagespoeld met CleanCell (KOH + detergentoplossing). De resultaten worden bekomen via een calibratiecurve (calibratie t.o.v. mastercurve).

De praktische implementatie hiervan gebeurt op een autoanalyser Modular E170 (T0470) en Cobas 6000 (T0080).

De aantoonbaarheidsgrens (LOD) voor totaal oestradiol bedraagt 12 pg/mL.

Kwaliteitscontroles: Bio-RAD Laboratories EQAS.

**Vrij oestradiol:** evenwichtsberekening aan de hand van SHBG, E2, testosteron waarden

#### F. Bepaling van SHBG

Het principe van de test is een niet-competitieve immunoradiometric assay (IRMA) van Orion Diagnostics. Verdunde serumstalen, standaarden en controles worden toegevoegd aan een buis gecoat met een mengsel van twee monoklonale muis antilichamen tegen humaan SHBG. Vervolgens wordt gemerkt  $I^{125}$  SHBG muis monoklonaal antilichaam toegevoegd. Na incubatie 3 uur bij  $37^{\circ}C$  wordt de vrije fractie van de gebonden fractie gescheiden door afgieten van de vloeistof gevolgd door een wasstap. De gebonden fractie wordt gemeten. De tellingen veroorzaakt door onbekende concentraties in de stalen, zal vergeleken worden met deze veroorzaakt door standaarden met gekende concentraties. De gemeten radioactiviteit kan uitgezet worden tegenover de concentratie standaard; met behulp van deze standaardcurve worden de concentraties van de onbekende stalen afgeleid uit de hoeveelheid gemeten radioactiviteit voor die onbekende stalen.

Aantoonbaarheidsgrens (LOD) = 1 nmol/L.

Kwaliteitscontroles: Bindingsanalyse SKML (LWBA) / Bio-RAD Laboratories EQAS.

#### G. Bepaling van LH

De basis voor deze test is het sandwich principe. In een eerste fase wordt 20  $\mu$ l serumstaal geïncubeerd met twee verschillende LH-specifieke antilichamen: één ervan gelabeld met biotine, het andere met een rutheniumcomplex. Vervolgens worden micropartikels gecoat met streptavidine toegevoegd. De LH-antilichaam-biotine fractie wordt aan de vaste fase gebonden via de interactie biotine-streptavidine. Het reactiemengsel wordt afgezogen naar de meetcel waar de partikels magnetisch worden vastgehouden op de oppervlakte van een elektrode. De ongebonden fracties worden verwijderd met ProCell (tripropylamine in fosfaatbuffer). Door het aanleggen van een spanning op de elektrode wordt de chemiluminescentie geïnduceerd. De lichtemissie wordt gemeten in een fotomultiplier. Vervolgens wordt de meetcel nagespoeld met CleanCell (KOH + detergentoplossing). De resultaten worden bekomen via een calibratiecurve (calibratie t.o.v. mastercurve)

De praktische implementatie hiervan gebeurt op een autoanalyser: Modular E170 (OT470) en Cobas 6000 (T0080).

Aantoonbaarheidsgrens (LOD) = 0,1 mU/mL.

Kwaliteitscontroles: Bio-RAD Laboratories EQAS.

#### H. Bepaling van FSH

De basis voor deze test is het sandwich principe. In een eerste fase wordt 40  $\mu$ l serumstaal geïncubeerd met twee verschillende FSH-specifieke antilichamen: één ervan gelabeld met biotine, het andere met een rutheniumcomplex. Vervolgens worden micropartikels gecoat met streptavidine toegevoegd. De FSH-antilichaam-biotine fractie wordt aan de vaste fase gebonden via de interactie biotine-streptavidine. Het reactiemengsel wordt afgezogen naar de meetcel waar de partikels magnetisch worden vastgehouden op de oppervlakte van een elektrode. De ongebonden fracties worden verwijderd met ProCell (tripropylamine in fosfaatbuffer). Door het aanleggen van een spanning op de elektrode wordt de chemiluminescentie geïnduceerd. De lichtemissie wordt gemeten in een fotomultiplier. Vervolgens wordt de meetcel nagespoeld met CleanCell (KOH + detergentoplossing). De resultaten worden bekomen via een calibratiecurve (calibratie t.o.v. mastercurve)

De praktische implementatie hiervan gebeurt op een autoanalyser: Modular E170 (T0470).

Steunpunt Milieu en Gezondheid, Humane Biomonitoringcampagne 2007-2011  
VITO - oktober 2011

Aantoonbaarheidsgrens (LOD) = 0,1 mU/mL.  
Kwaliteitscontroles: Bio-RAD Laboratories EQAS.