

Tämä on rinnakkaistallenne.

Rinnakkaistallenteen sivuasettelut ja typografiset yksityiskohdat *saattavat poiketa* alkuperäisestä julkaisusta.

Julkaisun tekijä(t): Tykkyläinen, Anne; Holappa-Girginkaya, Jaana

Julkaisun nimi: Steroidihormonien määrittäminen massaspektrometrialla, menetelmät hyödyt verrattuna immunologisiin menetelmiin

Julkaisuvuosi: 2022

Versio: Julkaistu versio

Käytä viittauksessa alkuperäistä lähdetä:

Tykkyläinen, A. & Holappa-Girginkaya, J. (2022). Steroidihormonien määrittäminen massaspektrometrialla, menetelmät hyödyt verrattuna immunologisiin menetelmiin. Bioanalyytikko: artikkelijulkaisu, (2022), 43-46.

Haettu 29.5.2023 osoitteesta

[https://issuu.com/bioanalytikkoliitto/docs/bioanalyytikko\\_0522\\_issuu](https://issuu.com/bioanalytikkoliitto/docs/bioanalyytikko_0522_issuu)

# STEROIDIHORMONIEN MÄÄRITTÄMINEN MASSASPEKTRO- METRIALLA, MENETELMÄN HYÖDYT VERRATTUNA IMMUNOLOGISIIN MENETELMIIN

TEKSTI Anne Tykkyläinen ja Jaana Holappa-Girginkaya

## 1 JOHDANTO

Oikean analyysitekniikan valinta on herättänyt paljon keskustelua viime vuosien aikana määrittäessä steroidihormoneja. Immunologia (IA) ja nestekromatografia-tandemmassaspektrometria (LC-MS/MS) ovat yleisimmin käytössä olevat menetelmät kliinisissä laboratorioissa maailmanlaajuisesti. Näitä menetelmiä on tutkittu paljon ja on olemassa useita kansainvälisiä julkaisuja, joissa näiden menetelmien sopivuutta steroidihormonien mm. kortisolin, estradiolin ja testosteronin määrittämiseksi on vertailtu ja arvioitu. Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on syventää tietoa yleisesti steroidihormonien määrittämisestä sekä vertailla menetelmien hyötyjä ja haittoja yleisellä tasolla.

Steroidihormonien tutkimisella on merkittävä rooli mm. selvitetessä endokrinologisia sairauksia. Joissakin sairauksissa veren hormonipitoisuudet vaihtelevat ja voivat olla siten hyvin pieniä. Tämä asettaa käytettävälle menetelmälle erityisvaatimuksia sensitiivisyydessä ja spesifisyydessä. Tarkkoja mittaustuloksia tarvitaan oikean diagnoosin tueksi ja potilaan hoitamiseksi [1, 2].

Oikean menetelmän valinta steroidihormoneja mitattaessa ei ole kuitenkaan niin yksiselitteistä, sillä molemmilla menetelmillä on omat hyvät ja huonot puolensa. Monessa kliinisessä laboratorioissa käytetään automaattianalysointia, esimerkiksi testosteronin määrittämiseen, ja niin sanottua suoraa immunologista

menetelmää, jossa analyysi tehdään ilman näytteen esikäsittelyvaihetta. Tämä analyysitekniikka on nopea ja kätevä mutta sen on huomattu olevan epätarkka alhaisia pitoisuuksia mitattaessa mm. erilaisten ristireaktioiden vuoksi. Tämä onkin yksi syy siihen, miksi massaspektrometriaan perustuvien menetelmien käyttö on lisääntynyt moninkertaiseksi viimeisimmän vuosikymmenen aikana [2].

Nestekromatografia yhdistettynä tandemmassaspektrometriaan on osoittautunut tehokkaaksi työkaluksi ja se tulee muuttamaan steroidihormonien analysointitapaa kliinisissä laboratorioissa. Tekniikan kehittymisen myötä tätä menetelmää käytetään yhä enemmän korvaamaan immunologisia menetelmiä. Markkinoille on tullut uusia kaupallisia sovelluksia kokonaisten steroidihormonipaneelien määrittämiseksi ja tämä puolestaan tuo lisää työkaluja sairauksien diagnosointiin ja seurantaan [3].

Erilaiset asiantuntijoiden julkaisut ja ammattikuntien kannanotot steroidihormonien määrittämisestä, kuten esimerkiksi testosteronia mitattaessa, ovat yhtä mieltä siitä, että eri menetelmien välillä on liikaa vaihtelua ja epätarkkuutta. Tämän vuoksi mm. testosteronitulosten tarkkuuden ja luotettavuuden parantamiseksi on perustettu hormonien standardointiohjelma (HoSt) [2]. Steroidihormonianalytiikan ja sen laadun parantamiseksi tarvitaan jatkossakin lisää asiantuntijoiden välistä verkostoitumista ja yhteistyötä [4].

## 2 STEROIDIHORMONIT

Hormonit on jaettu kemiallisen luonteensa perusteella kahteen pääryhmään: vesiliukoisiin peptideihin tai aminohappojohdannaisiin sekä rasvaliukoisiin kolesterolista syntyneisiin steroidihormoneihin. Veren hormonipitoisuudet ovat tyypillisesti hyvin pieniä ja ne vaihtelevat hormoneittain (1 pmol/l – 1 µmol/l). Kunkin hormonin pitoisuus veressä on riippuvainen sen sitoutumisvoimakkuudesta reseptoriproteiiniin sekä sen rytmisestä piirteestä, kuten esimerkiksi vuorokausivaihtelusta (kortisoli) tai kuukautiskierrosta (steroidihormonit) [5]. Steroidihormoneita erittyy mm. lisämunuaisista, sukupuolirauhasista ja istukasta [5]. Ne ovat tärkeässä asemassa nestetasapainon säätelyssä, aineenvaihdunnassa, stressivasteessa ja sukupuolisten ominaisuuksien kehittämisessä [6].

Steroidihormonit ovat pienimolekyylisiä, rasvaliukoisia ja valtaosa niistä on sitoutuneena verenkierrossa spesifisiin kuljettajaproteiineihin (CBG eli kortikosteroidija sitova globuliini ja SHBG eli sukupuolihormoneja sitova globuliini). Vain pieni osa steroidihormoneista on vapaana verenkierrossa [5]. Jos spesifinen kuljettajaproteiini puuttuu synnynnäisesti, huolehtivat muut elimistön proteiinit hormonien kuljettamisesta [1].

Steroidihormoneja ja niiden metaboliatuotteita on tutkittu useiden vuosikymmenien ajan. Tekniikan kehittymisen myötä voidaan nykyisin yksittäisten steroidihormonien lisäksi määrittää kokonaisia steroidihormonipaneeleita [6].

## 3 MASSASPEKTROMETRIA STEROIDIHORMONIEN MÄÄRITTÄMISESSÄ

Massaspektrometriaa on käytetty steroidihormonien tutkimiseen jo 1930-luvulta lähtien. Erityisesti steroidihormonimetabolian tutkiminen ja virtsan steroidihormoniprofiilin määrittäminen mahdollistuivat 1960-luvulla kaasukromatografia-massaspektrometrian (GC-MS) kehittyessä. Steroidihormonien analysointiin saatiin lisää herkkyyttä kvadrupolimassa-analysointoriin, nestekromatografian (LC) sekä parempien näytteen uuttotekniikoiden myötä 1980 – 1990-luvuilla [7]. Nestekromatografiassa näytteen sisältämät analyytit (steroidihormonit) erotellaan häiritsevistä yhdisteistä niiden polaarisuuden perusteella käyttäen kolonneja. Steroidihormonit sitoutuvat kolonnin kiinteään faasiin, josta ne eluoidaan muuttamalla liikkuvan faasin polarisuutta. Analyyttien kromatografisen erottelun jälkeen näyte muutetaan ionimuotoon massaspektrometrin io-

nälähteen avulla. Näitä ionilähteitä ovat mm. ESI-ionilähde (electrospray ionization) eli sähkösumutus-ionisaatio sekä APCI-ionilähde (atmospheric pressure chemical ionization). Ionit kulkevat kaasufaasin mukana massa-analysointoriin, jossa kvadrupolit pilkkovat ja erottelvat ionit niiden massan perusteella [4, 7, 8]. Tällä analyysitekniikalla saadaan lisättyä menetelmän spesifisyyttä [2].

### 3.1. LC-MS/MS-menetelmän hyödyt ja haitat

Nykyisin kliinisissä laboratorioissa käytetään kaasukromatografiaa yleisemmin nestekromatografia-tandem-massaspektrometria (LC-MS/MS) kolonnien kehittymisen, HPLC (high pressure liquid chromatography) -tekniikan sekä helpomman näytteen esikäsittelyn vuoksi. Näytteen esikäsittely on välttämätöntä proteiinien poistamiseksi näytteestä. Se pienentää matriisin vaikutusta ja pitää MS-laitteen puhtaampana [7]. LC-MS/MS-menetelmästä on tullut yhä suosittumpi pienimolekyylisiä steroidihormoneja määrittäessä sen monien hyödyllisten ominaisuuksien vuoksi. Muun muassa analyysiin tarvittavat näytemäärät ovat pienempiä ja analysointiajat lyhyempiä. Lisäksi menetelmän spesifisyys on kehittynyt entisestään ja sillä pystytään määrittämään useita steroidihormoneja kerrallaan sekä tekemään mitauksia laajalla pitoisuusalueella (Taulukko 1) [3].

Steroidihormoneja analysoitaessa LC-MS/MS-menetelmän käyttöönotto vaatii yksittäisten steroidihormonien validoinnin. Validointi tehdään kullekin steroidihormonille tutkimalla erilaisia parametrejä, kuten esimerkiksi selektiivisyys, sensitiivisyys, toistettavuus, ja matriisivaikutus. Viimeisten vuosikymmenien aikana menetelmien suorituskyky ja luotettavuus ovat parantuneet huomattavasti näiden laatuun vaikuttavien kriteerien seurauksena [7].

LC-MS/MS-menetelmässä on kuitenkin edelleen kehitettävää liittyen standardointiin eri laboratorioiden välillä. Kaikille steroidihormoneille ei nimittäin ole saatavilla kaupallista sertifioitua standardia, joten ne täytyy valmistaa itse. Lisäksi kaikilla laboratorioilla ei ole aikaa ja teknisiä taitoja näiden standardien tekemiseen. Tämä aiheuttaa tulostasoeroja laboratorioiden välillä (Taulukko 1). Siksi standardien yhdenmukaistaminen olisi äärimmäisen tärkeää spesifisyyden ja LC-MS/MS-menetelmän laajemman käyttöönoton kannalta [3].

Useiden eri lähteiden mukaan LC-MS/MS-laitteiden käyttöä pidetään hankalana. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että suuri osa laboratorioista on automatisoi-

tuja ja siksi henkilöstön analyttiset taidot ja tietotaso tältä osin puutteellisia. LC-MS/MS-tekniikan kehityksen myötä laitteen käyttö on kuitenkin yksinkertaistunut ja ylläpitohuolto helpottunut. Hyvä perehdytys mahdollistaa massa-analysaattorien käyttöönoton laajemmalti myös kiireisissä rutiinilaboratorioissa. Esimerkiksi Etelä-Manchesterin yliopistollisessa sairaalassa kliinisen kemian laboratoriossa laitteet ovat päivystyslaboratorion rutiinikäytössä. Henkilökunnan taitotasoa pidetään yllä riittävällä työkierrolla [7].

#### 4 IMMUNOLOGIA STEROIDIHORMONIEN MÄÄRITTÄMISESSÄ

Immunologisia menetelmiä on käytetty steroidihormonien tutkimiseen jo lähes 50 vuotta. Kyseinen menetelmä perustuu immunologiaan, jossa tutkittavan analyysin määrä saadaan selville merkkiaineella leimatun antigeenivasta-ainereaktion avulla. Steroidihormonien määrittämisessä käytetyt immunologiset menetelmät ovat ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), FIA (fluoroimmunoassays) sekä RIA (radioimmunoassay) [9, 10].

##### 4.1 Immunologisten menetelmien hyödyt ja haitat

Immunologiset menetelmät soveltuvat käytettäväksi suurien automaatiolaboratorioiden lisäksi myös pienissä laboratorioissa, sillä ne ovat helppokäyttöisiä. Markkinoilla on saatavilla eri valmistajien kehittämiä sovel-

luksia ja reagensseja. Laitteet ovat automatisoituja, joten analyysien suorittaminen on suhteellisen edullista. Näytteet eivät vaadi esikäsittelyä, joten potilaan hoitoon tarvittavat vastaukset saadaan nopeasti. Tulokset ovat luotettavia laadunvalvonnan ollessa käytössä (Taulukko 1) [7].

Immunologisten menetelmien suurimpia haittoja ovat spesifisyyden ja herkkyiden puute johtuen ristireaktioista samankaltaisten molekyylien kanssa, matriisivaikutuksista, steroideja sitovien proteiinien esiintymisestä näytteissä sekä laboratorioiden välisistä standardoinnista johtuvista tulostasocroista (Taulukko 1). Aikaisemmin nämä ongelmat saatiin eliminoitua näytteen esikäsittelyllä, kuten esimerkiksi konsentroidamalla tai uuttamalla. Nykyisissä niin sanotuissa suorissa immunologisissa menetelmissä näytteitä ei kuitenkaan esikäsitellä [7].

Esimerkiksi sukupuolihormoneja, kuten testosteroni ja estradioli, määrittäessä alhaisilla pitoisuuksilla immunologisen menetelmän tarkkuus ja herkkyys ovat riittämättömiä. Kirjallisuuden mukaan tämä tulee esille etenkin naisten ja lasten testosteroninäytteiden kohdalla, sillä hormonimäärä on niissä pieni verrattuna miesten näytteiden testosteronitasoihin. LC-MS/MS-menetelmällä on puolestaan riittävä herkkyys havaita naisten ja lasten alhaiset testosteronipitoisuudet, mutta MS-menetelmien välillä saattaa esiintyä huomattavaa standardoinnista johtuvaa vaihtelua [7].

MENETELMÄ	LC-MS-MS	IA
HYÖDYT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Korkea spesifisyys ja herkkyys</li> <li>• Lyhyet analysointiajat</li> <li>• Useiden steroidihormonien analysointi samanaikaisesti</li> <li>• Referenssimenetelmä</li> <li>• Mittaukset laajalla pitoisuusalueella</li> <li>• Mahdollisuus pystyttää omia menetelmiä</li> <li>• Soveltuu pienille molekyylille</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyvä spesifisyys, jos laadunvalvonta kunnossa</li> <li>• Nopeat vastausajat rutiinianalytiikassa</li> <li>• Menetelmän käyttö ei vaadi erityiskoulutusta</li> <li>• Reagenssit helposti saatavilla</li> <li>• Kohtuullinen hinta</li> </ul>
HAITAT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Osaavan henkilökunnan puute</li> <li>• Kaikille steroideille ei saatavilla kaupallista standardia -&gt; tulostasocrot laboratorioiden välillä</li> <li>• Laitteistot kalliita</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mahdollinen spesifisyyden ja herkkyiden puute johtuen ristireagoinnista</li> <li>• Matriisivaikutukset</li> <li>• Steroideja sitovat proteiinit</li> <li>• Laboratorioiden väliset tulostasocrot</li> <li>• Jatkuvasti muuttuvat reagenssit</li> </ul>

Taulukko 1. LC-MS/MS ja IA-menetelmien hyödyt ja haitat.

## 5 YHTEENVETO

Johtopäätöksenä voidaan sanoa, että sekä massaspektrometrialla että immunologisilla menetelmillä saadaan riittävän tarkkoja tuloksia steroidihormoneja määrittäessä, kun laadunvalvonta ja standardointi ovat kunnossa. Kirjallisuuden mukaan massaspektrometrialla on kuitenkin parempi spesifisyys kuin immunologisilla menetelmillä ja lisäksi sillä voidaan määrittää matalampia pitoisuuksia. Tämän vuoksi massaspektrometria soveltuu referenssimenetelmäksi. Kyseinen menetelmä ei kuitenkaan vielä sovellu käytettäväksi kultaisena standardina, sillä eri tutkimusten mukaan laadunvalvonnessa ja menetelmän validoinnissa on edelleen puutteita. Tällä hetkellä kaikille yksittäisille steroidihormoneille ei kuitenkaan ole saatavilla kaupallisia standardeja. Tulevaisuudessa yksittäiset steroidihormonit tulisikin validoida käyttäen kaupallisia standardeja, jotka ovat kaikkien laboratorioden saatavissa ja jotta laboratorioden välisiä tulostaseroja saataisiin tasoitettua.

Vaikka LC-MS/MS-menetelmä on yleensä spesifimpi ja herkempi, ei se voi korvata immunologisten menetelmien tarvetta täysin. Pienissä kliinisissä laboratorioissa ja päivystyslaboratorioissa nimittäin tarvitaan yhä immunologisia määrittämiä rutiinimittauksissa, sillä nopeat vastaukset, laitteen helppokäyttöisyys ja kustannustehokkuus ovat avainasemassa. LC-MS-MS-menetelmä sopii puolestaan paremmin käytettäväksi suurempiin keskuslaboratorioihin, joissa on riittävästi henkilökuntaa ja osaamista laitteen ja analytiikan ylläpitämiseksi.

*Anne Tykkyläinen, laboratoriohoitaja, kliinisen asiantuntijan tutkinto-ohjelma, Savonia-ammattikorkeakoulu*

*Jaana Holappa-Girginkaya, tohtorikoulutettava, terveystieteiden maisteri, bioanalytiikan lehtori, Oulun ammattikorkeakoulu*

## LÄHTEET

1. Pertti Koskinen 2010, Hormonitutkimukset, 141. Onni Niemelä ja Kari Pulkki. Laboratoriolääketiede. Kandidaattikustannus Oy 2010.
2. Zhimin (Tim) Cao, Julianne Cook Botelho, Robert Reja and Hubert Vesp 2017. Accuracy-based proficiency testing for testosterone measurements with immunoassays and liquid chromatography-mass spectrometry. Clin Chim Acta. 2017 June ; 469: 31–36. doi:10.1016/j.cca.2017.03.010.
3. Brian G. Keevil, 2016. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. Clinical Biochemistry, Volume 49, Issues 13-14, September 2016, 989-997. ScienceDirect <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.04.009>
4. S.A.Wudy, G.Schuler, A.Sanches-Guijo, M.F.Hartmann 2017. The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis 2017. The journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology, Volume 179, May 2018, 88-103. Science Direct, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>
5. Heikki A. Koistinen, Olli A. Jänne 2009, Endokriininen järjestelmä, 14. Matti Välimäki, Timo Sane, Leo Dunkel. Endokrinologia. Kustannus Oy Duodecim 2009.
6. Lina Schiffer, Lise Barnard, Elizabeth S. Baranowski, Lorna C. Gilligan, Angela E. Taylor, Wiebke Arlt, Cedric H.L. Shackleton, and Karl-Heinz Strobeck, Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review, J Steroid Biochem Mol Biol. 2019 Nov; 194: 105439. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439
7. Angela E Taylor, Brian Keevil, Ilpo T Huhtaniemi 2015. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. 2015 Aug;173(2):D1-12. Doi: 10.1530/EJE-15-0338. Epub 2015 Apr 15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25877990/>
8. Esa Hämäläinen, Ursula Turpeinen 2006. Steroidien määrittämisestä nestekromatografia-tandemmassaspektrometrialla (LC-MS/MS). Kliinisen laboratorioalan julkaisu 02-2006. [https://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/media/klab\\_062\\_0.pdf](https://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/media/klab_062_0.pdf)
9. Kari Savolainen, Markku Parviainen 2010, Immunokemialliset menetelmät, 65. Onni Niemelä ja Kari Pulkki. Laboratoriolääketiede. Kandidaattikustannus Oy 2010.
10. C. Rossi, I. Cicalini, S. Verrocchio, G.D. Dalmazi, L. Federici, I. Bucci, 2020. The Potential of Steroid Profiling by Mass Spectrometry in the Management of Adrenocortical Carcinoma. Biomedicines. 2020 Sep; 8(9): 314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7555975/>