

Syllabus

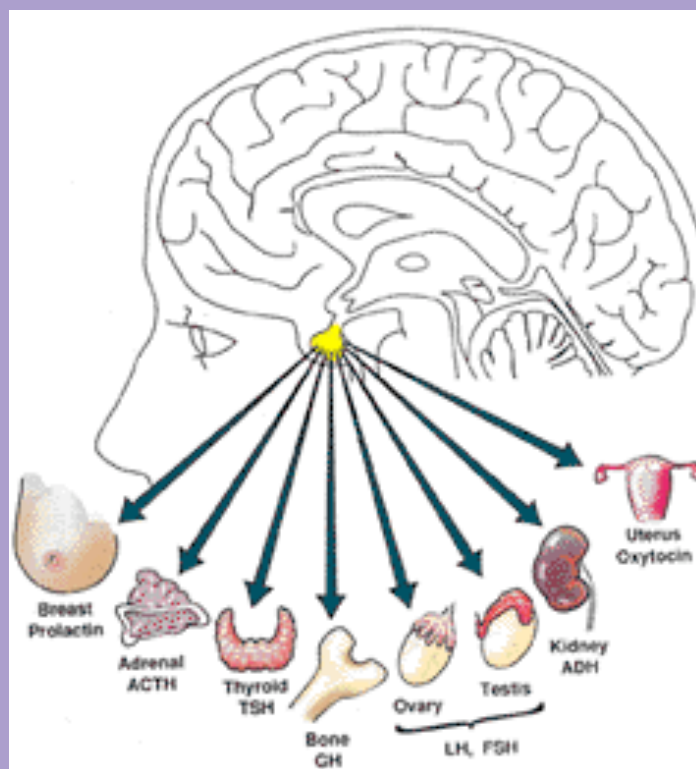
PAOKC-cursus Klinische Chemie en LaboratoriumGeneeskunde

Diagnostische uitdagingen in de endocrinologie



Nederlandse Vereniging
voor Klinische Chemie
en Laboratoriumgeneeskunde

Dinsdag 14 oktober 2008
Congrescentrum De Eenhoorn, Amersfoort



Programma

9.15 – 10.00	Ontvangst en koffie
	OCHTENDPROGRAMMA <i>Voorzitter: I. Vermes</i>
10.00 – 10.10	Opening <i>I. Vermes</i>
10.10 – 11.25	Nieuwe ontwikkelingen in de fertiliteitdiagnostiek <i>J.S.E. Laven</i> <i>A.P.N. Themmen</i>
11.25 – 11.35	Koffie
11.35 – 12.50	GH deficiëntie: diagnostische functietesten en criteria voor behandeling <i>A.S.P. van Trotsenburg</i> <i>H.M. Dijstelbloem</i>
12.50 – 13.40	Lunch
	MIDDAGPROGRAMMA <i>Voorzitter: E. Endert</i>
13.40 – 14.55	Hypofyse tumoren: actief of niet actief; wat zijn de diagnostische benaderingen? <i>W.W. de Herder</i> <i>Y.B. de Rijke</i>
14.55 – 15.10	Thee
15.10 – 16.40	Schildklierdiagnostiek: is meten altijd weten? <i>P.H. Bisschop</i> <i>M.M. Buijs</i>
16.40 – 16.45	Afsluiting <i>E. Endert</i>
16.45 – 17.30	Borrel

Sprekers

Dr. Peter H.L.T. Bisschop

Internist – endocrinoloog

Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Dr. Madelon M. Buijs

Klinisch chemicus – endocrinoloog i.o.

Academisch Medisch Centrum, Amsterdam en Medial, Hoofddorp

Dr. Hilde M. Dijkstra

Klinisch chemicus – endocrinoloog

Universitair Medisch Centrum, Utrecht

Dr. Wouter W. de Herder

Internist – endocrinoloog

Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam

Dr. Joop S.E. Laven

Gynaecoloog

Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam

Dr. Yolande B. de Rijke

Klinisch chemicus – endocrinoloog

Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam

Dr. Ir. Axel P.N. Themmen

Biochemicus

Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam

Dr. A.S. Paul van Trotsenburg

Kinderarts – endocrinoloog

Academisch Medisch Centrum, Amsterdam

Organisatie

Organisatiecommissie

Dr. Madelon M. Buijs Klinisch chemicus – endocrinoloog i.o.	Academisch Medisch Centrum, Amsterdam Medial, Hoofddorp
Dr. Hilde M. Dijkstra Klinisch chemicus – endocrinoloog	Universitair Medisch Centrum Utrecht
Drs. Erik Endert Klinisch chemicus – endocrinoloog	Academisch Medisch Centrum Amsterdam
Prof.dr. Istvan Vermes Klinisch chemicus – endocrinoloog	Medisch Spectrum Twente Enschede

Deze cursus is mede georganiseerd door de werkgroep Endocrinologie van de NVKC

Inhoud

	Pag.
Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function <i>J.S.E. Laven / A.P.N. Themmen</i>	6
Groeihormoon (GH) deficiëntie: welke diagnostische functietesten en welke criteria voor behandeling? <i>A.S.P. van Trotsenburg / H.M. Dijkstra</i>	15
Diagnosis of Pituitary Tumours <i>W.W. de Herder / Y.B. de Rijke</i>	24
De regulatie van schildklierhormoonsynthese <i>P.H. Bisschop / M.M. Buijs</i>	37

Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function

Jenny A Visser, Frank H de Jong, Joop S E Laven¹ and Axel P N Themmen

Department of Internal Medicine and ¹Division of Reproductive Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, Erasmus MC, PO Box 1738, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands

Correspondence should be addressed to J A Visser; Email: j.visser@erasmusmc.nl

Abstract

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a member of the transforming growth factor β family of growth and differentiation factors. In the ovary, AMH has an inhibitory effect on primordial follicle recruitment as well as on the responsiveness of growing follicles to follicle-stimulating hormone (FSH). The ovary-specific expression pattern in granulosa cells of growing nonselected follicles makes AMH an ideal marker for the size of the ovarian follicle pool. This review summarizes recent findings concerning AMH and its role as a marker for the quantitative aspect of ovarian reserve as well as ovarian dysfunction.

Reproduction (2006) **131** 1–9

Introduction

The ovarian reserve, constituted by the size of the ovarian follicle pool and the quality of the oocytes therein, declines with increasing age, resulting in the decrease of a woman's reproductive function (te Velde *et al.* 1998a). The size of the follicle pool is established at an early point in life. During fetal life, germ cells populate the ovary and become surrounded by somatic cells, forming the so-called primordial follicles. At birth, about 1 million oocytes are present. This number decreases during childhood, resulting in a primordial follicle pool of 300 000–500 000 follicles at menarche (Faddy *et al.* 1992). Throughout life, follicles leave the primordial follicle pool to enter the growing pool. The majority of these growing follicles will be lost as a result of atresia, unless they are rescued by follicle-stimulating hormone (FSH). This rescue by FSH starts after puberty when the pituitary-gonadal endocrine axis has been activated. Among the cohort of rescued follicles, only one follicle is selected to become the dominant follicle, which will ovulate under the influence of luteinizing hormone (LH) (McGee & Hsueh 2000). This process continues throughout life until the primordial follicle pool is exhausted and, as a consequence, growing follicles are no longer present in the ovary, resulting in menopause. This classical view of a finite primordial follicle pool has been challenged recently by Johnson *et al.* (2004, 2005), who showed that germline stem cells can repopulate a germ cell-depleted postnatal ovary and renew the primordial follicle pool. However, it remains unknown to what extent this process delays the onset of menopause.

In the years preceding menopause, fertility already decreases and the menstrual cycle becomes irregular. This menopausal transition period precedes menopause by a fixed time interval (den Tonkelaar *et al.* 1998, te Velde *et al.* 1998b, te Velde & Pearson 2002). In the Western world, menopause is reached at a median age of 51 years. However, there is considerable individual variation in the age of menopause and, subsequently, also in the age of subfertility (te Velde *et al.* 1998b, te Velde & Pearson 2002). Hence, chronological age is a poor indicator of reproductive aging, and thus of the ovarian reserve.

To assess an individual's ovarian reserve, early follicular phase serum levels of FSH, inhibin B and estradiol (E_2) have been measured. Inhibin B and E_2 are produced by early antral follicles in response to FSH, and contribute to the classical feedback loop of the pituitary-gonadal axis to suppress FSH secretion. With the decline of the follicle pool, serum levels of inhibin B and E_2 decrease and subsequently serum FSH levels rise (Burger *et al.* 1995). Because these factors are part of a feedback system, their serum levels are not independent of each other. Furthermore, changes in serum levels of FSH, inhibin B and E_2 occur relatively late in the reproductive aging process (Burger *et al.* 1999). So far, assessment of the number of antral follicles by ultrasonography, the antral follicle count (AFC), best predicts the quantitative aspect of ovarian reserve (Scheffer *et al.* 2003). However, measurement of the AFC requires an additional transvaginal ultrasound examination during the early follicular phase. Therefore, a serum marker that reflects the number of follicles that have made the transition from the primordial pool into the growing follicle pool, and that is not controlled by gonadotropins, would benefit both patients and clinicians.

In recent years, accumulated data indicate that anti-Müllerian hormone (AMH) may fulfill this role.

Anti-Müllerian hormone (AMH)

AMH, also known as Müllerian inhibiting substance (MIS), has been mainly studied for its regulatory role in male sex differentiation. AMH, produced by the Sertoli cells of the fetal testis, induces the regression of the Müllerian ducts, the anlagen of the female reproductive tract (Josso *et al.* 1993, Lee & Donahoe 1993). However, after birth, this sex-dimorphic expression pattern is lost and AMH is also expressed in granulosa cells of growing follicles in the ovary.

Detailed studies in rodents have shown that AMH expression starts in the columnar granulosa cells of primary follicles immediately after differentiation from the flattened pregranulosa cells of primordial follicles. Expression is highest in granulosa cells of preantral and small antral follicles, and gradually diminishes in the subsequent stages of follicle development. AMH is no longer expressed during the FSH-dependent final stages of follicle growth (Fig. 1). In addition, AMH expression disappears when follicles become atretic. The level of expression in follicles of the same class does not seem to change during the estrous cycle in rat, although some heterogeneity was observed in AMH expression in preantral and small antral follicles at estrous and diestrous (review by Durlinger *et al.* 2002a).

Interestingly, two major regulatory steps of folliculogenesis, initial follicle recruitment and cyclic selection for dominance (McGee & Hsueh 2000), flank this window of expression. Analysis of the follicle dynamics in AMH null mice provided more insight into the intraovarian role of AMH and revealed that AMH specifically affects these two regulatory steps. Ovaries of 4-month-old AMH null mice contained almost threefold more small nonatretic growing follicles than their wild-type littermates, accompanied by a decrease in the number of primordial follicles (Durlinger *et al.* 1999). This increased recruitment had already started before the initiation of the estrous cycle, since a higher number of growing follicles was already evident in AMH null mice at day 25. These results indicate that, in the

absence of AMH, primordial follicles are recruited at a faster rate. Consequently, the primordial follicle pool is prematurely exhausted and estrous cycling stops at an earlier age in AMH null mice (Durlinger *et al.* 1999). *In vitro* culture of neonatal ovaries in the presence of AMH confirmed the inhibitory effect of AMH on primordial follicle recruitment (Durlinger *et al.* 2002b). Based on the low FSH levels measured in AMH null mice in the presence of an increased number of growing follicles, it was hypothesized that, in the absence of AMH, follicles are more sensitive to FSH. Indeed, AMH inhibited FSH-dependent follicle growth of cultured mouse preantral follicles (Durlinger *et al.* 2001). Similarly, in granulosa cell cultures, AMH attenuates the FSH-dependent increase in aromatase activity and LH receptor expression (di Clemente *et al.* 1994). Furthermore, an *in vivo* study in which FSH levels were modulated showed that in the presence of both low and high serum FSH concentrations more growing follicles are found in AMH null mice than in wild-type mice (Durlinger *et al.* 2001). This inhibitory effect of AMH on FSH sensitivity of follicles could play a role in the process of selection. It is thought that each follicle exerts its own threshold FSH concentration that has to be exceeded to allow selection. A role for AMH in this process is indirectly supported by the differential expression level of AMH in nonatretic, large preantral and small antral follicles in the rat ovary (Baarends *et al.* 1995). A low expression of AMH within the follicle would diminish the threshold level for FSH, allowing these follicles to continue growth and to ovulate in the next estrous cycle.

Although they are mostly based on rodent studies, these results also appear to apply to the human ovary. In women, AMH expression can first be observed in granulosa cells of primary follicles, and expression is strongest in preantral and small antral follicles (≤ 4 mm). AMH expression disappears in follicles of increasing size and is almost lost in follicles larger than 8 mm, where only very weak staining remains, restricted to the granulosa cells of the cumulus (Weenen *et al.* 2004). This expression pattern suggests that, also in man, AMH may play a role in initial recruitment and in the selection of the dominant follicle

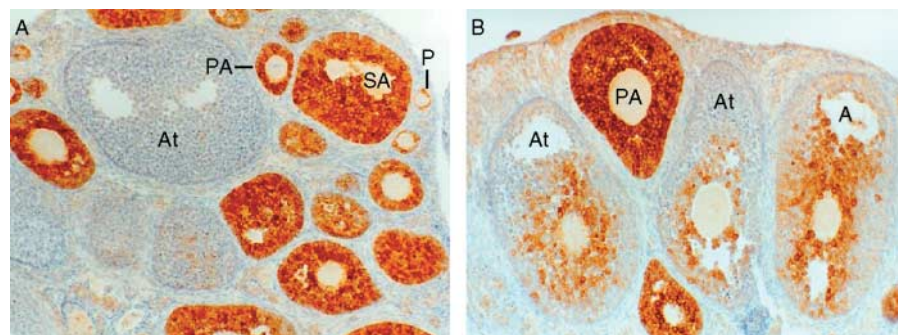


Figure 1 AMH expression in mouse ovaries. (A) AMH is expressed in granulosa cells of primary (P), preantral (PA) and small antral (SA) follicles. (B) AMH expression disappears in antral (A) and atretic (At) follicles. Expression is lost last in the granulosa cells surrounding the oocytes. AMH expression was detected using a monoclonal antibody that recognises rat, mouse and human AMH. Magnification $\times 200$.

(Fig. 2). The possible mechanisms of action of AMH are reviewed elsewhere (Durlinger *et al.* 2002a, Visser 2003).

AMH as a marker for ovarian aging

The specific expression pattern of AMH in growing non-selected follicles has prompted us and others to investigate whether serum AMH levels are indicative for the size of the growing follicle pool. As discussed above, the quantitative aspect of ovarian aging is reflected by a decline in the size of the primordial follicle pool. Direct measurement of the primordial follicle pool is impossible. However, the number of primordial follicles is indirectly reflected by the number of growing follicles (Scheffer *et al.* 1999). Hence, a factor primarily secreted by growing follicles will reflect the size of the primordial follicle pool. Since AMH is expressed by growing follicles up to selection (Durlinger *et al.* 2002a), and can be detected in serum (Hudson *et al.* 1990, Lee *et al.* 1996), it is a promising candidate.

In young normal ovulatory women, early follicular phase hormone measurements at 3-year intervals revealed that serum AMH levels decline significantly whereas serum levels of FSH and inhibin B and the number of antral follicles do not change during this interval (de Vet *et al.* 2002). Stratification for age revealed that both serum AMH levels and numbers of antral follicles decline with age (Fig. 3A). Importantly, a strong correlation of serum AMH levels with AFC was observed (Fig. 3B). This positive correlation was later confirmed by Fanchin *et al.* (2003b), who showed a stronger correlation between serum AMH levels and follicle count than between AMH and serum levels of inhibin B, FSH, and E_2 on cycle day 3.

The results of de Vet *et al.* (2002) also suggest that changes in serum AMH levels occur relatively early in the sequence of events associated with ovarian aging. Substantially elevated serum levels of FSH are not found until cycles have already become irregular (Burger *et al.* 1999). Therefore, a marker that already shows a considerable change when cyclicity is still normal would better identify women with declining fertility. Indeed, in studies by van

Rooij *et al.* (2004, 2005), in which several markers of aging were measured in normal women at 4-year intervals, serum levels of AMH gave the highest accuracy (ROC_{AUC} 0.87) to predict occurrence of menopausal transition within 4 years. When serum inhibin B levels and age were included in a multivariate model, the ROC_{AUC} improved to 0.92. Furthermore, compared to other ovarian reserve markers, only serum AMH level showed a mean longitudinal decline over time. Taken together, these data strongly suggest that serum levels of AMH can be used as a marker of ovarian aging.

The usefulness of serum AMH levels as a measure of the ovarian reserve was recently shown in young women after treatment for childhood cancer. Chemotherapy and radiotherapy treatment have adverse effects on the ovary in particular, resulting in loss of primordial follicles. Indeed, in cancer survivors, the partial loss of the ovarian reserve is reflected by increased FSH levels and decreased ovarian volume. Unexpectedly, the number of small antral follicles is unchanged (Bath *et al.* 2003), a finding that may reflect the low accuracy and observer dependency of AFC measurements. Nevertheless, serum AMH levels were decreased in these patients, supporting the use of serum AMH levels as an early predictor of the ovarian reserve.

AMH as a marker of ovarian responsiveness

AMH's role as a peripheral signal of the size of the growing follicle pool may have important clinical benefits. In women undergoing treatment for infertility, ovarian aging is characterized by decreased ovarian responsiveness to exogenous gonadotropin administration and poor pregnancy outcome. On the one hand, correct identification of poor responders by assessment of their ovarian reserve before entering an *in vitro* fertilization (IVF) program is important. On the other hand, assessment of the ovarian reserve may also benefit patients that would generally be excluded from IVF programs because of advanced age.

Several studies have shown that AMH is an excellent marker to determine ovarian responsiveness also in an IVF program. Hormone measurements in the early follicular phase (day 3 of spontaneous cycle), retrospectively or in a group of unselected patients, revealed that AMH levels are lower in patients with poor ovarian response than in women with normal response (Seifer *et al.* 2002, van Rooij *et al.* 2002), ovarian responsiveness being defined as the number of oocytes retrieved, or as cancellation due to impaired or absent follicular growth. In agreement with the studies described above, AMH serum levels were shown to be highly correlated with the number of antral follicles before treatment and number of oocytes retrieved upon ovarian stimulation (van Rooij *et al.* 2002). Logistic regression analysis for prediction of poor response showed that serum AMH levels had a better predictive value than serum levels of FSH, inhibin B and E_2 , and that the

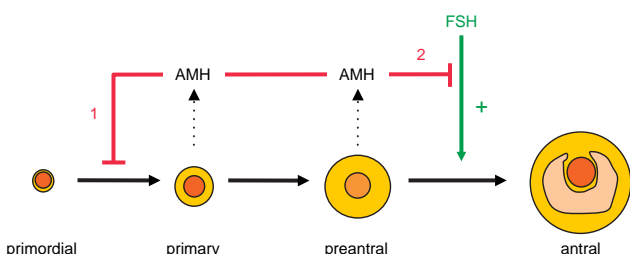


Figure 2 Model of AMH action in the ovary. Progressing stages of folliculogenesis are depicted. AMH is produced by the small growing (primary and preantral) follicles in the postnatal ovary and has two sites of action. It inhibits initial follicle recruitment (1) and inhibits FSH-dependent growth and selection of preantral and small antral follicles (2).

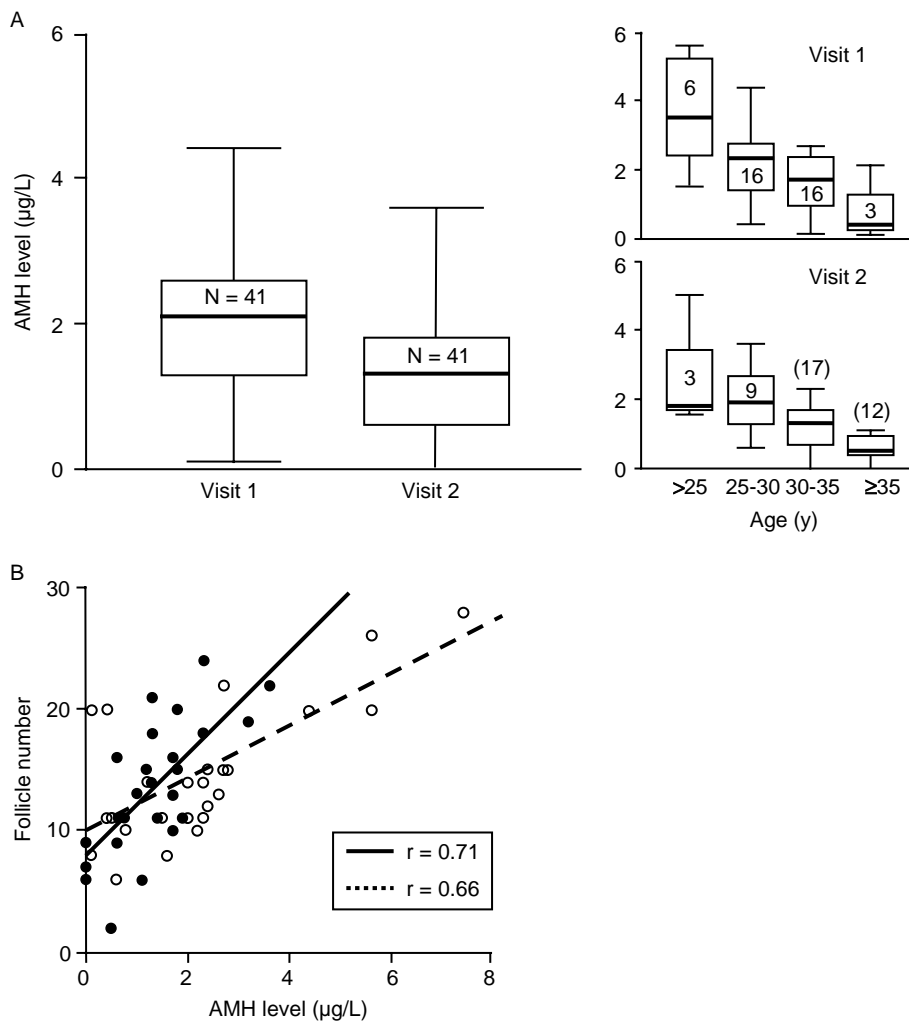


Figure 3 Serum AMH levels in normo-ovulatory women. (A) Box and whiskers plots show declining AMH levels with increasing age. AMH levels were measured at two time points with a 2.6 ± 1.7 -year interval. (B) AMH levels positively correlate with numbers of antral follicles at visit 1 (closed circles, solid line) and visit 2 (open circles, dotted line). Reproduced from de Vet *et al.* (2002), with permission from American Society for Reproductive Medicine.

Table 1 Logistic regression for prediction of poor response after ovarian hyperstimulation.

Univariate analysis	Odds ratio (95% CI)	P	ROC _{AUC}
AFC (per follicle)	0.70 (0.61–0.81)	<0.001	0.86
AMH (per 0.1 µg/l)	0.82 (0.75–0.90)	<0.001	0.85
FSH (per IU/l)	1.41 (1.22–1.63)	<0.001	0.83
Inhibin B (per ng/l)	0.98 (0.97–0.99)	<0.001	0.76
Age (per year)	1.07 (0.99–1.16)	NS	0.60
E ₂ (per pmol/l)	1.003 (1.000–1.006)	NS	0.52
Multivariate analysis	OR (95% CI)		ROC _{AUC} (final model)
<i>All variables</i>			
AFC (per follicle) and Inhibin B (per pg/ml) and FSH (per IU/l)	0.77 (0.65–0.90)	0.001	0.92
	0.98 (0.97–0.99)	0.006	
	1.27 (1.07–1.50)	0.006	
<i>AFC excluded from analysis</i>			
AMH (per 0.1 µg/l) and Inhibin B (per pg/ml) and FSH (per IU/l)	0.90 (0.82–0.98)	0.018	0.90
	0.98 (0.97–0.99)	0.005	
	1.26 (1.07–1.50)	0.006	

Data taken from van Rooij *et al.* (2002), © European Society of Human Reproduction and Embryology. Reproduced by permission of Oxford University Press/Human Reproduction.

predictive values for AMH and AFC were almost identical (ROC_{AUC} 0.85 vs 0.86) (Table 1). Inclusion of FSH and inhibin B together with AMH in a multivariate model improved this predictive value to 0.90 (van Rooij *et al.* 2002) (Table 1). Similarly, cycle day-5 AMH levels are a better marker of ovarian responsiveness than inhibin B levels (Muttukrishna *et al.* 2004). Measurement of serum AMH levels has several advantages over other serum markers such as FSH, inhibin B and E_2 . To achieve a reliable predictive outcome, one single hormone measurement for AMH seems sufficient (Fanchin *et al.* 2005a). Furthermore, in contrast to FSH, inhibin B and E_2 , AMH levels remain relatively constant during the follicular phase and entire menstrual cycle (Cook *et al.* 2000, La Marca *et al.* 2004a, and our own unpublished results (F H J, J L, A T and Dr F Broekmans), consistent with the continuous, noncyclic growth of small follicles.

The absence of regulation of AMH by gonadotropins was shown in both rodents and man. Heterozygous AMH null mice present with an ovarian phenotype between that of wild-type and homozygous AMH null mice (Durlinger *et al.* 1999), suggesting that AMH acts as a paracrine rather than a systemic factor, and thus is not part of a negative feedback loop with involvement of gonadotropins. In agreement, treatment of IVF patients with a single, high dose of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist, resulting in a rise of endogenous FSH and LH, does not affect AMH serum levels (van Rooij *et al.* 2002). Similarly, in conditions where FSH levels are suppressed, such as pregnancy, AMH levels remain constant (La Marca *et al.* 2005). Thus, AMH is not influenced by the gonadotropic status and reflects only the follicle population. The latter conclusion was confirmed in a more detailed study by Fanchin *et al.* (2003a), who treated women with FSH and human chorionic gonadotropin (hCG) after complete pituitary desensitization with a GnRH agonist. In a normal menstrual cycle, the early antral follicle pool remains intact throughout the follicular phase. However, upon ovarian hyperstimulation, all small antral follicles are stimulated to the preovulatory stage, thus providing a model to determine the relationship between AMH levels and follicle dynamics. Serum AMH levels, determined at three days during FSH treatment and at the day of hCG administration, decline significantly at each consecutive measurement (Fanchin *et al.* 2003a), reflecting the reduction in number of small antral follicles. A decline in serum AMH was also observed after FSH administration immediately following a spontaneous cycle (La Marca *et al.* 2004a). Moreover, on day 5 of gonadotropin therapy, levels of serum AMH and estradiol constitute an even better prediction of the ovarian response than cycle day 3 AMH levels (Penarrubia *et al.* 2005). However, from a clinical point of view, poor responders should be identified before treatment; therefore, it is more useful to determine serum AMH levels during a spontaneous cycle.

Throughout the controlled ovarian hyperstimulation protocol, serum AMH levels correlated well with the decrease in number of small antral follicles (≤ 12 mm) (Fanchin *et al.* 2003a), reflecting the complete conversion of small antral follicles into large antral follicles in response to FSH stimulation. Indeed, no correlation with the number of growing follicles (> 12 mm) was observed (Fanchin *et al.* 2003a), in line with the low expression of AMH in these follicles (Weenen *et al.* 2004). In the days following hCG treatment, AMH serum levels initially declined, possibly as a result of the luteinization of granulosa cells upon hCG treatment that also causes a decline in E_2 levels. During the midluteal phase, AMH serum levels slightly increased, probably as a result of the presence of newly developed, small antral follicles (Fanchin *et al.* 2005b). Thus, these changes in serum AMH levels seem to reflect follicle dynamics rather than regulation by gonadotropins.

All combined these studies strongly support a role of serum AMH level as a marker for ovarian responsiveness. However, the application of AMH to predict ongoing pregnancy seems limited, although day 3 serum AMH levels are higher in patients that become pregnant after IVF treatment than in those who do not (Hazout *et al.* 2004). However, data on pregnancy outcome were not stratified for the number of retrieved oocytes, which also in this study showed a positive correlation with AMH levels. Therefore, it is likely that the quantitative aspect of AMH as a marker of the ovarian reserve has contributed predominantly to the association with pregnancy outcome. Indeed, other studies did not observe a predictive value of AMH serum levels for ongoing pregnancy after IVF treatment (van Rooij *et al.* 2002, Penarrubia *et al.* 2005).

AMH as a marker for ovarian pathophysiology

The results of the studies described above indicate that serum AMH level can be used as a marker for the number of growing follicles. Besides being a marker for a diminishing follicle pool, serum AMH level can also serve as a marker in ovarian pathophysiology, such as polycystic ovary syndrome (PCOS), in which the antral follicle pool is enlarged. PCOS is one of the most common endocrine disorders in women of reproductive age (Franks 1995). It is characterized by anovulation manifested as oligo- or amenorrhea, elevated levels of circulating androgens, and polycystic ovaries as visualized by ultrasound. The diagnosis is based on the presence of at least two of the described characteristics, as defined by the Rotterdam Consensus (2004). PCOS encompasses a broad spectrum of clinical and biochemical characteristics, and, although the mechanisms leading to PCOS are still poorly understood, the common denominator is a disturbance in the selection of the dominant follicle resulting in anovulation. The defective selection mechanism results in an accumulation of small antral follicles, which contribute

significantly to the production of AMH. As discussed above, studies in mice showed that AMH lowers the sensitivity of follicles to FSH (Durlinger *et al.* 2001), possibly contributing to deranged follicle selection. It has been suggested that aromatase activity in PCOS patients might be decreased because follicles from PCOS women do not produce large amounts of E_2 (Agarwal *et al.* 1996). AMH also inhibits aromatase activity, as discussed above, suggesting that AMH contributes to the severity of PCOS.

Initial studies showed that follicular fluid and serum of PCOS women contained increased AMH levels (Fallat *et al.* 1997, Cook *et al.* 2002). In agreement with previous results obtained in normal cycling women, also in PCOS women serum AMH levels were correlated with antral follicle number. The two- to threefold increase in the number of growing follicles is reflected by a two- to threefold increase in serum AMH level (Pigny *et al.* 2003, Laven *et al.* 2004) (Fig. 4). In PCOS, the follicular excess is mainly caused by an increase of small antral follicles upto 2–5 mm in size (Hughesdon 1982, Jonard *et al.* 2003). Interestingly, in follicles beyond this stage, AMH expression diminishes (Weenen *et al.* 2004). Therefore, it is not surprising that serum AMH levels positively correlate with the number of 2–5 mm, but not 6–9 mm, follicles in PCOS women (Pigny *et al.* 2003). The finding that AMH levels are also increased in the follicular fluid of PCOS women (Fallat *et al.* 1997) suggests that the increase in serum AMH levels is not only due to an increase in the number of growing follicles, but may also result from increased AMH production per follicle. So far little is known about the factors that regulate AMH expression in the ovary.

Categorization of anovulatory women into groups with or without polycystic ovaries (PCO), by number of antral follicles (≥ 12 follicles per ovary measuring 2–9 mm) or

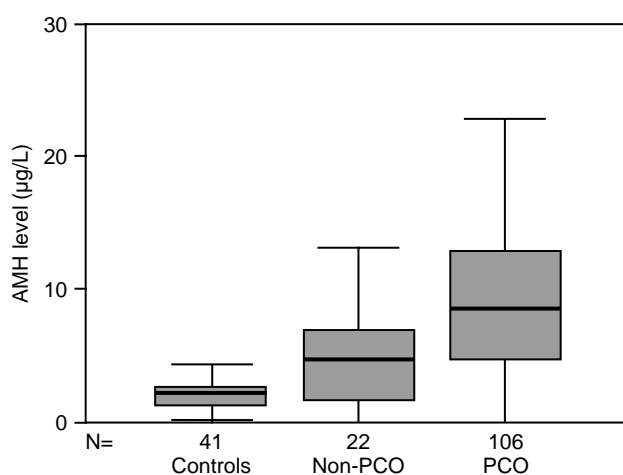


Figure 4 Serum AMH levels are increased in normogonadotropic anovulatory infertile women. Box and whisker plots show AMH levels in infertile women with PCO and those without (non-PCO) compared with control women. Reproduced from Laven *et al.* (2004) (©2004, Endocrine Society).

ovarian volume (> 10 ml), revealed that serum AMH levels were significantly higher in the PCO group than in non-PCO patients (Laven *et al.* 2004). Nevertheless, serum levels in non-PCO women were still significantly elevated compared to those in control women (Fig. 4). This suggests that the pool of smaller follicles, which is not detected on ultrasound, may be increased and contributes significantly to serum AMH levels in anovulatory women. In a study by Eldar-Geva *et al.* (2005), categorization of PCOS women by presence or absence of hyperandrogenism showed that AMH levels were significantly different between groups. Both groups had increased AMH levels compared to control women, but levels in women with PCO and hyperandrogenism were even further elevated. Interestingly, the numbers of small antral follicles did not differ between the two PCO groups, and multiple regression analysis showed that follicle number and testosterone levels independently correlated with AMH serum levels (Eldar-Geva *et al.* 2005). These results suggest that the nonvisible pool of follicles may be further increased in the presence of increased androgen levels. Indeed, in the rhesus monkey, androgens stimulate the initiation of primordial follicle growth (Vendola *et al.* 1999). In addition, androgens stimulate the proliferation of granulosa and theca cells of growing follicles in rhesus monkeys (Vendola *et al.* 1998). It is possible that under these conditions follicles may produce more AMH. Since AMH inhibits aromatase activity, local androgen concentrations may be increased, possibly resulting in a positive feedback mechanism between AMH and androgens. However, the mechanism behind the positive association between androgens and AMH in PCOS women requires further studies, in particular, since in males during puberty an inverse relationship between AMH and testosterone levels was found (Rey *et al.* 1993). In this respect, it would be interesting to analyze the expression level and pattern of AMH by immunohistochemical analysis in polycystic ovaries of women with or without hyperandrogenism.

In PCOS women, levels of serum AMH are also correlated with other clinical features, such as cycle duration, mean ovarian volume, testosterone and androstenedione levels, and free androgen index, whereas no correlations with inhibin B and E_2 levels were observed (Pigny *et al.* 2003, Laven *et al.* 2004).

A substantial proportion of PCOS women are obese and exhibit insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia (Dunaif 1997). The increased insulin levels in some PCOS women can, in part, account for the hyperandrogenism, because insulin acts synergistically with LH to enhance androgen production by theca cells (Franks *et al.* 1999). However, serum AMH levels do not seem to correlate with BMI and insulin levels (Pigny *et al.* 2003, Laven *et al.* 2004, Fleming *et al.* 2005). In contrast, in a small study, La Marca *et al.* (2004b) observed a positive correlation between serum AMH levels and the HOMA index, an insulin resistance index calculated from fasting insulin and fasting glucose levels.

Improvement of insulin levels by insulin-lowering drugs, such as metformin and thiazolidinediones, which also indirectly affect androgen production, have been shown to be beneficial in PCOS women (Franks *et al.* 1999). In a study of obese PCOS women, metformin treatment suppressed androstenedione levels and ovulation rate (Fleming *et al.* 2005), although androgen levels were still above the upper limit of the normal range. Metformin administration also resulted in a small but significant reduction of serum AMH levels after 8 months of treatment, whereas the follicle number did not change significantly (Fleming *et al.* 2005). In a smaller study, metformin treatment for 6 months also decreased serum AMH levels only slightly (Piltonen *et al.* 2005), and levels remained strongly elevated compared to controls. Although AMH and androgen levels are positively correlated in PCOS women, the decrease in AMH levels may be secondary to the decrease in androgens upon metformin treatment. Furthermore, since the number of follicles is not likely to change in a short period of time, more detailed studies with longer follow-up are required to determine the long-term effect of insulin-lowering agents on AMH levels.

As in cycling women, AMH levels decline with increasing age in PCOS. However, the decrease in serum levels is significantly different from that in controls (Laven *et al.* 2004). A follow-up study investigated this phenomenon in more detail by measuring serum AMH levels in control and PCOS women on two occasions with a median time interval of 2.6 years. Although AMH levels had declined over time in both groups, the decline was less pronounced in PCOS women (Mulders *et al.* 2004). These results were confirmed by Piltonen *et al.* (2005), who showed that, in contrast to older control women with low to undetectable AMH levels, women with PCOS of the same age still had high AMH levels. This suggests that the ovarian aging process in PCOS women may have been slowed down, possibly due to suppressed primordial follicle outgrowth by the high levels of AMH observed in these women. However, it has also been suggested that exhaustion of the primordial follicle pool occurs later in PCOS women because their intrinsic primordial follicle pool may be increased (Webber *et al.* 2003). Data regarding the menopausal age in PCOS women are scarce. However, smaller studies seem to indicate that women with PCOS reach menopause at an older age (Dahlgren *et al.* 1992).

Conclusions and future directions

The studies described here indicate that serum AMH levels decrease with age in premenopausal women. In addition, serum levels of AMH correlate strongly with the number of antral follicles, suggesting that AMH levels by extension reflect the size of the primordial follicle pool. Assessment of the ovarian reserve is particularly important in the IVF clinic, where AMH may be useful as a predictor of poor response. Since a considerable proportion of

subfertility is due to postponement of childbearing, measurement of AMH levels to assess the ovarian reserve may also be of interest in women in general. Assessment of the ovarian reserve, at least of the size of the ovarian follicle pool, may provide insight into the number of fertile years a woman has left. However, in order to determine whether serum AMH level has prognostic value, additional prospective studies in a normal population are necessary to provide definite proof for this concept.

The positive correlation between serum AMH levels and number of antral follicles is also observed in women with PCOS. The elevated levels of AMH in these women strongly suggest that serum AMH levels may also be used in the diagnosis of PCOS. The difference in serum levels of AMH between subgroups of PCOS women suggests that AMH might also be used to establish a subclassification of this heterogeneous syndrome. However, more studies, preferably prospective, with thoroughly analyzed patient cohorts are necessary to define cutoff values. In addition, studies are necessary to determine whether serum AMH levels are also indicative of improved ovarian function upon treatment of PCOS women.

In conclusion, recent studies have validated the use of serum AMH levels as a marker for the quantitative aspect of ovarian reserve. Because AMH levels are strongly correlated with the size of the follicle pool, and because of the lack of cycle variations, serum levels of AMH are a good candidate for inclusion in standard diagnostic procedures to assess other ovarian dysfunctions, such as premature ovarian failure. Knowledge of the serum AMH levels in such conditions might provide more insight into the possible cause or effect of altered AMH levels. Genetic studies of well-defined population cohorts would also provide more knowledge about the role of AMH in ovarian physiology.

Acknowledgements

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Agarwal SK, Judd HL & Magoffin DA 1996 A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 3686–3691.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen APN & Grootegoed JA 1995 Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* **136** 4951–4962.
- Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C & Anderson RA 2003 Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Human Reproduction* **18** 2368–2374.
- Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Shelley JM, Green A, Smith A, Dennerstein L & Morse C 1995 The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based

- sample. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **80** 3537–3545.
- Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N, Guthrie JR, Green A & Dennerstein L** 1999 Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 4025–4030.
- Cook CL, Siow Y, Taylor S & Fallat ME** 2000 Serum mullerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertility and Sterility* **73** 859–861.
- Cook CL, Siow Y, Brenner AG & Fallat ME** 2002 Relationship between serum mullerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertility and Sterility* **77** 141–146.
- Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F, Oden A, Janson PO, Mattson LA, Crona N & Lundberg PA** 1992 Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertility and Sterility* **57** 505–513.
- den Tonkelaar I, te Velde ER & Looman CW** 1998 Menstrual cycle length preceding menopause in relation to age at menopause. *Maturitas* **29** 115–123.
- de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen APN & Fauser BC** 2002 Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertility and Sterility* **77** 357–362.
- di Clemente N, Goxe B, Rémy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B & Salesse R** 1994 Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* **2** 553–558.
- Dunaif A** 1997 Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews* **18** 774–800.
- Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA & Themmen APN** 1999 Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* **140** 5789–5796.
- Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA & Themmen APN** 2001 Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* **142** 4891–4899.
- Durlinger ALL, Visser JA & Themmen APN** 2002a Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* **124** 601–609.
- Durlinger ALL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA & Themmen APN** 2002b Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* **143** 1076–1084.
- Eldar-Geva T, Margalioth EJ, Gal M, Ben-Chetrit A, Algur N, Zylber-Haran E, Brooks B, Huerta M & Spitz IM** 2005 Serum anti-Mullerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation in women with polycystic ovaries with and without hyperandrogenism. *Human Reproduction* **20** 1814–1819.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ & Nelson JF** 1992 Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction* **7** 1342–1346.
- Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C & Carrillo A** 1997 Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertility and Sterility* **67** 962–965.
- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R & Taieb J** 2003a Serum anti-Mullerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Human Reproduction* **18** 328–332.
- Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R & Taieb J** 2003b Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Human Reproduction* **18** 323–327.
- Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R & Bouyer J** 2005a High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status. *Human Reproduction* **20** 923–927.
- Fanchin R, Mendez Lozan DH, Louafi N, Achour-Frydman N, Frydman R & Taieb J** 2005b Dynamics of serum anti-Mullerian hormone levels during the luteal phase of controlled ovarian hyperstimulation. *Human Reproduction* **20** 747–751.
- Fleming R, Harborne L, MacLaughlin DT, Ling D, Norman J, Sattar N & Seifer DB** 2005 Metformin reduces serum mullerian-inhibiting substance levels in women with polycystic ovary syndrome after protracted treatment. *Fertility and Sterility* **83** 130–136.
- Franks S** 1995 Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine* **333** 853–861.
- Franks S, Gilling-Smith C, Watson H & Willis D** 1999 Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **28** 361–378.
- Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM & Cohen-Bacrie P** 2004 Serum antimullerian hormone/mullerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertility and Sterility* **82** 1323–1329.
- Hudson PL, Dougas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB & MacLaughlin DT** 1990 An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **70** 16–22.
- Hughesdon PE** 1982 Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called ‘hyperthecosis’. *Obstetrical and Gynecological Survey* **37** 59–77.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK & Tilly JL** 2004 Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **428** 145–150.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT & Tilly JL** 2005 Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* **122** 303–315.
- Jonard S, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Pigny P, Decanter C & Dewailly D** 2003 Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles? *Human Reproduction* **18** 598–603.
- Josso N, Cate RL, Picard JY, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky RB, Guerrier D, Boussin L, Legeai L & Carré-Eusèbe D** 1993 Anti-mullerian hormone: the Jost factor. *Recent Progress in Hormone Research* **48** 1–59.
- La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P & Volpe A** 2004aa Anti-Mullerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Human Reproduction* **19** 2738–2741.
- La Marca A, Orvieto R, Giulini S, Jasonni VM, Volpe A & De Leo V** 2004bb Mullerian-inhibiting substance in women with polycystic ovary syndrome: relationship with hormonal and metabolic characteristics. *Fertility and Sterility* **82** 970–972.
- La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V & Volpe A** 2005 Anti-Mullerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Human Reproduction* **20** 1569–1572.
- Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen APN, De Jong FH & Fauser BC** 2004 Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 318–323.
- Lee MM & Donahoe PK** 1993 Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews* **14** 152–164.
- Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D & MacLaughlin DT** 1996 Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 571–576.

- McGee EA & Hsueh AJ 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* **21** 200–214.
- Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, de Jong FH, Themmen APN & Fauser BC 2004 Changes in anti-Mullerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Human Reproduction* **19** 2036–2042.
- Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H & Sathanandan M 2004 Inhibin B and anti-Mullerian hormone: markers of ovarian response in IVF/CSI patients? *BJOG* **111** 1248–1253.
- Penarrubia J, Fabregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA & Balasch J 2005 Basal and stimulation day 5 anti-Mullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Human Reproduction* **20** 915–922.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S & Dewailly D 2003 Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88** 5957–5962.
- Piltonen T, Morin-Papunen L, Koivunen R, Perheentupa A, Ruokonen A & Tapanainen JS 2005 Serum anti-Mullerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* **20** 1820–1826.
- Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC, Barbet P, Cate RL, Roger M, Chaussain JL & Josso N 1993 Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **77** 1220–1226.
- Rotterdam Consensus, 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* **19** 41–47.
- Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW & te Velde ER 1999 Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertility and Sterility* **72** 845–851.
- Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, de Jong FH & te Velde ER 2003 The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Human Reproduction* **18** 700–706.
- Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B & Shelden RM 2002 Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertility and Sterility* **77** 468–471.
- te Velde ER & Pearson PL 2002 The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction Update* **8** 141–154.
- te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ & Fauser BC 1998a Developmental and endocrine aspects of normal ovarian ageing. *Molecular and Cellular Endocrinology* **145** 67–73.
- te Velde ER, Dorland M & Broekmans FJ 1998b Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas* **30** 119–125.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH & Themmen APN 2002 Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction* **17** 3065–3071.
- van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH, Themmen APN & te Velde ER 2004 Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* **11** 601–606.
- van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen APN & Te Velde ER 2005 Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertility and Sterility* **83** 979–987.
- Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M & Bondy CA 1999 Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biological Reproduction* **61** 353–357.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ & Bondy CA 1998 Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *Journal of Clinical Investigation* **101** 2622–2629.
- Visser JA 2003 AMH signaling: from receptor to target gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* **211** 65–73.
- Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K & Franks S 2003 Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet* **362** 1017–1021.
- Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC & Themmen APN 2004 Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction* **10** 77–83.

Received 21 July 2005

First decision 30 August 2005

Revised manuscript received 31 August 2005

Accepted 26 September 2005

GROEIHORMOON (GH) DEFICIËNTIE: WELKE DIAGNOSTISCHE FUNCTIETESTEN EN WELKE CRITERIA VOOR BEHANDELING?

A.S.P. van Trotsenburg, kinderarts-endocrinoloog

H.M. Dijkstra, klinisch chemicus-endocrinoloog

Humaan groeihormoon (GH) is een 191 aminozuren lang, niet geglycosyleerd eiwit met een molecuul gewicht van 22 kDa. Het coderende gen ligt op de lange arm van chromosoom 17 en komt voornamelijk tot expressie in de hypofyse, de plaats waar GH wordt geproduceerd en in de circulatie wordt uitgescheiden. Naast het 22 kDa GH (80-90% van het circulerende GH) produceert de hypofyse een GH variant (“alternative splicing”) dat de aminozuren 32 t/m 46 mist, het zogenaamde 20 kDa GH (de overige 10-20% van het circulerende GH).

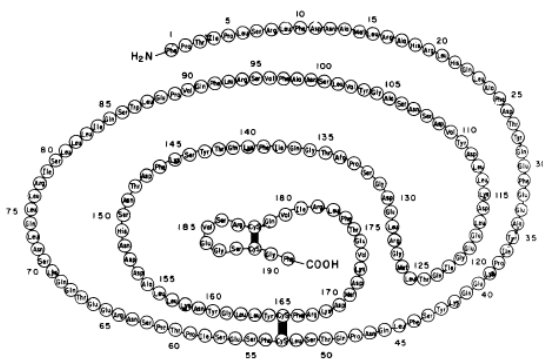


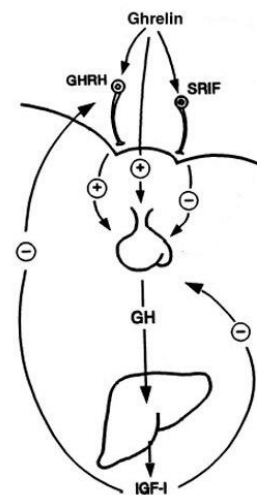
Figure 1 Covalent structure of hGH.

De covalente structuur van humaan GH (Chawla RK et al, Annu Rev Med 34 (1983) 519-547)

GH wordt geproduceerd in en afgescheiden door de somatotrope cellen in de hypofyse voorkwab. De secretie is pulsatief, iedere 3 à 4 uur, en tussen de pulsen is de plasma GH concentratie zeer laag.

De hypofysaire GH productie en secretie staat onder directe controle van de hypothalamus via het daar geproduceerde en uitgescheiden “growth hormone releasing

hormone” (GHRH) en somatostatine (SS; ook wel somatotropin release inhibiting factor [SRIF] genoemd). GHRH en SS bereiken de hypofyse voorkwab via het veneuze poortader stelsel dat tussen de hypothalamus en de hypofyse voorkwab ligt. GHRH stimuleert en SS remt de productie en secretie van GH door de somatotrope cellen. Een derde, vrij recent “ontdekt” hormoon dat de hypofysaire GH secretie stimuleert is Ghrelin. Ghrelin wordt in de maag geproduceerd en uitgescheiden, en stimuleert tevens de eetlust. De productie en secretie van GHRH en SS staan onder controle van een groot aantal neurotransmitters en neuropeptides, waaronder serotonine, histamine, norepinefrine, dopamine, acetylcholine, etc.



Schematische weergave van de hypothalamus-hypofyse/GH-IGF-1 as
 (bron: <http://www.myhealthspan.com/AgeRelatedHGHChanges.shtml>)

GH oefent zijn effecten op doelweefsels uit door binding aan de GH receptor die met name tot expressie komt in de lever, maar ook in andere weefsels zoals de botten. Binding aan de GH receptor resulteert in activering van een tyrosine kinase, waardoor activering van diverse signaal transductie paden en uiteindelijk gen transcriptie. Een van de belangrijkste op deze manier door GH geactiveerde genen is het “insulin like growth factor-1” (IGF-1) gen. Het eiwit hormoon IGF-1 is zeer waarschijnlijk verantwoordelijk voor het grootste deel van de “klinische” effecten van GH. IGF-1 wordt niet alleen in de lever geproduceerd (als “endocrien” hormoon), maar ook in de botten en andere doelweefsels als para- en autocrien hormoon.

De belangrijkste functie van GH en/of IGF-1 op de kinderleeftijd is (lengte-)groei, via stimulerende effecten op de kraakbenige groeischijven en botten. Daarnaast oefenen GH en IGF-1 effecten uit op vet- en spierweefsel (vet-“afbraak” resp. spier-“opbouw”). IGF-1 heeft een remmend effect op de hypofysaire GH en hypothalamische GHRH secretie.

GH deficiëntie op de kinderleeftijd kan het gevolg zijn van hypothalamische dysfunctie of van hypofysaire GH deficiëntie. Daarnaast kan een onderverdeling gemaakt worden in congenitale aandoeningen (bijvoorbeeld een aanlegstoornis van de hypothalamus/hypofyse regio) en verworven aandoeningen (bijvoorbeeld een tumor in de hypothalamus/hypofyse regio of na craniale radiotherapie).

Het meest duidelijke verschijnsel/symptoom van GH deficiëntie op de kinderleeftijd is lengtegroei vertraging, die bij “congenitale” GH deficiëntie al duidelijk kan worden tijdens de 2^e helft van het eerste levensjaar. Daarnaast hebben (werkelijk) GH deficiëntie kinderen vaak “romp”-obesitas en matige spierontwikkeling.

Bij klinische verdenking op de diagnose GH deficiëntie wordt qua diagnostiek in het algemeen gestart met een eenmalige bloedafname voor bepaling van de (serum) IGF-1 (en bij jonge kinderen tevens de IGFBP-3) concentratie. Als de IGF-1 concentratie in de bovenste helft van het leeftijdsspecifieke referentie interval (LSRI) ligt, is de diagnose GH deficiëntie zeer onwaarschijnlijk. Als de IGF-1 concentratie in de onderste helft van, of beneden het LSRI ligt worden GH stimulatietesten verricht. In de consensus “Diagnostiek kleine lichaamslengte bij kinderen” (1997) is afgesproken dat de eerste te verrichten test een clonidine stimulatietest is. Als de maximale (plasma) GH concentratie bij deze test < 20 mE/l is, dient een 2^e (arginine stimulatie) test verricht te worden.

In de bovengenoemde consensus zijn de volgende criteria voor de diagnose GH deficiëntie voorgesteld:

- lengtegroeiachterstand en (of) afbuigende groeicurve;
- een vertraagde skeletrijping (achterstand > 1 SD);
- een maximale groeihormoon-serumconcentratie < 20 mE/l na uitvoeren van 2 verschillende provocatietests, waarbij voorbehandeling met geslachtshormonen ('priming') bij prepuberale kinderen in de puberale leeftijd dient te worden toegepast;
- een verlaagde of laag-normale 'insulin like growth' factor-I (IGF-I)-serumconcentratie die niet op een andere manier kan worden verklaard;
- uitsluiting van andere oorzaken van groeiachterstand.

GH en IGF-1 worden doorgaans gemeten op geautomatiseerde bindingsanalyseplatforms met behulp van een LIEMA, een zogenaamde "luminescence-enhanced immunoenzymatic assay". Voor het meten van IGF-1 is het daarbij noodzakelijk dat IGF-1 eerst wordt gedissocieerd van bindende eiwitten met behulp van een zure preincubatie en een overmaat aan IGF-2 om vrijgekomen bindingsplaatsen te bezetten. In Nederland wordt voor het meten van GH en IGF-1 vrijwel alleen nog maar gebruik gemaakt van assays van de firma Siemens voor Immulite 1, 2000 en 2500. Dit komt de spreiding in waarden tussen verschillende laboratoria aanmerkelijk ten goede. Voor GH worden uitslagen bovendien geharmoniseerd door middel van een specifiek monster met een vastgestelde consensuswaarde dat periodiek wordt meegenomen tijdens de metingen, waardoor deze spreiding verder wordt beperkt.

Behoudens de gebruikelijke valkuilen bij het meten met behulp van bindingsanalyse (interferentie door storende factoren als fibrinestolsels, hemolyse, medicatie of heterofiele antilichamen; high-dose hook effecten) dient bij het meten van GH bij patiënten die worden behandeld met GH rekening gehouden te worden met het ontstaan van antilichamen tegen GH. Deze humane antilichamen tegen GH kunnen ook na het staken van de behandeling nog voorkomen en geven mogelijk vals verlaagde uitslagen in de test.

Referentiewaarden voor GH voor een willekeurige, enkelvoudige meting zijn van beperkte waarde; een waarde in het referentiegebied sluit deficiëntie (of overproductie) van GH geenszins uit. Voor de beoordeling daarvan zijn stimulatie- (en suppressie)testen geïndiceerd. Voor IGF-1 worden leeftijdsafhankelijke referentiewaarden gehanteerd; de serumconcentratie stijgt sterk gedurende de puberteit en daalt gestaag van de volwassen tot oudere leeftijd. In Nederland wordt veelal gebruik gemaakt van referentiewaarden gebaseerd op een studie van Rikken et al. (in-house radioimmunoassay) dan wel referentiewaarden geleverd door de firma Siemens (Elmlinger et al.). Deze curves ontlopen elkaar niet veel, behoudens enigszins hogere waarden en een grotere spreiding met name voor jonge kinderen bij de referentiewaarden van Siemens. Dit wordt mogelijk verklaard door het lage aantal data in de leeftijdscategorie 2-6 jaar en een niet-westerse afkomst van een deel van de gebruikte sera. Nieuwe Nederlandse referentiewaarden voor IGF-1, zowel voor kinderen als volwassenen, worden binnenkort verwacht.

Om de diagnose GH deficiëntie te stellen, zijn inmiddels vele stimulatietesten ontwikkeld en een veelvoud van combinaties van stimulatietesten uitgevoerd. Desondanks is er geen goede gouden standaardtest voor het vaststellen van GH deficiëntie. Vaak wordt de insulinetolerantietest (ITT) als gouden standaardmethode opgevoerd, maar dat is geenszins onderbouwd in de literatuur. In de consensus “Diagnostiek kleine lichaamslengte bij kinderen” (1997) worden de clonidinstimulatietest en arginestimulatietest aanbevolen.

Het is echter bekend dat stimulatietesten, waaronder ook bovengenoemde, reproduceerbaarheid en juistheid ontberen om de diagnose GH deficiëntie te kunnen stellen. Wanneer dezelfde stimulatietest binnen korte tijd tweemaal wordt uitgevoerd, is in verschillende studies reeds aangetoond dat dit slechts in ongeveer 50% van de gevallen tot dezelfde uitslag leidt. Wanneer de reproduceerbaarheid van een test zo slecht is, wordt het vrijwel onmogelijk om iets over de juistheid van de test te kunnen zeggen, met name als een gouden standaard voor het stellen van de diagnose ontbreekt. De juistheid wordt daarbij ook nog eens beïnvloed door de gekozen afkapwaarde van de

test. Dit wordt goed geïllustreerd door de studie van Tillman et al. waarbij de diagnose GH deficiëntie werd gesteld op basis van klinische en auxologische data. Als stimulatietesten werden arginine-, glucagon-, clonidine- of inspanningstesten gebruikt, alsmede insulinetolerantietesten. In sommige gevallen werd geprimed met geslachtshormonen. Bij een afkapwaarde van 15 mU/L waren sensitiviteit en specificiteit van de stimulatietesten respectievelijk 73% en 85%; de positief voorspellende waarde was slechts 50%. Bij een afkapwaarde van 5 mU/L waren sensitiviteit en specificiteit respectievelijk 53% en 92% met een positief voorspellende waarde van 80%. Dit geeft aan dat een hoge afkapwaarde een onacceptabel aantal fout positieve uitslagen tot gevolg heeft. Daardoor worden te vaak normale kinderen bestempeld als GH deficiënt. Echter, door een lage sensitiviteit zullen met regelmaat GH deficiënte kinderen worden gemist. Daarnaast is gebleken dat de voorspellende waarde ten aanzien van het aanslaan van GH behandeling van stimulatietesten beperkt is (Van den Broeck et al.), met name bij hogere afkapwaarden.

Mogelijk dat in de toekomst meer gebruik gemaakt kan worden van IGF-1 en IGFBP-3 bij het stellen van de diagnose GH deficiëntie bij kinderen. In een studie door Adan et al. werd de diagnose complete of transiente GH deficiëntie (gesteld op grond van MRI, stimulatietesten en hypoglycemie/microfallus) ondersteund door de bepaling van IGF-1 en IGFBP-3 met een sensitiviteit van 96% en een specificiteit van 92%. Bovendien is aangetoond dat een laag IGF-1 bij diagnose een betere voorspellende waarde heeft voor het aanslaan van GH behandeling. Daarnaast draagt verbetering op het gebied van MRI in belangrijke mate bij aan het stellen van de diagnose GH deficiëntie. Dit zal in de toekomst ook meer en meer gelden voor genetische testen.

Voor het stellen van de diagnose GH deficiëntie bij volwassenen wordt over het algemeen gebruik gemaakt van de insulinetolerantietest. De test kent vergelijkbare beperkingen in sensitiviteit, specificiteit en positief voorspellende waarde als hierboven beschreven, maar wordt toch beschouwd als gouden standaardmethode voor stimulatietesten. Vanwege het risico op complicaties bij hypoglycemie is deze test gecontraïndiceerd bij kinderen.

GH behandeling bij volwassenen wordt vervolgd met behulp van IGF-1 en IGFBP-3 bepalingen. Aangezien GH behandeling bij volwassenen dient als vervangingstherapie en niet om lengtegroei te stimuleren, worden deze bepalingen als een goede afspiegeling gezien van de systemische effecten van GH. Doordat de dosis daarmee laag is, worden bijwerkingen, waaronder een verhoogd risico op maligniteiten, beperkt.

Anno 2008 zijn de (biochemische) criteria voor de diagnose GH deficiëntie op de kinderleeftijd enigszins aangepast in vergelijking met de consensus van 1997. Op basis van de maximale (gestimuleerde) plasma GH concentratie en de serum IGF-1 concentratie is een indeling gemaakt in 7 categorieën met een afnemende zekerheid/waarschijnlijkheid dat er (werkelijk) sprake is van (partiële) GH deficiëntie (zie tabel 1). Als een van GH deficiëntie verdacht kind qua waardes in categorie 1 t/m 4 valt, wordt de diagnose (partiële) GH deficiëntie voldoende zeker geacht en mag GH behandeling worden gestart.

De “(lengte-)uitkomst” van kinderen bij wie de diagnose GH deficiëntie ZEKER of VRIJWEL ZEKER is, is in principe uitstekend. Als de diagnose tijdig wordt gesteld (hoe jonger, hoe beter) en GH behandeling snel wordt gestart, kan vrijwel altijd een eindlengte boven de -2 sd bereikt worden en vaak zelfs een eindlengte in de buurt van de “target height” (de op basis van de ouderlengtes berekende waarschijnlijke eindlengte).

De “(lengte-)uitkomst” van met GH behandelde kinderen met een partiële GH deficiëntie lijkt echter minder optimaal te zijn, en verschilt niet veel van met GH behandelde kleine kinderen met “idiopathic short stature” (kleine gestalte niet veroorzaakt door [klassieke] GH deficiëntie, en zonder andere duidelijke verklaring; “lengte-winst” van 4-7 jaar GH behandeling: 3,3 – 7,5 cm).

De verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat een substantieel aantal kinderen met de diagnose partiële GH deficiëntie ten onrechte als zodanig geclassificeerd zijn, samenhangend met de matige reproduceerbaarheid en juistheid van de op de

kinderleeftijd gebruikte GH stimulatietesten. Een andere punt is dat de vrijwel overal (nationaal en internationaal) gehanteerde afkapwaarde van 10 ng/ml (20-30 mU/L) in GH stimulatietesten waarschijnlijk te hoog is, waardoor veel vals-positieve diagnoses gesteld worden.

Ondanks valide kritiek op de accuratesse van GH stimulatie testen op de kindleeftijd is de diagnostische aanpak bij verdenking op GH deficiëntie nog niet aangepast, en ziet het er ook niet uit dat dit op korte termijn zal gebeuren.

Tabel 1

Categorie	Maximale plasma GH concentratie (mE/l)	Serum IGF-1 concentratie	Interpretatie: diagnose
1	<5	<p3	GH deficiëntie ZEKER
2	<10	<p50	GH deficiëntie VRIJWEL ZEKER
3	10-20, en	<p50	Partiële GH deficiëntie WAARSCHIJNLIJK
4	20-30	<p3	Partiële GH deficiëntie MOGELIJK
5	20-30	P3-p50	Partiële GH deficiëntie WEINIG WAARSCHIJNLIJK
6	>20	>p50	GH deficiëntie ONWAARSCHIJNLIJK

Literatuur

1. Rosenfeld RG and Cohen P. Disorders of growth hormone/insulin-like growth factor secretion and action. In: *Pediatric Endocrinology*, 3rd edition. Sperling, M, ed. Saunders Elsevier. 2008.
2. Normal and disordered growth. Patel L and Clayton PE. In: *Brook's Clinical Pediatric Endocrinology*, 5th edition. Brook C, Clayton P and Brown R, eds. Blackwell Publishing. 2005.
3. Diagnostiek kleine lichaamslengte bij kinderen. 1997.
<http://www.cbo.nl/product/richtlijnen/folder20021023121843/lichaamslengte.pdf>
4. Rikken B et al. Plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGFII and IGF-binding protein-3 in the evaluation of childhood growth hormone deficiency. *Horm Res* 1998; 50: 166-176.
5. Elmlinger MW et al. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insuline-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 654-664.
6. Gandrud LM et al. Is growth hormone stimulation testing in children still appropriate? *Growth hormone & IGF-1 research* 2004; 14: 185-194.
7. Tillmann V et al. Biochemical tests in the diagnosis of childhood growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 531-535.
8. Van den Broeck J et al. Growth response to recombinant human growth hormone (GH) in children with idiopathic growth retardation by level of maximum GH peak during GH stimulation tests. *Horm Res* 2000; 53: 267-273.
9. Adan L et al. Diagnostic markers of permanent idiopathic growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 353-358.

DIAGNOSIS OF PITUITARY TUMOURS

*W.W.de Herder, internist-endocrinoloog
Y.B. de Rijke, klinisch chemicus-endocrinoloog*

Introduction

Pituitary adenomas account for about 10-15% of all intracranial tumours. The reported annual incidence of these tumours is approximately 0.2-2.8/100.000 population and the prevalence is approximately 8.9/100.000. In post-mortem examinations, pituitary adenomas have been incidentally found in 1.5 to 27 per cent of subjects not suspected of having pituitary disease while alive. Presumably, either the small size and/or the lack of significant hormonal activity of these tumours were the reasons for the absence of clinical manifestations and, therefore, the failure of clinical detection.

The age distribution of pituitary tumours depends principally on the hormone produced in excess. Tumours secreting prolactin (PRL) and adrenocorticotrophin (ACTH) are most common in 25-35-year-olds, whereas those secreting growth hormone (GH) are most common in 35-50-year-olds; clinically non-functioning tumours (NFPAs) usually present after the age of 60 years.

Functioning versus non-functioning tumours

Most patients with pituitary adenomas present with signs and symptoms related to hormonal hypersecretion. These functioning adenomas cause the amenorrhoea-galactorrhoea syndrome (via the action of prolactin (PRL) and subsequent suppression of the pituitary gonadotrophs), acromegaly (via the action of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I (IGF-I)), or Cushing's disease (via the action of

adrenocorticotrophin (ACTH) and cortisol). Clinically non-functioning tumours (NFPAs), which account for about 30% of all pituitary tumours removed surgically, are not associated with clinical manifestations related to pituitary hormone hypersecretion. In most patients, these tumours present with symptoms related to the mass of the tumour and/or signs and symptoms of pituitary hypofunction (TABLE I).

Endocrinological assessment

Prolactinoma

In a patient with consistently raised prolactin (PRL) levels, other non-pituitary causes of an elevated prolactin level as: pregnancy, primary hypothyroidism, renal failure and therapy with several drugs like neuroleptics, metoclopramide and methyldopa should be excluded first. Neuroradiological studies will enable distinction between macroprolactinomas (tumoursize > 10 mm.) and microprolactinomas (tumoursize < 10 mm.). Microprolactinomas require no further endocrinological investigation, as they are usually not associated with hypopituitarism. However, in patients with macroprolactinomas, examination of the visual acuity and visual fields as well as assessment of residual pituitary function is warranted (TABLE II).

Acromegaly

In case of clinical suspicion of acromegaly, serum IGF-I levels are generally used as a screening tool and a pathological GH response to an oral glucose load subsequently confirms the diagnosis. Once the diagnosis of acromegaly is confirmed, neuroradiological studies should be performed and residual pituitary function assessed.

Cushing's disease

In patients with clinical suspicion of Cushing's disease, hypercortisolaemia should be confirmed first before further investigations into the aetiology of hypercortisolaemia are performed. These preliminary investigations include repeated assessment of 24-hour urine free cortisol secretion and the overnight (1 mg) dexamethasone suppression test. Subsequently, a differentiation between adrenocorticotrophin (ACTH)-dependent and ACTH-independent Cushing's syndrome should be made. Normal or elevated ACTH levels in the presence of hypercortisolaemia allow this differentiation. Next comes the difficult differential diagnosis between Cushing's disease and ectopic ACTH secretion. Based on epidemiological data alone, 90% of patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome will turn out to have Cushing's disease. Therefore, tests discriminating these two conditions should have a very high sensitivity and specificity (>90%). Useful parameters for making a correct diagnosis also include serum potassium and LDH estimations, the height of the ACTH levels, tumour markers, pituitary radiology, simultaneous bilateral inferior petrosal sinus sampling for ACTH determinations, before and after the administration of (adreno)corticotrophin-releasing hormone (CRH), OctreoScan[®] and CT or MRI of the chest and abdomen.

When assessing residual pituitary function, it is important to remember that hypercortisolaemia per se has a negative effect on gonadotrophins and GH secretion. Thus any hypopituitarism observed may potentially be caused by either hypercortisolaemia or may be a tumour mass effect.

Clinically non-functioning pituitary tumours

Presenting symptoms in patients with NFPAs can be divided into:

- symptoms related to the pressure effect on the normal anterior pituitary gland.

This results in the loss of secretion of one or more pituitary hormones (hypopituitarism) (TABLES I, II).

- symptoms related to extrasellar tumour growth.

In the case of superior expansion this results in headaches and compression of the optic chiasm and visual pathways, generally resulting in a characteristic bitemporal loss of vision. Surrounding brain structures, like the frontal and temporal lobes, can be compressed as well, resulting in personality changes, focal hemispheric neurological signs and epilepsy. In the case of inferior expansion this can result in nasal cerebrospinal fluid (CSF) leakage and in the case of lateral expansion in ophthalmoplegia. Headaches commonly occur.

Pituitary apoplexy is an acute enlargement of a pituitary adenoma as a result of haemorrhagic infarction, causing headaches, depressed consciousness, sudden loss of vision, other focal signs and often meningism may present as an endocrine or neurologic emergency.

The distinction between 'functioning' and 'non-functioning' pituitary adenomas (NFPAs) is not clear-cut. Most NFPAs may be poorly secreting, rather than completely non-secreting. In cell culture, a large proportion of NFPAs secrete pituitary glycoprotein hormones and their subunits. Pituitary glycoprotein hormones include luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), which are synthesised by the gonadotroph cells, and thyroid-stimulating hormone (TSH), which is synthesised by

thyrotroph cells. These three hormones are each composed of α and β subunits. The α -subunit is identical among the glycoprotein hormones. The β -subunit confers biological specificity. The un-combined subunits are biologically inactive, and there are no clinical effects from excess free subunit secretion. Hypogonadism usually results from insufficient production of biologically active LH and FSH in patients harbouring large NFPAAs that have already destroyed the surrounding normal gonadotrophs. Most NFPAAs secrete a combination of more than one glycoprotein, or only α subunits. In most patients, the production of subunits or small quantities of intact glycoprotein hormones has no obvious clinical effect. Patients with apparent NFPAAs should have assessment of anterior pituitary function and visual acuity and visual fields. Traps for the unwary include the prolactin "high dose hook" effect, in which very high levels of PRL produce falsely low results on immunoradiometric assays, thereby leading to misclassification of a prolactinoma as an NFPA. About 50% of patients with NFPAAs lack a specific serum hormone marker and it is therefore impossible to reliably distinguish these tumours from other intrasellar and suprasellar non-pituitary masses that may mimic pituitary adenomas in their clinical, endocrinological, and radiographic presentation. The differential diagnosis of these lesions is depicted in TABLE 3.

Neuroradiological assessment

As already alluded to, neuroradiological studies preferentially include magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography (CT). On T1-weighted MRI, the anterior pituitary has signal intensity similar to white matter and the posterior pituitary has an increased signal intensity (the pituitary "bright spot"). The sellar diaphragm may be seen as a band of decreased signal intensity, allowing differentiation between suprasellar

extension of sellar lesions and primary suprasellar lesions. The optic chiasm is also easily shown. The cavernous sinus and its contents are well shown on T1-weighted coronal MRI.

Macroadenomas cause enlargement of the sella turcica and expansion beyond its confines. Superior extension of the macroadenoma may result in compression and displacement of the optic chiasm and occasionally in obstructive hydrocephalus by compression of the third ventricle. Lateral expansion of tumour results in invasion of the cavernous sinus. Inferior growth of an adenoma results in erosion of the sella turcica and/or invasion of the sphenoid sinus. Frequently, cystic degeneration and haemorrhage can be shown.

On non-contrast-enhanced T1-weighted MRI, microadenomas usually present as focal low signal intensity lesions relative to the normal signal intensity of the surrounding anterior pituitary. On T2-weighted MRI, the signal intensity is variable. Contralateral deviation of the pituitary stalk or a focal convexity of the superior border of the gland may mark the presence of a microadenoma on CT or MRI. Contrast enhancement of MRI with Gd-DTPA is required in patients in whom the microadenoma cannot be definitely identified on pre-contrast MRI. Early (within 1 to 2 min.) after contrast injection, the normal anterior pituitary becomes contrast-enhanced and the microadenoma will appear relatively hypo-intense.

The pituitary bright spot is generally absent in central diabetes insipidus.

Pituitary incidentalomas

Observations in the anterior pituitary glands of healthy controls and studies in patients, undergoing neuroradiological imaging for unrelated reasons, have revealed focal areas of low density in 4 to 20% of contrast-enhanced CT studies and of decreased signal intensity

in 15% of Gd-DTPA-enhanced MRI.

Guidelines for the evaluation of the patient with these so-called “incidentalomas” need to be balanced against patient’s age and other associated illnesses in accord with standard clinical judgement. Clinical assessment focuses at answering two questions:

1. Is this a functioning pituitary adenoma for which specific treatment might be necessary to correct the hormonal hypersecretion?
2. Is this an adenoma or other lesion that potentially cause future problems for the patient because of enlargement

With respect to the first question, patients can be evaluated and screened for hormonal hypersecretion as discussed in TABLE IVI and treated appropriately. However, if there is no evidence of hormone hypersecretion, then follow-up will depend upon considerations of tumour growth. With respect to pituitary microadenomas, it is known that about 5-7% of prolactinomas, tend to show growth over a period of 5 - 7 years. Non-secreting adenomas may also show this low rate of significant enlargement. Therefore, a reasonable approach may be to repeat the neuroradiological imaging procedure at yearly intervals for two years and, if growth of the lesion does not seem to occur, the interval between scans can be subsequently lengthened. Surgery does not seem to be indicated for such non-secreting lesions unless growth is demonstrated.

TABLE I

Signs and symptoms of pituitary insufficiency

Growth hormone (GH)

Fatigue, loss of energy, impaired psychological well being, increased abdominal fat mass, reduced muscle strength and exercise capacity

Luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)

Women

Oligomenorrhoea/amenorrhoea, infertility, dyspareunia, breast atrophy, flushes

Men

Loss of libido, impotence, infertility, flushes, regression of secondary sexual characteristics, loss of body hair, weak testicles, fine wrinkles around the mouth

Thyroid-stimulating hormone (TSH)

Fatigue, muscle weakness, sensitivity to cold, constipation, apathy, weight gain, dry skin

Adrenocorticotrophin (ACTH)

Fatigue, anorexia, weight loss, weakness, nausea, vomiting, hypoglycaemia, apathy, loss of pubic and axillary hair in women

Vasopressin (ADH)

Polyuria, polydipsia, nocturia

TABLE II

Laboratory findings suggesting and tests for confirming pituitary insufficiency

Growth hormone (GH)

- Low insulin-like growth factor I (IGF-I) adjusted for sex and age
- Insulin-induced hypoglycaemia test (glucose < 2.2 mmol/litre = 40 mg/decilitre), maximal stimulated growth hormone (GH) < 3.5 µg/litre = < 10 mU/litre [N > 10 mU/litre]

Luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)

In women

- Reduced estradiol with normal, or reduced basal luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)

In men

- Reduced testosterone with normal, or reduced basal luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)
- Normochromic, normocytic anaemia

Thyroid-stimulating hormone (TSH)

- Reduced thyroxin (T₄), or free thyroxin (FT₄) with normal or reduced thyroid-stimulating hormone (TSH)
- Elevated cholesterol

Adrenocorticotrophin (ACTH)

- Low, or reduced basal cortisol (08.00 – 09.00 a.m.) $< 83 \text{ nmol/litre} = 3 \text{ }\mu\text{g/decilitre}$
[N $> 83 \text{ nmol/litre}$], with normal, or reduced adrenocorticotrophin (ACTH)
- Hypoglycaemia (glucose $< 2.2 \text{ mmol/litre} = 40 \text{ mg/decilitre}$),
- Eosinophilia
- Lymphocytosis
- Insulin-induced hypoglycaemia test (glucose $< 2.2 \text{ mmol/litre} = 40 \text{ mg/decilitre}$),
maximal stimulated cortisol $< 550 \text{ nmol/litre} = 20 \text{ }\mu\text{g/decilitre}$ [N $> 550 \text{ nmol/litre}$]

Vasopressin (ADH)

- Reduced urine osmolality
- Elevated serum osmolality and sodium
- Water deprivation test

TABLE III

Differential diagnosis of lesions arising within the sellar and parasellar regions

Pituitary adenomas

- PRL-secreting
- GH-secreting
- ACTH-secreting
- TSH-secreting
- gonadotrophin-secreting, glycoprotein hormone subunit-secreting, non-secreting

Other benign lesions

- meningioma
- gangliocytoma
- hypothalamic hamartoma

Germ cell tumors

- germinoma
- dermoid cyst
- teratoma
- dysgerminoma

Cell rest tumor

- craniopharyngioma
- Rathke's cleft cyst
- chordoma

Gliomas

- optic glioma
- oligodendroglioma
- ependymoma
- astrocytoma

Metastatic tumors

Granulomas and inflammatory lesions

- tuberculosis
- sarcoidosis
- abscess (bacterial and fungal)
- lymphocytic hypophysitis
- histiocytosis X (eosinophilic granuloma)

Miscellaneous

- aneurysm internal carotid artery
- arachnoid cyst
- empty sella syndrome

TABLE IV

Screening tests for pituitary hormone hypersecretion in pituitary incidentaloma patients

Prolactin (PRL)

- Elevated basal levels, repeated at least once,
- Exclusion of other causes by history, physical examination, chemistry screening and pregnancy and thyroid function tests

Growth hormone (GH)

- Elevated insulin-like Growth Factor I (IGF-I)
- Failure to suppress growth hormone (GH) levels to $< 2 \mu\text{g/litre} = 6 \text{ Mu/litre}$ with oral glucose load

Adrenocorticotrophin (ACTH)

- Elevated 24-hour urinary free cortisol level
- Failure to suppress basal (08.00 – 09.00 a.m) cortisol levels to $< 140 \text{ nmol/litre} = < 5 \mu\text{g/decilitre}$ with 1 mg of dexamethasone given orally 11.00 – 12.00 p.m. the previous night

Luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)

- Elevated basal levels of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) and glycoprotein hormone α -subunits

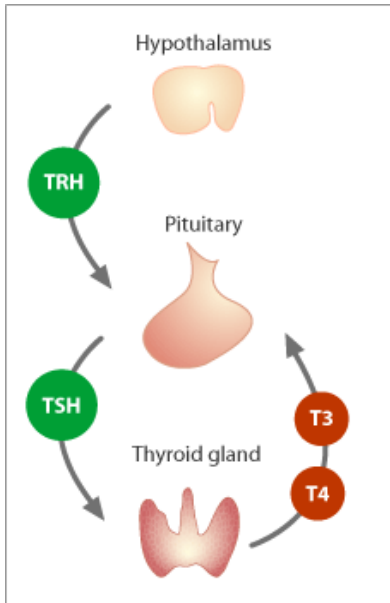
Thyroid-stimulating hormone (TSH)

Elevated basal levels of thyroxin (T_4) and/or free thyroxin (FT_4), with non-suppres

DE REGULATIE VAN SCHILDKLIERHORMOONSYNTHESE

P.H. Bisschop, internist-endocrinoloog
M.M. Buijs, klinisch chemicus-endocrinoloog i.o.

De synthese van schildklierhormoon vindt plaats in de follikelcellen (thyrocyt) in de schildklier. Jodium is het rate-limiting substraat voor schildklierhormoonsynthese. Jodium wordt actief de thyrocyt in getransporteerd door de Na-I symporter in de basolaterale membraan, waarna aan de apicale zijde efflux plaatsvindt naar het folliculaire lumen. In het folliculaire lumen wordt schildklierhormoon gesynthetiseerd onder invloed van thyroïdperoxidase (TPO), waarbij thyreoglobuline als matrix dient. TPO zorgt voor de oxidatie van jodium en katalyseert de jodering van tyrosineresiduen in het thyreoglobuline. Door fusie van twee tyrosineresiduen ontstaat schildklierhormoon, dat als colloïd opgeslagen wordt. Bij behoefte aan schildklierhormoon wordt dit geïnternaliseerd in de thyrocyt, losgekoppeld van Tg en als T₄ (80%) en T₃ (20%) afgegeven aan het bloed. T₄ is biologisch nagenoeg inactief, maar wordt in de lever omgezet naar actief T₃ onder invloed van deiodinase (type 1). De effecten van schildklierhormoon komen tot stand door binding van T₃ aan de (nucleaire) schildklierhormoonreceptor (TR). TR's regelen vervolgens, via een complex proces waarbij co-stimulators en repressoren betrokken zijn, de transcriptie van TR responsive genen. Het proces van schildklierhormoonsynthese wordt gestimuleerd door TSH. TSH wordt geproduceerd in de thyreotrofe cellen van de hypofyse en afgegeven aan de bloedbaan, waarna het bindt aan de TSH receptor in de thyrocyt. TSH secretie wordt op zijn beurt gestimuleerd door TRH dat geproduceerd wordt in de paraventriculaire nucleus in de hypothalamus en via de median eminence getransporteerd wordt naar de thyreotrofe cellen in de hypofyse. De secretie van TSH wordt gereguleerd door negatieve feedback van T₃ op TRH en TSH synthese/secretie (figuur 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de regulatie van schildklierhormoonconcentraties. Groen geeft een stimulerend effect weer en rood een inhiberend.

Aandoeningen van de hypothalamus-hypofyse-schildklieras kunnen aanleiding geven tot een tekort (hypothyreoïdie) of teveel aan schildklierhormoon (hyperthyreoïdie). Indien de oorzaak van de aandoening in de schildklier ligt spreekt men van primaire hypo- of hyperthyreoïdie. Als er een hypofysaire of hypothalame oorzaak is spreekt men van secundaire of tertiaire hypo- of hyperthyreoïdie (centrale hypo- of hyperthyreoïdie). Primaire schildklierdysfuncties komen veel vaker voor dan centrale. Dit is met name van belang voor de initiële biochemische diagnostiek naar schildklierdysfuncties.

Hypothyreoïdie

Hypothyreoïdie is gedefinieerd als de klinische en biochemische uiting van schildklierhormoondeficiëntie in doelorganen van schildklierhormoon. Veel voorkomende klachten van hypothyreoïdie zijn vermoeidheid, koudeintolerantie, gewichtstoename, obstipatie en spierpijn. De meest voorkomende oorzaak van primaire hypothyreoïdie is een chronische autoimmuun thyreoïditis (ziekte van Hashimoto). Deze komt vaker voor bij vrouwen dan bij mannen en vaak is er sprake van genetische predispositie. Deze aandoening wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van antistoffen tegen TPO bij bijna alle patiënten. Antistoffen tegen Tg kunnen ook aanwezig zijn, maar de sensitiviteit van Tg-as is lager dan van TPO-as voor het stellen van de diagnose M.

Hashimoto. Andere oorzaken van primaire hypothyreoïdie zijn een reversibele autoimmuun hypothyreoïdie (post-partum of silent thyreoïditis), schildklierchirurgie of -bestraling (^{131}I behandeling of externe radiotherapie), infiltratieve of infectieuze schildklierziekten en aangeboren schildklierafwijkingen.

Bij een klinische verdenking op hypothyreoïdie wordt in eerste instantie een TSH bepaald, omdat een primaire hypothyreoïdie altijd gepaard gaat met een verhoogd TSH. Indien het TSH verhoogd is wordt een fT_4 bepaald. Is het fT_4 normaal dan is er sprake van een subklinische hypothyreoïdie. Dit is een strikt biochemische diagnose. Is het fT_4 verlaagd dan is er sprake van hypothyreoïdie. Bij verdenking op secundaire of tertiaire hypothyreoïdie dient ook het fT_4 bepaald te worden, omdat het TSH meestal normaal of zelfs verlaagd is. Verdenking op een centrale oorzaak kan ontstaan bij afwijkingen aan hypofyse/hypothalamus, uitval van andere hypofysehormonen of schedelbestraling. Routinematige bepaling van het fT_4 voor de screening op hypothyreoïdie wordt echter afgeraden en dient alleen op indicatie te geschieden, vanwege de relatieve zelfzaamheid van centrale hypothyreoïdie.

De behandeling van (niet passagère vormen van) hypothyreoïdie bestaat uit orale substitutie met levothyroxine. Hierbij dient gestreefd te worden naar een normalisering van het TSH, waarna kleine dosisaanpassingen mogelijk zijn op geleide van de klachten. Daarnaast is er ook combinatietherapie mogelijk met levothyroxine en T_3 , maar op wetenschappelijke gronden biedt dit geen voordelen. De indicatie voor behandeling van een subklinische hypothyreoïdie wordt onder andere bepaald door de hoogte van het TSH en de aanwezigheid van TPO-as. Bij centrale hypothyreoïdie is het TSH geen geschikte parameter voor evaluatie van therapie en dient gestreefd te worden naar een normaal fT_4 met wederom dosisaanpassingen op geleide van de klachten en kliniek. Vanwege de lange halfwaardetijd van T_4 (5-7 dagen), wordt een nieuwe steady state pas 5-6 weken na het veranderen van de levothyroxine dosering bereikt. Frequentere controle is over het algemeen niet zinnig. Bij een goed gesubstitueerde hypothyreoïdie volstaat jaarlijkse biochemische controle bij afwezigheid van klachten.

Hyperthyreoïdie

Hyperthyreoïdie is gedefinieerd als de klinische en biochemische uiting van schildklierhormoonexces in doelorganen van schildklierhormoon. Veel voorkomende klachten van hyperthyreoïdie zijn vermoeidheid, gewichtsverlies, warmteintolerantie, zweten, gejaagdheid en hartkloppingen. De belangrijkste oorzaken van primaire hyperthyreoïdie zijn de ziekte van Graves, toxisch multinodulair struma, toxische nodus, jodiumgeïnduceerd, vroege fase van een subacute thyreoïditis en post-partum thyreoïditis. Het vaststellen van de diagnose is van bijzonder belang, omdat deze de behandeling bepaalt. Naast klinische parameters, zoals de palpatie van de schildklier of aanwezigheid van Graves' oftalmopathie, is er een aantal diagnostische hulpmiddelen om tussen de verschillende oorzaken van hyperthyreoïdie te kunnen differentiëren. Bij de ziekte van Graves zijn in 95% TSH receptor antistoffen aantoonbaar. Naast een hoge sensitiviteit hebben TSH receptor antistoffen ook een hoge specificiteit. De schildklierscan met radioactief jodium of technetium is een ander belangrijk diagnostisch hulpmiddel.

Een normaal TSH sluit een primaire hyperthyreoïdie uit. Bij verdenking op een hypothyreoïdie dient alleen een fT_4 en eventueel T_3 bepaald te worden indien het TSH verlaagd is. Een uitzondering hierop vormt de centrale hypothyreoïdie als gevolg van een TSH producerend hypofyseadenoom. Deze aandoening is echter zo zeldzaam, dat zij het routinematig bepalen van fT_4 bij een verdenking op hyperthyreoïdie niet rechtvaardigt.

De behandeling van primaire hyperthyreoïdie is gericht op het herstellen van euthyreoïdie. De eerste keus behandeling van de ziekte van Graves is een thyreostaticum in lage dosering (titratie) of in hoge dosering gecombineerd met levothyroxine (block and replacement therapie). Als deze behandeling na een jaar gestaakt wordt is de kans op persisterende euthyreoïdie ongeveer 50%. Een recidief hyperthyreoïdie wordt meestal behandeld met ^{131}I of een subtotale thyreoïdectomie. Een toxisch uninodulair of multinodulair struma recidiveert altijd na staken van thyreostatica en wordt daarom bij voorkeur direct met ^{131}I behandeld. Bij passagère vormen van hyperthyreoïdie is een expectatief beleid gerechtvaardigd.

Schildklierdiagnostiek

Het diagnostisch pakket voor schildklierafwijkingen omvat de volgende testen: TSH, fT₄, (f)T₃, T₄, T₃ uptake, vrij T₄ index (FT4I), reverse T₃, TBG, thyreoglobuline (TG), as TG, as TPO, en TSH-receptorantilichamen (TBII).

De TSH bepaling

Een TSH meting is de meest gevoelige parameter voor het opsporen van schildklierdisfunctie. Dit komt door de log/lineaire relatie tussen TSH en T₄, waardoor een kleine verandering van T₄ leidt tot een veel grotere verandering in TSH (Spencer *et al*, JCEM 70:453, 1990). Zo zijn schildklierziekten al op te sporen voordat iemand daadwerkelijk hypo- of hyperthyreoot is op grond van fT₄ referentiewaarden. We spreken in deze gevallen van een subklinische hypo- of hyperthyreoïdie.

TSH is een glycoproteïne met een molecuulgewicht van ongeveer 28000 Da. Het bestaat uit 2 subunits, de α - en een β -keten. De α -keten van TSH komt overeen met die van andere hypofyse hormonen, LH en FSH, en het placentaire hormoon HCG. TSH concentraties worden tegenwoordig met zeer gevoelige immunometrische assays bepaald. Een immunometrische methode is een immunoassay, waarbij een overmaat TSH antilichamen gebonden is aan een vaste drager. Deze capture-antilichamen binden TSH moleculen aanwezig in het plasma. Een tweede mono- of polykonaal antilichaam voorzien van een label (detectie-antilichaam) bindt op een ander epitoom het “gevangen” TSH molecuul. Na een incubatieperiode en nadat de niet-gebonden componenten zijn weggespoeld, wordt de hoeveelheid label gedetecteerd. Het signaal is evenredig met de concentratie TSH in het serum. De sensitiviteit van de huidige 3^e generatie assays is met een factor 100 toegenomen t.o.v. de eerste TSH radioimmunoassays (RIA). Deze 1^e generatie methode had een sensitiviteit van 1 tot 2 mU/l, waarmee hyperthyreoïdie analytisch niet kon worden onderscheiden van euthyreoïdie. De 2^e generatie assay had een gevoeligheid tot ongeveer 0.1 mU/l.

Het voornaamste TSH assay probleem ontstaat door interferentie met heterofiele antilichamen. Deze antilichamen kunnen zowel vals verhoogde als vals verlaagde

uitslagen geven. Indien het antilichaam zonder tussenkomst van TSH zorgt voor binding van het detectie-antilichaam aan het capture-antilichaam zullen vals verhoogde uitslagen ontstaan. Vals verlaagde uitslagen ontstaan indien het heterofiele antilichaam voorkómt dat het detectie-antilichaam via TSH aan het capture-antilichaam bindt. Een andere oorzaak voor een vals verlaagde uitslag kan het high dose hook effect zijn. Dit treedt op bij extreem hoge TSH concentraties. TSH verzadigt zowel het capture- als het detectie-antilichaam. Hierdoor wordt de laatste weggewassen aangezien binding via TSH met de vaste drager niet kan plaatsvinden. Er ontstaat een vals verlaagd signaal. Het inzetten van verdunningsreeksen kan beide problemen aan het licht brengen. Indien in de assay een wasstap aanwezig is voordat het detectieantilichaam wordt toegevoegd, zal het high dose hook effect niet optreden.

Het huidige euthyreote TSH referentie interval is, vergeleken met gemaakte schattingen van de 1^e RIA's, behoorlijk versmald. Gingen we uit van een referentiegebied van 2.0 – 15.2 mU/l, inmiddels is dit teruggebracht naar ongeveer 0.4 – 4.0 mU/l. Een belangrijke factor die hieraan bijgedragen heeft, is het excluderen van personen met subklinische schildklierziekten aan referentiestudies door gebruik te maken van gevoelige assays voor schildklierantistoffen. Daarnaast is de introductie van monoclonale capture-antilichamen met specificiteit voor de TSH β -keten belangrijk geweest. Hierdoor wordt kruisreactiviteit met andere hormonen voorkomen. Momenteel zijn er opnieuw discussies over de bovengrens van het TSH referentiegebied (verlagen naar 3.0 mU/l). Screenen op alleen schildklierantistoffen zou niet voldoende zijn om niet-gediagnostiseerde schildklierpathologie op te sporen en er zijn aanwijzingen dat het referentiegebied leeftijdsafhankelijk is (Surks MI *et al*, JCEM 92:, 4575, 2007).

De FT₄ bepaling

Een TSH uitslag binnen het referentiegebied sluit schildklierdysfunctie vrijwel uit. Uitzonderingen hierop zijn de sporadisch voorkomende centrale hyper- en hypothyreoïdie. Bij verdenking hierop moet naast een TSH ook altijd een fT₄ worden bepaald. Bij een afwijkende TSH uitslag zal de mate van het schildklierprobleem beoordeeld moeten worden. Dit gebeurt ook door een fT₄ bepaling.

T₄ en T₃ zijn in de circulatie voornamelijk gebonden aan bindende eiwitten (thyroxine bindend eiwit (TBG, 70%), albumine (20%), en thyroxine bindend pre-albumine (10%)). Gebonden schildklierhormoon is echter inactief. Slechts 0.03% van T₄ en 0.3% van T₃ is vrij. Afwijkingen in de bindende eiwitten beïnvloeden de gebonden hoeveelheid hormoon. Ze hebben géén invloed op vrije fracties, zodat vrije hormoon concentraties in die situaties beter geïnterpreteerd kunnen worden. Ondanks dat fT₃ biologisch actief is, geeft fT₄ een beter inzicht in de schildklierfunctie. Dit komt doordat de T₃ concentratie zo lang mogelijk stabiel gehouden wordt tijdens veranderingen in het aanbod van T₄ (gereguleerde activiteit type 1 iodothyronine deiodinase). Zo kan de T₃ concentratie nog binnen de referentiewaarden zijn, terwijl het (f)T₄ al duidelijk afwijkend is. Deze preferentiële omzetting wordt ook gezien tijdens onderbehandeling van hypothyreoïdie.

T₄ is een klein molecuul met een gewicht van 777 Da en 4 jodium atomen. FT₄ kan op verschillende manieren bepaald worden. De meeste klinische laboratoria meten FT₄ met geautomatiseerde competitieve immunoassays. Een immunoassays bestaande uit 2 stappen (tweestaps terugtitratie) heeft de voorkeur. Tijdens de eerste stap wordt serum geïncubeerd met een antilichaam gebonden aan een vaste drager. Na een wasstap om alle niet-gebonden componenten weg te spoelen, volgt de tweede fase, waarbij gelabeld T₄ wordt toegevoegd. Dit T₄ bindt de overige vrije antilichaam plaatsen. Hierna volgt een tweede wasstap en vervolgens wordt de hoeveelheid label gedetecteerd. Het signaal is omgekeerd evenredig met de concentratie fT₄; immers hoe hoger de fT₄ concentratie in het monster des te minder vrije bindingsplaatsen er nog beschikbaar zijn voor het gelabelde T₄ na de 1^e wasstap. Andere beschikbare assays voor fT₄ zijn de éénstaps immunoassay (identiek aan tweestaps terugtitratie, echter zonder 1^e wasstap) en de eenstaps gelabelde-antistof methode. Bij deze laatste methode is het toegevoegde T₄ gebonden aan een vaste drager.

Een analytisch probleem dat zich bij al deze assays kan voordoen is beïnvloeding van het evenwicht tussen vrij en gebonden T₄ tijdens de assay. Deze beïnvloeding treedt op door de toevoeging van eiwit en buffer in de test (in de vorm van het antilichaam en/of het al dan niet gelabelde T₄). De mate van verstoring hangt af van het type assay (2-

steps assay < 1-steps gelabelde-antistof < 1-steps assay). Aangezien de vrije T₄ fractie zo klein is (zie boven), zal een beperkte verstoring toch grote gevolgen hebben voor de gemeten vrije concentratie. Assay-onafhankelijk factoren kunnen eveneens het evenwicht tussen vrij en gebonden T₄ beïnvloeden. Denk hierbij aan afwijkende concentraties of affiniteit van de bindende eiwitten zelf (TBG-deficiëntie, hypoalbuminemie), of de invloed van geneesmiddelen. Ook zijn er geneesmiddelen die *in vivo* verstoringen geven van het evenwicht tussen vrij en gebonden T₄. Voorbeelden hiervan zijn heparine en furosemide. Beide remmen de binding van T₄ aan serumeiwitten; heparine doet dit via een toename in vrije vetzuren. Uiteraard kunnen auto-antistoffen of antistoffen tegen bepaalde componenten van de assay ook analytische problemen opleveren.

Technieken die geen last hebben van deze problematiek zijn dialyse- en ultracentrifugemethoden, aangezien hier een fysieke scheiding van de vrije en gebonden fractie plaatsvindt. Deze methoden worden dan ook als referentietechnieken beschouwd. Dialyse technieken zijn op te splitsen in indirecte en directe methoden. De indirecte methoden, waarbij de totale hoeveelheid hormoon en de vrije fractie wordt gemeten, zijn weer op te splitsen in evenwichts-dialyse en symmetrische dialyse methoden. Bij de indirecte evenwichts-dialyse wordt monster en gelabeld T₄ aan één zijde van een semipermeabel membraan gebracht. Aan de andere kant van het membraan bevindt zich een buffer. Het vrije on- en gelabelde T₄ verdelen zich over beide compartimenten. Met behulp van de totale T₄ concentratie en de concentratie gelabeld T₄ in het dialysaat is de vrije hormoon concentratie in het monster te berekenen. De symmetrische dialyse is gebaseerd op het principe dat de dialysesnelheid van gelabeld T₄ evenredig is met de vrije T₄ fractie. Bij deze techniek wordt aan beide zijden van een semipermeabel membraan monster gebracht. Slechts aan één zijde wordt gelabeld T₄ geplaatst. Na een vastgestelde incubatietijd wordt het label aan beide kanten gemeten; hieruit wordt de dialysesnelheid berekend. Samen met de totale T₄ concentratie geeft dit de vrije hormoonconcentratie. Bij de directe evenwichts-dialyse wordt in het dialysaat direct de vrije hormoon concentratie bepaald d.m.v. een immunoassay. Het grote voordeel van deze laatste techniek is dat onzuiverheden in het gelabelde product geen rol spelen, echter de specificiteit van het antilichaam is wel belangrijk.

(F)T₃, rT₃ en T₄ bepalingen

Er zijn een aantal indicaties voor het bepalen van de (f)T₃ concentraties. De belangrijkste indicatie is verdenking op een T₃-toxicose. Andere redenen zijn de diagnostiek naar non-thyroidal illness (zie verder), en tijdens het gebruik van geneesmiddelen die de omzetting van T₄ naar T₃ kunnen beïnvloeden (zoals amiodarone).

Totaal T₃ concentraties, dus zowel gebonden als vrij T₃ (fT₃), worden bepaald met competitieve immunoassays. Gelabeld T₃ strijdt met T₃ uit het monster om binding aan een specifiek antilichaam tegen T₃. Dit antilichaam is gekoppeld aan een vaste drager. Een variant op deze immoassay is het gebruik van gebonden T₃ aan een vaste drager. Het specifieke antilichaam is in dit geval voorzien van een label. In beide assays is uiteraard het signaal omgekeerd evenredig met de hoeveelheid T₃ in het monster. Analytische problemen bij deze assays kunnen optreden bij de aanwezigheid van auto-antistoffen of het gebruik van bepaalde medicatie. Deze assays zijn uiteraard niet gevoelig voor verstoringen van het evenwicht tussen gebonden en niet-gebonden hormoon, zoals beschreven bij de fT₄ assay. Echter, bij afwijkende concentraties van de bindende eiwitten worden bij deze assays wel afwijkende hormoon concentraties gevonden. Technieken voor de bepaling van fT₃ concentraties komen overeen met de technieken zoals beschreven bij fT₄. Dit geldt ook voor de analytische problemen.

rT₃ concentraties kunnen op een aantal endocrinologische laboratoria bepaald worden. Dit gebeurt m.b.v. competitieve immunoassays met specifieke antilichamen tegen rT₃. Net zoals T₃ is ook rT₃ gebonden aan bindende eiwitten, zodat afwijkende concentraties van deze eiwitten kunnen leiden tot moeilijk te interpreteren rT₃ concentraties.

Totaal T₄ concentraties worden vrijwel alleen bepaald indien er discrepanties zijn tussen TSH, fT₄ en (f)T₃ uitslagen. Ditzelfde geldt voor de T₃ uptake en de FT4I. De T₃ uptake geeft een schatting van het aantal bindingsplaatsen, welke in combinatie met de totaal T₄ concentratie een maat is voor de vrije hormoonconcentratie (FT4I). Gezamenlijk zijn deze assays vervangen door de directe fT₄ immunoassays. Daarnaast kan bij verdenking

van een TBG-deficiëntie of -overmaat, de TBG concentratie bepaald worden met een immunometrische assay.

Thyreoglobuline (Tg) en anti-Tg

Tg is een glycoproteïne van 660 kD en wordt gesynthetiseerd in de schildklier follikelcellen. Tg is essentieel als voorlopereiwit voor de synthese van T₃ en T₄. De tyrosine residuen op het Tg-molecuul worden op de grens van de follikelcel en het colloïd geïodeerd tot monoiodothyronine (MIT)-en diiodothyronine (DIT)-moleculen. De combinatie van een DIT-molecuul met een MIT- of met een DIT-molecuul levert T₃- dan wel T₄-moleculen op. In normale omstandigheden komt weinig meetbaar Tg in de circulatie terecht. Tijdens pathologie kan deze concentratie aanzienlijk toenemen. De Tg concentratie is namelijk de resultante van de massa van gedifferentieerd schildklierweefsel, beschadiging van de schildklier, waardoor vrijmaking van Tg (thyreoïditis / bestraling schildklier door radioactief jodium), en de mate waarin de TSH-receptor van schildkliercellen wordt gestimuleerd.

Naast dat een Tg bepaling differentieert tussen agenesie v.d. schildklier en dyshormonogenese als oorzaak van een congenitale hypothyreoïdie is een belangrijke indicatie voor een Tg bepaling het vervolgen van patiënten met een gedifferentieerd schildklier carcinoom. Om eventuele metastasen in een zo vroeg mogelijk stadium te detecteren is een gevoelige Tg bepaling nodig, dus met een lage detectielimiet. Een methode is gevoelig indien de ondergrens van het normale referentiegebied kan worden vastgesteld met daarbij een functionele sensitiviteit (FS) die er onder ligt. De FS wordt gedefinieerd als de laagste Tg concentratie die met een interassayvariatie van 20% kan worden gemeten.

Een groot probleem van de immunometrische Tg methoden is de negatieve interferentie van anti-Tg antistoffen op de Tg uitslag. Hierdoor kan de aanwezigheid van een recidief schildklier carcinoom of -metastasen gemist worden. De aanwezigheid van anti-Tg antistoffen moet dan ook altijd gerapporteerd worden, zeker bij lage of niet detecteerbare Tg concentraties. De prevalentie van circulerende anti-Tg antistoffen is hoger bij patiënten met gedifferentieerd schildklier carcinoom dan bij personen in de

algemene bevolking, namelijk 25% vs. 10%. De aanwezigheid van anti-Tg antistoffen kan ook leiden tot vals verhoogde Tg waarden.

TBII en anti-TPO antilichamen

Naast anti-Tg antistoffen zijn antistoffen gericht tegen het thyroïdperoxidase (TPO) en de TSH-receptor (Thyrotropin-binding inhibiting immunoglobulin, TBII) belangrijke auto-antistoffen tegen schildklierantigenen. Anti-TPO-antilichamen komen in ongeveer 90% van de patiënten met de ziekte van Hashimoto voor. Bij subklinische hypothyreoïdie hebben positieve anti-TPO titers een voorspellende waarde voor het ontstaan van hypothyreoïdie. Daarnaast is het zinvol om patiënten met andere autoimmuunziekten of ongewenste fertiliteit te screenen op de aanwezigheid van anti-TPO-antistoffen.

Specifieke en gevoelige TPO antistof immunoassays, waarbij gebruik wordt gemaakt van gezuiverd natief of recombinant humaan TPO als antigeen, hebben de oudere ongevoelige 'anti-microsomale' antilichamen agglutinatie testen vervangen. Echter, de variëteit in gebruikte TPO producten in de diverse assays leiden tot grote verschillen in sensitiviteit en specificiteit tussen de methoden. Ondanks dat de meeste TPO assays tegenwoordig gestandaardiseerd worden m.b.v. het referentiepreparaat MRC 66/387 is dit probleem nog niet opgelost (Sinclair, *Autoimmunity*, 41:46, 2008).

TBII omvatten zowel thyreoïd stimulerende immunoglobulinen (TSAb) als TSH receptor blokkerende immunoglobulinen (TBAb). M.b.v. TBII assays zijn deze twee verschillende antistoffen analytisch niet van elkaar te onderscheiden. De huidige 2^e generatie assays bepalen TBII door de door de aanwezige antistoffen geremde binding van ¹²⁵I-gelabeld TSH aan recombinant humane TSH receptoren te kwantificeren. Met deze assays wordt een sensitiviteit in de range van 90 tot bijna 100% bereikt (Costagliola et al, *JCEM*, 84:90, 1999 bij de diagnostiek naar de ziekte van Graves. Tevens is bij vrouwen met de ziekte van Graves in de voorgeschiedenis onderzoek naar TBII geïndiceerd tijdens de zwangerschap. TBII passeren nl. de placenta, waardoor er een risico bestaat op neonatale hyperthyreoïdie. TBII lijken via een short-loop feedback mechanisme de TSH afgifte van de hypofyse te blokkeren (Prummel *et al*, *Hot*

Thyroidology, 1, 2003). Hierdoor kunnen TSH concentraties lange tijd onderdrukt blijven ondanks genormaliseerde fT_4 en T_3 concentraties.

Schildklierhormoon diagnostiek in bijzondere situaties

Non-thyroidal illness

Als gevolg van systemische ziekten kunnen veranderingen in schildklierhormoonmetabolisme optreden, die niet het gevolg zijn van een schildklieraandoening. Dit wordt non-thyroidal illness of euthyroid sick syndrome genoemd. Dit kan aanleiding geven tot een verlaagd, maar soms ook verhoogd TSH en meestal een verlaagd fT_4 , T_3 en verhoogd reverse T_3 . Er wordt aangenomen dat downregulatie van TRH in de hypothalamus en veranderingen in deiodinase activiteit hierbij een rol spelen.

Zwangerschap

Met name in het eerste trimester van de zwangerschap neemt de behoefte aan schildklierhormoon toe, onder andere door stijging van het TBG onder invloed van oestrogeen. Voor patiënten met een hypothyreoïdie betekent dat de schildklierhormoonsubstitutie gemiddeld met ongeveer 25% verhoogd dient te worden om euthyreoid te blijven. In het eerste trimester van de zwangerschap kan een passagere daling van het TSH optreden, doordat betaHCG aan de TSH receptor bindt. In enkele gevallen geeft dit aanleiding tot hyperthyreoïdie, meestal in associatie met hyperemesis gravidarum, waarbij betaHCG concentraties vaak extra hoog zijn.

Medicatie

Verschillende medicamenten hebben invloed op TSH en circulerend schildklierhormoon. Hoge doses glucocorticoïden en dopaminergica remmen TSH secretie zonder dat dit aanleiding geeft tot hypothyreoïdie. Hoge doses glucocorticoïden en verscheidene beta-blokkers verlagen het T_3 door remming van de conversie van T_4 naar T_3 . Van dit principe wordt gebruik gemaakt bij de behandeling van een thyreotoxische crisis, de meest ernstige vorm van hyperthyreoïdie. Hoge doses furosemide en salicylaten inhiberen de binding van T_4 en T_3 aan TBG met een tijdelijke stijging van fT_4 en fT_3 tot

gevolg. Fenytoïne, carbamazepine en fenobarbital versnellen de klaring van T_4 en T_3 en kunnen derhalve serum concentraties enigszins verlagen.