

## Steroïden en bindende eiwitten

A. VERMEULEN\*

De steroïde hormonen circuleren in het plasma gebonden aan eiwitten en een geringe fractie, slechts enkele procenten, is vrij en ongebonden. Merkwaaardig hierbij is dat over het algemeen alleen de actieve hormonen aan specifieke eiwitten met beperkte bindingscapaciteit zijn gebonden, terwijl de inactieve prohormonen of metabolieten aspecifiek zijn gebonden: cortisol is gebonden aan corticosteroïd-bindend globuline (CBG), cortison vrijwel niet; testosteron (T) en dihydrotestosteron (DHT) zijn gebonden aan sexhormoon-bindend globuline (SHBG), androsteendion en DHEA vrijwel niet; oestradiol is gebonden, oestron vrijwel niet.

Het is merkwaaardig dat het specifiek gebonden hormoon vrijwel inactief is, echter het steroïdhormoon-eiwitcomplex kan wel met membraanreceptoren reageren en aldus niet-genomische effecten, via stimulatie van het c-AMP, uitlokken. Dit doet dan meteen de vraag rijzen naar de functie van deze bindingseiwitten. Men heeft lange tijd gedacht dat transporteiwitten de lipofiele steroïden in plasma oplosbaar maken. Evenwel, de hoogstens micromolaire concentratie der steroïden in plasma vereist geen transporteiwitten ter solubilisatie in een waterig milieu. Met Ekins en Mendel (1, 2) kan men aannemen dat deze eiwitten de opname in de cel en derhalve de afbraak en biologische activiteit van het hormoon vertragen, terwijl ze tevens acute schommelingen in de plasmaconcentratie, als gevolg van de pulsatie secretie, voorkomen en een homogene distributie over het organisme verzekeren.

Steroïdhormoonbindende eiwitten in humaan plasma zijn albumine,  $\alpha_2$ -zure globuline (AAG), CBG en SHBG.

*Albumine* heeft een vrijwel onbeperkte bindingscapaciteit, dankzij de hoge concentratie ( $6,2 \times 10^{-4}$  mol/l); de associatieconstanten met de steroïdhormonen zijn laag (voor testosteron  $4 \times 10^4$  l/mol, voor oestradiol  $4,2 \times 10^4$  l/mol en voor DHT  $6,6 \times 10^4$  l/mol (3), zodat de albuminegebonden fractie gemakkelijk dissocieert gedurende de capillaire transitijd (9 sec). Derhalve is het albumine gebonden hormoon beschikbaar voor de weefsels en behoort het tot de bio-actieve hormoonfractie van het plasma hormoon.

De concentratie van het AAG bedraagt ongeveer 750 mg/l en bij een moleculair gewicht van  $\pm 41.000$  is de

molaire concentratie  $1,8 \times 10^{-5}$  mol/l, terwijl de associatieconstante bij  $37^\circ\text{C}$ ,  $2,5 \times 10^5$  l/mol is voor T,  $0,4 \times 10^5$  l/mol voor cortisol en oestradiol en  $0,8 \times 10^5$  l/mol voor cortison. De bindingscapaciteit is zeer groot, waaruit voortvloeit dat de aan AAG gebonden fractie ( $K_{AAG} \times \text{conc. AAG}$ ) ongeveer eenmaal de vrije fractie is!

Het *CBG* is een  $\beta$ -globuline met een moleculair gewicht van  $\pm 52.000$  en een bindingcapaciteit van  $7 \times 10^{-7}$  mol/l. De associatieconstante bij  $37^\circ\text{C}$  is  $5 \times 10^7$  voor cortisol,  $1,4 \times 10^6$  voor T en  $2 \times 10^4$  l/mol voor oestradiol.

Het *SHBG* is een  $\beta$ -globuline met een MW van  $\pm 90.000$  en een bindingscapaciteit van  $3-6 \times 10^8$  mol/l bij de man, bij de vrouw  $4-8 \times 10^8$  mol/l. De associatieconstante bij  $37^\circ\text{C}$  is voor T, androsteendiol en D5-androsteendiol  $\pm 1 \times 10^9$  l/mol, al lopen de literatuurgegevens daaromtrent nogal uiteen, voor oestradiol  $0,5 \times 10^9$ , voor DHT  $3,9 \times 10^9$  l/mol.

De *verdeling* van het cortisol in plasma is: 90% gebonden aan CBG, 7% aan albumine en 3,9% vrij (4). Wat het testosteron betreft is ongeveer 2% vrij (bij de vrouw 1,5%), 2% gebonden aan AAG, 3,5% aan CBG, 50% aan albumine, 45% aan SHBG; bij de vrouw is 1-1,5% vrij, 25-35% gebonden aan albumine en 70% gebonden aan SHBG. De verdeling van het oestradiol bij de man is: 2,5% vrij; 20% SHBG-gebonden en 78% albumine-gebonden; bij de vrouw, (buiten de zwangerschap) met een lagere albumineconcentratie ( $6,2 \times 10^{-4}$  t.o.v.  $6,6 \times 10^{-4}$  mol/l bij de man) (3) is de binding aan albumine slechts 52%, terwijl 45% aan SHBG gebonden is.

### Wat is de biologisch actieve fase?

Om hun effecten uit te oefenen moeten de steroïden door de celmembraan heen de specifieke receptor bereiken. Algemeen wordt aangenomen dat dit een passief diffusieproces is. Het is duidelijk dat het eiwitgebonden hormoon niet door de celmembraan heen kan diffunderen, hetgeen wel voor het vrij hormoon mogelijk is. Evenwel, steroïd-eiwit-complexen met een geringe associatieconstante kunnen tijdens de capillaire transitijd door de weefsels (9 sec) dissociëren, wat ook deze fractie voor de weefsels beschikbaar maakt. Zo konden Georgi et al. (5) aantonen dat bij perfusie van prostaatweefsel het albumine-gebonden testosteron dissocieert. Bijkomende argumenten hiervoor zijn, dat de metabolische clearance rate (MCR) van de androgenen negatief gecorreleerd is met de affiniteit voor het SHBG, maar positief is gecorreleerd met het percentage steroïd gebonden aan het albumine, waarbij de variaties in de associatieconstante een rol spelen.

\*Emeritus hoogleraar, Kliniek voor Inwendige Geneeskunde, Afd. Endocrinologie, Universitair Ziekenhuis, Gent (België)

**Tabel 1.** Beïnvloeding van de concentratie aan bindingseiwit-ten door pathofysiologische factoren

Verhoging van de SHBG-concentratie	Verlaging van de SHBG-concentratie
Leeftijd	Obesitas
Oestrogenen	Androgenen; anabolica
Thyroidhormoon	Groeihormoon; IGF-1
Anti-epileptica	Insuline
Barbituraten	Prolactine
Progestativa: Lynestrenol	
Norethisterone	
Norgestrel	
MPA	
Gestrinone	
Tamoxifen, clomid	
Anti-androgenen: Anandron	
Cyproteronacetaat	
Verhoging van de CBG-concentratie	Verlaging van de CBG-concentratie
Oestrogenen	Corticoïden in hoge dosis
Anti-epileptica	Septische shock
	Androgenen in hoge dosis

Toch dient er op te worden gewezen dat de vrije hormoonfractie steeds in labiel evenwicht is met de eiwitgebonden fracties en dat iedere daling van de vrije fractie haar weerslag heeft op alle eiwitgebonden fracties, zij het dat de dissociatiehalfwaardetijd verschillend is voor de verschillende bindingseiwit-ten. Daar de bindingscapaciteit van de specifiek bindende eiwit-ten nauwelijks de fysiologische concentraties van de steroïdhormonen overtreft, zullen variaties in de bindingscapaciteit de vrije hormoonfractie beïnvloeden. De concentratie aan bindingseiwit-ten wordt door meerdere pathofysiologische factoren beïnvloed (zie tabel 1). Een verhoging van het albuminegehalte gaat in de regel gepaard met een verlaging van de vrije fractie en stijging totaal testosteron, maar met een normaal bioactief testosteron; het omgekeerde doet zich voor bij een laag albuminegehalte.

### Bepaling van de bioactieve hormoonfractie

Als men er van uitgaat dat het specifiek gebonden steroïdhormoon niet beschikbaar is voor de weefsels, kan men zich de vraag stellen: hoe de bioactieve fractie bepalen? (6). Dit probleem doet zich vooral voor het testosteron, omdat voor het cortisol de urinaire uitscheiding een goede parameter is van het vrij cortisol, dat evenwel eveneens in het plasma kan worden gemeten.

Het bioactief steroïdhormoon wordt gevormd door het vrij en (ten dele?) door het albuminegebonden hormoon. Het specifiek bindend eiwit is een globuline dat, i.t.t. het albumine, neerslaat in een half verzadigde ammoniumsulfaatoplossing: *ammoniumsulfaatprecipitatie* is dan ook een bruikbare methode om het

bioactief hormoon (in oplossing) van het specifiek gebonden hormoon (neergeslagen) te scheiden. Het resultaat wordt niet beïnvloed door de aanwezigheid van andere specifiek gebonden steroïden of variaties in de associatieconstante van het eiwit en het hormoon en is een uitstekende methode om het bioactief steroïdhormoon te meten. De methode is evenwel omslachtig en moeilijk te automatiseren. De niet-SHBG-gebonden fractie van het testosteron bedraagt bij de normale man 45-50%, met als onderste normale grens 5,2 nmol/l. Bij de vrouw is de albumineconcentratie geringer en de geprecipiteerde SHBG-gebonden fractie is hoger:  $\pm 70\%$ . Voor cortisol bedraagt de bio-actieve fractie  $\pm 70\%$ .

*Evenwichtsdialyse* bij 37 °C geeft een vrije T-fractie van ongeveer 2% bij de man op middelbare leeftijd. Tengevolge van het stijgen van de SHBG-bindingscapaciteit met de leeftijd is de fractie bij de bejaarde man slechts 1,5%; bij de niet zwangere vrouw 1-1,5%; voor cortisol bedraagt de vrije fractie ongeveer 3%.

*Direct meten van het vrij testosteron* door middel van een testosteronanalogue levert waarden op die weliswaar gecorreleerd zijn met het vrij testosteron gemeten door dialyse, maar zijn er slechts een fractie van. De correlatie met het vrij T bekomen door dialyse is  $\pm 0,67$ , volgens de producent van de kit, DPC (7, 8).

De *vrijehormoonindex*, 100H/Sp.Bind.Prot geeft slechts een betrouwbare index van het vrije hormoon wanneer het gebonden hormoon slechts een kleine fractie van de bindingscapaciteit uitmaakt: dit is voor testosteron het geval bij de vrouw maar bij de man is deze index niet bruikbaar (6).

Tenslotte kan het *vrije hormoon berekend* worden uit het totale hormoon, de bindingscapaciteit van het specifieke eiwit en het albuminegehalte. Inderdaad, het vrije hormoon in het plasma beantwoordt aan de wet der massawerking en wanneer aan de voorwaarden van deze wet is voldaan, geeft de berekening een betrouwbare waarde van het vrije hormoon (6, 9).

### Welke zijn de voorwaarden?

- Uiteraard moeten de methodes om het totale hormoon, de bindingscapaciteit en het albuminegehalte te bepalen betrouwbaar zijn.
- De immunoreactiviteit moet overeen komen met de bindingscapaciteit voor het betreffende hormoon. De voornaamste foutenbron is de aanwezigheid van substanties welke in competitie treden met het hormoon voor de bindingsplaatsen: voor testosteron is dit vooral het dihydrotestosteron (na testosteronundecanoaat of transdermaalgel bijvoorbeeld), mesterolone en danazol en voor cortisol het corticosterone.

Niet steroïdale verbindingen welke zouden kunnen interfereren met de steroïdbinding zijn de vrije vetzuren (10), maar Meikle et al. (11) vonden geen verschil in de vrije testosteronconcentratie of de SHBG-bindingscapaciteit na een vetrijke maaltijd, terwijl Schulz (12) aantoonde dat fysiologische concentraties van vrije vetzuren de vrije oestradiolfractie niet beïnvloeden. Dit sluit uiteraard de mogelijkheid niet uit dat bij patiënten met extreem hoge vrije vetzuurspiegels, de berekening

lagere FT-waarden zou opleveren dan verkregen na dialyse of via precipitatie. Derhalve is het aan te bevelen het bloedmonster enkel bij nuchtere personen af te nemen. In feite hebben we nooit een discrepantie gevonden tussen de immunoreactiviteit en de bindingscapaciteit, en bij warmtedenaturatie verdwijnen beide in parallel.

- c. Volgens de producent van de kit dient het SHBG gemeten te worden in serum, daar de waarden die met heparineplasma zijn verkregen 3-6% lager zijn, met EDTA-plasma 17,5% en met citraatplasma 34,8% lager.
- d. Het is evident dat de in de berekening aangevonden associatieconstante van het bindend eiwit voor het steroidhormoon de berekende vrije fractie zal beïnvloeden.  
Voor het SHBG zijn de in de literatuur gebruikte associatieconstanten zeer uiteenlopend. De oorzaken hiervan zijn niet duidelijk. Wij gebruiken een associatieconstante die een berekende vrije fractie geeft, welke vergelijkbaar is met de bio-actieve fractie die door ammoniumsulfaatprecipitatie is verkregen.
- e. Een mogelijke bron van fouten is het voorkomen van variaties in de associatieconstante door het bestaan van isovormen van het bindend eiwit (13, 14); dit zou verband kunnen houden met het effect van het koolhydraatgedeelte op de conformatie van de steroidbindende site van het eiwit, aangezien er geen evidentie is voor heterogeniteit van de polypeptideketen. Toch kon Hammond nooit enig verschil in bindingsaffiniteit vaststellen.
- f. Tenslotte zij er op gewezen dat de bindingseiwitten en dan vooral het SHBG thermolabiel zijn en reeds bij 40 °C denatureren; herhaaldelijk vriezen en ontdooien van het plasmamonster wordt dan ook ontraden.

Wanneer aan deze voorwaarden is voldaan, geeft de berekening een waarde voor het vrij hormoon welke in goede overeenstemming is met de waarden die door evenwichtsdialyse zijn verkregen.

## Literatuur

1. Ekins R, Edwards P, Newman B. The role of binding proteins in hormone delivery. In: Albertini A, Ekins RP (Eds). Free hormones in blood. New York; Elsevier 1982; pp 3-44.
2. Mendel CM. The free hormone hypothesis. Distinction from free hormone transport hypothesis. *J Androl* 1992; 13: 107-116.
3. Södergard R, Bäckström T, Shanbahg N, Cartensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and oestradiol-17  $\beta$  to human plasma proteins at body temperature. *J Ster Biochem* 1982; 16: 801-810.
4. Dunn JD, Nisula BC, Robard D. Transport of steroidhormones: Binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 58-68.
5. Georgi EP, Moses TF. Dissociation of testosterone from plasma proteins during superfusion of slices from human prostate. *J Endocrinol* 1975; 65: 279-284.
6. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3666-3672.
7. Winters SJ, Kelly DE, Goodpaster B. The analog free testosterone assay: are the results clinically useful? *Clin Chem* 1998; 44: 2178-2182.
8. Rosner W. Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2014-2015.
9. Vermeulen A, Kaufman HM. Diagnosis of hypogonadism in the aging male. *The Aging Male* 2002; 5: 170-176.
10. Martin ME, Vranckx R, Benassayag C, Nunez EA. Modifications of the properties of human sex steroid binding protein of non esterified fatty acids. *J Biol Chem* 1991; 261: 2954-2959.
11. Meikle AW, Stringham JD, Woodward MG, MacMurry MP. Effect of a fat containing meal on sex hormones in men. *Metabolism* 1990; 39: 943-946.
12. Schulz TD. Physiological free fatty acid concentrations do not increase free estradiol in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 65-68.
13. Cornelisse MM, Bennett PE, Christiansen M et al. Sex hormone binding globulin phenotypes: their detection, and distribution in healthy adults and in different clinical conditions. *Clin Chim Acta* 1994; 225: 115-121.
14. Teraski T, Nowlin DM, Partridge WM. Differential binding of testosterone and estradiol to isoforms of sex hormone binding globulin. Selective alteration of estradiol binding in cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 639-643.