

Nieuwe ontwikkelingen bij bepaling van hCG, een overzicht

C.M.G. THOMAS

Zowel in het symposium over tumormarkers in de urologische oncologie als in dit themanummer is uitgebreid aandacht besteed aan de klinische betekenis die bepaling in serum van alfa-foetoproteïne (AFP) en humaan choriongonadotropine (hCG) heeft voor de diagnostiek, therapiekeuze, begeleiding van de behandeling en de follow-up bij testiscarcinoom. Dit overzicht is gebaseerd op merendeels actuele literatuurgegevens en gaat in op recente ontwikkelingen in de biochemie van hCG. Ook wordt de betekenis van hCG in de fysiologische en pathofysiologische zwangerschap besproken, evenals bij trofoblasttumoren en andere vormen van kanker. Daarbij wordt eerst ingegaan op de structuur van hCG en isovormen, de synthese van hCG-subketens, het biologisch effect van hCG en vervolgens worden de diverse moleculaire vormen van hCG en synthese en metabolisme tijdens de zwangerschap besproken. Daarna komt de meting van hCG aan de orde en wordt ingegaan op de pre-analytische fase met betrekking tot stabiliteit van hCG in serum en urine. Na een overzicht van de diverse toegepaste antisera volgen de huidige, gangbare soorten immuno-assays, de specificiteit van een aantal moderne geautomatiseerde hCG-assays, de thans beschikbare referentiepreparaten en een reeks van nieuwe standaarden van de moleculaire vormen van hCG en varianten. Tot slot volgt een overzicht van in de literatuur gepubliceerde voorstellen tot standaardisatie van bepaling van hCG en de huidige opvattingen op welke wijze vergaande standaardisatie zou kunnen worden verkregen.

Structuur van hCG en isovormen

Het glycoproteïnehormoon hCG behoort samen met luteïniserend hormoon (LH), follikelstimulerend hormoon (FSH) en schildklierstimulerend hormoon (TSH) tot dezelfde familie van glycoproteïnen. Al deze hormonen zijn opgebouwd uit twee proteïneketens. De α - en de β -subketen ('subeenheid', 'subunit') worden door ladingsverschillen (non-covalent) bijeen gehouden. De α -subketen, bestaande uit 92 aminozuren (AA) met vijf disulfidebruggen, zijn vrijwel identiek voor de vier glycoproteïnen en hebben zelf geen intrinsieke biologische activiteit. De β -subketen heb-

ben een grote mate van overeenkomst, waarbij de verschillen tussen de ketens bepalend zijn voor de biologische activiteit van het betreffende hormoon. De homologie tussen de β -ketens van LH (121 aminozuren) en hCG (145 aminozuren met zes disulfidebruggen) is ongeveer 80%; het verschil wordt bepaald door het verschil in lengte. Het unieke, proline- en serinerijke, 24 aminozuren tellende C-terminale peptide (CTP) is bepalend voor de biologische werking van het intacte hCG. De moleculaire massa (MW) van hCG is ongeveer 37.500, 14.000 voor hCG α en 23.500 voor hCG β . Ongeveer eenderde van de moleculaire massa bestaat uit koolhydraten die op acht plaatsen aan het hCG-molekuul zijn gebonden. Twee stikstofgebonden ('N-linked') koolhydraatketens zijn gekoppeld aan asparagine (Asn)52 en Asn78 van de hCG- α -subeenheid, twee andere zijn gebonden aan Asn13 en Asn30 van de hCG- β -subketen, terwijl vier zuurstofgebonden ('O-linked') suikerzijketens gekoppeld zijn aan serine(Ser)121, Ser127, Ser132 en Ser138 van het CTP van hCG β (1, 2).

Tijdens de normale zwangerschap en bij molazwangerschap worden van de aan hCG gekoppelde stikstofgebonden ('N-linked') koolhydraatketens primair mono- en biantennaire oligosaccharides aangetroffen, terwijl de zuurstofgebonden ('O-linked') koolhydraatketens van de hCG- β -subeenheid vooral uit tri- en tetrasaccharideachtige suikerketens bestaan. Daarnaast worden bij normale en molazwangerschappen een klein aandeel meer complexe triantennaire stikstofgebonden oligosaccharides (0-30 %) en grotere hexasaccharideachtige zuurstofgebonden koolhydraten (0-20 %) aangetroffen (3). In tegenstelling daarmee werden vooral triantennaire stikstofgebonden oligosaccharides (tot 100 %) en hexasaccharideachtige zuurstofgebonden oligosaccharides (tot 100 %) gevonden in hCG afkomstig van choriocarcinoom. hCG met deze grotere stikstof- en zuurstofgebonden oligosaccharidezijketens wordt hypergeglycosyleerd hCG genoemd. Dit hypergeglycosyleerd hCG komt ook in grote hoeveelheden voor in het begin van de zwangerschap. Tijdens de zwangerschap zitten aan het uiteinde van de hCG-koolhydraatketens ongeveer 10-14 siaalzuurrestiden, terwijl in geval van choriocarcinoom dit aantal siaalzuurresten kan variëren tussen 0 en 19. Door deze aanzienlijke ladingsheterogeniteit kan hCG door iso-elektrofocusering- of chromatofocuseringstechnieken in ladingscomponenten (isovormen) worden gescheiden, waarbij hCG β iso-elektrische punten (pI) van 3 tot 5 en hCG α pI-waarden tussen 5 en 8 laat zien (4). Bovendien kan de heterogeniteit van de lading de affiniteit

Afdeling Chemische Endocrinologie en Afdeling Obstetrie en Gynaecologie, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen

Correspondentie: Dr. C.M.G. Thomas, Universitair Medisch Centrum St Radboud, 530 ACE, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
E-mail: C.Thomas@ace.umcn.nl

van antilichamen voor hCG beïnvloeden. Een tekort aan sialzuur kan een sterk verhoogde respons voor hCG in competitieve immuno-assays opleveren, terwijl een overmaat aan sialzuur kan leiden tot verlaging van de respons (5).

Synthese van hCG-subketens

HCG- α -subketens worden gecodeerd door een enkel gen op chromosoom 12q21.1-23, terwijl de hCG- β -subketens, samen met LH- β -subketens worden gecodeerd door zes, op chromosoom 19q13.3 geclusterde nonallelische genen. Dit genencluster wordt aangeduid met CG β 1-CG β 9. Twee pseudogenen, β 1 en β 2, komen niet tot expressie, terwijl β 4 codeert voor LH β . Van de hCG-genen die tot expressie komen, zijn β 7 en β 9 de inactieve (allele) varianten van respectievelijk β 6 en β 3. Twee structureel verschillende vormen van hCG worden tot expressie gebracht. Dit betreft de genen β 6/7, aangeduid met type-I en coderend voor een proteïne met aminozuur alanine in positie 117, terwijl de type-II-genen β 3/9, β 5 en β 8 coderen voor een proteïne met asparaginezuur in positie 117. De expressie van type-I- en type-II-genen is weefselafhankelijk. Type-II-genen komen voornamelijk tot expressie in weefsel van placenta, maligne tumoren en testis, terwijl type-I-genen in minieme hoeveelheden tot expressie worden gebracht in normale, non-trofoblastaire weefsels (6).

Biologisch effect van hCG

LH en hCG hebben een gemeenschappelijke receptor voor het mediëren van hun biologisch effect. Tijdens de zwangerschap stimuleert hCG de productie van steroïdhormonen in de ovaria en is rond week 10 van belang bij het overnemen van de progesteronproductie van het corpus luteum van de zwangerschap ('corpus luteum gravidarum') door de trofoblast. De mogelijk belangrijkste biologische functie van hCG is gelegen in het aanzetten van het corpus luteum tot productie van progesteron. Reeds één week na de midcyclische LH-piek die binnen 36 tot 48 uur wordt gevolgd door ovulatie, kan hCG in meetbare hoeveelheden in bloed worden gedetecteerd, aangezien de productie van hCG vrijwel direct na implantatie van een bevruchte eicel op gang komt (2). De daartoe benodigde hoeveelheid trofoblastweefsel voor productie van detecteerbare hoeveelheden hCG is extreem laag. Een hoeveelheid van tienduizend trofoblastcellen kan al een stijging van de hCG-concentratie in het serum veroorzaken (7). De subeenheden van hCG hebben geen biologische activiteit, ofschoon hCG- β -subeenheden in staat lijken de groei van tumorcellen in vitro te bevorderen door het verhinderen van apoptose (8). Dit zou wellicht verklaren waarom expressie van vrije hCG- β -subeenheden voorkomt bij agressieve vormen van kanker.

Moleculaire vormen van hCG en concentraties tijdens de zwangerschap

'Nicked' en 'nonnicked' hCG (hCGn en hCG)

Biologisch actief intact hCG is het zogenaamde 'nonnicked' hCG ('niet gekliefd of gekerfd hCG'), dat in

serum en urine voorkomt, samen met een scala van gedissocieerde of gedegradeerde hCG-achtige moleculen die nauwelijks of geen biologische activiteit hebben. 'Nicked' hCG (hCGn) heeft een enkele splitsing (een 'nick', klief) in de β -peptideketen tussen aminozuur 47 en 48 en soms tussen aminozuur 43 en 44 of aminozuur 44 en 45. Zowel de 'nonnicked' als de 'nicked' hCG-varianten verdubbelen elke 48 uur en stijgen vanaf het begin van de zwangerschap exponentieel naar maximumconcentraties die worden bereikt rond de tiende week na de laatste menstruatie. De concentratie van 'nonnicked' hCG daalt tussen week 10 en week 16 naar ongeveer een vijfde van de piekwaarde en blijft op dit niveau tot het eind van de zwangerschap. Het gemiddelde aandeel hCGn is in de tweede maand van de zwangerschap ongeveer 9% van het totaal aanwezige hCG en stijgt gemiddeld door naar ongeveer 21% van het totale hCG in de laatste maand van de normale zwangerschap. Vergelijkbare verhoudingen hCGn worden aangetroffen in de urine (9). De hoeveelheid hCGn vertoont een grote interindividuele variatie. Zo werd in serummonsters uit het eerste trimester aan hCGn tussen 0 en 59% van het totale hCG aangetroffen (10).

Vrije α -subunit (hCG α)

Twee vormen van vrije, niet gebonden α -subunit komen voor in serum en urine. Dit betreft een reguliere α -vorm die identiek is aan de α -subeenheid van het intacte hCG en een grote vrije α -subketen ('large free α '). De grote vrije α -subketen is hypergeglycosyleerd met grote, meer complexe stikstofgebonden oligosaccharides die de binding van deze α -vorm met de β -subketen tot intact hCG verhinderen (11). Als zodanig worden de grote vrije α -subketens uitsluitend geproduceerd door trofoblastcellen als een vrije subeenheid, die niet wordt geïncorporeerd in hCG (11). Uit elektroforesestudies is gebleken dat het merendeel van de vrije α -ketens in urine van zwangeren uit grote vrije α -subketens bestaat (11). Beide soorten α -ketens kunnen met de gangbare immunochemische bepalingen niet afzonderlijk worden gemeten, maar worden samen bepaald. Het aandeel vrije α -ketens in serum is ongeveer 5% van de gemiddelde hCG-concentratie in de tweede maand van de zwangerschap en dit wordt op molaire basis ongeveer de helft van de gemiddelde hCG-concentratie in maand negen van de zwangerschap (9). In urine kan het aandeel vrije α -ketens wat groter zijn (9). Evenals 'nicked' hCG kan het aandeel vrije α -ketens tussen personen aanzienlijk variëren.

'Nicked' en 'nonnicked' vrije β -subketen (hCG β n en hCG β)

Beide vormen komen voor in serum en urine bij zwangerschap. De vrije β -concentraties vertonen een zelfde patroon als intact hCG, met een piek rond de tiende week van de zwangerschap, die minder dan 1% van het intacte hCG bedraagt en afneemt tot 0,5% van de hCG-concentratie in de negende maand van de zwangerschap (9). In urine is de concentratie van vrije β -ketens met 9% tot 40% van de hCG-concentratie aanzienlijk hoger (9).

β-Core fragment (hCGβcf)

Het terminale degradatieproduct van hCG is β-core fragment (hCGβcf). Het is opgebouwd uit twee peptidketens, de β-subketenfragmenten AA 6-40 en AA 55-92, die door vijf disulfidebruggen bijeen worden gehouden (12). De grootte van hCGβcf (MW 9000) is ongeveer eenvierde van de omvang van hCG (MW 37.500). Ofschoon hCGβcf het belangrijkste molecuul in de urine van zwangeren is, is het (met minder dan 0,3 % van de totale hCG-concentratie) nauwelijks detecteerbaar in het serum van zwangeren (12, 13). In urine volgt het grofweg een zelfde patroon als dat van hCG in serum, met een piek rond week 10, waarbij de beginconcentratie van hCGβcf lager is dan die van hCG. In week 5 van de zwangerschap stijgen de waarden van hCGβcf sterk en worden in week 6-7 op molaire basis gelijk aan die van hCG en overtreffen deze in de periode daarna (9, 10). In de tweede maand van de zwangerschap is de hCGβcf-concentratie 58 % van die van de gemiddelde hCG-concentratie in de urine en stijgt in de laatste maand van de zwangerschap door naar 305 % van de gemiddelde hCG-concentratie in urine (9, 10).

Hypergeglycosyleerd hCG

Tijdens de eerste weken van de zwangerschap en in geval van choriocarcinoom is 'invasieve trofoblast antigen' (ITA), een hypergeglycosyleerde vorm van hCG met extra lange zuurstofgebonden oligosaccharideketens, de belangrijkste vorm van hCG (14). In de zwangerschap wordt ITA reeds vóór de implantatie geproduceerd door fenotypische invasieve cytotrofoblastcellen en bereikt een maximum rond week 5 à 6 van de zwangerschap. Naarmate de differentiatie van cytotrofoblastcellen naar syncytiotrofoblastcellen voortschrijdt, neemt de productie van ITA af en neemt de door de syncytiotrofoblastcellen geproduceerde hoeveelheid hCG toe (15). In geval van choriocarcinoom en bij agressieve vormen van trofoblasttumoren wordt voornamelijk ITA geproduceerd dat afkomstig is uit invasieve trofoblastcellen (3).

Synthese en metabolisme

'Nonnicked' hCG, 'nonnicked' vrije β-ketens en grote vrije α-ketens worden gesecerneerd door geïsoleerde trofoblastcellen, terwijl hCGn, vrije β-subketens en hCGβcf niet door trofoblastcellen worden uitgescheiden. Uit immunohistochemische en in-vitro studies blijkt dat hCG na secretie wordt gekliefd ('ge-nicked') door enzymen die worden geproduceerd door aan trofoblastcellen gerelateerde macrofagen. hCGn is instabiel en splitst snel in 'ge-nicked' vrij β (hCGβn) en vrij hCGα in serum. De vrijwel volledige afwezigheid van hCGβcf in serum en de hoofdzakelijke aanwezigheid daarvan in urine is suggestief voor de vorming van hCGβcf in de nieren. De afbraak van hCG zou er als volgt uit kunnen zien (9): 'nonnicked' hCG → 'nicked' hCG → 'nicked' vrij β → β-core fragment.

Veel grotere en gevarieerdere aandelen 'nicked' hCG, vrij β en hCGβcf worden gezien in serum en urine van Downsyndroomzwangerschappen, preëclampsie en trofoblastziekte. Serum of urine met uitsluitend

'nicked' hCG of vrij β en urinemonsters met enkel hCGβcf zijn gevonden in bepaalde gevallen van trofoblastziekte, testiscarcinoom of bij blaaskankerpatiënten, evenals bij normale zwangeren 3-10 dagen postpartum. Aangenomen wordt dat de enzymactiviteit voor 'nicking' en de wegen voor degradatie van hCG actiever zijn in afwijkende zwangerschappen, bij kanker en trofoblastziekte (16-18).

Onderlinge verhoudingen van hCG-vormen

Tijdens de normale zwangerschap, molazwangerschap, persisterende trofoblastziekte (PTD), choriocarcinoom en andere maligniteiten komen de diverse vormen van hCG in wisselende hoeveelheden voor. Figuur 1 geeft een indruk van de mogelijke hCG-varianten in serum en urine in de diverse klinische situaties en is samengesteld uit gepubliceerde gegevens afkomstig van Cole en Butler (19). Globaal kan daarbij een onderscheid worden gemaakt tussen zwangerschap (vroeg zwangerschap: 3-6 weken, patroon 1; periode daarna: 7 weken tot à terme, patroon 2), molazwangerschap (vóór afbreken (evacuatie) van de mola, patroon 2; mola na evacuatie met uitgangswaarden van hCG >100 IU/l, patroon 2, of ≤100 IU/l, patroon 3), persisterende trofoblastziekte met stijgende serum-hCG-concentraties, patroon 4, choriocarcinoom vóór behandeling, patroon 5, en overige maligniteiten met aantoonbaar hCG in het serum of uitscheiding van β-corefragment in de urine, patroon 6. Bij de vroeg zwangerschap (3-6 weken, patroon 1) zijn de belangrijkste serumcomponenten hypergeglycosyleerd hCG (ITA) en hCG met daarnaast nog een zeer minieme hoeveelheid vrije β-subunit. Na deze periode van de normale zwangerschap en in geval van molazwangerschap vóór evacuatie, alsmede na afbreken (evacuatie) van de molazwangerschap bij uitgangskoncentraties van hCG >100 IU/l, is intact hCG de belangrijkste component in serum, met daarbij minieme hoeveelheden ITA, hCGn, hCGβ en hCGβn (patroon 2). Na mola-evacuatie met hCG-uitgangskoncentraties ≤100 IU/l (patroon 3), zijn de belangrijkste vormen in serum het hCGn, hCGβ en hCGβn, terwijl ITA en hCG veel lagere concentraties laten zien. In geval van PTD (patroon 4) en bij choriocarcinoom vóór behandeling (patroon 5) komen de patronen overeen met patroon 2, echter met ITA in plaats van hCG als de belangrijkste variant. Bij alle voorkomende vormen van molazwangerschap (patronen 2 en 3) en in geval van PTD (patroon 4) is hCG-CTP meestal afwezig, maar kan in sommige gevallen toch sterk variabel en dominant aanwezig zijn. Choriocarcinoom vóór behandeling vertoont maximale ITA-concentraties en minimale hoeveelheden hCG, hCGn, hCGβ, hCGβn (patroon 5) en lijkt daarmee sterk op patroon 4 van PTD. Soms is echter intact hCG bij choriocarcinoom vóór behandeling (patroon 5) de belangrijkste bron van hCG-reactiviteit. In geval van andere (nontrofoblastaire) maligniteiten (bijvoorbeeld van voortplantingsorganen, ovariële kiemceltumoren, gastro-intestinale tumoren, urineblaas, long (patroon 6)) is hCGβn de belangrijkste variant, terwijl dit in de urine geldt voor hCGβcf.

Bepaling van hCG

Als leidraad voor de bespreking van de navolgende aspecten over bepaling van hCG heeft een overzicht van Cole uit 1997 gediend (1).

Pre-analytische fase: stabiliteit in serum en urine

'Nonnicked' hCG is zeer stabiel in bloed en serum. In onderzoek wordt voor 'nonnicked' hCG in bloed en serum voor de dissociatie in vrije subunits een halfwaardetijd genoemd van 700 uur bij 37 °C (20). Onderzoek van recentere datum geeft hiervoor 1300 uur bij 37 °C aan (21). Bij deze temperatuur was de dissociatiegraad $14\% \pm 1,4\%$ per week voor serum, maar voor urine was deze aanzienlijk hoger ($34\% \pm 5,6\%$ per week). Bij 21 °C en 4 °C werd in serum een lage dissociatie voor hCG gevonden die in beide gevallen resulteerde in nauwelijks lagere hCG-concentraties ($94\% \pm 3,1\%$ tot $3,8\%$) na 4 weken (17). Als oorzaak wordt degradatie door 'nicking', gevolgd door een snellere dissociatie van hCGn genoemd (17). In het eerste trimester van de zwangerschap kunnen de concentraties van vrij hCG β in serum- of urine-monsters na 1 week opslag of verzending bij kamer-

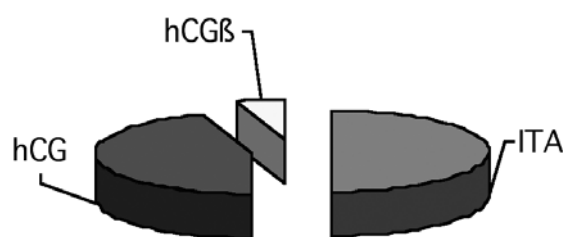
temperatuur wel met een factor 20 tot 30 toenemen. HCG β cf is veel stabiel en levert geen problemen op voor eerste trimesterurine na opslag van een week bij 37 °C mits daaraan antibiotica zijn toegevoegd (21).

Toegepaste antisera

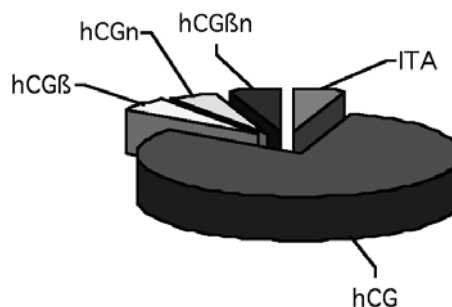
De traditionele hCG+ β -RIA, meestal ten onrechte aangeduid met ' β hCG-RIA', maakt gebruik van een polykloonaal antiserum dat in konijn is opgewekt tegen vrije hCG- β -subunit, waaraan deze bepaling zijn naam ontleent. De naamgeving is misleidend omdat daar de suggestie van uit gaat dat hCG β wordt gemeten, terwijl heel algemeen gesproken alle verschillende vormen van de β -subunit van hCG in vrije vorm ('nicked' en 'nonnicked' vrije hCG- β -subunit) of in de vorm van intact hCG ('nicked' en 'nonnicked' hCG) in onderling wisselende mate worden meebepaald vanwege verschillen in affiniteit van de antilichamen voor de diverse moleculaire vormen van hCG of de subunits.

Meervoudige antilichaam-bindingsplaatsen zijn aanwezig op het hCG-molecuul en de daarvan afgeleide varianten. Tabel 1 geeft een overzicht van de huidige

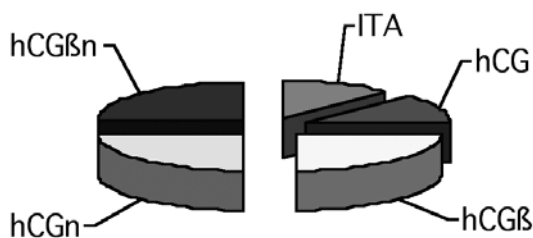
Patroon 1: zwangerschap, 3-6 weken



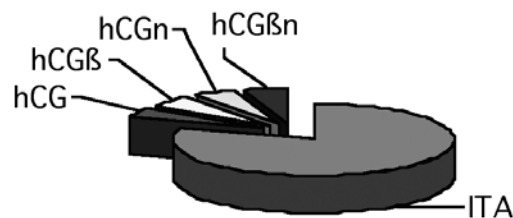
Patroon 2: zwangerschap, 7-40 weken; mola vóór evacuatie*; mola na evacuatie & hCG >100 IU/L*



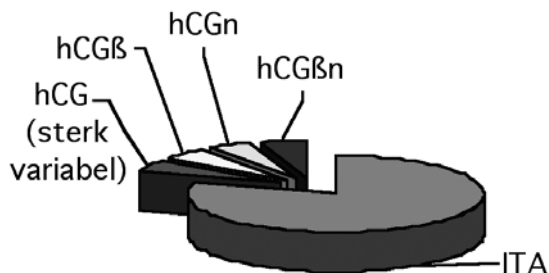
Patroon 3: mola na evacuatie & hCG ≤ 100 IU/L*



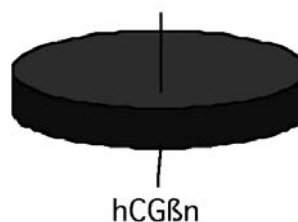
Patroon 4: PTD met stijgend hCG*



Patroon 5: choriocarcinoom vóór behandeling



Patroon 6: andere maligniteiten



Figuur 1. Voorkomende profielen van moleculaire vormen van hCG en subunits in serum tijdens de zwangerschap, bij trofoblast-ziekten en in geval van kanker (data ontleend aan Cole en Butler (19)).

* hCG minus CTP soms sterk variabel en dominant aanwezig.

Tabel 1. Soort antisera en bijbehorende epitopen voor hCG, vrije subunits en degradatieproducten (data ontleend aan Cole (1))

Antilichaam-nummer	Epitoom	Locatie	Geschikt voor meten van*
1	Anti-hCG-dimeer	op overgang α : β 'nonnicked' hCG	a
2	Anti-algemeen- β 1	gemeenschappelijk op hCG, vrij β , β -core	a-f
3	Anti-algemeen- β 2	verschillend gemeenschappelijk op hCG, vrij β (β -core?)	a-e, f (?)
4	Anti- β , C-terminaal	gemeenschappelijk op hCG en vrij β	a-b, d-e
4a	Anti- β , C-terminaal	gemeenschappelijk op ITA en vrij β -ITA	h
5	Anti-algemeen- α	gemeenschappelijk op hCG en vrij α	a-c
6	Anti-vrij- β	vrije-subunit-specifiek, verborgen op hCG	d-e
7	Anti-'nonnicked'-vrij- β	vrije-subunit-specifiek, dicht bij nickingsplaats	d
8	Anti-vrij- β + β -core	gemeenschappelijk op vrij β en β -core fragment	d-f
9	Anti- β -corefragment	anti- β -core fragment-specifiek, verborgen voor vrij β	f
10	Anti-vrij- α	vrije-subunit-specifiek, verborgen op hCG	g

* a = 'non-nicked' hCG (hCG); b = 'nicked' hCG (hCGn); c = hCG-CTP (hCG-CTP); d = 'non-nicked' vrij β (hCG β); e = 'nicked' vrij β (hCG β n); f = β -core fragment (hCG β cf); g = vrij α of 'large' vrij α (hCG α); h = ITA, vrij β -ITA (ITA)

typen antisera en bijbehorende epitopen voor hCG, vrije subunits en degradatieproducten. Van deze zogenaamde epitopen zijn verschillende discrete typen aangetoond. 'Nonnicked' hCG heeft 5 verschillende epitopen en 'nicked' hCG 4, terwijl 'nonnicked' vrije hCG- β -subunit 6 en 'nicked' vrije β -subunit 5 verschillende epitopen heeft. Het β -corefragment heeft er zelfs 4, terwijl vrije hCG- α -subunit 2 verschillende epitopen heeft. De veelal commercieel beschikbare antilichamen, gericht tegen deze epitopen, leveren een grote verscheidenheid aan specificiteit op (tabel 1). Slechts één antiserum (Ab-nr 1) is gericht tegen de epitoom die zich bevindt op de overgang van de twee subunits op het 'nonnicked' hCG, resulterend in een antiserum gericht tegen 'nonnicked' hCG. Overeenkomstig zijn er in totaal 2 soorten antisera gericht tegen een epitoom, gelegen op de hCG α -subunit en niet minder dan 8 typen antisera zijn gericht tegen epitopen op de β -subunit van hCG. Daaronder bevindt zich één antilichaam (B152, in tabel 1 aangeduid met nummer 4a) dat specifiek gericht is tegen het CTP-deel van de β -subunit van hypergeglycosyleerd hCG en bindend aan zowel het intacte ITA als aan de vrije β -subunit van ITA (22, 23).

Soorten immunoassays

Cole (1) inventariseerde in 1997 de destijds commercieel verkrijgbare kwantitatieve bepalingen voor meting van hCG, vrije subunits en degradatieproducten van hCG. Tabel 2 geeft een samenvatting van de soorten immuno-assays en rubriceert de bepalingen na indeling op specificiteit, aantal bepaling(s)kit)methoden, aantal verschillende fabrikanten en toegepaste typen antilichaam (voor antiserumcode zie tabel 1). Voor hCG+ β -assays kunnen ongeveer 5 à 7 typen kits worden onderscheiden, terwijl voor bepaling van de vrije subunits en fragmenten vier soorten bepalingen beschikbaar waren.

Specificiteit van een aantal moderne geautomatiseerde hCG-assays

In een overzicht uit 2001 werd door Cole en medewerkers (24) de geschiktheid van een aantal commer-

cieel verkrijgbare hCG-immuno-assays nagegaan voor de diagnostiek en begeleiding van de behandeling van trofoblastziekten. Zoals reeds gesteld hebben patiënten met trofoblastziekten, naast het normale intacte hCG, een aantal irregulaire vormen, onder andere hCGn, hCG-CTP, ITA en vrije hCG β -subunit, in het bloed. Het wordt als essentieel beschouwd om alle vormen, zo mogelijk in gelijke mate ('equimolair'), mee te bepalen. Standaardmateriaal voor 5 van deze irregulaire vormen van hCG (vrije β -subunit, hypergeglycosyleerd hCG (ITA), hCGn, asialo-hCG, hCG-CTP) werden door commerciële laboratoria getest (met opgave van de range van de 'recovery' voor de vijf standaarden waarvan een molair equivalent van elk 200 IU/l werd getest) in geautomatiseerde immunometrische bepalingen voor hCG of hCG β (Beckman Access hCG β (range 88-178%), Abbott AxSYM hCG β (range 90-122%), Chiron ACS:180 hCG β (range 70-117%), Baxter Stratus hCG (85-95%), DPC Immulite hCG (range 103-143%), Serono MAIAclone hCG β (range 3,8-93%) en een hCG+ β -RIA (range 85-124%). Alleen de RIA en de DPC Immulite detecteerden alle 5 irregulaire hCG-standaarden met recoverypercentages van minstens 75%, terwijl de 5 andere assays één tot vier van de vijf geteste standaarden zeer onvoldoende bleken te meten. Daarnaast leverden alleen de assays van Beckman, DPC en Abbott resultaten op, die minder dan 25% afwaken van de resultaten verkregen met de RIA voor een panel van 59 patiënten met manifest aanwezige trofoblastziekten. Uit deze data werd geconcludeerd dat alleen de DPC Immulite de vijf irregulaire vormen van hCG detecteerde, daarbij resultaten opleverde die het best overeenkomen met die van de RIA, en dat deze beide bepalingen het meest optimaal in staat zijn fout-negatieve testresultaten in monsters van trofoblasttumoren te voorkomen.

Als vervolg op voorgaande studie werd in een recent overzicht (25) voor 9 verschillende commercieel verkrijgbare geautomatiseerde hCG-bepalingen nagegaan wat de meest waarschijnlijke oorzaak is voor het optreden van tussenmethodenvariatie. Volgens de fabrikant is één van de vergeleken assays specifiek

voor hCG-meting (Dade Dimension RXL), maar volgens de auteurs (25) vertoonde deze bepaling toch kruisreactie met toegevoegd hCG β . Volgens opgave van de fabrikant zijn 7 assays specifiek voor hCG plus hCG β . Dit betreft Abbott AxSYM, Bayer ACS-180, Bayer ADVIA Centaur, Dade Stratus CS, Ortho Vitros Eci, Roche Elecsys en Tosoh AIA600. Slechts één bepaling meet volgens opgave alle belangrijke varianten (DPC Immulite). Voor elk van de 9 assays varieerde de verhouding tussen de laagste en de hoogste meetwaarde voor elk individueel gemeten serum en voor enkele pure hCG-kalibratoren (hypergeglycosyleerd hCG, vrij hCG β , hCGn en hCG β cf) tussen 1,5 tot 3,3 en was de rangorde van de immunochemische respons van de verschillende preparaten voor alle geteste assays overeenkomend. Dit laatste bleek eveneens uit de resultaten, verkregen uit bepaling van vier verschillende hCG-isovormen met pI-waarden van respectievelijk 3-4, 4-5, 5-6, en 6-7, die waren verkregen na iso-elektrische focussing van een gezuiverd intact hCG-preparaat. Cole en medewerkers concluderen dat de belangrijkste bron voor tussenassayvariatie moet worden toegeschreven aan de verschillen in specificiteit van de geteste assays en aan de samenstelling van de kalibratoren (25).

Beschikbare referentiepreparaten en standaarden voor de moleculaire vormen van hCG en varianten
De standaardisatie van hCG-bepalingen kent een lange traditie. De meest bekende referentiestandaarden voor intact hCG en de α - en β -subunits zijn reeds in 1972 bereid en door de WHO uitgegeven. Dit betreft de internationale referentiepreparaten (IRP) voor immuno-assay met de codes WHO 1st IRP 75/537 voor intact hCG (identiek aan de latere Derde Internationale Standaard, 3rd IS), 1st IRP 75/569 voor de hCG- α -subunit en 1st IRP 75/551 voor de hCG- β -subunit. De recent benoemde 4th IS voor intact hCG (75/589)

werd uit dezelfde batch bereid als de 3rd IS en is daaraan identiek, met als enig verschil het tijdstip en procedure van ampulleren. Vanwege de aanzienlijke hoeveelheden contaminerende varianten van hCG en andere onzuiverheden werd in 1992 besloten tot instelling van een werkgroep voor standaardisatie van immunoassays voor hCG (26). Belangrijk doel was het ontwikkelen van nieuwe referentiepreparaten. Daarnaast ondernam de werkgroep stappen voor het ontwikkelen van drie nieuwe standaarden voor urine-metabolieten van hCG. Dit betrof de 'nicked' vormen van hCG (hCGn) en hCG β (hCG β n) en van het β -corefragment van hCG β (hCG β cf). Behalve dat deze potentieel klinisch belangrijke metabolieten vooral voorkomen in urine, worden ze ook in serum aangetroffen. Het is dus van belang dat assays voor bepaling van hCG en zijn varianten in urine deze metabolieten kunnen meten. Ook werden substantiële hoeveelheden van deze metabolieten, naast sporen van proteaseactiviteit, aangetoond in de gangbare IRP's, waaraan deels de variabiliteit van de 3rd en 4th IS in diverse commerciële bepalingen voor hCG kan worden toegeschreven. Contaminatie met hCGn is ook een groot probleem omdat sommige assays wel, en andere geen hCGn herkennen, waardoor kalibratiefouten kunnen ontstaan. In een recent artikel wordt de bereiding en karakterisering van de zogenoemde nieuwe WHO 'Reference Reagents' (RR) voor immuno-assaystandaardisatie van hCG en hCG-gerateerde varianten gerapporteerd (4). Uitgaande van een ruw urinair hCG-preparaat van farmaceutische zuiverheid (Diosynth, Akzo/Nobel) werd hCG β cf door gelfiltratie op basis van molecuulgrootte geïsoleerd en met behulp van Blue Sepharose en 'reversed-phase' (RP) HPLC verder opgezuiverd. Uit de resterende hCG-pool werd door anionwisseling, gebaseerd op moderne chromatografiereagentia en -methoden en na hydrofobe interactiechromatografie zuiver hCG

Tabel 2. Commercieel verkrijgbare kwantitatieve immuno-assaykits voor bepaling van hCG, vrije subunits en degradatieproducten (data ontleend aan Cole (1))

Gebruik	Aantal kits (fabrikanten)	Toegepaste antilichamen* capture Ab / labeled Ab
<i>1. hCG+β- assays</i>		
hypergeglycosyleerd hCG (+vrij β -ITA?)	1 kit (1 fabrikant)	4a / 8
'nonnicked' hCG	9 kits (9 fabrikanten)	1 / 2 (in 8 kits) 1 / 5 (in 1 kit)
'nicked' + 'nonnicked' hCG	10 kits (9 fabrikanten)	5 / 2 (in 8 kits) 5 / 4 (in 1 kit)
'nonnicked' hCG + vrij β	4 kits (4 fabrikanten)	1+6 / 2
'nicked' + 'nonnicked' hCG+ vrij β	7 kits (5 fabrikanten)	4 / 2 (in 3 kits) 5+6 / 2 (in 3 kits) 3 / 2 (in 1 kit)
idem, + β -core?	7 kits (7 fabrikanten)	3 / 2
idem, + β -core	5 kits (5 fabrikanten)	2 (competitief)
<i>2. Vrije-subunit- en fragmentassays</i>		
vrije α -subunit	2 kits (2 fabrikanten)	10 / 5
'nicked' + 'nonnicked' vrij β	5 kits (5 fabrikanten)	6 / 2
β -corefragment	4 kits (4 fabrikanten)	9 / 2
β -corefragment + vrij β (gelijk)	1 kit (1 fabrikant)	8 / 2

* antilichaamnummer: zie tabel 1

verkregen. Na herhaalde hydrofobe scheiding werd bovendien eveneens hCGn verkregen. Daarnaast resteerde een uitgangspool van hCG β -vormen die na RP-HPLC konden worden gescheiden in vrije CTP's en hCG β -vormen. Ter verkrijging van de hCG-subunits, hCG α , hCG β en hCG β n werd uitgegaan van een hCG-preparaat van een min of meer gedefinieerde zuiverheid (Canfield-Ross (CR)-kwaliteit) dat door middel van ureum en anionwisseling hCG α en hCG β van CR-kwaliteit opleverde, waaruit na diverse, op RP-HPLC gebaseerde, zuiveringsstappen uiteindelijk hCG α -, hCG β - en hCG β n-preparaten werden geïsoleerd. De zuiverheid van elk preparaat werd gecontroleerd door middel van SDS-PAGE, immunoblots, IFMA's en door N-terminale sequentieanalyse, terwijl het eiwitgehalte van elk preparaat werd gekwantificeerd door middel van aminozuuranalyse.

Standaardisatie

Uit de bovengenoemde studie van Birken en medewerkers is duidelijk gebleken dat het nieuwe 1st RR voor hCG veel minder hCGn, hCG β , hCG α en hCG β cf bevat dan de 3rd/4th IS voor hCG (tabel 3) (4). De beschikbaarheid van de nieuwe RR's vormt een solide basis voor het verbeteren van de standaardisering van bepalingen van hCG-gerelateerde moleculen. De 3rd IS voor hCG (75/537) werd in bioassays in IU's tegen de 2nd IS gekalibreerd. Aan de subunits die geen biologische activiteit bezitten, werden arbitraire eenheden, ook IU's, toegekend welke waren gebaseerd op massa (1 μ g = 1 IU). Het gebruik van dezelfde eenheden, IU, suggereert ten onrechte dat er sprake is van een gemeenschappelijke basis voor de 'standaardisatie' van hCG en zijn subunits. Historisch gezien is dit een kunstfout die nog steeds veel verwarring veroorzaakt. In hun commentaar benadrukken Birken en medewerkers (4) dat waardetoekenning op basis van biologische activiteit geschikt is voor hCG-standaarden wanneer deze therapeutisch worden toegepast, maar dat ijking van immuno-assays veel informatiever wordt wanneer waardetoekenning is gebaseerd op substantieconcentraties van de hCG-standaarden welke zijn afgeleid van aminozuuranalyse, zoals is uitgevoerd en gerapporteerd voor de

RR's. Als een eerste belangrijke stap in het verbeteren van de vergelijkbaarheid van hCG-immuno-assays beschouwen deze auteurs dan ook het uittesten en berekenen van de kruisreactiviteit van deze 6 hCG-gerelateerde moleculen in commercieel verkrijgbare assaysystemen. Het opgeven van deze data in de productinformatie biedt de gebruiker inzicht in de relatieve herkenning van deze moleculen in de aangeboden bepalingen. Dit zou volgens Birken en medewerkers voor de huidige beschikbare assays haalbaar zou moeten zijn, terwijl zij ook aangeven dat de primaire ijking van de volgende generatie immuno-assays zal dienen te zijn gebaseerd op de nieuwe (RR-)standaarden (4). Daarbij zal wel de nodige zorg moeten worden besteed aan de wijze waarop de primaire standaarden die geen 'nicked'-vormen bevatten, kunnen worden 'vertaald' in de secundaire werkstandaard van de kit, die waarschijnlijk wel 'nicked' hCG-vormen zal bevatten. Naast de implementatie zal de belangrijkste uitdaging voor de laboratoriumgemeenschap echter liggen in het overtuigen van de klinisch werkzame collegae van de voordelen, die het uitdrukken van molaire eenheden voor hCG op termijn zal blijken te hebben. Zo zal het gebruik van molaire eenheden bijzonder nuttig zijn voor het vergelijken van de ratio's van diverse vormen van hCG, zoals het geval is bij de diagnose van Down-syndroom of bij trofoblasttumoren.

Een ander aspect is het gegeven dat de koolhydraatresiduen van glycoproteïnen de immunochemische reactiviteit zelden beïnvloeden, maar daarentegen dikwijls een sterk effect hebben op de biologische activiteit, bijvoorbeeld door het moduleren van de verdwijnsnelheid ('half life') van circulerende glycoproteïnen, of beïnvloeden van receptorbinding en -activering. Omdat de meeste antilichamen gericht zijn tegen peptidenstructuren, zal de molaire hoeveelheid proteïne een betere maat zijn voor wat wordt gemeten in een immuno-assay dan dat de uitslag wordt uitgedrukt in termen van bioactiveiteenheden. Uitzondering op deze regel vormt de potentiële toepassing van hypergeglycosyleerd hCG in de vroege zwangerschap en bij trofoblasttumoren (14, 23). Gebaseerd op het hoge koolhydraatgehalte wordt dit hypergeglycosy-

Tabel 3. Verontreiniging van huidige WHO-referentiepreparaten en 'Reference Reagent' voor hCG en metabolieten (data ontleend aan Birken e.a. (4))

Referentiepreparaat (WHO code)		Molecuul- massa	Siaalzuur- gehalte (mol/mol)	Koolhydraat t.o.v. eiwitmassa (%)	Assay voor (% mol/mol)			
					hCG*	hCG β **	hCG β cf	hCG α
hCG ¹⁾	3rd IS 75/537	37.500	n.b. ²⁾	n.b.	100	3,9	0,8	1,4
hCG	1st RR 99/688	37.500	9,8 (12-16)	29	100	1,1	0,2	1,0
hCGn	1st RR 99/642		8,5 (12-16)	35	100	1,3	0,5	1,3
hCG β	1st RR 99/650	23.500	13,3 (8-12) ³⁾	43 ⁴⁾	0,3	100	0,2	0,02
hCG β n	1st RR 99/692		8,8 (8-12)	83	0,017	100	1,0	0,3
hCG β cf	1st RR 99/708			14	0,004	n.v.t.	100	<0,001
hCG α	1st RR 99/720	14.000	2,0 (2-4)	29	0,031	0,015	0,04	100

*geldt ook voor hCGn, hCG-CTP; ** geldt ook voor hCG β n, hCG β -CTP, hCG β n-CTP, hCG β cf

¹⁾ 3rd IS identiek aan 4th IS; ²⁾ volledige koolhydraatanalyse niet uitgevoerd; siaalzuurgehalte (10,6 %, w/w) echter vrijwel identiek aan dat van hCG 1st RR 99/688 (11,1 %, w/w); ³⁾ hoger dan verwachte siaalzuurgehalte van hCG β mogelijk een experimenteel artefact; ⁴⁾ reden voor hoog suikergehalte van hCG β n onbekend; mogelijk niet-eiwitgebonden suikercontaminatie als gevolg van zuiveringsprocedure

leerd hCG herkend door een antilichaam (B152), dat is gericht tegen het koolhydraatgedeelte en de peptidenstructuur in het CTP-gebied van hCG β (27). Daarbij worden echter niet alle vormen van hypergeglycosyleerd hCG herkend (bijvoorbeeld de vormen die alleen zijn gemodificeerd in het 'N-linked' koolhydraatketengebied). Helaas is door Birken en medewerkers (4) geen RR voor hypergeglycosyleerd hCG ontwikkeld, omdat dit buiten het bestek van de projectvraagstelling lag. Zij voegen verder aan de discussie toe dat het onwaarschijnlijk is dat de aanwezigheid van diverse hypergeglycosyleerde hCG-vormen in serum of urine tot fouten zal leiden in de huidige commercieel verkrijgbare hCG-assays. Met diverse technieken is aangetoond dat alle geteste mAbs het hele spectrum van glycosyleringsvarianten, inclusief gedeglycosyleerd hCG, asialo-hCG, varianten van meer neutrale pI en sterk zure (hypergeglycosyleerde) varianten van hCG, afkomstig van zwangerschap of van tumoren, herkennen (28).

In een recente 'editorial' in *Clinical Chemistry* over de te volgen weg voor het bereiken van verdere verbeteringen met betrekking tot standaardisering komt Stenman (29) tot de volgende aanbevelingen:

- Gebruik de 1st RR's voor hCG en hCG β om bestaande assays voor hCG en hCG β opnieuw te kalibreren.
- Stel conversiefactoren vast voor vertaling van IU/l (E/l) naar mol/l voor bestaande assays.
- Rapporteer resultaten voor hCG zowel in IU/l als in mol/l gedurende een overgangsperiode.
- Druk resultaten van subunits uit in mol/l.
- Karakteriseer assay specificiteit met de 1st RR-preparaten. Pas, indien noodzakelijk, het assay ontwerp aan.
- Rapporteer epitoopspecificiteiten van de gebruikte antilichamen en bepaal ze zo nodig.
- Identificeer of produceer preparaten voor hCG en hCG β , die vrij zijn van storende contaminanten en die kunnen worden gebruikt als kalibratoren voor klinische methoden.
- Produceer standaarden voor hypergeglycosyleerd hCG.
- Start studies om de toepasbaarheid van referentiemethoden en gekalibreerde serumpanels te evalueren.

Samenvattend wordt gesteld dat een aantal van deze aanbevelingen eenvoudig is te realiseren, maar dat andere aanbevelingen voor tenminste enkele fabrikanten aanzienlijke veranderingen teweeg zullen brengen. Uiteraard zullen de te maken kosten moeten opwegen tegen de te behalen voordelen waarvan er enkele zeer voor de handliggend zijn.

Dankzegging

Dank aan prof. dr. C.G.J. Sweep voor waardevol commentaar.

Literatuur

1. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 1997; 43: 2233-2243.
2. Stenman UH, Alfthan H, Hotakainen K. Human chorionic gonadotropin in cancer. *Clin Biochem* 2004; 37: 549-561.
3. Elliott MM, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA. Carbohydrate and peptide structure of the α - and β -subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 1997; 7: 15-32.
4. Birken S, Berger P, Bidart JM, Weber M, Bristow A, Norman R, Sturgeon C, Stenman UH. Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites. *Clin Chem* 2003; 49: 144-154.
5. Cole LA. Human chorionic gonadotropin assay. In: Hancock BW, Newlands ES, Berkowitz RS, eds. *Gestational trophoblastic disease*. Chapman & Hall, London, 1997.
6. Bellet D, Lazar V, Bieche I, Paradis V, Giovangrandi Y, Paterlini P, et al. Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin β genes normally transcribed in trophoblastic cells. *Cancer Res* 1997; 57: 516-523.
7. Mann K, Saller B, Hoermann R. Clinical use of hCG and hCG β determinations. *Scand J Clin Lab Invest, Suppl* 1993; 216: 97-104.
8. Butler SA, Ikram MS, Mathieu S, Iles RK. The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free β subunit of human chorionic gonadotropin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation. *Br J Cancer* 2000; 82: 1553-1556.
9. Cole LA, Kardana A, Park S-Y, Braunstein GD. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 704-713.
10. Cole LA, Seifer DB, Kardana A, Braunstein GD. Selecting human chorionic gonadotropin immunoassays: consideration of cross-reacting molecules in first-trimester pregnancy serum and urine. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 1580-1586.
11. Blithe DL, Nisula BC. Variations in the oligosaccharides on free and combined α -subunits of human chorionic gonadotropin in pregnancy. *Endocrinology* 1985; 117: 2218-2228.
12. Birken S, Armstrong EG, Kolks MAG, Cole LA, Agosto GM, Krichevsky A, et al. Structure of human chorionic gonadotropin β -subunit core fragment from pregnancy urine. *Endocrinology* 1988; 123: 572-580.
13. Alfthan H, Stenman UH. Pregnancy serum contains the β -core fragment of human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 783-787.
14. Cole LA, Shahabi S, Oz UA, Bahado-Singh RO, Mahoney MJ. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (invasive trophoblast antigen) immunoassay: A new basis for gestational Down syndrome screening. *Clin Chem* 1999; 45: 2109-2119.
15. Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, Davies S, Stephens ND. Hyperglycosylated hCG (invasive trophoblast antigen, ITA) a key antigen for early pregnancy detection. *Clin Biochem* 2003; 36: 647-655.
16. Kardana A, Cole LA. Human chorionic gonadotropin β -subunit nicking enzymes in pregnancy and cancer patient serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 761-767.
17. Kardana A, Cole LA. The stability of hCG and free β in serum samples. *Prenat Diagn* 1997; 17: 141-147.
18. Cole LA. New perspectives in measuring human chorionic gonadotropin levels for measuring and monitoring trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1994; 39: 193-200.
19. Cole LA, Butler S. Detection of hCG in trophoblastic disease. The USA hCG Reference Service Experience. *J Reprod Med* 2002; 47: 433-444.
20. Strickland TW, Puett D. The kinetic and equilibrium parameters of subunit association and gonadotropin dissociation. *J Biol Chem* 1982; 257: 2954-2960.
21. Cole LA. Stability of hCG free β -subunit and β -core fragment in urine. *Prenat Diagn* 1996; 17: 185-189.
22. O'Connor JF, Birken S, Lustbader JW, Krichevsky A, Chen Y, Canfield RE. Recent advances in the chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin: impact on clinical measurements. *Endocrine Rev* 1994; 15: 650-683.

23. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, O'Connor JF. Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG. *J Endocrinology* 1999; 161: 99-106.
24. Cole LA, Shahabi S, Butler SA, Mitchell H, Newlands ES, Behrman HR, Verrill HL. Utility of commonly used commercial human chorionic gonadotropin immunoassays in the diagnosis and management of trophoblastic diseases. *Clin Chem* 2001; 47: 308-315.
25. Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between-method variation in human chorionic gonadotropin test results. *Clin Chem* 2004; 50: 874-882.
26. Stenman UH, Bidard JM, Birken S, Mann K, Nisula B, O'Connor J. Standardization of protein immunoprocures. Choriogonadotropin (CG). *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1993; 216: 42-78.
27. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, Ozaki N, Sauer M, Lindheim S, Cohen M, Kelly A, Schlatterer J, O'Connor JF. Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope. *J Endocrinology* 2002; 172: 497-506.
28. Berger P, Schwarz S, Spottl G, Wick G, Mann K. Variants of human chorionic gonadotropin from pregnant women and tumor patients recognized by monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 347-351.
29. Stenman U-H. Standardization of assays for human chorionic gonadotropin. *Clin Chem* 2004; 50: 789-800.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 16-17

Prostaatspecifiek antigeen: biochemie

R.H.J. BRUIJNS

Prostaatspecifiek antigeen (PSA) is een zeer complex molecuul. Opheldering van de biochemie van het PSA heeft er zeker toe bijgedragen dat het bij uitstek de marker geworden is voor het management van prostaatacarcinoom. PSA is een glycoproteïne met een molecuulmassa van 28.400 Da (1) en bestaat uit 237 aminozuren (2). In het serum komen vijf isovormen voor, twee biologisch actieve welke verschillen in de mate van glycosylering, en drie biologisch inactieve vormen (3). PSA bezit serineproteaseactiviteit vergelijkbaar met chymotrypsine (4) en behoort tot de familie van de kallikreïnes.

Monoklonale antilichamen gericht tegen PSA zijn in 1999 geclassificeerd door de 'International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine' (ISOBM)-TD-3-workshop (5). Groep 1 omvat de antilichamen welke reageren met het vrij PSA-epitoom terwijl groepen 2-6 reageren met de epitopen van de gecomplexeerde vorm.

PSA wordt gesynthetiseerd in de ductus en de epithelcellen van de prostaat, vanwaar het wordt gese-creteerd naar de zaadvloeistof in een concentratie van 0,5-2,0 g/l (6). Uit recente literatuur werd al snel duidelijk dat de prostaat niet het enige weefsel is waar PSA voorkomt (vandaar ook de nieuwe notatie met kleine 's'). PSA wordt ook gevonden in de schildklier (7), bij borsttumoren (8) en bij neuroblastoomcel-

lijnen (9). De biologische functie van het PSA is in de vervloeiing van het semencoagulum middels proteolyse, waardoor de spermatozoa vrijkomen; het speelt zodoende een belangrijke rol in het bevruchttingsproces (10). De meest voorkomende vorm aanwezig in het bloedplasma is het 80-90-kDa-complex van PSA gebonden aan het α_1 -antichymotrypsine (ACT). Vrij PSA vertegenwoordigt een klein ($\pm 15\%$) maar variabel deel van het totale PSA. Kleinere fracties van PSA zijn gebonden aan andere proteaseremmers, het merendeel aan α_2 -macroglobuline (A2M), maar ook aan de inter- α -trypsin-inhibitor (IATI) en in hoge concentraties aan het α_1 -antitrypsine (AAT). In de zaadvloeistof is zo'n 5% van het PSA tevens gebonden aan de 'protein C inhibitor' (11). Vrijwel alle commerciële assays voor PSA kunnen het vrij PSA, PSA-ACT, de PSA-AAT-complexen en waarschijnlijk ook de PSA-IATI aantonen. De PSA-A2M-complexen worden niet aangetoond omdat het PSA ingevangen wordt door het A2M en zodoende niet herkend kan worden door het monoklonale antilichaam.

In vitro wordt tot 60% van het uit zaadvloeistof afkomstige vrij PSA binnen 1-3 uur gebonden aan het A2M bij 37 °C. Binding aan het ACT duurt ongeveer 24 uur en aan AAT 48 uur. Na prostatectomie zal de serum-PSA-waarde binnen 4 weken tot onder de 0,01 $\mu\text{g/l}$ dalen. Stijging boven deze waarde is dan indicatief voor een terugval in de ziekte (12). Als de PSA-waarde gedurende drie jaar onder de 0,01 $\mu\text{g/l}$ blijft is de kans dat er weer een prostaatacarcinoom ontstaat kleiner dan 8% (13). Commercieel verkrijgbare assay's voor de bepaling van het totale PSA hebben een zeer lage detectielimiet (0,003 $\mu\text{g/l}$ tot 1,0 $\mu\text{g/l}$). Het merendeel van de commercieel verkrijgbare kalibra-

Pathologie en Laboratoriumgeneeskunde, Academisch Ziekenhuis Groningen

Correspondentie: Dr. Ing. R.H.J. Bruijns, AZG, Pathologie en Laboratoriumgeneeskunde, Postbus 30001, 9700 RB Groningen
E-mail: r.h.j.bruijns@lc.azg.nl