

3. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Fondurulia J, Chen MH, Kaplan I, et al. Pretreatment nomogram for prostate-specific antigen recurrence after radical prostatectomy or external-beam radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 168-72.
4. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 766-71.
5. Freedland SJ, Aronson WJ, Kane CJ, Terris MK, Presti JC, Jr., Trock B, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy among men with normal preoperative serum prostate-specific antigen levels. *Cancer* 2004; 101: 748-53.
6. Stamey TA, Johnstone IM, McNeal JE, Lu AY, Yemoto CM. Preoperative serum prostate specific antigen levels between 2 and 22 ng/ml. correlate poorly with post-radical prostatectomy cancer morphology: prostate specific antigen cure rates appear constant between 2 and 9 ng/ml. *J Urol* 2002; 167: 103-11.
7. Balk SP, Ko YJ, Bublej GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 2003; 21: 383-91.
8. Khan MA, Partin AW, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD, Sokoll LJ, Chan DW, et al. Evaluation of proprostate specific antigen for early detection of prostate cancer in men with a total prostate specific antigen range of 4.0 to 10.0 ng/ml. *J Urol* 2003; 170: 723-6.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 261-263

Hepcidinmetingen in serum en urine met behulp van massaspectrometrie: analytische aspecten en klinische implicaties

E.H.J.M. KEMNA, H. TJALSMA en D.W. SWINKELS

Hepcidine is een door de lever geproduceerd, ijzer-regulerend peptidehormoon. Toename in ijzervoorraad en inflammatie induceren hepcidine-expressie in hepatocyten, terwijl hypoxie en anemie de productie onderdrukken (1). De recente ontdekking van hepcidine als centrale regulator van de ijzerstofwisseling heeft het inzicht in de pathofysiologie van ijzerregulatiestoornissen enorm vergroot. Echter, analysemethoden om het peptide te meten zijn wereldwijd beperkt tot enkel een immunochemische methode (2) en een door ons recentelijk beschreven 'surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight'-massaspectrometrie (SELDI-TOF MS) methode (3), beide voor metingen in urine. In deze studie beschrijven we een recente aanpassing van de SELDI-TOF-MS-methode waardoor het mogelijk is geworden hepcidine ook in serum te bepalen.

Materiaal en methode

Er is gebruik gemaakt van 73 gepaarde serum- en urine-monsters afkomstig van gezonde controle personen (n=20), patiënten met ferriprive anemie (n=6), patiënten met thalassemia major (n=5), hereditaire hemochromatosepatiënten (n=14; homozygoot C282Y in verschillende fasen van flebotomiebehandeling) en vrijwilligers geïnjecteerd met endotoxine (n=28). Serumijzerindices, CRP en urinecreatinineconcentraties zijn bepaald met een Aeroset analyser (Abbott). Serumferritinewaarden zijn immunologisch bepaald met een Immulite 2500 (DPC). Routinehematologie is gemeten met een Sysmex XE-2100 analyser.

Serum- en urinehepcidine is 'on-spot' gemeten met behulp van Immobilized Metal Affinity Capture (IMAC) 30 ProteinChip arrays (Ciphergen Biosystems) (4). Externe massakalibratie is uitgevoerd met commercieel verkrijgbaar synthetisch humaan hepcidine-25 (Peptides International). De hepcidine-25-piek is geïdentificeerd in zowel serum als urine met behulp van immunocapture en tandem-massaspectrometrie. Piekintensiteiten gemeten met de PBSIIc-massaspectrometer zijn voor urinemonsters genormaliseerd naar mmol creatinine en worden uitgedrukt in intensiteit/mmol creatinine, terwijl serumwaarden worden uitgedrukt in intensiteit/l.

Analytische testkarakteristieken zijn verkregen door de binnenchip- en de tussenchipvariatie voor zowel urine (2 niveaus) als serum (1 niveau) te bepalen op 10 achtereenvolgende dagen. Daarnaast is ook naar pre-analytische en biologische interferenties gekeken door de invloed van opslagtemperatuur en meervoudige vries/dooicycli op de hepcidinemeting te analyseren, en middels het vaststellen van de aanwezigheid van een diurnaal ritme op de hepcidineproductie.

Resultaten en discussie

Het gebruik van de IMAC30-chip laat zien dat hepcidinmetingen in serum goed correleren met de waarden gevonden in urine ($R = 0,822$, $P < 0,0001$; figuur 1). De reproduceerbaarheid van de hepcidine-25-metingen laten echter een grote tussenchipvariatie zien voor zowel urine (VC van 22,0 tot 27,5%) als voor serum (VC van 14,9%) en een kleinere interspotvariatie (urine tussen 11,0 en 12,8%; serum 11,5%). Naast deze analytische variaties blijken preanalytische invloeden als het meervoudige blootstellen aan vries/dooicycli vooral

UMC St Radboud, Afdeling Klinische Chemie, Nijmegen

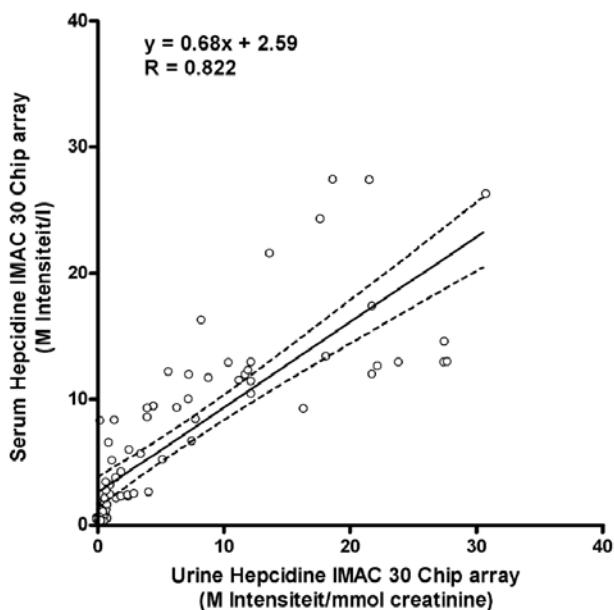
een sterk verlies aan hepcidine in urine op te leveren (tot 50%), waarbij individuele verschillen waargenomen worden. Afname van hepcidine, waarschijnlijk als gevolg van aggregatie van eiwitten, wordt sneller waargenomen als urine opgeslagen is bij temperaturen boven -70°C.

Daarnaast ontstaat vooral in urinemonsters geoxideerd hepcidine tijdens het drogen van de arrays aan de lucht in het preanalytische traject. Het verschijnen van deze extra oxidatiepieken in het spectrum wordt voorkomen door te werken onder stikstof. Serum lijkt minder gevoelig voor oxidatie maar wordt echter meer beïnvloed door het diurnaal ritme zoals te zien is in figuur 2. Standardisatie van afnametijden is daarom van belang als gekozen wordt voor serummetingen in gro-

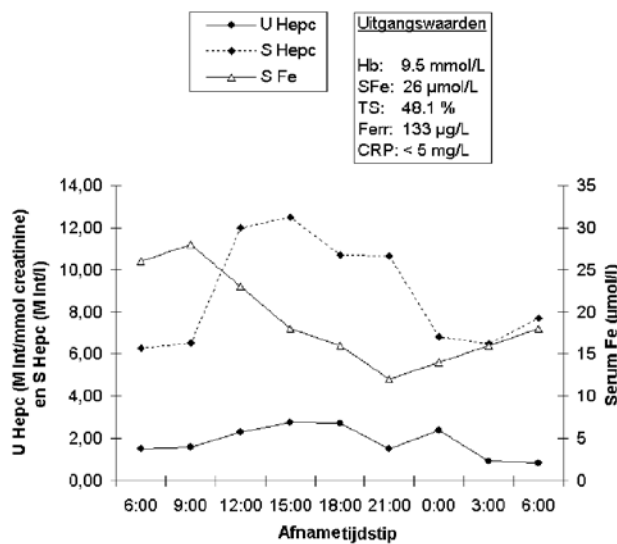
tere studies. Daarnaast lijkt analyse in serum door de detectie van kortetermijnvariëaties meer geschikt voor het meten van effecten van bijvoorbeeld interventie in individuele patiënten.

Ondanks deze (pre-)analytische en biologische variaties is differentiatie tussen door inflammatie geïnduceerde anemie en ferriprievae anemie met behulp van hepcidine-25-metingen in zowel urine als serum goed mogelijk (figuur 3).

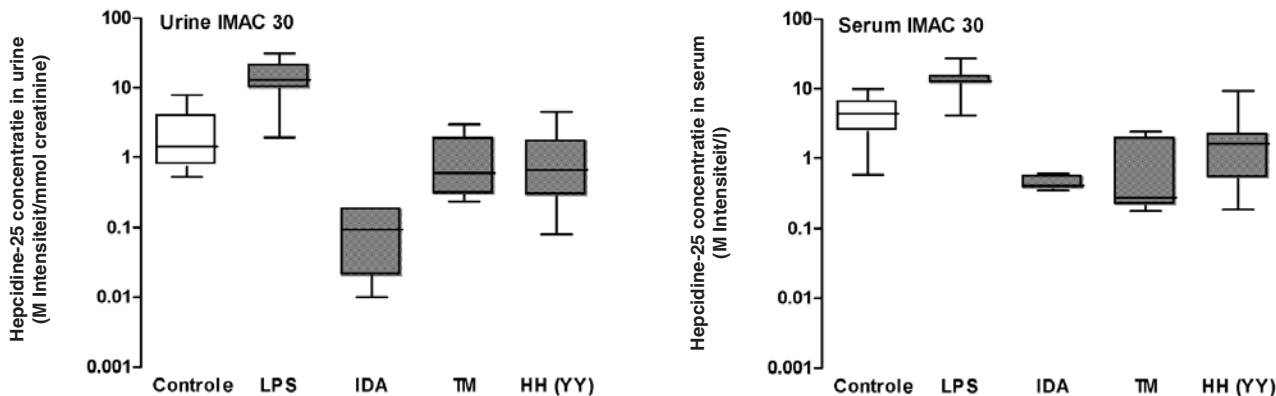
Verdere optimalisatie van de hier beschreven methode door het gebruik van een interne standaard zal bijdragen tot een verbetering van de analytische variatie, correctie voor matrixverschillen tussen serum en urine en de mogelijkheid tot kwantificering van zowel de serum- als urineapplicatie.



Figuur 1. Correlatie van hepcidine-25-resultaten tussen gepaarde serum- en urinemonsters, gemeten met IMAC30 ProteinChip arrays. De doorgetrokken lijn toont de regressielijn en de stippellijn toont het 95%-betrouwbaarheidsinterval van de regressielijn.



Figuur 2. Urine- en serumhepcidineconcentraties en serumijzerwaarden in een gezonde vrijwilliger gedurende een 24-uurs-cyclus. Het diurnaal effect wordt gezien op alle gemeten parameters.



Figuur 3. Urine- en serumhepcidine-25-concentraties in geselecteerde klinische populaties gemeten op IMAC 30 ProteinChip. LPS, vrijwilligers geïnjecteerd met lipopolysaccharide (6 uur na injectie); IDA, patiënten met ijzergebreksanemie; TM, thalassemia-major-patiënten; HH(YY), homozygote C282Y hemochromatosepatiënten. Boxplots laten het 25^{ste} en 75^{ste} percentiel zien met de mediaan voor elke groep. De foutenbalken representeren de minimale en maximale waarden.

Conclusie

De hier beschreven SELDI-TOF-MS-applicaties laten zien dat hepcidinmetingen in zowel serum als urine goed mogelijk zijn, maar dat serummetingen gestandaardiseerde afnameprotocollen vereisen. Door de introductie van de hepcidine wordt het tevens mogelijk klinische studies uit te voeren, waardoor inzicht in de (patho)fysiologie van het ijzermetabolisme vergroot wordt. Deze inzichten kunnen bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe farmaca ter behandeling van ijzermetabolisme-gerelateerde aandoeningen waaronder hereditaire en secundaire hemochromatose (bijvoorbeeld thalassemie) en anemie van de chronische ziekte. Daarnaast kan de diagnostische meerwaarde van deze bepaling ten opzichte van al bestaande parameters gevalideerd worden.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 263-265

Referenties

1. Swinkels DW, Janssen MCH, Bergmans J, Marx JJM. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clin Chem* 2006; 52: 950-68.
2. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia in inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113: 1271-6.
3. Kemna E, Tjalsma H, Laarakkers C, Nemeth E, Willems H, Swinkels D. Novel hepcidin assay by mass spectrometry. *Blood* 2005; 106: 3268-70.
4. Kemna EHJM, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 2007; 53: 620-8.

Surfactantproteïne-C-mutaties in families met idiopathische pulmonale fibrose

C.H.M. van MOORSEL^{1,2}, M.F.M. van OOSTERHOUT³, J.M.M. van den BOSCH¹, H.J.T. RUVEN²
en J.C. GRUTTERS¹

Een belangrijke barrière tegen ingeademde microbiële, organische en anorganische deeltjes in de longen wordt gevormd door de surfactantvloeistof die het longepitheel bedekt. Pulmonaal surfactant bestaat voor ongeveer 90% uit lipiden en voor 10% uit proteïnen. Eén van deze proteïnen is het zgn. surfactantproteïne-C (SP-C), dat de oppervlaktetensionverlagende werking van het surfactant verbetert. Het humaan pro-proteïne C bestaat uit een precursor van 197 aminozuren, die in de cel sequentieel wordt gekleefd tot zijn uiteindelijke vorm van 35 aminozuren. Het is bekend dat dit proteïne bij zeer jonge kinderen met ernstige respiratoire aandoeningen niet altijd aanwezig is in bronchoalveolaire lavage(BAL-)vloeistof. Genetische analyse van het gen dat codeert voor surfactant C (SFTPC) bij deze kinderen liet zien dat in een aantal gevallen een heterozygote mutatie in een exon of 'splice site' aanwezig was. In alle gevallen waarin de mutatie ook in één van de ouders werd aangetoond, vertoonden ook deze ernstige longproblemen met een beeld behorende bij idiopathische pulmonale fibrose (IPF) (1). IPF behoort tot de idiopathische interstitiële pneumonieën (IIP) en kenmerkt zich door ernstige progressieve longfibrose, waarvan de oorzaak onbekend is, en een zeer slechte prognose. De gemiddelde

leeftijd bij diagnose ligt rond de 60 jaar en de gemiddelde overleving is ongeveer vier jaar. Het ziekteproces verloopt via schade aan het alveolaire epitheel waar fibroblastenfoci ontstaan die de longfunctie irreversibel verstoren. Wat betreft de oorzaak wordt IPF gezien als een zogenaamde 'complexe ziekte' waarbij men denkt dat een combinatie van omgevings- en genetische factoren bijdragen aan het ziekteproces. Er zijn associaties met polymorfismen in de human-leukocyte-antigenregio en cytokinen gevonden (2). Sinds jaren zijn er families bekend waarin meerdere familieleden lijden aan IPF en waarbij een dominante overerving van de ziekte wordt gezien. Bestudering van de genetica van deze families kan inzicht geven in de mogelijke oorzaak en het verloop van het ziekteproces en kan daardoor leiden tot nieuwe etiologische inzichten en aanknopingspunten voor nieuwe therapieën. In deze studie onderzoeken we of mutaties in het SFTPC-gen een rol zouden kunnen spelen bij patiënten met een familiale vorm van IPF.

Materiaal en methoden

De patiënten zijn behandeld in het Centrum voor Interstitiële Longziekten, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein, waar de diagnose IPF is gesteld in overeenstemming met de internationale multidisciplinaire ATS/ERS-consensusclassificatie van IIP. Dit onderzoek is uitgevoerd met toestemming van de patiënt en is goedgekeurd door de medisch-ethische toetsingscommissie van het St Antonius Ziekenhuis. DNA van

Centrum voor Interstitiële Longziekten¹, afdeling Klinische Chemie², Sint Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein; afdeling Pathologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht³, Nederland