

На правах рукописи

**Малышева Наталья Михайловна**

**СВОБОДНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ  
ТЕСТОСТЕРОНА КАК НАИБОЛЕЕ АДЕКВАТНЫЕ МАРКЕРЫ  
ДЛЯ ОЦЕНКИ АНДРОГЕННОГО СТАТУСА**

03.00.13 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2009 г.

Работа выполнена в ФГУ Эндокринологический научный центр  
(директор – академик РАН и РАМН И.И.Дедов)

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор  
Николай Петрович Гончаров

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Ольга Вячеславовна Смирнова

доктор биологических наук, профессор  
Николай Дмитриевич Фанченко

**Ведущая организация:** Институт биологии развития  
им. Н.К.Кольцова РАН

Защита состоится 12 октября 2009 г. в 15 ч. 30 мин. в ауд. М-1  
на заседании диссертационного совета Д 501.001.93  
биологического факультета Московского  
государственного университета им. М.В. Ломоносова  
(Ленинские горы, Москва, ГСП-1, 119991).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова  
Автореферат разослан 10 сентября 2009 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 501.001.93

доктор биологических наук

Б.А. Умарова

## **Общая характеристика работы.**

Актуальность темы исследования. Проблемы, связанные с нарушениями физиологических механизмов регуляции функции репродуктивной системы у мужчин в различные периоды онтогенеза занимают одно из важных мест в современной биологии и медицине. Развитие и поддержание репродуктивной функции у мужчин определяется физиологической динамикой секреции тестостерона с формированием востребованного уровня циркулирующих форм тестостерона в крови. Нарушение этого сложного многофакторного процесса приводит к развитию целого ряда патологий в репродуктивном здоровье человека, лабораторная диагностика которых в первую очередь определяется адекватностью и доступностью методов определения главного мужского гормона – тестостерона (Т).

Тестостерон является ключевым элементом системы гипоталамус-гипофиз-гонады. Физиологическая роль его у мужчин хорошо известна и заключается, прежде всего, в формировании мужского фенотипа и обеспечении сперматогенеза. Оценка андрогенного статуса необходима при широком спектре клинических симптомов и патологических состояний, например, таких как тестикулярная недостаточность, бесплодие, сексуальная дисфункция, гипогонадизм различного генеза и др. Мониторинг за уровнем Т необходим при проведении антиандрогенной терапии определенных форм дисгормонального рака, а также при проведении заместительной терапии препаратами. Точное количественное определение Т необходимо для диагностики широко распространенного возрастного андрогенного дефицита. У детей при замедленном или ускоренном половом созревании, нарушении деятельности надпочечников, тестикулярных и овариальных нарушениях. У женщин показаниями к определению тестостерона являются гирсутизм, тестикулярная феминизация, аменорея, бесплодие, андроген секретирующие опухоли яични-

ков и надпочечников, синдром поликистозных яичников, андрогенная недостаточность.

Тестостерон циркулирует в крови в комплексе со специфическим глобулином (СССГ) – 35-75% (Кд - 20 сек.) и неспецифическим белком альбумином – 25-65% (Кд – 1 сек), который имеет низкую аффинность, но большую емкость за счет его высокой концентрации в крови. И только 1-2% тестостерона циркулирует в крови в свободном виде. Свободный тестостерон и связанный с альбумином тестостероном обозначают как биологически активную форму гормона. Обычно содержание общего тестостерона в сыворотке здоровых мужчин колеблется в пределах физиологической нормы (12-30 нмоль/л) и коррелирует с концентрацией СССРГ. Свободный тестостерон и связанный с альбумином тестостероном обозначают как биологически активную форму гормона, обеспечивающую его биологические эффекты. Однако даже в физиологических условиях концентрация СССРГ широко варьирует в зависимости от диеты, ИМТ, концентрации инсулина и возраста. А при патофизиологических состояниях, таких как острый и хронический стресс, психосоматические патологии, гипогонадизм и т.д., уровень СССРГ, а также альбумина и их соотношение нарушается, что неизбежно влияет на содержание биологически доступного Т.

В начале 2007 года опубликовано официальное заявление международной ассоциации эндокринологов о недопустимости использования прямых не экстракционных методов для определения общего тестостерона в диапазоне низких концентраций (об.Т < 10 нмоль/л), поскольку это ведет к ошибкам в диагностике с последующим назначением неправильного лечения.

Именно поэтому только наличие адекватных аналитических методов определения св.Т, обеспечило бы наиболее оптимальную диагностику андрогенного статуса организма как у мужчин, так и у женщин и детей, особенно до периода полового созревания.

Цель настоящей работы: оценка адекватности определения общего тестостерона крови различными методами иммуноанализа, разработка современного высокочувствительного метода определения в слюне и сыворотке крови свободной формы тестостерона как маркера для оценки андрогенного статуса и доказательства надежности его применения при различных физиологических и патофизиологических условиях у детей, подростков и взрослых мужчин.

Для достижения этой цели поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ современных методов определения общего тестостерона в сыворотке крови и выбрать наиболее надежный.
2. Адаптировать метод определения свободной формы тестостерона в слюнной жидкости, стандартизировать методику сбора слюны и определить диапазон физиологических колебаний уровня свободного тестостерона у детей, подростков и взрослых мужчин.
3. Разработать методические подходы для определения свободной формы тестостерона в сыворотке методом люминесцентного иммуноанализа с предварительной ультрафильтрацией и определить диапазон физиологических колебаний свободного тестостерона в сыворотке.
4. Провести сравнительный анализ современных методов определения свободной формы тестостерона в слюне и сыворотке крови.
5. Оценить возможности LIA и ELISA технологий для определения свободной формы тестостерона в слюне в зависимости от используемого диапазона концентраций.

Научная новизна. В представленной работе впервые проведена комплексная сравнительная оценка современных методов иммуноанализа общего и свободного тестостерона у мужчин в различных биологических жидкостях.

Впервые в России адаптирован на различных моделях и обосновано введен в рутинную практику метод определения свободной формы тестостерона в слюнной жидкости на моделях различных физиологических и патофизиологических состояний репродуктивной системы.

Установлено, что использование количественных параметров общего и расчетного Т имеет существенные ограничения для оценки андрогенного статуса у детей в период препубертата (до 10 лет). В то же время определение содержания св. Т в слюне является дополнительным к клинической симптоматике и важным биохимическим маркером для диагностики возможных нарушений андрогенного гомеостаза.

Впервые разработан оригинальный тандем для определения свободного тестостерона в сыворотке мужчин. Разделение свободной и связанной с белками фракции тестостерона с помощью технологии ультрафильтрации на специальных фильтрах Amicon Ultra – 4 (30 кДа) в комбинации с измерением его уровня в ультрафильтрате высокочувствительным методом люминесцентного иммуноанализа (LIA, IBL), который обеспечивает адекватное определение тестостерона у мужчин в широком диапазоне концентраций.

Практическая значимость. С введением в практику очень чувствительной и специфичной LIA-технологии, концентрация тестостерона в слюне и ультрафильтрате может быть широко использована в качестве объективного гормонального маркера диагностики различных форм андрогенного дисбаланса у детей, подростков и взрослых мужчин. Определение свободного тестостерона LIA-методом может служить методом выбора для целого ряда научных исследований, мониторинга и лечения гонадальных дисфункций, включая изучение фармакокинетики производных тестостерона при заместительной терапии. Выявление неадекватно используемых методов иммуноанализа, применение которых приводит к завышению результатов определения Т, позволяет избежать возможных диагностических ошибок.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты определения уровня общего тестостерона прямыми неизотопными методами и автоматизированными системами широко варьируют в одних и тех же образцах сыворотки, особенно в диапазоне низких концентраций.
2. Концентрация свободного тестостерона в слюне у мужчин, определенная методом усиленной хемилюминесценции, отражает уровень свободного, несвязанного с белками, тестостерона в крови.
3. Показатель свободного тестостерона в ультраfiltrате является дополнительным к клинической диагностике чувствительным маркером выявления андрогенного дефицита.
4. Единого идеального маркера и метода определения андрогенного статуса не существует, поэтому, в зависимости от поставленной перед исследователем задачи, необходимо правильно выбрать адекватный показатель, а также чувствительный и специфичный метода его определения.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены в виде докладов на 8-ом Международном Конгрессе Андрологии (Сеул, июнь 2005), Международной Конференции «Балтийский форум» (Санкт-Петербург, июнь 2008), в виде тезисов на 9-ом Международном Конгрессе Андрологии (Барселона, Испания, март 2009), на 8-ом Европейском Конгрессе по Менопаузе (EMAS) (Лондон, май 2009). По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них 2 - в зарубежной печати.

Диссертация апробирована на межотделенческой конференции ФГУ Эндокринологический научный центр (апрель 2009).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 8 отечест-

венных и 170 зарубежных источников. Работа содержит 17 таблиц, 20 рисунков.

## **Материалы и методы**

### *Пациенты*

Были обследованы следующие группы пациентов:

1. Мужчины ( $n = 100$ ) в возрасте от 19 до 65 лет, которые обращались в клинику для подтверждения или исключения диагноза различных нарушений функции эндокринных желез.
2. Добровольцы-мужчины ( $n = 55$ ) в возрасте от 21 до 50 лет (медиана 30 лет). В этой группе 41 человек собирали 9 образцов слюны (3 – утром, 3 – днем, и 3 – вечером), согласно протоколу сбора слюны, чтобы определить суточную динамику тестостерона в слюне. Остальные 14 человек собирали только 3 утренние порции слюны. Все исследуемые в этой группе добровольцы были клинически здоровыми.
3. Добровольцы-мужчины ( $n = 15$ ) в возрасте 38-55 лет (медиана 48 лет). Утренние образцы слюны (3 образца с интервалом в 30 минут, 8.30 - 9.30) были собраны один раз в неделю в течение 5 недель. Эта группа была стандартизирована по профессиональной деятельности, физической и эмоциональной нагрузке, режиму дня (время вставания, характер диеты и т.д.)
4. Пациенты-мужчины ( $n = 189$ ), которые обращались в клинику для подтверждения или исключения диагноза различных форм гипогонадизма, возрастного андрогенного дефицита, сексуальной дисфункции и других нарушений гормональной функции яичек. Возраст пациентов колебался от 19 до 83 лет.
5. Мальчики ( $n=93$ ) в возрасте 2-18 лет без эндокринной патологии, с нормальным уровнем полового развития в соответствии со шкалой Таннера.



### *Процедура сбора крови*

Образцы крови были взяты из локтевой вены между 8.00 и 10.00 утра в день сбора слюны. Отделение сыворотки от форменных элементов проходило в течение 6 часов при комнатной температуре, центрифугирование при 3000 об/мин. Образцы сыворотки хранились при  $-40^{\circ}\text{C}$  в двух аликвотах до измерения в них содержания общего тестостерона и сексстероидсвязывающего глобулина (СССГ).

### *Процедура сбора слюны*

Образцы слюны были собраны в специальные контейнеры (SaliCaps<sup>®</sup>, IBL) со специальной трубочкой, изготовленные из материала, который не абсорбирует стероиды. Слюна была собрана не менее чем через 30 минут после еды, питья, чистки зубов или жевания жвачки. Требовалось примерно 2 минуты, чтобы собрать необходимое количество слюны (0,6-0,8 мл). Слюна не должна быть контаминирована кровью, концентрация тестостерона в которой в 10-15 раз выше, чем в слюне. Такие пробы исключали из анализа. Собранная слюна хранилась при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед тестированием образцы слюны размораживали и центрифугировали.

Для дальнейшего исследования три порции слюны, собранные в течение одного часа, смешивали в равных количествах. Такой пул имеет среднее значение концентрации свободного тестостерона, которое реально отражает уровень гормона.

*Определение свободного тестостерона в слюне (св.Т).* Нами адаптирован метод определения свободного тестостерона в слюне для прицельной диагностики андрогенного дефицита у мужчин и женщин. Образцы слюны, собранные описанным выше способом, анализировались на содержание Т методом усиленной люминисценции LIA (фирма IBL-Гамбург, Германия).

Для сравнения двух различных технологий от фирмы IBL для измерения св.Т в слюне, определение в некоторых образцах слюны проводили

также методом твердофазного ферментного иммуноанализа ELISA, с регистрацией фотометрического сигнала на мультианализаторе Victor 2.

*Определение свободного тестостерона в сыворотке (св.Т)* проводили с предварительным отделением свободной фракции тестостерона методом ультрафильтрации (УФ). Образец сыворотки 0,5 мл помещали в вертикальный центрифужный фильтр Amicon<sup>®</sup> Ultra-4 (MILLIPORE) с мембраной 30К – 30,000 NMWL. Затем добавляли 0,7 мл HEPES буфера (pH 7,4).

Смесь сыворотки с буфером инкубировали 30 минут на водяной бане при 37°C, затем центрифугировали 15 минут при 37°C и 5250g, центрифугу предварительно прогревали в течение 30 минут при 37°C в работающем режиме (5250g). Определение свободной фракции тестостерона в ультрафильтрате проводили методом усиленной люминисценции LIA (фирма IBL-Гамбург, Германия), основанном на принципе конкурентного связывания. Регистрацию люминисцентного сигнала проводили на мультианализаторе Victor 2 (фирма Wallac, Финляндия).

*Определение общего тестостерона (об.Т)* в образцах крови проводили методом усиленной хемилюминисценции с помощью автоматического анализатора Vitros Eci (Ortho-Clinical Diagnostics, J&J, Великобритания). Для сравнения различных методов измерения общего тестостерона в сыворотке крови и выбора наиболее адекватного анализатора, определение проводили также следующими широко используемыми в настоящее время методами:

- 1) Vitros Eci (“Ortho-Clinical Diagnostics”), автоматический мультианализатор;
- 2) Architect (“Abbott Laboratories”), автоматический мультианализатор;
- 3) Access (“Beckman Elmer”), автоматический мультианализатор;
- 4) Delfia (“Perkin Elmer”), мультианализатор;
- 5) DRG, иммуноферментный набор (ELISA)
- 6) РИА-набор (<sup>3</sup>H-Т), после экстракции, стандартизированный ВОЗ.

*Определение сексстероидсвязывающего глобулина (СССГ), проводили с помощью автоматического анализатора Elecsys 2010 (Hoffmann – La Roche).*

*Вычисление концентрации свободного тестостерона в крови проводили с помощью математической формулы, использующей показатели содержания в крови общего тестостерона и СССР (A.Vermeulen, 1999) (сайт в Интернете <http://www.issam.ch/freetesto.htm>).*

*Статистическая обработка результатов.* Полученные данные были обработаны с помощью программы Statistica for Windows, StatSoft, Inc. (1999). Результаты представлены в виде медианы, 10/90 и 2,5/97,5-перцентилей, геометрической средней и среднего квадратичного отклонения. Анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. При  $p < 0,05$  распределение признака считалось отличающимся от нормального. Корреляционные связи между показателями с распределением, отличающимся от нормального, оценивали с помощью метода Спирмена. Анализ вида зависимости между показателями (при нормальном распределении) проводили с помощью метода регрессионного анализа. Значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрических методов, U-критерия Манна-Уитни и критерия Уилкоксона. Различия  $p < 0,05$  считались статистически достоверными.

## **Результаты исследования**

### *Взрослые мужчины*

#### ***Сравнительный анализ различных методов определения общего тестостерона в сыворотке крови***

На первом этапе исследования мы провели сравнение современных, широко используемых в настоящее время неизотопных методов измерения общего тестостерона в сыворотке крови. В качестве метода сравнения был

выбран РИА метод иммуноанализа. РИА метод с предварительной экстракцией и применением высокоспецифичных моноклональных антител в лаборатории биохимической эндокринологии и гормонального анализа ЭНЦ РАМН использовали на протяжении 15 лет. За основу метода была взята технология Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), разработанная в рамках Программы ВОЗ по репродукции человека (Sufi S.V. et al, Лондон, 1992). Этот метод был калиброван с референсным методом (газовая хроматография/ масс-спектрометрия); нормальный уровень общего тестостерона при его определении данным методом составлял 11-33 нмоль/л у здоровых мужчин репродуктивного возраста.

Суммарные показатели концентрации тестостерона у 100 мужчин представлены в табл. 1. Как показали результаты исследования, наблюдаются значительные различия в значении средних показателей содержания тестостерона, полученных различными методами. Концентрация тестостерона в крови, определенная любыми неизотопными методами, была статистически значимо выше, чем при определении РИА. Самый высокий уровень (медиана 19,2 нмоль/л) зафиксирован при определении методом Delfia, самый низкий (медиана 13 нмоль/л) – при определении РИА. Наиболее близки были показатели Vitros ECi и РИА (медиана 13,1 и 13 нмоль/л соответственно).

Таблица 1. Значения уровня общего тестостерона, полученные РИА и неизотопными методами (n = 100)

Метод	Геометрическое среднее	Медиана	Разброс min-max	Стандартное отклонение	Критерий Уил-коксона
Access	13,9	14,2	3,1-50,1	6,8	Access/РИА p < 0.0001
Delfia	19,3	19,2	3,6-94,6	13	Delfia/РИА p < 0.0001
Architect	16,8	17,8	3,8-114,4	12,7	Architect/РИА p < 0.0001
DRG	15,6	16,3	3,5-40,8	6,5	DRG/РИА p < 0.0001
Vitros ECi	12,7	13,1	1,8-44,2	7,7	Vitros ECi/РИА p = 0,0190
РИА	12,1	13	2,1-34,6	6	РИА -

При вычислении разницы между показателями РИА и неизотопного метода (табл. 2) оказалось, что медиана этого показателя колебалась от минимальных значений (0,4 нмоль/л для Vitros Eci, что составляло в среднем 0.03%) до максимальных (7,3 нмоль/л для Delfia, что составляло в среднем 65%).

Таблица 2. Отклонения в концентрации общего тестостерона между показателями, полученными РИА и неизотопными методами (n = 100)

Метод	Медиана, нмоль/л	Разброс, нмоль/л	Медиана, %	Разброс, %
Access/РИА	1,2	-7,0/41,3	12	-26/469
Delfia/РИА	7,3	-10,4/85,8	65	-61/951
Architect/РИА	4,9	-7,3/105,6	39	-45/1200
DRG/РИА	2,7	-9,8/19	21	-33/284
Vitros Eci/РИА	0,4	-5,2/16,8	0,03	-49/163

Если определять этот показатель по двум подгруппам, ниже физиологической нормы (11 нмоль/л) и в нормальном диапазоне (выше 11 нмоль/л), то оказалось, что при определении уровня тестостерона всеми неизотопными методами, кроме Vitros Eci, в 1-й подгруппе разница значений более выражена, тогда как во 2-й подгруппе эта разница снижается, но остается существенной (рис. 1). Исключением является Access: при определении этим методом концентрация тестостерона в нормальном диапазоне близка к таковой при определении РИА.

Регрессионный анализ результатов показал, что концентрация общего тестостерона, определенная методом РИА, коррелирует с показателями, полученными неизотопными методами (табл. 3). Наиболее сильная корреляция наблюдается между РИА и Vitros Eci, наименьшая – между Delfia/РИА и Architect/РИА. В подгруппе с содержанием тестостерона менее 11 нмоль/л наблюдалась слабая корреляция между показателями, определенными референсным РИА методом и неизотопными методами. В подгруппе с нормальным содержанием тестостерона корреляция между РИА и неизотопными методами возрастает (см. табл. 3).

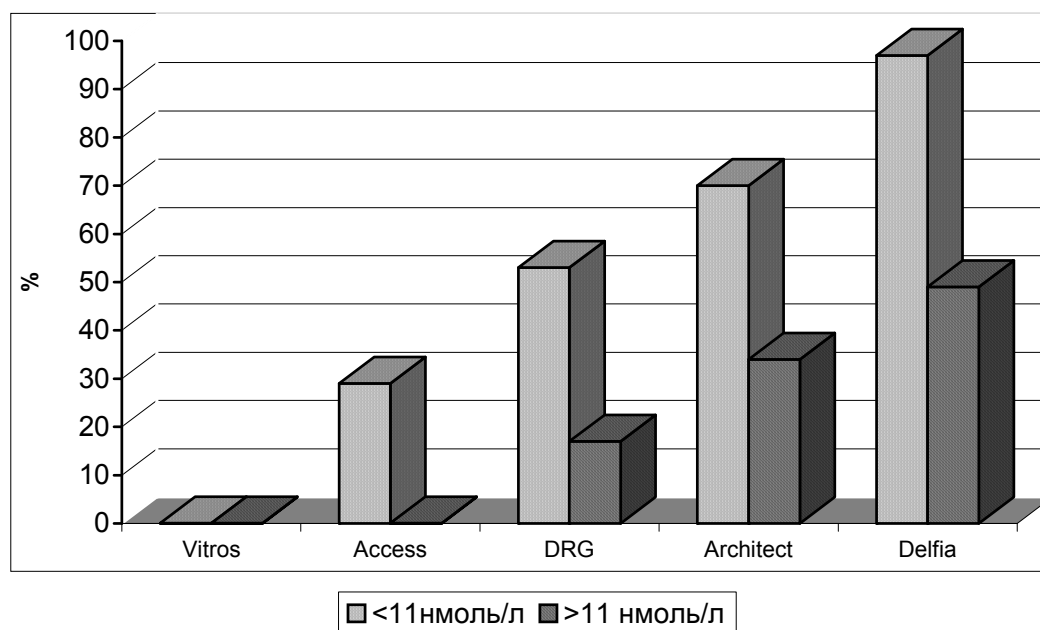


Рис. 1. Различия (в процентах) между показателями концентрации тестостерона (медиана), полученными РИА и неизотопными методами у мужчин с содержанием тестостерона (по РИА) <11 нмоль/л и >11 нмоль/л.

Таблица 3. Сравнение результатов определения уровня тестостерона, полученных РИА и неизотопными методами, у всех пациентов методом регрессионного анализа.

Метод	Вся группа (n = 100)		T < 11 нмоль/л (n = 32)		T > 11 нмоль/л (n = 68)	
	r	p	r	p	r	p
Access	0,708	<0,0001	0,459	0,0080	0,829	<0,0001
Delfia	0,423	<0,0001	0,392	0,0264	0,631	<0,0001
Architect	0,454	<0,0001	0,300	0,0950	0,695	<0,0001
DRG	0,780	<0,0001	0,629	0,0001	0,743	<0,0001
Vitros Eci	0,838	<0,0001	0,607	0,0002	0,794	<0,0001

Таким образом, все неизотопные методы, за исключением Vitros Eci, приводят к завышению определяемого уровня общего тестостерона по сравнению со стандартизированным РИА-методом. Наиболее выраженная систе-

матическая ошибка наблюдается при определении низких концентраций тестостерона, т. е. у тех мужчин, у которых при клиническом обследовании заподозрено наличие клинических признаков дефицита андрогенов.

Если при анализе результатов в качестве пограничного критерия норма/андрогенный дефицит использовать величину 11 нмоль/л, то из 100 обследованных образцов сывороток по данным РИА концентрация тестостерона 11 нмоль/л и ниже определялась у 38 мужчин, т.е. в 38% случаев предполагалось наличие андрогенного дефицита различной степени тяжести (от 2,1 до 9,8 нмоль/л). Если уровень тестостерона определяли неизотопными методами, то частота выявления андрогенного дефицита при использовании метода Vitros ECi составляла 25%, Architect – 13%, DRG – 10%, Delfia – 7%, Access – 5% (рис. 2).

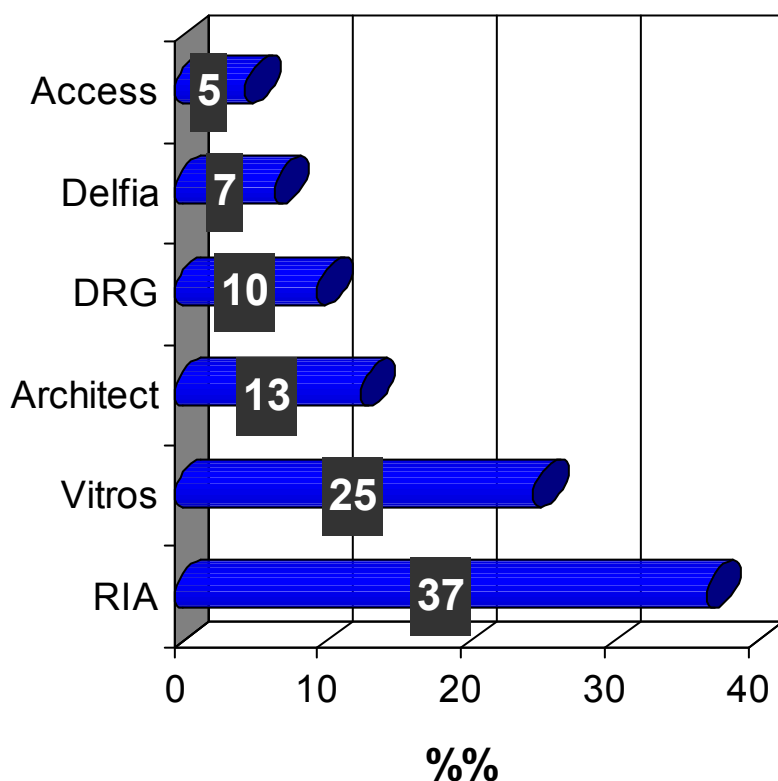


Рис. 2. Частота (в %%) биохимического диагноза андрогенного дефицита при использовании различных методов определения общего Т в одних и тех же образцах сывороток мужчин.

При использовании значений нормы, рекомендуемых в инструкциях разработчиков неизотопных методов, частота выявления андрогенного дефицита среди всех обследованных мужчин снижается в еще большей степени.

### ***Определение свободной формы тестостерона в слюне***

Неудовлетворительные результаты определения об.Т автоматизированными системами послужили основанием для поиска альтернативных технологий и прежде всего прямого и доступного метода определения свободной формы Т, как наиболее адекватного маркера андрогенного статуса как у мужчин так и у женщин и детей.

Однако прямое определение свободной формы тестостерона в крови сопряжено с определенными технологическими трудностями. Поэтому мы обратились к альтернативной биологической жидкости – слюне, куда поступает только свободные формы стероидов, включая тестостерон. Сбор слюны прост, не инвазивен и имеет большие преимущества перед традиционными методами определения стероидов в венозной крови, взятие которой само по себе является добавочным стрессорным фактором, способным исказить показатели гормональных параметров.

Нами исследованы гормональные показатели здоровых мужчин и мужчин с андрогенным дефицитом в возрасте от 21 до 54 лет.

Таблица 4. Характеристика исследуемых групп (медиана и 10/90 процентиля)

Группы	n	Возраст (годы)	Общий тестостерон (нмоль/л)	СССГ (нмоль/л)	Вычисленный свободный тестостерон (пмоль/л)
здоровые мужчины	41	38 (21-50)	18,8 (12,4-26,1)	36,1 (21-54)	374 (225-544)
мужчины с андрогенным дефицитом	36	35 (21-54)	6,7 (1,2-10,8)	33,0 (14,7-104,1)	135 (9,3-215)
P		0,2242	<0,0001	0,3958	<0,0001

Обнаружено, что сопоставимые по возрасту здоровые мужчины и мужчины с андрогенным дефицитом имели сравнимый уровень СССРГ (табл. 4).



Однако уровень общего тестостерона был значительно выше в группе здоровых мужчин.

Таблица 5. Суточная динамика свободного тестостерона в слюне (пмоль/л) у здоровых мужчин и мужчин с андрогенным дефицитом (медиана и 10-90 процентиля)

Группы	Время сбора слюны (часы)								
	8-30	9-00	9-30	15-30	15-00	16-00	22-00	22-30	23-00
здоровые	371 (260 -562)	364 (277 -531)	374 (263 -541)	329 (208 -440)	322 (225 -502)	288 (225 -440)	212 (146 -423)	295 (222 -430)	343 (164 -475)
андроген- ный дефи- цит	205 (76 -250)	209 (36 -267)	218 (52 -302)	240 (35 -416)	201 (21 -319)	169 (51 -347)	131 (45 -364)	157 (66 -305)	145 (42 -316)
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0926	0,0147	0,0037	0,0083	0,0019	0,0056

Средняя концентрация тестостерона в слюне у здоровых мужчин (по 3 утренних образца от каждого, 8-30 – 9-30) составляла 380 пмоль/л (270-544). Средняя концентрация днем и вечером, соответственно,  $80 \pm 15\%$  и  $71 \pm 21\%$  от утренней концентрации (рис. 3, табл. 5).

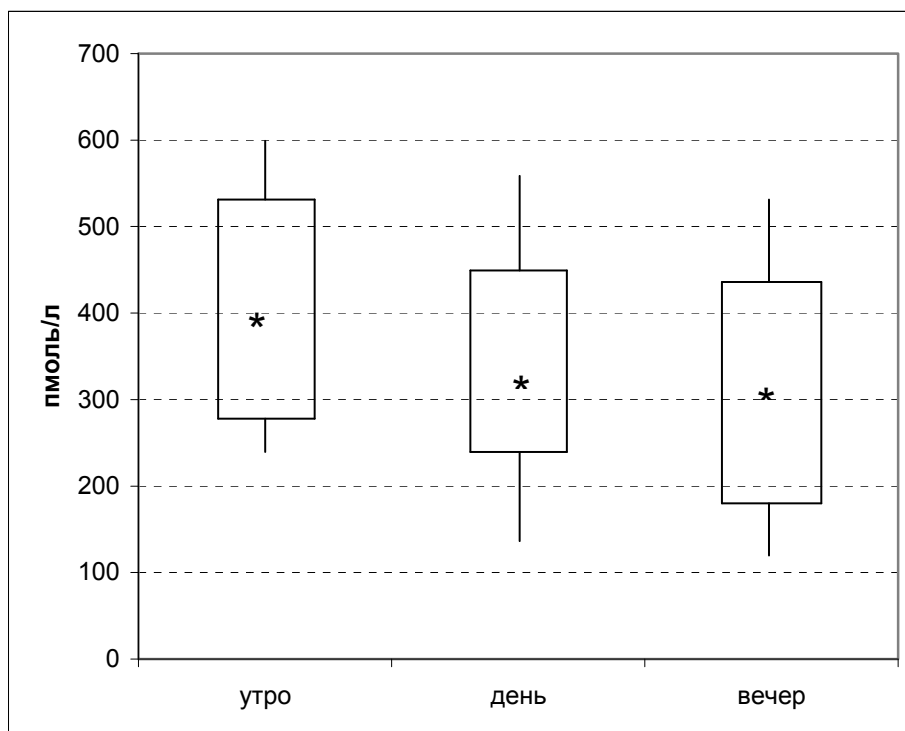


Рис. 3. Суточная динамика свободного тестостерона в слюне у здоровых мужчин (\* - медиана, достоверность разницы – между утром и вечером  $P=0,0012$ , между днем и вечером  $P=0,0006$ )

В отличие от здоровых мужчин, суточная динамика свободного тестостерона в слюне у больных с андрогенным дефицитом выражена менее заметно. Концентрации свободного тестостерона утром и днем практически не отличались, статистически достоверное различие было обнаружено только вечером -  $68 \pm 29\%$  от утреннего уровня (рис.4 табл.5).

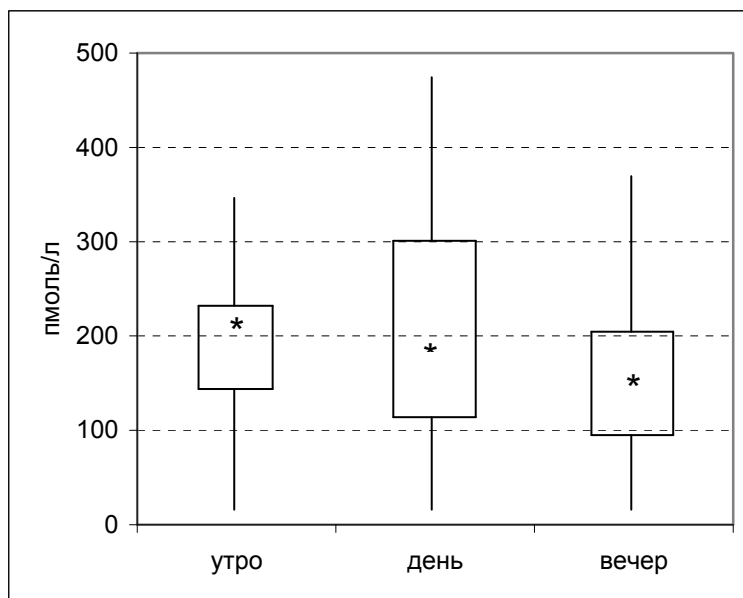


Рис. 4. Суточная динамика свободного тестостерона в слюне больных мужчин с андрогенным дефицитом (\* - медиана, достоверность разницы между утром и вечером  $P=0,583$ , между днем и вечером  $P=0,0006$ ).

Концентрация св.Т в слюне и расчетная концентрация свТ в крови у здоровых мужчин практически не отличались друг от друга: 380 пмоль/л (270-544 пмоль/л) и 374 пмоль/л (225-544 пмоль/л,  $p=0,111$ ) (рис. 5), тогда как у пациентов с андрогенным дефицитом концентрация св.Т как правило превышала показатели математического метода определения концентрации св.Т в крови. Медиана свободного тестостерона в трех утренних образцах слюны была выше (215 пмоль/л, разброс 55-249 пмоль/л), чем вычисленная концентрация свободного тестостерона в крови – 135 пмоль/л (разброс 9,3-215 пмоль/л) (рис. 6).

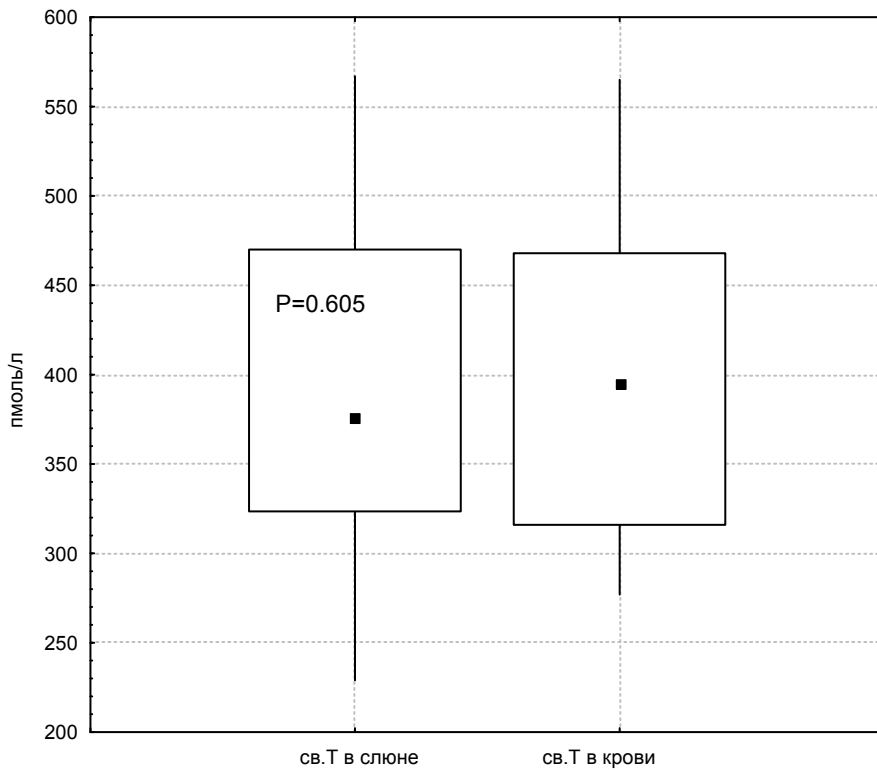


Рис. 5. Сравнение показателей расчетного св. Т в крови и св. Т в слюне в утренние часы у здоровых мужчин.

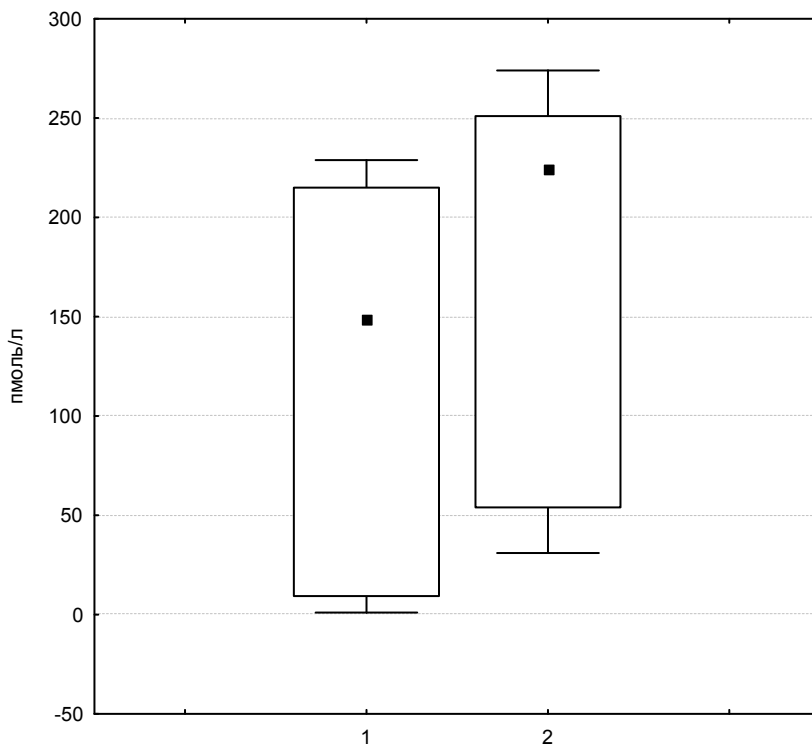


Рис. 6. Сравнение показателей расчетного св. Т в крови (1) и св. Т в слюне (2) в утренние часы у пациентов с андрогенным дефицитом.

Для оценки воспроизводимости индивидуальных показателей свободного тестостерона в слюне, мы собирали слюну в группе здоровых мужчин в течение 5 недель (один раз в неделю утром). В начале исследования (1-ая неделя) концентрация свободного тестостерона у обследуемых была в пределах 180-745 пмоль/л. Последующие определения тестостерона (2-ая – 5-ая недели) показали приемлемую повторяемость результатов, коэффициент вариации 13 % (рис.7).

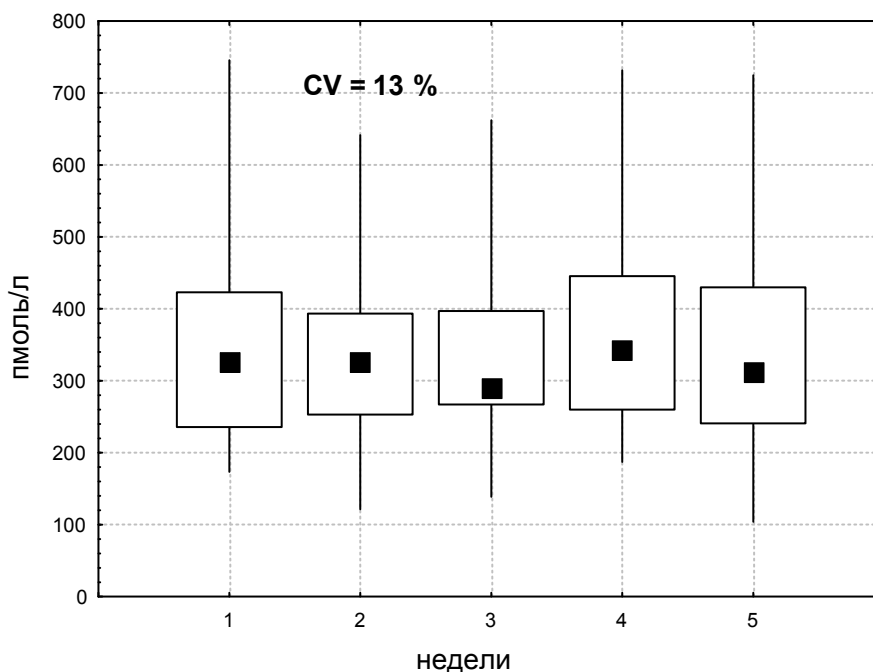


Рис. 7. Воспроизводимость концентрации св.Т в слюне в группе здоровых мужчин в течение 5 недель ( сбор образцов слюны один раз каждую неделю).

#### Мальчики от 2 до 18 лет

Для оценки информативности определения св.Т в слюне в области низких значений общего Т. мы обследовали группу мальчиков на различных этапах постнатального развития в возрасте от 2 до 18 лет. В группу были отобраны здоровые мальчики без эндокринной патологии, с нормальным уровнем полового развития в соответствии со шкалой Таннера.

В целом по группе содержание общего Т варьировало от 0,05 до 25,8 нмоль/л, расчетного Т от 0,001 до 557 пмоль/л (рис. 8-9).

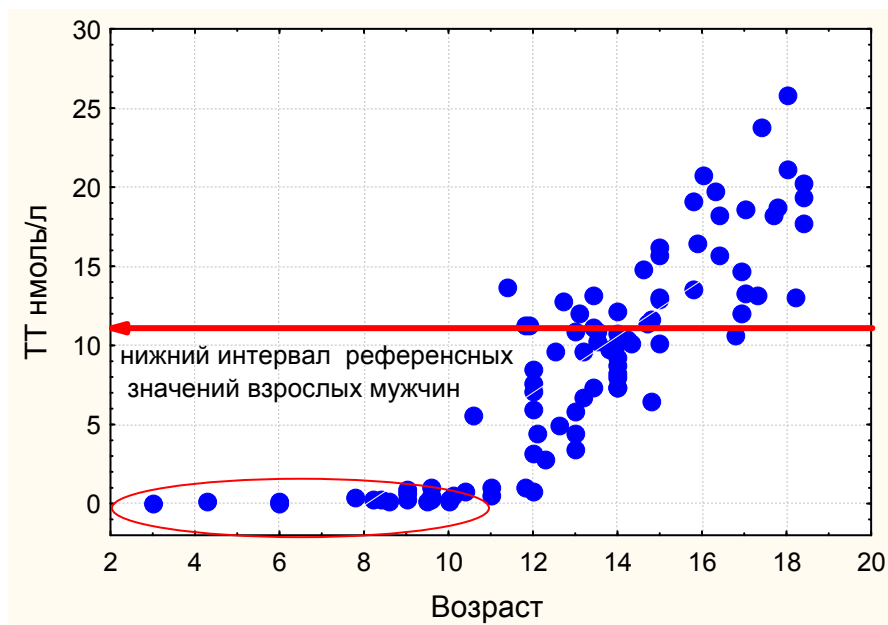


Рис. 8. Динамика общего тестостерона у мальчиков на различных этапах пубертатного развития.

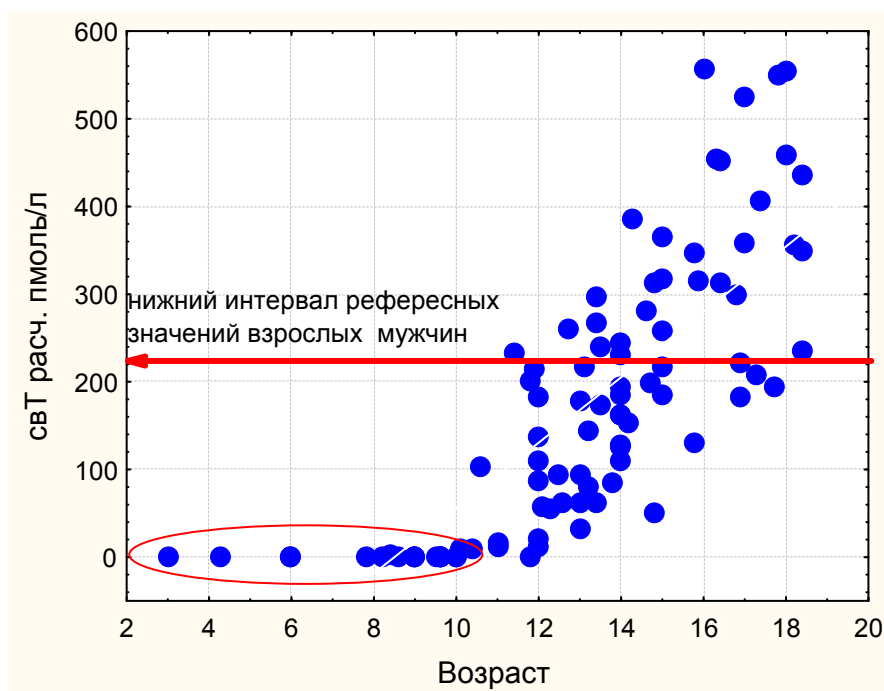


Рис. 9. Динамика расчетного свободного тестостерона в крови у мальчиков на различных этапах пубертатного развития.

Особый интерес для нас представляла стадия препубертата – дети до 10 лет. Общий тестостерон в данной подгруппе варьировал в пределах 0,05 –

0,44 нмоль/л, т.е. на пределе чувствительности используемой нами автоматизированной системы Витрос, чувствительность которой 0,03 нмоль/л.

Такая же динамика характерна и для расчетного Т, который варьировал практически около нуля, что является естественным результатом специфики стадии препубертата – низкий уровень Т в комбинации с высоким уровнем СССГ. В то же время содержание св.Т. в слюне в данной подгруппе варьирует в диапазоне определяемых концентраций от 3 до 127 пмоль/л (рис.10). С возрастом концентрация об.Т, расч. Т и св. Т в слюне нарастает и к 16-18 годам сглаживается и достигает уровня средних значений взрослых мужчин.

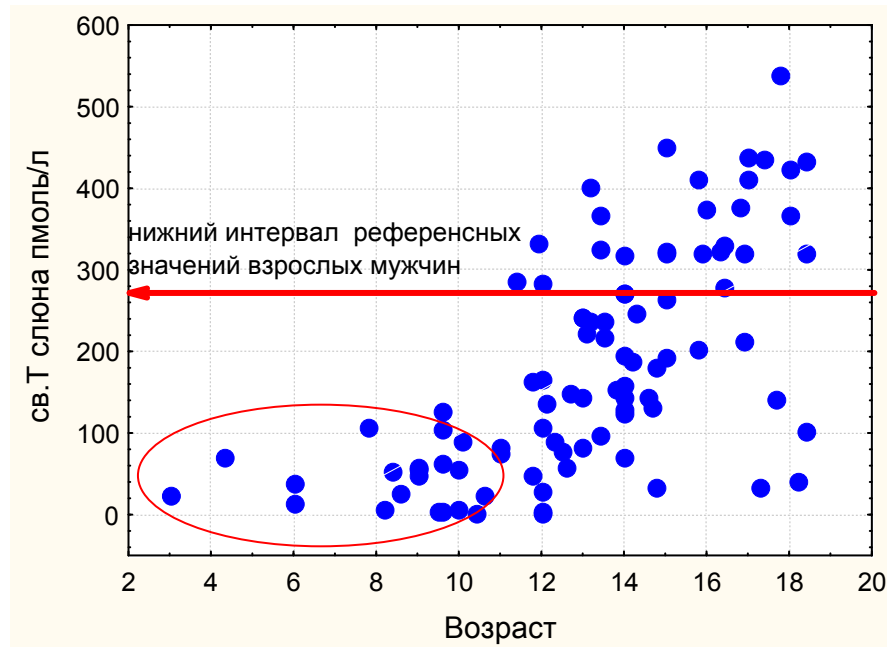


Рис. 10. Динамика свободного тестостерона в слюне у мальчиков на различных этапах пубертатного развития.

Во всех возрастных группах показатели св. Т в слюне с различной степенью значимости коррелируют с общим Т к крови. Коэффициент корреляции между общим, расчетным и св. Т в крови достигает статистической значимости только после 10 лет (табл. 6).

Таблица 6. Корреляционные связи между показателями тестостерона в группах обследованных мальчиков.

Возраст, лет		св. Т слюны		расч. св. Т крови	
		r	p	r	p
2 – 10 (n = 14)	об. Т крови	0,559	0,037	0,237	0,413
	св. Т слюны	-	-	0,085	0,787
10 – 13 (n = 25)	об. Т крови	0,667	<0,0001	0,983	<0,0001
	св. Т слюны	-	-	0,718	<0,0001
13 – 16 (n = 33)	об. Т крови	0,400	0,020	0,688	<0,0001
	св. Т слюны	-	-	0,473	0,005
16 – 18 (n = 21)	об. Т крови	0,452	0,030	0,552	0,009
	св. Т слюны	-	-	0,680	<0,0001

Полученные данные показали, что использование количественных параметров общего и расчетного Т неприемлемо для оценки андрогенного статуса у детей в период препубертата (до 10 лет). В то же время определение содержания св. Т в слюне является дополнительным к клинической симптоматике важным биохимическим маркером для диагностики возможных нарушений андрогенного статуса.

В таблице 7 представлены выработанные нами интервалы значений уровня свободного Т в слюне в исследованных возрастных подгруппах. Необходимо отметить, что полученные значения могут использоваться только в качестве справочных. Рекомендуется отработка собственных результатов для установления референсных значений в каждой лаборатории.

Таблица 7. Показатели свободного тестостерона в слюне у мальчиков (результаты представлены в виде медианы и 5/95-перцентилей).

Возраст, лет	св. Т слюны, пмоль/л
2 - 10	31,6
	3,2 – 127
10 - 13	82,3
	1,5 – 284
13 - 16	216
	71,2 - 402
16 - 18	331
	42,0 - 439

Мониторинг заместительной терапии андрогенами по уровню свободного тестостерона в слюне

Мы проводили мониторинг определения св.Т в слюне у транссексуала (женщина → мужчина) после лечения сустаномом (рис. 11). До лечения уровень общего и вычисленного свободного тестостерона в крови был очень низок (соответственно 3,9 нмоль/л и 42,3 пмоль/л). Через 1 неделю после инъекции сустанона уровень об.Т в крови вырос на 29%, концентрация вычисленного св.Т в крови – на 140%, тогда как содержание св.Т в слюне возросло утром на 275% и вечером на 527%.

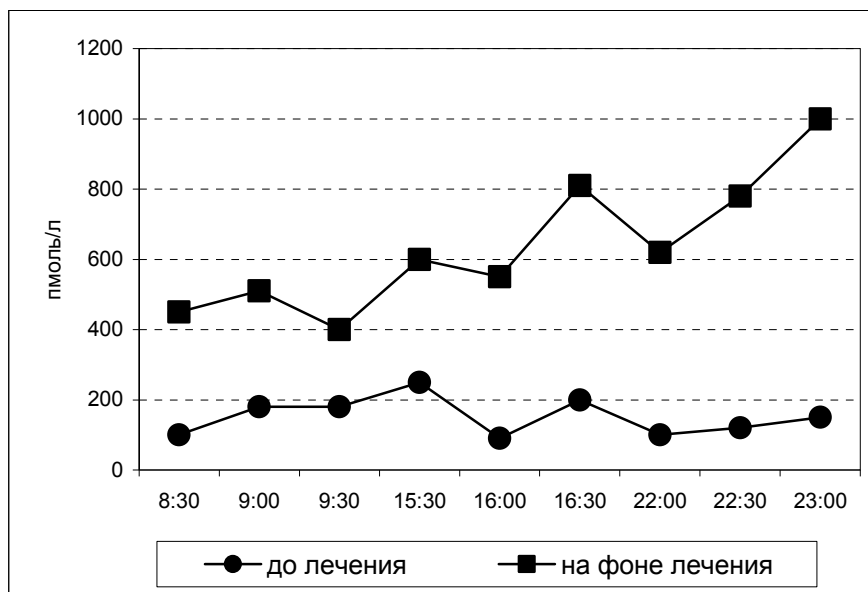


Рис. 11. Динамика св. Т в слюне у транссексуала (женщина → мужчина)

Мониторинг заместительной терапией андрогенами более адекватен при определении св.Т в слюне с помощью ЛИА-технологии. С этим методом достаточно просто изучать фармакокинетику в каждом отдельном случае, с тем, чтобы подбирать оптимальную дозу препарата и пути его введения.



***Сравнительный анализ LIA и ELISA технологий для определения свободной формы тестостерона в слюне в широком диапазоне концентраций.***

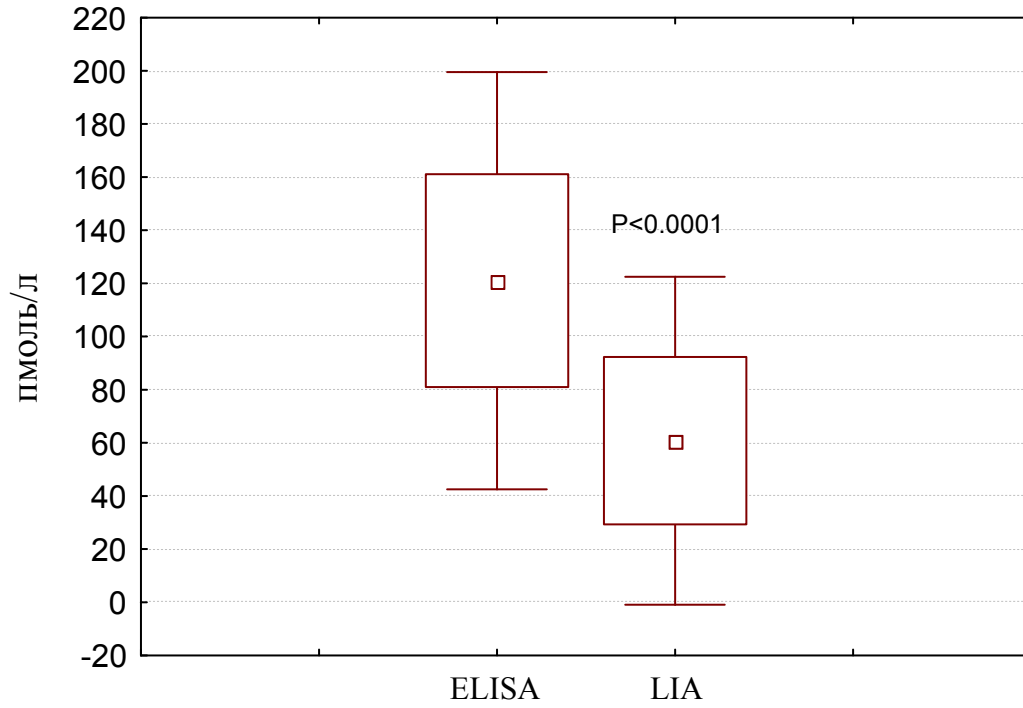
В работе были использованы 160 образцов слюны, в которых содержание св. Т, при определении LIA методом, варьировало в пределах 10 - 990 пмоль/л (3 – 285 пг/мл).

Мы проводили измерение уровней свободного тестостерона в одних и тех же образцах слюны LIA (ультра чувствительный хемилюминесцентный анализ) и ELISA (ферментный иммуноанализ с регистрацией сигнала методом фотометрии) наборами, рекомендованными фирмой IBL для определения св. Т в слюне. Достаточно высокая корреляция между определяемыми показателями регистрируется во всем исследуемом диапазоне концентраций. Коэффициент корреляции составлял 0.94 в диапазоне высоких концентраций (св. Т в слюне > 110 пмоль/л по результатам LIA метода) и 0.86 в диапазоне низких концентраций (менее 110 пмоль/л).

Анализ абсолютных значений св. Т в слюне показал, что в диапазоне высоких концентраций различия между методами практически отсутствовали. В то же время в диапазоне низких концентраций использование метода ELISA завышает показатели Т в 1,5 – 2 раза (рис. 12).

Таким образом, с введением в практику очень чувствительной и специфичной LIA-технологии, концентрация тестостерона в слюне может быть широко использована как объективный и адекватный гормональный критерий в диагностике различных форм андрогенного дефицита у мужчин, а его определение LIA-методом может служить методом выбора для целого ряда научных исследований, мониторинга в процессе терапии гонадальных дисфункций, включая изучение фармакокинетики производных тестостерона при заместительной терапии.

А



Б

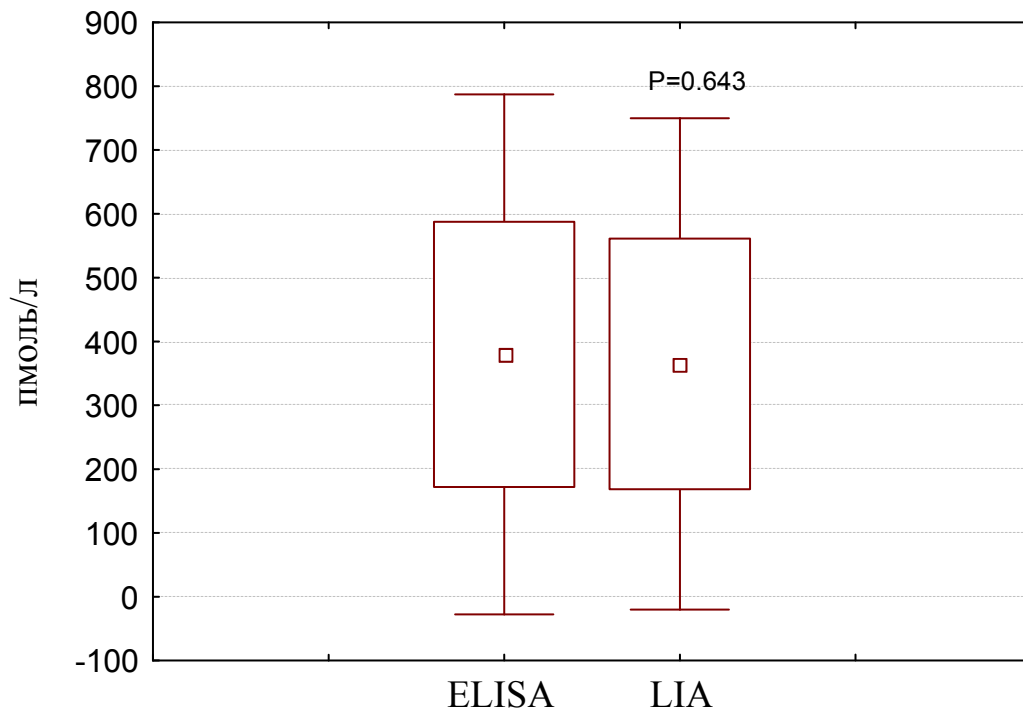


Рис. 12. Сравнительный анализ методов LIA и ELISA при определении св. Т в слюне в диапазоне его низких (А) и высоких (Б) концентраций.

***Определение свободной формы тестостерона в сыворотке крови с предварительной ультрафильтрацией.***

Коммерческие диагностические наборы для прямого измерения свободных стероидов, в особенности для тестостерона в крови, пока не пригодны для диагностического исследования и могут использоваться лишь в научных целях. «Золотым стандартом» для отделения св.Т от тестостерона связанного с белками является метод равновесного диализа. В последние годы появились работы, демонстрирующие возможности метода ультрафильтрации (УФ) для выделения свободных форм пептидных и стероидных гормонов.

Технология ультрафильтрации для разделения свободного и связанного с белком тестостерона была выбрана нами как наиболее быстрая, доступная и простая в использовании. При отработке методики мы придерживались опубликованных ранее рекомендаций по оптимальному режиму процесса ультрафильтрации для стероидных гормонов. По адсорбционным характеристикам лучшие результаты показали устройства, изготовленные из восстановленной целлюлозы с низко связывающей мембраной (адсорбция  $2,0 \pm 1,5\%$ ). Мы использовали вертикальные центрифужные фильтры Amicon® Ultra-4 (MILLIPORE) с мембраной 30K – 30,000 NMWL. Для поддержания термодинамического равновесия между свободной и связанной фракцией исследуемого гормона выбрана температура 37°C и физиологическое значение pH 7,4. Влияние на равновесие оказывает продолжительность проведения ультрафильтрации, которая в свою очередь зависит от исходного объема образца и его вязкости. Эксперименты с разведением показали в 4 раза большую адсорбцию с использованием нативной сыворотки, по сравнению с разведенной, а также установили, что небольшие разведения (1:1,4) уменьшают концентрацию общего тестостерона и оказывают лишь незначительный эффект на концентрацию свободного ( $0,3 \pm 1,6\%$ ). Разница становится значимой при разведении 1:10 ( $13,7 \pm 4,1\%$ ). Подобные эффекты согласуются с положе-

ниями закона действия масс. На основании детального анализа вышеизложенных данных, процесс ультрафильтрации был проведен нами в оптимальных условиях (см. раздел Материалы и методы), что дает возможность говорить о надежности полученных результатов. Высокая аналитическая (6,2 пмоль/л) и функциональная (17,3 пмоль/л) чувствительность LIA-метода позволяет количественно определять очень низкие (2-3 пг в пробе) концентрации Т в ультрафильтрате и в слюне, что особенно важно для диагностики андрогенного дефицита у мужчин, а также оценки андрогенного статуса у женщин и детей.

В данном исследовании мы одновременно определяли концентрацию свободного тестостерона в образцах крови и слюны 189 мужчин (19-83 лет), которые обращались в клинику для подтверждения или исключения диагноза различных нарушений функции эндокринных желез.

Суммарные показатели у всех обследованных 189 мужчин представлены в таблице 8.

Таблица 8. Гормональная характеристика пациентов (n=189), включенных в исследование.

	Среднее ± стандартное отклонение	Медиана	Разброс 2,5/97,5 проценти- тили
об.Т, нмоль/л	15,6 ± 7,0	14,7	2,2-33,2
св.Т крови (УФ), пмоль/л	144 ± 85	130	6,3-359
св.Т слюны, пмоль/л	418 ± 206	368	119-878
расчетный св.Т, пмоль/л	298 ± 141	279	47-601
СССГ, нмоль/л	40,3 ± 15,9	36,8	18,6-76,7

Наблюдаются значительные различия в значении средних показателей, полученных различными методами. По нашим данным процент свободного тестостерона от общего составил (медиана и 2,5/97,5-процентили): 2,6% (1,0-8,1%) при определении в слюне, 1,9% (1,1-2,7%) при расчетном способе

и 0,9% (0,21-2,1%) при определении в сыворотке с предварительной ультрафильтрацией.

Для оценки связи между анализируемыми параметрами применяли ранговый тест Спирмена, при  $p < 0,05$  различия считали статистически достоверными (табл. 9).

Таблица 9. Корреляционные связи анализируемых показателей.

	Коэфф. корреляции (r)	p
об.Т/ св.Т крови (УФ)	0,494	<0,0001
об.Т/ св.Т слюны	0,472	<0,0001
об.Т/ расч. св.Т	0,864	<0,0001
св.Т крови (УФ)/ св.Т слюны	0,414	<0,0001
св.Т крови (УФ)/ расч. св.Т	0,600	<0,0001
св.Т слюны/ расч. св.Т	0,489	<0,0001

Статистически значимая корреляция регистрируется между всеми обозначенными в работе маркерами андрогенного гомеостаза: общим Т, св. Т в крови (УФ), св. Т в крови (расчетный метод) и св. Т в слюне. Наиболее сильная связь наблюдается между общим Т и расчетным св.Т. Наличие такой связи заключено в самом принципе расчетного метода, в котором концентрация общего тестостерона наряду с содержанием СССГ является определяющей детерминантой в калькуляции св. Т. В то же время показатели св. Т в крови после ультрафильтрации сохраняли значимую положительную связь с показателями расчетного св. Т. Более слабая зависимость характерна для показателей св. Т в слюне.

Для количественной оценки абсолютных показателей все пациенты были условно разделены на две группы, исходя из величины нижней границы интервала референсных значений общего Т в крови. Первая группа с содержанием об. Т > 11 нмоль/л, вторая группа – об. Т < 11 нмоль/л.

Таблица 10. Показатели свободного тестостерона у мужчин (результаты представлены в виде медианы и 2,5/97,5-перцентилей).

Группы	об. Т	св.Т пмоль/л		
		слюна	кровь (расчетный)	сыворотка (после ультрафильтра- ции)
об.Т >11 нмоль/л (n=148)	17,3 1,8-33,2	405 161-836	309 204-604	151 52-370
об.Т <11 нмоль/л (n=41)	8,6 0,6-10,9	274 44-660	170 10-246	85 5,7-197
р	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Как видно из таблицы 10, в зависимости от содержания общего тестостерона в выделенных подгруппах статистически значимо снижаются все исследуемые показатели свободного тестостерона.

Интересно отметить, что в подгруппе пациентов с нормальным содержанием общего Т регистрируется значимое возрастное снижение показателя св. Т в крови ( $r = -0,22$ ,  $p < 0,02$ ). В то время как в динамике общего Т указанная зависимость не прослеживается.

В подгруппе с содержанием об.Т менее 11 нмоль/л корреляция отсутствует по всем показателям.

При анализе процентного соотношения св. Т от общего в подгруппах (табл. 11), выявлено статистически значимое повышение процентного показателя св. Т в слюне и расчетного св. Т у пациентов с содержанием общего Т ниже референсного предела.

Таблица 11. Процент свободного Т в подгруппах.

	об. Т > 11 нмоль/л	об.Т < 11 нмоль/л	р
Слюна	2,5 1,0 – 4,4	3,6 2,2 – 17,0	<0,0001
Ультрафильтрат	0,9 0,3 – 1,7	1,3 0,2 – 2,5	0,070
Расчетный метод	1,9 1,1 – 2,7	2,0 1,4 – 2,8	0,026

Если при анализе результатов в качестве пограничного критерия норма/андрогенный дефицит использовать нижний предел референсных значений, то по данным расчетного метода A.Vermeulen сниженная концентрация свободного тестостерона определялась в 15% случаев (референсный интер-

вал: 225-545 пмоль/л). По результатам определения в слюне – в 18% случаев (референсный интервал: 260-555 пмоль/л), при определении общего тестостерона в сыворотке и свободного тестостерона в сыворотке с предварительной ультрафильтрацией в 20 и 38% случаев (референсный интервал: 11-34 нмоль/л и 110-368 пмоль/л соответственно). Согласно этим данным, определение уровня свободного Т в сыворотке с предварительной ультрафильтрацией является более чувствительным и точным маркером для выявления различных форм андрогенных нарушений у мужчин.

### **Выводы**

1. Использование прямых неизотопных методов и автоматизированных систем иммуноанализа для определения уровня общего тестостерона в крови является критическим при измерении данного маркера в диапазоне низких концентраций (< 8-10 нмоль/л).
2. Концентрация тестостерона в слюне у мужчин, определенная методом усиленной хемилюминесценции, отражает уровень свободного, несвязанного с белками, тестостерона в крови. Физиологический диапазон его содержания в утренние часы составлял 270-544 пмоль/л со снижением в вечернее время на 20-30 %.
3. Использование параметра уровня общего и расчетного Т неприемлемо для диагностики у детей препубертатного этапа развития. Содержание св. Т в слюне является оптимальным биохимическим маркером для оценки андрогенного статуса у детей на всех стадиях пубертатного развития, включая стадию препубертата.
4. Концентрация свободного тестостерона в ультрафильтрате является более чувствительным маркером выявления андрогенного дефицита по сравнению с расчетным методом и методом его определения в слюне. Физиологический диапазон его колебаний в сыворотке крови взрослых мужчин составляет 110-368 пмоль/л.

5. При определении свободного тестостерона в слюне у здоровых мужчин возможно использование как LIA, так и ELISA технологии, однако, для диагностики андрогенного дефицита необходимо использовать LIA метод, также как и для определения свободного тестостерона в слюне у детей и подростков.

### **Практические рекомендации**

1. Полученные результаты показывают важность выбора адекватного маркера уровня тестостерона для диагностики андрогенного статуса и надежного метода определения его содержания.
2. Высокая чувствительность и специфичность LIA-метода в сочетании с неинвазивностью и простотой получения слюны позволяет рекомендовать его для широкого использования в диагностической практике, включая динамический мониторинг различных состояний, изучение фармакокинетики производных тестостерона при заместительной терапии.
3. Для выявления различных форм андрогенных нарушений у мужчин рекомендуется определять уровень свободного тестостерона в сыворотке, используя LIA метод с предварительной ультрафильтрацией.
4. Оценку андрогенного статуса у детей в период препубертата рекомендуется проводить по уровню свободного тестостерона в слюне.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. «Современные подходы к оценке андрогенной функции у мужчин на модели сахарного диабета 1 и 2 типа: значение биологически доступного, свободного и общего тестостерона» (Гончаров Н.П., Кацья Г.В., Калинин С.Ю., Тодуа Т.Н., Малышева Н.М., Козлова О.Г., Мамаева Г.Г.)// Андрология и генитальная хирургия, 2003, № 2, стр. 53-56.
2. «Возрастной андрогенный дефицит и его диагностика» (Гончаров Н.П., Кацья Г.В., Малышева Н.М.)// 1-я Конференция Российской ассоциации психонейроэндокринологии, Санкт-Петербург, сентябрь 2008.



3. «Андрогенный дефицит и проблемы его диагностики современными неизотопными методами определения тестостерона» (Гончаров Н.П., Кацья Г.В., Добрачева А.Д., Малышева Н.М.)// Проблемы эндокринологии, 2008, т. 54, № 5, стр. 30-39.
4. «Диагностические возможности определения биологически активного свободного тестостерона в крови с использованием современной технологии ультрафильтрации» (Малышева Н.М., Кацья Г.В., Гончаров Н.П.)// Проблемы эндокринологии, 2009, т.55, №3, стр. 34-37.
5. «Free Testosterone in Serum and Saliva for Assessment of Androgen Status» (Goncharov N, Katsya G, Malysheva N, Herbst V, Westermann J.)// 9-ый Международный Конгресс Андрологии (Барселона, Испания, март 2009)
6. «Assessment of Androgen Status in Men and Women used Free Testosterone as Marker: Compare ELISA and Ultrasensitive Immunoluminescence Methods» (Goncharov N, Katsya G, Malysheva N) // 8-ой Европейский Конгресс по Менопаузе (Лондон, май 2009)

### Список сокращений

Кд – константа диссоциации  
ИМТ – индекс массы тела  
СССГ – сексстероидсвязывающий глобулин  
Т – тестостерон  
об. – общий  
расч. – расчетный  
св. – свободный  
РИА – радиоиммунологический анализ  
УФ – ультрафильтрация  
ELISA – ферментный иммуноанализ  
LIA – люминесцентный иммуноанализ  
n – размер выборки  
p – доверительная вероятность (достоверность)  
r – коэффициент корреляции