

Выводы

1. Применение инсулина гларгин (лантус) в качестве базального инсулина позволяет значительно улучшить гликемический контроль у пациентов с СД 1-го и 2-го типов не только при кратковременном курсе лечения (3 мес), но и при длительном применении (1 год).

2. Улучшение показателей углеводного обмена не сопровождается увеличением дозы базального инсулина у пациентов с СД 1-го типа. У пациентов с СД 2-го типа наблюдается увеличение дозы лантуса по сравнению с дозой НПХ, причем наиболее значительное улучшение показателей гликемии наблюдается при применении поддерживающей дозы через 1 год лечения.

3. Анализ удовлетворенности лечением показал положительный результат и желание продолжить терапию лантусом почти у всех пациентов с СД 1-го и 2-го типов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fritsche et al. // Ann. Intern. Med. — 2003. — Vol. 138. — P. 952—959.
2. Lepore M., Pampelli S., Bolli G. // Diabetes. — 2000. — Vol. 49. — P. 2142—2148.
3. Owens D. R. et al. // Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23. — P. 813—819.
4. Raskin P., Klaff L. et al. // Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23. — P. 1666—1671.
5. Riddle M. C. et al. // Diabetes Care. — 2003. — Vol. 26. — P. 3080—3086.
6. Wright A. et al. // Diabetes Care. — 2002. — Vol. 25. — P. 330—336.
7. Yki-Jarvinen H. et al. // Diabetes Care. — 2000. — Vol. 23. — P. 1130—1136.
8. Yki-Jarvinen H. // Diabetes Care. — 2001. — Vol. 24. — P. 758—767.
9. Yki-Jarvinen H. // Diabetes Care. — 2001. — Vol. 24, N 4. — P. 758—767.
10. Yki-Jarvinen H. // Diabetes Metab. Res. Rev. — 2002. — Vol. 18. — Suppl. 3. — P. S77—S81.
11. Yki-Jarvinen H. // Eur. J. Clin. Invest. — 2004. — Vol. 34, N 6. — P. 410—416.

Поступила 25.04.05

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 616.154:577.175.624]-074

Н. П. Гончаров, Г. В. Кация, Г. С. Колесникова, А. Н. Нижник, А. Д. Добрачева, Т. Н. Тодуа

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

ГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Определяли концентрацию общего тестостерона в сыворотке 100 пациентов-мужчин (19—65 лет), которые обращались в клинику и поликлинику ЭНЦ РАМН с жалобами на различные нарушения функции эндокринных желез. Для определения уровня тестостерона использовали широко известные в настоящее время методы: мультианализаторы Vitros ECI, Architect и Access, ручные иммуноферментные методики Delfia и DRG и радиоиммунную методику, разработанную в рамках программы ВОЗ "Репродукция человека" и калиброванную с референсным методом (газовая хроматография/масс-спектрометрия).

Наиболее близкие результаты получены при определении уровня тестостерона РИА-методом и с помощью мультианализатора Vitros ECI (медиана 13 и 13,1 нмоль/л). Остальные методы имеют низкое совпадение с РИА-методом, регистрируется позитивное отклонение, наиболее заметное при использовании наборов Delfia (до 60%, а при низких концентрациях до 100%). Наблюдается тенденция к снижению позитивного отклонения в группе лиц с более высокой концентрацией тестостерона (выше 10 нмоль/л) у всех использованных методов.

Ключевые слова: тестостерон, методы определения, автоматизированные анализаторы Vitros ECI, Architect и Access, ручные иммуноферментные методики Delfia и DRG и радиоиммунный метод.

The serum concentration of total testosterone were measured in 100 male patients aged 19-65 years who had visited the clinic and polyclinic of the Endocrinology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences for complaints about different dysfunctions of the endocrine glands. Testosterone was measured by the well-known currently available technologies: automatic Vitros ECI, Architect, and Access multianalyzers, manual Delfia and DRS enzyme immunoassay kits, and radioimmunoassay (RIA) that had been developed within the framework of the WHO Human Reproduction Programme and adjusted by the reference assay (gas chromatography/mass spectroscopy).

The closest results were obtained when determining the level of testosterone by RIA and by means of the Vitros ECI multianalyzer (13.1 vs 13.0 nmol/l, medians). All other technologies demonstrated a low correlation with RIS and had positive biases, especially with the use of the Delfia kits (as high as 60 and, at low concentrations, 100%). The positive bias tends to decrease in patients with higher testosterone levels (> 10 nmol/l) for all studied methods.

Key words: testosterone; assays, automatic Vitros ECI, Architect, and Access multianalyzers; manual Delfia and DRS enzyme immunoassay kits; radioimmunoassay.

Определение уровня тестостерона в сыворотке крови играет важную роль в клинической оценке многих эндокринных заболеваний у мужчин: гипогонадизма различной этиологии, преждевременного полового развития или отставания физического развития у мальчиков, мониторинга адекватности гормональной заместительной терапии андрогенами. Чрезвычайно важно проводить мониторинг со-

держания тестостерона в крови у пациентов с раком предстательной железы, получающих лечение пролонгированными аналогами люлиберина. Одновременное определение уровня тестостерона, ЛГ и ФСГ способствует получению информации о природе гормональной дисфункции яичек. В частности, определение содержания тестостерона необходимо для подтверждения возрастного его де-

фицита (синдром PADAM) как объективного маркера для назначения терапии препаратами тестостерона.

У женщин определение уровня тестостерона необходимо для оценки функции гонад при гирсутизме, алопеции, акне, при подозрении на андроген-секретирующие опухоли яичников и надпочечников, мониторинге лечения гирсутизма для выбора оптимальной дозы препарата, подавляющего избыточную продукцию андрогенов. Он является важным маркером при динамическом наблюдении за пациентами с врожденной дисфункцией коры надпочечников, получающими терапию глюкокортикоидами. Во всех этих случаях требуется высокочувствительный, специфичный и воспроизводимый метод определения уровня общего тестостерона в биологических средах.

Для лучшего понимания технологии современного иммуноанализа, в частности методов определения уровня тестостерона в биологических средах, необходимо вспомнить, как шло развитие этих методов.

До 1960 г. основным методом был биологический, затем появились количественные физико-химические методы с использованием газовой хроматографии и метода двойной изотопной метки, однако они требовали для определения значительное количество плазмы (до 20 мл) и обязательный этап экстракции тестостерона из плазмы большими объемами органических растворителей, что ограничивало возможность их применения в диагностических гормональных лабораториях [10]. Кроме того, они были малопроизводительны. В конце 60-х годов прошлого века появились методы определения уровня тестостерона с использованием секс-стероидсвязывающего глобулина, а затем и радиоиммунологические (РИА) методы на основе специфической антисыворотки [5, 14]. Высокая чувствительность РИА-метода позволяла определять содержание тестостерона в 50–100 мкл плазмы, но с обязательной экстракцией.

Дальнейшее развитие РИА-методов, создание иммунометрического варианта, использование в качестве метки ^{125}I вместо трития способствовало повышению чувствительности РИА-метода, который был основным в определении уровня тестостерона на протяжении почти 30 лет.

Параллельно вели разработку альтернативной неизотопной технологии, в частности иммуноферментных методов (ИФА), с использованием в качестве метки пероксидазы хрена, щелочной фосфатазы и создание соответствующих инструментов (ридеров) для регистрации сигнала. ИФА-технология как прямой не экстракционный метод получила широкую популярность. Однако она не обеспечила необходимую чувствительность при определении очень низких концентраций гормона у детей и женщин [3].

Около 25 лет назад были созданы сверхчувствительные методы иммуноанализа 3-го поколения с использованием в качестве метки европия и специального флюориметра (регистрация отсроченной во времени флюоресценции). Данная технология была разработана группой финских ученых

(система "Дельфия") и быстро завоевала широкую популярность [7].

Приблизительно в это же время английскими учеными был разработан метод усиленной люминесценции с применением пероксидазы хрена и люминола, изолюминола или акридина и регистрацией усиленного люминесцентного сигнала на люминометре [1].

Оба метода обеспечивают очень высокую чувствительность, что позволяет определять низкие концентрации тестостерона ($1 \cdot 10^{-13}\text{M}$), равно как и других гормонов. Одновременно шло создание полностью автоматизированных анализаторов, которые к настоящему времени стали доминировать в эндокринологических и клинических биохимических лабораториях во всех странах [8].

В отличие от РИА-методов автоматизированные системы являются абсолютно закрытыми, и сотрудники лабораторий не могут корректировать их работу. Более того, многие операции данной технологии являются секретом фирмы-производителя. Основные преимущества автоматизированных систем — высокая производительность и оперативность в выдаче результатов и экономическая выгода. К наборам прилагается инструкция с ожидаемым диапазоном колебаний концентрации тестостерона, предлагаемым фирмой — производителем набора. Как правило, фирмы не учитывают физиологические нормальные значения, полученные референсным методом (газовая хроматография и масс-спектрометрия), и не проводят сравнения с этим методом, а дают тот диапазон, который получен при определении уровня тестостерона у здоровых лиц их методом. Обычно компании при выпуске своей технологии ограничиваются тестированием, используя пул сывороток с высоким, средним и низким содержанием гормона. При таком подходе нижняя граница содержания тестостерона у здоровых мужчин может быть снижена у некоторых компаний до 4,5 нмоль/л вместо уровня 11–12 нмоль/л, принятого повсеместно во всех странах в качестве нижней границы физиологической нормы. Такая практика часто дезориентирует сотрудников лабораторий и врачей в интерпретации полученных результатов.

В ИФА-методах, как и в автоматизированных системах иммуноанализа 3-го поколения, проводится прямое безэкстракционное определение уровня общего тестостерона, что создает труднопреодолимую проблему, несмотря на использование моноклональных антител: как получить величину точного, истинного содержания тестостерона в сыворотке. При проведении прямого метода иммуноанализа очень сложно избежать влияния матрикса — вмешательство в реакцию лиганд-антисыворотка связывающих транспортных белков, различных стероидов и их метаболитов, обладающих близкой структурой молекулы, липидов и т. д. На результаты определения уровня общего тестостерона влияет и состояние больного. Например, его содержание может быть существенно снижено благодаря уменьшению концентрации секс-стероидсвязывающего глобулина в крови и как следствие ускорению его обмена (ожирение, гипотиреоз, нефропатический синдром, прием андрогенов,

глюкокортикоидов, прогестинов) и, наоборот, повышение уровня тестостерона может быть обусловлено повышением концентрации секс-стероидсвязывающего глобулина (возраст, гипертиреоз, дефицит андрогенов, прием эстрогенов и противозачаточных средств, цирроз печени).

Зависимость содержания тестостерона в сыворотке от изменения концентрации секс-стероидсвязывающего глобулина требует для оценки достаточной андрогенной функции клеток Лейдига определения уровня как свободного, так и биологически доступного тестостерона. Определение содержания свободного тестостерона — наиболее трудная задача. Наибольшую популярность получил математический метод расчета, предложенный A. Vermuelen [13]. Доля свободного тестостерона в крови не превышает 2% от общего тестостерона, связанного с альбумином (60%) и секс-стероидсвязывающим глобулином (38%).

Широкое распространение автоматизированных систем и их повседневное использование в лабораториях гормонального анализа для определения уровня тестостерона привело к возникновению ряда проблем, основная из которых — систематическое завышение результатов, что зачастую приводит к диагностическим ошибкам.

Очень мало системных работ по оценке воспроизводимости, точности и специфичности этих методов. Важность проведения работ в этой области отмечена в редакционной статье [9]. За последние 2

года были опубликованы фундаментальные работы [12, 15], посвященные данной проблеме, результаты которых будут изложены в разделе "Обсуждение".

В лаборатории биохимической эндокринологии и гормонального анализа ЭНЦ РАМН на протяжении 15 лет использовали РИА-метод определения уровня общего тестостерона с предварительной его экстракцией и применением высокоспецифичных моноклональных антител. За основу метода была взята технология ВОЗ [11], разработанная в рамках Программы ВОЗ по репродукции человека. Этот метод был калиброван с референсным методом (газовая хроматография/масс-спектрометрия); нормальный уровень общего тестостерона при его определении данным методом составлял 12–35 нмоль/л у здоровых мужчин репродуктивного возраста. Система внутреннего и внешнего контроля качества ВОЗ, в которой участвовала лаборатория гормонального анализа ЭНЦ РАМН совместно со 165 лабораториями разных стран, позволяла проводить систематический мониторинг получаемых результатов определения уровня тестостерона, которые отличались от согласованной средней на ± 5 –7% и только в отдельных случаях при низкой концентрации тестостерона позитивное отклонение достигало 19%. Поэтому в представленной работе названный РИА-метод был выбран нами в качестве референсного.

Таблица 1

Основные аналитические характеристики неизотопных и изотопного методов определения уровня тестостерона

Характеристика	Vitros ECI ("Orto-Clinical Diagnostics")	Architect ("Abbott Laboratories")	Access ("Beckman Ebmer")	Delfia ("Perkin Elmer")	DRG ("International Inc.")	RIA WHO matched reagent program
Принцип метода	Конкурентный	Конкурентный	Конкурентный	Конкурентный	Конкурентный	Конкурентный
Природа антител	Моноклональные антитела, биотинированные	Моноклональные антитела	Моноклональные антитела	Поликлональные IgG-антитела	Моноклональные антитела	Моноклональные антитела
Твердая фаза	Лунки, покрытые стрептовидином	Парамагнитные частицы	Парамагнитные частицы	IgG, противокроличьи	Моноклональные антитела	—
Меченый тестостерон	Пероксидаза хрена	Эфир акридина	Щелочная фосфатаза	Eu ²⁺	Пероксидаза хрена	³ H
Способ регистрации сигнала	Непрямая химилуминесценция	Прямая химилуминесценция	Люминесценция	Флюоресценция	Абсорбция	β -Излучение
Объем образца, мкл	25	150	20	25	25	50
Полное время инкубации, мин	32	29	20	125	75	50
Длительность стабильности калибровки, дни	28	28	14	—	—	—
Диапазон определения, нмоль/л	0,3–73,6	0–52	0,3–48	0–65	0–55,5	0–33
Чувствительность метода	0,03	0,28	0,3	0,3	0,24	0,3
Коэффициент вариации, % (Within-assay, высокие/низкие концентрации)	2,5/3,1	1,9/4,5	3,9/2,1	6/5,5	5,8/3,8	8,8/6,5
Коэффициент вариации, % (Between-assay, высокие/низкие концентрации)	4,9/7	3,7/8	7,1/4,9	12,9/6,8	3,7/3	11,2/9,6
Ожидаемые значения у здоровых мужчин, нмоль/л	4,6–28,2	9,7–38,1	5,3–23,4	9,4–33,5	8,3–41,6	11–33

Таблица 2

Значение уровня тестостерона, полученные РИА и неизотопными методами ($n = 100$)

Метод	Геометрическое среднее	Медиана	Разброс	Стандартное отклонение	Критерий Уилкоксона	
Access	13,9	14,2	3,1—50,1	6,8	Access/РИА	0
Delfia	19,3	19,2	3,6—94,6	13	Delfia/РИА	0
Architect	16,8	17,8	3,8—114,4	12,7	Architect/РИА	0
DRG	15,6	16,3	3,5—40,8	6,5	DRG/РИА	0
Vitros ECI	12,7	13,1	1,8—44,2	7,7	Vitros ECI/РИА	0,019009
РИА	12,1	13	2,1—34,6	6	РИА	—

Целью настоящей работы явилось сопоставление результатов определения различными современными неизотопными методами концентрации общего тестостерона в сыворотке крови у мужчин разного возраста по сравнению с вышеуказанным стандартным РИА-методом.

Материалы и методы

Образцы крови были собраны от 100 мужчин, которые обращались в клинику и поликлинику ЭНЦ РАМН для подтверждения или исключения диагноза различных форм гипогонадизма, возрастного андрогенного дефицита, сексуальной дисфункции и других нарушений гормональной функции яичек. Возраст пациентов колебался от 16 до 65 лет. Кровь брали из кубитальной вены локтевого сгиба утром (9—10 ч). После центрифугирования полученные сыворотки разливали на аликвоты по 0,5 мл в 6 пробирок и хранили при -20°C до анализа. Ни один из образцов не был подвергнут разморозке и повторному замораживанию.

В представленной работе мы определяли концентрацию общего тестостерона 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 ($^3\text{H-T}$), после экстракции, стандартизованный ВОЗ.

Основные характеристики используемых наборов представлены в табл. 1.

Статистический анализ. Результаты определения уровня тестостерона, полученные с помощью РИА, мы сравнили с показателями, полученными вышеперечисленными неизотопными методами, чтобы определить, насколько согласуются между собой эти показатели, используя пакет программ Statistica (Statsoft. Inc, 1999). Поскольку полученные концентрации тестостерона не подчинялись законам нормального распределения, мы вычисляли геометрическое среднее и медиану для значений, полученных каждым методом. Сравнение этих рядов с результатами, полученными РИА, проводили с помощью критерия Уилкоксона. Корреляцию между показателями РИА (независимая переменная) и остальными методами (зависимая переменная) оценивали с помощью модели линейной регрессии. Метод отношений (результаты тес-

тируемого метода/результаты РИА) использовали для выяснения распределения значений, полученных тестируемым методом, по сравнению с показателями РИА.

Результаты

Суммарные показатели концентрации тестостерона у 100 мужчин представлены в табл. 2. 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).

При вычислении разницы между показателями РИА и неизотопного метода (табл. 3) 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%). Если определять этот показатель по 2 подгруппам — ниже нормы (10 нмоль/л) и близко к норме (выше 10 нмоль/л), то оказалось (рис. 1), 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. Исключением является Access: при определении этим методом концентрация тестостерона в нормальном диапазоне близка к таковой при определении РИА.

Таблица 3

Отклонения в концентрации тестостерона между показателями, полученными РИА и неизотопными методами ($n = 100$)

Метод	Медиана, нмоль/л	Разброс, нмоль/л	Стандартное отклонение	Медиана, %	Разброс, %
Access/РИА	1,2	-7,0/41,3	4,9	12	-26/469
Delfia/РИА	7,3	-10,4/85,8	11,8	65	-61/951
Architect/РИА	4,9	-7,3/105,6	11,3	39	-45/1200
DRG/РИА	2,7	-9,8/19	4,1	21	-33/284
Vitros ECI/РИА	0,4	-5,2/16,8	4,2	0,03	-49/163

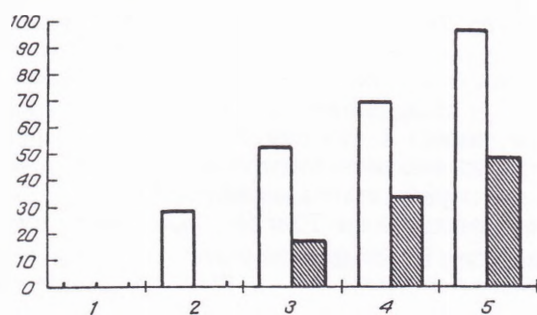


Рис. 1. Различия (в %) между концентрациями тестостерона (медиана), полученными РИА и неизотопными методами, у мужчин с содержанием тестостерона (по РИА) < 10 и > 10 нмоль/л.

По оси абсцисс — используемый метод: 1 — Vitros; 2 — Access; 3 — DRG; 4 — Architect; 5 — Delfia. Светлые столбики — < 10 нмоль/л, заштрихованные — > 10 нмоль/л.

Регрессионный анализ результатов показал, что концентрация тестостерона, определенная методом РИА, коррелирует с показателями, полученными неизотопными методами (табл. 4). Наиболее сильная корреляция наблюдается между РИА и Vitros ECI, наименьшая — между Delfia/РИА и Architect/РИА.

В подгруппе с содержанием тестостерона менее 10 нмоль/л наблюдалась слабая корреляция между показателями, определенными РИА и неизотопными методами (см. табл. 4). В подгруппе с нормальным и высоким содержанием тестостерона корреляция между РИА и неизотопными методами возрастает (см. табл. 4).

Таким образом, все неизотопные методы, за исключением Vitros ECI, приводят к завышению определяемого уровня тестостерона по сравнению со стандартизированным РИА-методом. Наиболее выраженная систематическая ошибка наблюдается при определении низких концентраций тестосте-

Таблица 4

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

Метод	Формула регрессии	Коэффициент корреляции	<i>p</i>
<i>Вся группа (n = 100)</i>			
Access	Access = 4,6152 + 0,79905 · РИА	0,708	0
Delfia	Delfia = 9,8008 + 0,91753 · РИА	0,423	0
Architect	Architect = 6,5755 + 0,95731 · РИА	0,454	0
DRG	DRG = 5,6617 + 0,84531 · РИА	0,780	0
Vitros ECI	Vitros ECI = 0,41963 + 1,0713 · РИА	0,838	0
<i>Тестостерон < 10 нмоль/л (n = 32)</i>			
Access	Access = -2,087 + 1,8084 · РИА	0,459	0,0080
Delfia	Delfia = -8,760 + 3,7201 · РИА	0,392	0,0264
Architect	Architect = -5,200 + 2,7689 · РИА	0,300	0,0950
DRG	DRG = -0,5855 + 1,7393 · РИА	0,629	0,0001
Vitros ECI	Vitros ECI = -1,817 + 1,4389 · РИА	0,607	0,0002
<i>Тестостерон > 10 нмоль/л (n = 68)</i>			
Access	Access = 3,5612 + 0,84311 · РИА	0,829	0
Delfia	Delfia = 6,7199 + 1,0479 · РИА	0,631	0
Architect	Architect = 3,8619 + 1,0794 · РИА	0,695	0
DRG	DRG = 5,7376 + 0,83149 · РИА	0,743	0
Vitros ECI	Vitros ECI = -0,6268 + 1,1220 · РИА	0,794	0

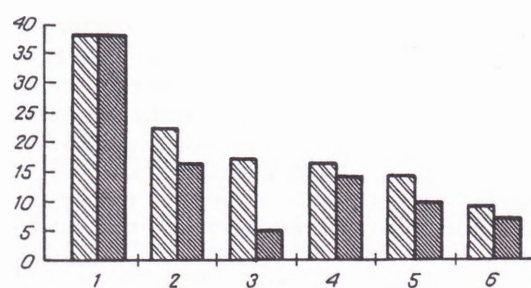


Рис. 2. Частота (в %) андрогенного дефицита среди 100 обследованных мужчин при сравнении с уровнями тестостерона, определенными РИА (1-я группа), и при использовании нормативов, указанных в инструкциях (2-я группа)

После адаптации метода и отработки нормальных значений для группы здоровых мужчин частота выявления дефицита тестостерона повысилась до 26%. По оси абсцисс — используемый метод: 1 — РИА; 2 — Vitros; 3 — Access; 4 — Architect; 5 — DRG; 6 — Delfia. Светлая штриховка — 1-я группа, темная — 2-я группа.

рона, т. е. у тех пациентов, у которых при клиническом обследовании заподозрено наличие 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 у этих 38 пациентов уровень тестостерона определяли неизотопными методами, то частота выявления андрогенного дефицита при использовании метода Vitros ECI составляла 59% (22 из 38 пациентов), Access — 46% (17 из 38 пациентов), Architect — 43% (16 из 38 пациентов), DRG — 38% (14 из 38 пациентов), Delfia — 24% (9 из 38 пациентов).

При использовании значений нормы, рекомендуемых в инструкциях разработчиков неизотопных методов, частота выявления андрогенного дефицита среди всех обследованных мужчин снижается в еще большей степени (рис. 2).

Если разделить всех пациентов на 4 подгруппы (рис. 3) по величине концентрации тестостерона, полученной с помощью РИА (1-я подгруппа — 0–6,5 нмоль/л, 2-я — 6,6–13,5 нмоль/л, 3-я — 13,6–18,5 нмоль/л, 4-я — выше 18,6 нмоль/л), то выяв-

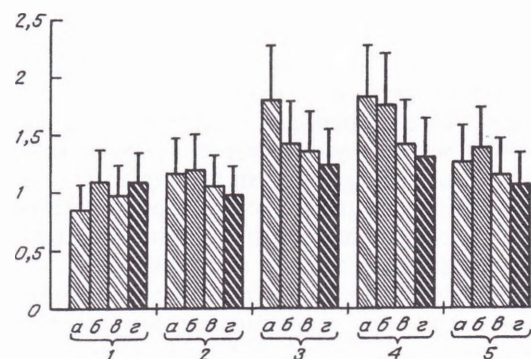


Рис. 3. Отношения концентраций тестостерона, полученных неизотопными методами и РИА.

По оси ординат — отношение; по оси абсцисс: 1 — Vitros/РИА; 2 — Access/РИА; 3 — Architect/РИА; 4 — Delfia/РИА; 5 — DRG/РИА. а — 0–6,5; б — 6,6–13,5; в — 13,6–18,5; г — 18,6–38.

ляется следующая закономерность. Отношение показателей Vitros/РИА практически одинаково во всех 4 подгруппах, т. е. различия между этими двумя методами не зависят от величины определяемого показателя. Вместе с тем отношение показателей Access/РИА, Architect/РИА, Delfia/РИА и DRG/РИА тем выше, чем ниже измеряемая концентрация. При высоких концентрациях тестостерона в крови отношения Access/РИА и DRG/РИА стремятся к 1. Однако отношения Architect/РИА и Delfia/РИА, хотя и имеют тенденцию к снижению, остаются довольно высокими.

Обсуждение

Как известно, современные прямые (без экстракции) неизотопные и изотопные, основанные на применении меченного ^{125}I -тестостерона, методы иммуноанализа, которые в настоящее время широко используются для определения содержания тестостерона в крови, демонстрируют широкую вариабельность полученных показателей между различными методами [2].

РИА-методы, основанные на применении меченного тритием тестостерона, включают в себя обязательную экстракцию стероида, которая включает связывающие глобулины, подобные по структуре белки, огромную группу различных стероидов и некоторые липиды. С помощью этих методов получены результаты, сравнимые с таковыми, полученными с помощью газожидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Последние методы, как правило, используются в референсных лабораториях как основные методы [4]. РИА-методы обеспечивали устойчивый диапазон определяемых концентраций тестостерона у здоровых мужчин (11–35 нмоль/л).

Неизотопные методы 3-го поколения на основе усиленной хемилюминесценции и флуоресценции, отсроченной по времени, адаптированы для использования в автоматических анализаторах различных диагностических компаний, которые в настоящее время очень широко используются в рутинной клинической практике. Однако до сих пор нельзя ответить на вопрос относительно степени сопоставимости результатов определения уровня тестостерона, полученных при их использовании. Приемлемая сопоставимость результатов была получена при определении содержания тестостерона в крови мужчин, но не женщин и детей. Такая зависимость от пола и возраста пациента определяется низкой концентрацией тестостерона в плазме женщин и детей. Аналогичную зависимость обнаружили и мы при сравнении тестируемых методов. Чем выше концентрация тестостерона в крови, тем больше степень совпадения абсолютных показателей, полученных разными методами.

Приведенные нами результаты однозначно демонстрируют, что практически все исследуемые неизотопные методы имеют низкое совпадение с РИА-методом, выбранным в качестве референсного. Наибольшие различия наблюдаются при сравнении с наборами Delfia, использующими поликлональные антитела. В этом случае регистрируется позитивное отклонение более 60%, а при низких

концентрация тестостерона — до 100%. Регрессионный анализ показал, что корреляция значений, полученных наборами Delfia и РИА, слабая с тенденцией к дальнейшему ее снижению при низких концентрациях тестостерона. Наборы Architect и DRG также имели положительное отклонение, т. е. завышение результатов на 40 и 20%, а при низких концентрациях — на 70 и 50% соответственно.

Наиболее близкие результаты получены с помощью наборов Vitros ECI и РИА. Различие между этими методами составляло менее 0,1% в общей группе пациентов с индивидуальным разбросом от –49 до 169%. Результаты определения уровня тестостерона имели хорошую корреляцию, хотя и более слабую в группе с низкой концентрацией тестостерона. При сравнении с показателями РИА андрогенный дефицит регистрируется у 59% пациентов, однако, если руководствоваться пределами нормальных значений, рекомендованных Vitros ECI Manual, доля пациентов с андрогенным дефицитом снижается до 16%.

Такая тенденция обнаружена и при использовании наборов Access: если руководствоваться пределами нормальных значений, рекомендованных производителями Access (нижняя граница нормы 5,3 нмоль/л), то доля выявленных пациентов с андрогенным дефицитом снижается с 46 до 5%.

Наши данные подчеркивают важность выбора здоровых субъектов для собственной контрольной группы, чтобы определить диапазон колебаний нормальной концентрации тестостерона, определяемой используемым методом.

Существует несколько возможных причин объяснения несовпадения между результатами, полученными прямыми методами (неизотопными) и методом с экстракцией (РИА).

На 1-м месте находится так называемый эффект матрикса. Ряд соединений, присутствующих в сыворотке крови, могут вмешиваться в реакцию антисыворотка — определяемый лиганд. К ним относятся весь спектр липидов и различных белков, включая специфический секс-стероидсвязывающий глобулин, а также значительные количества полярных и менее полярных стероидов, присутствующих в сыворотке. В условиях классического РИА-метода многие из этих соединений элиминируются на преаналитическом этапе. Процедура экстракции в РИА-методе сводит эффект матрикса к минимуму [16].

Важным источником несовпадений являются также приготовление калибровочной кривой и степень чистоты используемого кристаллического стандарта тестостерона для ее калибровки.

Другая важная причина разницы полученных результатов связана со специфичностью используемых антисывороток, имеющих разную степень аффинности к тестостерону и другим сопутствующим стероидам. Ряд компаний используют поликлональные антитела, тогда как другие — моноклональные. Большое значение имеет также и возможность метода определять минимальную концентрацию гормона, и его функциональная чувствительность (точность определения), что особенно важно при измерении низких (менее 1,7 нмоль/л) и очень

низких (порядка 0,17 нмоль/л) концентраций тестостерона в крови.

Оба эти фактора могут существенно влиять на показатели определяемой концентрации тестостерона, в основном завышая ее значение [6]. Как правило, при низкой или очень низкой концентрации тестостерона регистрируются эффект наибольшего завышения результатов и как следствие систематическая ошибка в работе метода. Это характерно для всех исследуемых нами систем, за исключением Vitros ECI, где результаты были сопоставимы с РИА-методом для концентраций выше 10 нмоль/л.

Наши данные очень близки к тем, которые получены в последние 2 года в ряде работ зарубежных авторов. Практически идентичные результаты получены группой зарубежных авторов, которые провели сравнительную оценку 8 различных методов [12]. По их данным, одна группа методов, включая Immulite 2000, ASC-180, Autodelphia, Architect 2000, RIA-Immunotech, Coat-A-count-DPC, давала результаты, которые значительно (в среднем на 70%) превышали результаты, полученные референсным методом (газовая хроматография/масс-спектрометрия), при этом наибольшее расхождение наблюдалось при использовании Immulite 2000 и Autodelphia. Вторая группа методов, куда входили Vitros ECI и Elecsis 2010, обеспечивала определение концентрации тестостерона в мужской сыворотке в пределах физиологических референсных интервалов. В то же время, по мнению авторов, которое мы разделяем, ни одна из всех вышеперечисленных автоматизированных систем не может обеспечить точное, надежное и воспроизводимое определение уровня тестостерона при его низких величинах (менее 1,7 нмоль/л), что характерно в основном для детей и женщин. Во многих случаях эти системы не могут быть использованы для объективной биохимической оценки их андрогенного статуса.

В работе L. Boots [2] также были выявлены недопустимо высокая разница и вариабельность в результатах определения уровня тестостерона в сыворотке при использовании безэкстракционных методов различных коммерческих компаний.

Практически аналогичные с нашими результаты получены в фундаментальной работе С. Wang и соавт. [15]. Авторы данной работы сравнивали РИА-метод определения уровня тестостерона и автоматизированные системы Elecsy Roche, Bayer Centaur, Vitros ECI, DPC, Immulite 2000 с референсным методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрией. Все методы иммуноанализа не обеспечивали необходимую точность в определении уровня тестостерона в сыворотке и давали завышение ре-

зультатов (за исключением Vitros ECI), особенно при низких его величинах. Авторы не рекомендуют их использовать для определения содержания тестостерона у женщин и детей до пубертата.

Выводы

1. Ни один из исследованных нами прямых не-изотопных методов без усовершенствования и модификации не может обеспечить точное определение концентрации тестостерона в крови ниже 10 нмоль/л. Это необходимо иметь в виду при определении андрогенного статуса у детей и женщин.

2. Автоматизированная система Vitros ECI наиболее близка к РИА и может использоваться для определения уровня тестостерона в мужской сыворотке или плазме, его колебания в пределах $\pm 20\%$ от референсных значений являются допустимыми и приемлемыми для клиники.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albrecht S., Zimmermann T., Brandl H. et al. // J. Lab. Med. — 1997. — Vol. 21. — P. 191–204.
2. Boots L. R., Potter S., Potter D. et al. // Fertil. and Steril. — 1998. — Vol. 69. — P. 286–292.
3. Clark B. R., Engvall E. // Enzyme-Immunoassay. — Boca Raton; Florida, 1983.
4. Dorgan J. F., Fears T. R., McMahon R. P. et al. // Steroids. — 2002. — Vol. 67. — P. 151–158.
5. Dufan M., Catt K., Tsurahara T. et al. // Clin. Chim. Acta. — 1972. — Vol. 37. — P. 109–116.
6. Fugua J. S., Sher E. S., Migeon C. J. et al. // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41. — P. 1146–1149.
7. Hemmula I., Dakubu S., Mikkala V. M. et al. // Analyt. Biochemistry. — 1984. — Vol. 137. — P. 335–343.
8. Jockenhovel F., Haase S., Hoerman R. Et al. // J. Clin. Ligand Assay. — 1996. — Vol. 19. — P. 138–144.
9. Matsumoto A. M., Bremner W. J. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89, N 2. — P. 520–524.
10. Siekman L. // J. Steroid. Biochem. — 1979. — Vol. 11. — P. 117–123.
11. Sufi S. B., Donaldson A., Jeffcote S. L. // WHO Matched Reagent Programme Method Manual. — London, 1992.
12. Taieb J., Mathian F., Patricot M. C. et al. // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49. — P. 1381–1395.
13. Vermuelen A., Verdonck L., Kaufman J. M. A // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1999. — Vol. 84. — P. 3666–3672.
14. Wang C., Yonatt G., O'Connor S. et al. // J. Steroid Biochem. — 1974. — Vol. 5. — P. 551–555.
15. Wang C., Catlin D. H., Laurence M. D. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2004. — Vol. 89. — P. 534–543.
16. Wheeler M. J., D'Sonza A., Matadeen J. et al. // Clin. Chem. — 1996. — Vol. 42. — P. 1445–1449.

Поступила 28.03.05