© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.154:577.175.624]-073.537.9

Н. М. Малышева, Г. В. Кацяя, Н. П. Гончаров

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СВОБОДНОГО ТЕСТОСТЕРОНА В КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОВРЕМЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

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

Современные методы иммуноанализа общего тестостерона в крови в большинстве случаев не обеспечивают достаточной диагностической точности. В данной работе мы определяли концентрацию свободного тестостерона в пробах крови и слюны 189 мужчин (19—83 лет), которые обращались в клинику для подтверждения или исключения диагноза различных нарушений функции эндокринных желез. Для определения уровня свободного тестостерона в сыворотке предварительно проводили ультрафильтрацию на фильтрах Amicon® Ultra-4 (MILLI-PORE) с мембраной 30K. Для измерения концентрации в ультрафильтрате и слюне использовали ультрачувствительный метод усиленной люминесценции (IBL-Гамбург, Германия). Процент выявления андрогенного дефицита по уровню свободного тестостерона в ультрафильтрате был выше, чем по уровню общего тестостерона и расчетного свободного тестостерона крови. Показатели свободного тестостерона в слюне и в сыворотке с предварительной ультрафильтрацией, измеренные ультрачувствительным методом усиленной люминесценции, могут служить дополнительным к клинической симптоматике чувствительным маркером для выявления различных форм нарушений андрогенного статуса.

Ключевые слова: свободный тестостерон в крови и слюне, ультрафильтрация.

N. M. Malysheva, G. V. Katsiya, N. P. Goncharov

DIAGNOSTIC CAPACITIES OF DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE FREE TESTOSTERONE IN BLOOD, BY USING CURRENT ULTRAFILTRATION TECHNIQUES

Endocrinology Research Center, Russian Agency for Medical Sciences, Moscow

In most cases, current methods for immunoassay of blood total testosterone fail to provide a sufficient diagnostic accuracy. The authors measured the concentration of free testosterone in the blood and saliva samples from 189 males aged 19 to 83 years who had come to the clinic to confirm or exclude the diagnosis of various endocrine dysfunctions. Ultrafiltration had been previously carried on Amicon® Ultra membrane 30K filters (MILLIPORE) to determine the serum level of free testosterone. The ultrasensitive enhanced luminescence technique (IBL-Hamburg, Germany) was used to measure its concentration in the ultrafiltrate and saliva. The detection rate of androgen deficiency from the levels of free testosterone in the ultrafiltrate was higher than that from those of total testosterone and calculated free testosterone in blood. The preultrafiltration salivary and serum free testosterone values measured by the ultrasensitive enhanced luminescence technique may complement a sensitive marker of clinical symptoms to detect different forms of androgenic disorders.

Key words: blood and salivary free testosterone, ultrafiltration.

В настоящее время трудности диагностики андрогенного дефицита связаны, в частности, с отсутствием адекватного маркера, а также чувствительного и специфичного метода его определения. В начале 2007 г. опубликовано официальное заявление Международной ассоциации эндокринологов о недопустимости использования прямых неэкстракционных методов определения общего тестостерона в диапазоне его низких концентраций (< 11 нмоль/л), поскольку это ведет к ошибкам в диагностике с последующим назначением неправильного лечения [10].

Согласно современным представлениям о свободных формах циркулирующих в крови гормонов, уровень свободного тестостерона (св.Т) отражает андрогенный статус более адекватно, чем содержание в крови общего тестостерона (об.Т) [4]. Поэтому разработка надежных аналитических методов

определения св.Т обеспечила бы наиболее надежную диагностику андрогенного статуса пациента.

Коммерческие диагностические наборы для прямого измерения свободных стероидов, в особенности тестостерона, в крови, пока не применимы для диагностического исследования и могут использоваться лишь в научных целях [3, 11]. Группой Vermeulen предложена формула для расчета концентрации св.Т на основе определения в крови об.Т и глобулина, связывающего половые гормоны (СССГ) [13], что требует четкого представления об истинных концентрациях об.Т и СССР. Однако современные автоматизированные методы измерения об.Т дают неоднозначные результаты; нижний предел референсного интервала в различных лабораториях варьирует от 4,5 до 15,6 нмоль/л, т. е. разброс достигает 350% [2, 5, 9, 12]. Необходимость определения СССР значительно удорожает стоимость такого подхода.

Традиционно отделение св.Т от тестостерона, связанного с белками сыворотки, проводится методом равновесного диализа, позднее появился метод ультрафильтрации (УФ). Технология УФ, предложенная рядом авторов, позволяет точно выделять свободные формы тестостерона и других стероидов [7, 8]. При этом необходим сверхчувствительный и высокоспецифичный метод определе-

Информация для контактов:

Гончаров Николай Петрович, доктор мед. наук, профессор, действительный член Европейской академии андрологии, руководитель лаборатории новых методов гормонального анализа ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий
Адрес: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, 11
Телефоны: 8-495-324-95-29, 8-499-124-45-01
Goncharov N.@aEndocrin centr.ru

ния низкой концентрации св.Т в фильтрате. Группа авторов, выполнив большое сравнительное исследование, рекомендовала использовать в качестве метода, разделяющего общий и свободный Т, технологию УФ вместо диализа с последующим количественным измерением концентрации св.Т методом масс-спектрометрии [14].

Поскольку точное определение уровня св.Т в крови сопряжено с технологическими трудностями, параллельно ведутся исследования по его определению в другой биологической жидкости — слюне, куда поступают только свободные формы стероидов, включая тестостерон (гормон, связанный с СССГ и альбумином, задерживается на мембране слюнных желез [15]).

Метод определения тестостерона в слюне прост, инвазивен и имеет большие преимущества перед традиционными методами определения концентрации стероидов в венозной крови, взятие проб которой требует квалифицированного персонала и само по себе является добавочным стрессорным фактором, способным исказить гормональные параметры.

В процессе развития методов гормонального анализа неоднократно предпринимались попытки использования слюны в качестве биологической среды для диагностики гормональных нарушений. Однако радиоиммунологический анализ, а в последующем и иммуноферментные методы, не обладали достаточной чувствительностью, необходимой для определения низких концентраций свободных стероидов в слюне. Поэтому для анализа были необходимы большие объемы слюны (до 3 мл) и последующая экстракция огнеопасным и взрывоопасным диэтиловым эфиром. Такую технологию невозможно адаптировать для рутинного использования в клинических гормональных лабораториях.

Появление современной технологии иммуноанализа, основанной на усиленной хемилюминесценции (LIA), сочетающей ультрачувствительность и высокую специфичность, сделало возможным определение низких концентраций в малых объемах [1].

Целью настоящей работы являлось изучение возможности LIA в оценке андрогенного статуса по содержанию св.Т в слюне и в сыворотке при использовании в качестве разделяющего метода технологии УФ.

Материалы и методы

Пробы крови и слюны были собраны от 189 мужчин, обратившихся в клинику Эндокринологического научного центра 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.

Кровь брали из локтевой вены натощак в 9—10 ч утра. После ее центрифугирования сыворотку аликвотировали по 0,5 мл в 3 пробирки и хранили до анализа при -20°C . Для определения концентрации св.Т в слюне три ее порции отбирали в течение 1 ч с интервалом в 20 мин; перед тестирова-

нием равные количества всех взятых проб слюны смешивали, усредняя концентрацию св.Т, реально отражающую уровень гормона. Пробы, контаминированные кровью (концентрация тестостерона в которой в 10—15 раз выше, чем в слюне), исключали из анализа. Слюну хранили при -20°C . Перед тестированием пробы размораживали и центрифугировали. Св. Т измеряли в 50 мкл слюны в дубликатах.

Уровень об.Т и СССГ в пробах крови определяли методом усиленной хемилюминесценции с помощью автоматических анализаторов Vitros Eci (Ortho-Clinical Diagnostics, J&J, Великобритания) и Elecsys 2010 (Hoffmann—La Roche) соответственно. Концентрацию св.Т в сыворотке определяли после отделения св.Т методом УФ. Пробы сыворотки (0,5 мл) помещали в вертикальный центрифужный фильтр Amicon® Ultra-4 (MILLIPORE) с мембраной 30K — 30,000 NMWL. Затем добавляли 0,7 мл буфера (pH 7,4) следующего состава (в граммах на 1 л бидистиллированной воды): HEPES — 12,57; NaCl — 5,265; K_2HPO_4 — 0,224; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,275; мочевины — 0,3; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,275; NaOH — 0,9.

Смесь сыворотки с буфером инкубировали 30 мин на водяной бане при 37°C , затем центрифугировали 15 мин при 37°C и 5250 g; центрифугу предварительно прогревали в течение 30 мин при 37°C в работающем режиме (5250 g). Уровень св.Т в ультрафильтрате определяли методом усиленной люминесценции LIA (IBL-Гамбург, Германия), основанном на принципе конкурентного связывания. Люминесцентный сигнал регистрировали на мультианализаторе Victor ("Wallac", Финляндия).

Концентрацию св.Т в слюне определяли также LIA-методом для сравнения ее с аналогичным показателем в ультрафильтрате сыворотки. Метод адаптирован нами для прицельной диагностики андрогенного дефицита у мужчин и женщин. Подробная процедура анализа описана ранее [6].

Концентрацию св.Т в крови вычисляли по формуле с учетом содержания в крови об.Т и СССГ [13] (сайт в Интернете <http://www.issam.ch/freetest-to.htm>).

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica for Windows, StatSoft, Inc. (1999). Результаты представлены в виде медианы и 2,5/97,5-перцентилей. Соответствие распределения показателей нормальной оценивали по критерию Колмогорова—Смирнова. При $p < 0,05$ распределение признака считалось отличающимся от нормального. Для оценки связи между различными показателями был использован ранговый тест Спирмена. Различия при $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение

Суммарные показатели у обследованных мужчин представлены в табл. 1.

Наблюдаются значительные различия средних значений показателей, определенных различными методами. По нашим данным, уровень св.Т (в % от общего) составил (медиана и 2,5/97,5-перцентилей)

Таблица 1

Гормональная характеристика пациентов ($n = 189$), включенных в исследование

Показатель	$M \pm \sigma$	Медиана	Разброс 2,5/97,5 процентиля
об.Т, нмоль/л	$15,6 \pm 7,0$	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	$40,3 \pm 15,9$	36,8	18,6—76,7

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 УФ.

С помощью УФ и последующего количественного измерения концентрации св.Т референсным методом масс-спектрометрии его содержание в сыворотке мужчин другие авторы находили равным 1,8% от об.Т, а при использовании диализа — 2,2% [7].

Связь между анализируемыми параметрами оценивали по ранговому тесту Спирмена (табл. 2).

Статистически значимая корреляция регистрировалась между всеми определяемыми маркерами андрогенного гомеостаза: об.Т, св.Т в крови (УФ), св.Т в крови (расчетный метод) и св.Т в слюне. Наиболее сильная связь наблюдалась между об.Т и расчетным св.Т. Наличие такой связи заключено в самом принципе расчетного метода, в котором концентрация об.Т (наряду с содержанием СССРГ) является детерминантой св.Т. Показатели св.Т в крови после УФ сохраняли значимую положительную связь с показателями расчетного св.Т. Более слабая зависимость характерна для показателей св.Т в слюне.

Необходимо подчеркнуть, что коэффициент корреляции не отражает существования причинно-следственных связей. Для выявления андрогенного дефицита необходимо знать абсолютные концентрации тестостерона.

Для количественной оценки абсолютных показателей все пациенты были условно разделены на 2 группы, исходя из нижней границы интервала референсных значений об.Т в крови (> 11 и < 11 нмоль/л соответственно).

Можно видеть, что в зависимости от содержания об.Т в выделенных подгруппах статистически значимо снижаются все исследуемые показатели св.Т.

Таблица 2

Корреляция анализируемых показателей

Показатель	r	p
об.Т/св.Т крови (УФ)	0,494	$< 0,001$
об.Т/св.Т слюны	0,472	$< 0,001$
об.Т/расч. св.Т	0,864	$< 0,001$
св.Т крови (УФ)/св.Т слюны	0,414	$< 0,001$
св.Т крови (УФ)/расч. св.Т	0,600	$< 0,001$
св.Т слюны/расч. св.Т	0,489	$< 0,001$

Примечание. расч. — расчетный.

Таблица 3

Показатели св. Т у мужчин (медиана и 2,5/97,5 процентиля)

Группа	об.Т	св.Т, пмоль/л		
		слюна	кровь (расчетный)	сыворотка (после УФ)
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

Примечание. $p < 0,001$ между показателями у пациентов двух групп.

При расчете среднего показателя СССРГ медиана для подгруппы с нормальным и высоким содержанием об.Т составила 38,7 нмоль/л, для подгруппы с низким содержанием об.Т — 28,2 нмоль/л ($p = 0,001$). Однако корреляции между показателями св.Т и СССРГ не наблюдалось ни в одном случае. Это связано со сложностью белковых взаимодействий гормонов и разнообразием факторов, модулирующих содержание СССРГ в сыворотке.

В обеих группах сохранялась корреляция, характерная для всей группы в целом.

Интересно, что в подгруппе пациентов с нормальным содержанием об.Т регистрировалось значимое снижение показателя св.Т с возрастом пациентов ($r = -0,22$, $p < 0,02$), тогда как в отношении об.Т эта зависимость не прослеживалась. В подгруппе с содержанием об.Т менее 11 нмоль/л корреляция отсутствовала между всеми показателями.

При анализе процентного соотношения св.Т и об.Т в подгруппах (табл. 4) выявлено статистически значимое повышение св.Т в слюне и расчетного св.Т у пациентов с содержанием об.Т ниже референсного предела.

Относительно низкий процент св.Т в ультрафильтрате может быть связан с более точным выделением именно свободной фракции гормона, тогда как расчетные показатели в сыворотке и особенно в слюне могут включать некоторое количество св.Т из легко диссоциирующей его связи с альбумином.

Если при анализе результатов в качестве пограничного критерия норма/андрогенный дефицит использовать нижний предел референсных значений, то, по данным расчетного метода, сниженная концентрация св.Т определялась в 15% случаев (референсный интервал 225—545 пмоль/л); по результатам определения в слюне — в 18% случаев (референсный интервал 260—555 пмоль/л), при опреде-

Таблица 4

Процент св.Т от об.Т в группах (медиана и 2,5/97,5 процентиля)

св.Т, %	об.Т > 11 , нмоль/л	об.Т < 11 , нмоль/л	p
Слюна	2,5 1,0—4,4	3,6 2,2—17,0	$< 0,001$
Ультрафильтрат сыворотки	0,9 0,3—1,7	1,3 0,2—2,5	$= 0,070$
Расчетный показатель	1,9 1,1—2,7	2,0 1,4—2,8	$= 0,026$

лении об.Т и св.Т в сыворотке с предварительной УФ — в 20 и 38% случаев (референсные интервалы 11—34 и 110—368 пмоль/л соответственно). Согласно этим данным, уровень св.Т в сыворотке, определяемый с предварительной УФ, является более чувствительным и точным маркером различных форм андрогенных нарушений у мужчин. Однако для подтверждения результатов всегда необходим учет клинических показателей.

Технология УФ для разделения свободного и связанного с белком тестостерона была выбрана нами как наиболее быстрая, доступная и простая. При отработке методики мы придерживались опубликованных ранее рекомендаций по оптимальному проведению УФ. Группа авторов провела большое исследование по различным типам мембран, их адсорбционным свойствам, влиянию температуры, pH и разведения исходной сыворотки [14]. Относительно адсорбционных исследований лучшие результаты показали устройства, изготовленные из восстановленной целлюлозы с низко связывающей мембраной (адсорбция $2,0 \pm 1,5\%$). 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 пробы и ее вязкости. Эксперименты с разведением показали в 4 раза большую адсорбцию гормона в нативной сыворотке по сравнению с разведенной, а также установили, что небольшие разведения (1:1,4) снижают концентрацию об.Т и оказывают лишь незначительный эффект на концентрацию св.Т ($0,3 \pm 1,6\%$). Разница становится значимой при разведении 1:10 ($13,7 \pm 4,1\%$). Подобные эффекты согласуются с законом действия масс. На основании детального анализа вышеизложенных данных, процесс УФ 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 функцио-

нальная ($17,3$ пмоль/л) чувствительность LIA-метода позволяет количественно определять очень низкие ($2-3$ пг в пробе) концентрации тестостерона в ультрафильтрате и в слюне, что особенно важно для диагностики андрогенного дефицита у мужчин, а также оценки андрогенного статуса у женщин и детей.

Вывод

Уровень св.Т, определяемый в слюне и в сыворотке с предварительной УФ и использованием ультрачувствительного метода усиленной люминесценции, может служить надежным маркером различных форм нарушений андрогенного статуса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Albrecht S., Zimmermann T., Brandl H. et al. // J. Lab. Med. — 1997. — Vol. 21. — P. 191—204.
2. Carruthers M., Trinick T. R., Wheeler M. J. // Aging Male. — 2007. — Vol. 10, N 3. — P. 165—172.
3. DPC Technical Services Department. — Immulite/Immulite, 1000 Total Testosterone — Manufactures Instruction. PILK-TW-7. — Los Angeles, 2005.
4. Ekins R. // Clin. Chem. — 1992. — Vol. 37, N 7. — P. 1289—1293.
5. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A. et al. // Aging Male. — 2005. — Vol. 8, N 3/4. — P. 194—202.
6. Goncharov N. et al. // Aging Male. — 2006. — Vol. 9, N 2. — P. 111—122.
7. Hammond G. L., Nikser J. A., Jones L. A., Sitteri R. K. // J. Bol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 5023—5026.
8. Kley H. K., Bartmann E. et al. // Acta Endocrinol. (Kbh.). — 1977. — Vol. 85. — P. 212—219.
9. Lazarou S., Reyes-Vallejo L., Morgentaler A. // J. Sex. Med. — 2006. — Vol. 3. — P. 1085—1089.
10. Rosner W., Auchus R., Azziz R. et al. // J. Clin. Endocrinol. — 2007. — Vol. 92, N 2. — P. 405—413.
11. Stockl D., Franzini C., Kratochvila J. et al. // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. — 1996. — Vol. 34. — P. 319—337.
12. Taieb J., Mathian B., Millot F. et al. // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49. — P. 1371—1385.
13. Vermeulen A., Verdonc K. L., Kaufman J. M. et al. // J. Clin. Endocrinol. — 1999. — Vol. 84. — P. 3666—3672.
14. Van Uytanghe K., Stockl D., Kaufman J. M. et al. // Clin. Chem. — 2004. — Vol. 50. — P. 2101—2110.
15. Vining R. F., McGinley R. A. // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. — 1986. — Vol. 23, N 2. — P. 95—146.

Поступила 19.12.08

© А. Я. КРАВЧЕНКО, В. М. ПРОВОТОРОВ, 2009

УДК 616.127-005.4+616.12-008.331.1]-07:616.154::577.175.624]-055.1

А. Я. Кравченко, В. М. Провоторов

УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА У МУЖЧИН С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Кафедра факультетской терапии (зав. — проф. В. М. Провоторов) Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко

Проведено исследование с целью установить распространенность возрастного андрогендефицита у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и гипертонической болезнью в возрасте до 60 лет и его связь с некоторыми факторами риска. В исследование включено 107 пациентов (средний возраст $50,2 \pm 7,2$ года). У 35 из них была гипертоническая болезнь, у 72 — ИБС, стенокардия напряжения. Оценивали концентрацию в крови тестостерона, холестерина; наличие и тип ожирения, определяли уровень депрессии. Установлено, что средний уровень тестостерона у больных ИБС и артериальной гипертензией ($9,2 \pm 0,96$ нмоль/л) соответствовал андрогендефицитному состоянию. Выявлена прямая корреляция концентрации тестостерона с окружностью талии и обратная — с уровнями атерогенных липопротеидов и депрессии.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, мужской пол, андрогендефицит, ожирение.