

ВОЗРАСТНОЙ АНДРОГЕННЫЙ ДЕФИЦИТ И ЕГО ДИАГНОСТИКА

Резюме

В статье рассматриваются вопросы связи между уровнем тестостерона и возрастной половой дисфункцией у мужчин. Обсуждаются методы современного обнаружения уровня тестостерона в крови, слюне и других биологических жидкостях. Особое внимание уделено методам иммуноферментного анализа с помощью автоматизированных систем, масс-спектрометрии, радиоиммунологическим методам исследования тестостерона.

Гончаров Н.П., Кация Г.В., Малышева Н.М. Возрастной андрогенный дефицит и его диагностика // Психофармакол. биол. наркол. 2008. Т. 8, № 1–2 (Ч. 1). С. 1-2306–1-2317.

Ключевые слова

тестостерон; половая дисфункция; методы исследования; андрогенный дефицит

ТЕСТОСТЕРОН — ОСНОВНОЙ ГОРМОН МУЖСКОГО ОРГАНИЗМА

Главная биологическая функция тестостерона (Т) — развитие, формирование и обеспечение мужского фенотипа и сперматогенеза. У женщин Т обеспечивает рост, метаболизм костной ткани, ее ремоделирование и поддержание анаболических процессов, особенно, в мышечной ткани.

Высокочувствительный и специфический метод определения Т необходим для диагностики многих клинических состояний. Как известно, концентрация Т в крови у женщин низкая и не превышает 7 % от его содержания в крови взрослых мужчин. Аналогичная ситуация характерна и для детей, что значительно затрудняет его количественное определение.

Вместе с тем оценка андрогенного статуса у женщин необходима при широком спектре клинических симптомов и патологических состояний, например таких, как гирсутизм, акне, алопеция, андрогенсекретирующие опухоли яичников и надпочечников. Его определение также очень важно для выбора минимальной дозы, необходимой для подавления продукции андрогенов у женщин с гиперандрогенией.

У детей точное количественное определение Т необходимо для уточнения диагноза половой принадлежности новорожденного с необычными, измененными гениталиями, а также для динамического наблюдения за детьми с задержкой пубертата и с преждевременным половым развитием.

Динамический мониторинг уровня Т требуется у пациентов с выявленным ВДКН как следствие дефицита 21-гидроксилазы и некоторых других ферментных систем стероидогенеза.

Мониторинг за уровнем Т необходим также при проведении антиандрогенной терапии определенных форм дисгормонального рака и в частности при лечении рака предстательной железы пролонгированными препаратами люлиберина (фармакологическая кастрация, широко используется в настоящее время).

Точное количественное определение Т необходимо для диагностики широко распространенного возрастного андрогенного дефицита, прежние название PADAM. Сниженный уровень общего тестостерона (об. Т) у мужчин в возрасте 40–60 лет регистрируется в 7 % случаев, а в возрасте 60–80 лет — в 21 % случаев.

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА

Сезонные колебания уровня Т

По данным Svartberg et al. [32] сезонные колебания концентрации общего Т достигают 19 %, а свободного — 31 %. Наиболее низкие концентрации регистрируются летом, пиковые осенью. Они также зависят от региона проживания. Приведенную разницу в уровнях, естественно, необходимо учитывать при выполнении продолжительных исследований.

Суточные колебания

Как известно, 50–60 % (об. Т) с высокой аффинностью связано с секс-стероидсвязывающим глобулином (СССГ), а 40–50 % связано с альбумином (легко диссоциирующая связь). Только 1–2 % Т циркулирует в свободной форме (св.Т) и вместе со связанным с альбумином Т, они обозначаются как биодоступный Т (био.Т). Суточные колебания био.Т достигают 57 %, св.Т — 68 %, тогда как колебания об.Т составляют 45 %. Данный процесс обусловлен увеличением синтеза Т в ночное время с одновременным снижением связывающих белков, как следствие особенностей гемодинамики организма в горизонтальном положении. С возрастом выраженный суточный ритм сглаживается, что также необходимо учитывать при выработке протокола клинических исследований.

Диета

Содержание Т во многом определяется временем приема пищи и ее составом. В большинстве проводимых исследований и опубликованных работах этот фактор не учитывается. Поэтому взятие крови натощак или после «легкого» завтрака может существенно влиять на результаты определения Т. Еще в 1973 году была опубликована работа, в которой зарегистрировано падение уровня Т в крови у здоровых мужчин после перорального приема глюкозы. Позднее при проведении глюкозотолерантного теста наблюдалось падение концентрации об.Т на 15 % через 30 мин, которое сохранялось на протяжении последующих 3 часов. Причем зарегистрированное падение было связано не со снижением сигнала со стороны ЛГ, а обусловлено выбросом в кровь глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), который уменьшает импульсную продукцию Т. Наиболее важный эффект диеты — изменение содержания секс-стероидсвязывающего глобулина (СССГ), уровень которого снижается при большом потреблении белка,

жирной пищи, и, наоборот, его концентрация повышается при вегетарианской пище и потреблении диеты богатой клетчаткой. Высокое содержание свободных жирных кислот нарушает процесс связывания половых стероидов с СССРГ, что сказывается на уровне св.Т.

1-2307

Алкоголь

В небольшой дозе алкоголь повышает уровень Т в крови на 20 % и у мужчин, и у женщин. Хроническое злоупотребление алкоголем приводит к необратимым деструктивным изменениям клеток Лейдига и клеток Сертоли семенников, к развитию ожирения, повышению уровня эстрогенов, в результате формируется необратимый дефицит андрогенов в комбинации с эректильной дисфункцией.

Физическая активность

Чрезмерные физические нагрузки, например у молодых спортсменов, приводят к падению уровня как об.Т, так и св.Т.

Психосоматическое состояние организма

Стресс как физический, так и психоэмоциональный приводит к подавлению продукции Т, через центральные механизмы — гипоталамус-аденогипофиз-гонадотропины. Кроме этого повышенный выброс кортизола ингибирует стероидогенез в клетках Лейдига.

Сексуальная активность

Уровень как об.Т, так и св.Т повышается в процессе интимных отношений у обоих партнеров, мастурбация также сопровождается увеличением концентрации циркулирующего Т.

Курение

У курильщиков уровень об.Т и св.Т возрастает на 5–15 %.

Преаналитический этап, связанный с получением проб крови и ее обработки

Сравнительно недавно экспериментально была четко обоснована схема получения сыворотки для последующего определения Т: отделение сыворотки

от форменных элементов должно проходить в течение 6 часов при комнатной температуре или пробы крови могут храниться при $+4^{\circ}\text{C}$ до 48 часов, а затем пробы центрифугируются. Пробы сыворотки можно хранить при -20°C в течение 3-х месяцев, а при -70°C больше 6 месяцев. Более продолжительное хранение проб сыворотки не гарантирует правильное определение концентрации Т, так как за это время может измениться сама технология определения гормона. Недопустимо также повторное замораживание и размораживание проб сыворотки, которая приводит к деструкции СССГ, что приводит к неправильному определению свободного и биологически доступного Т. Использование сыворотки или плазмы в случае экстракционного РИА метода определения Т не имеет значения. Однако в случае неизотопных прямых методов, включая автоматические анализаторы, необходимо использовать сыворотку, так как при измерении Т в плазме определяется заниженная концентрация гормона. Использование EDTA или цитрата для получения плазмы недопустимо для всех прямых методов. Забор крови в стеклянные или пластиковые пробирки для получения сыворотки не влияет на результаты определения Т. Однако при использовании гелевого разделяющего компонента, что имеет место в вакуумтейнерах для взятия крови, происходит завышение результатов для об.Т до 28 %, занижение уровня ФСГ на 43 %, завышение общего T_3 на 58 %, T_4 на 34 %. При одних и тех же вакуумтейнерах разные анализаторы могут генерировать различные результаты при определении того или иного гормона. Более подробно влияние различных экзогенных и эндогенных факторов на уровень общего тестостерона изложено в цитируемой работе.

ПРОБЛЕМЫ ИММУНОАНАЛИЗА ТЕСТОСТЕРОНА АВТОМАТИЗИРОВАННЫМИ СИСТЕМАМИ

Начиная с конца 1960-х гг., основным методом определения общего тестостерона в сыворотке являлся РИА-метод с предварительной экстракцией его этиловым эфиром. Этот метод принципиально изменил возможности диагностики различных форм андрогенного дефицита. Однако использование радиоактивной метки в методах РИА создавало целый ряд проблем для гормональных лабораторий.

Наиболее популярной альтернативой РИА-методам стало развитие иммуноферментного анализа (ИФА), где в качестве меченого компонента ис-

пользуется пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и др. Несколько позднее были созданы флуоресцентных методы (меченый компонент европий), метод усиленной люминесценции (меченый компонент люминол или акридин).

В настоящее время широко используются автоматизированные высокопроизводительные системы определения самых различных гормонов, включая тестостерон. Многие коммерческие диагностические компании используют технологии люминисцентного анализа с регистрацией усиленного люминисцентного сигнала. Все выше названные неизотопные методы являются «прямыми», то есть определению общего тестостерона проводится непосредственно в сыворотке без предварительной экстракции его органическими растворителями, что увеличивает возможность одновременного определения и других стероидов, близких по химической структуре к молекуле тестостерона.

Проведенный в последнее время целенаправленный анализ результатов определения тестостерона в сыворотке крови с помощью автоматизированных систем в сравнении с референсным методом масс-спектрометрии, показал наличие систематической ошибки анализаторов как в сторону завышения (в большинстве случаев), так и в сторону занижения содержания определяемого тестостерона. В частности, обстоятельную работу опубликовали французские авторы, в которой проведена сравнительная характеристика 10 анализаторов с референсным методом масс-спектрометрии. Вывод

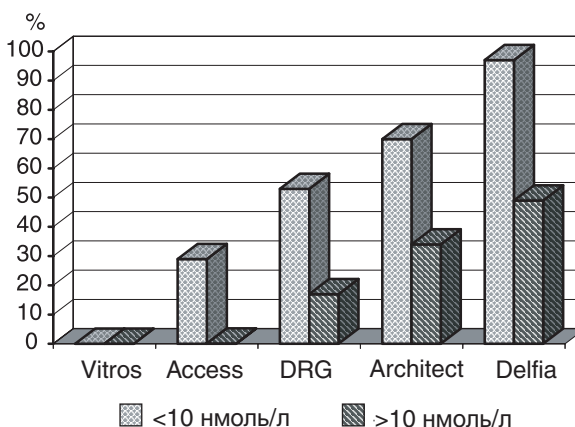


Рис. 1

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

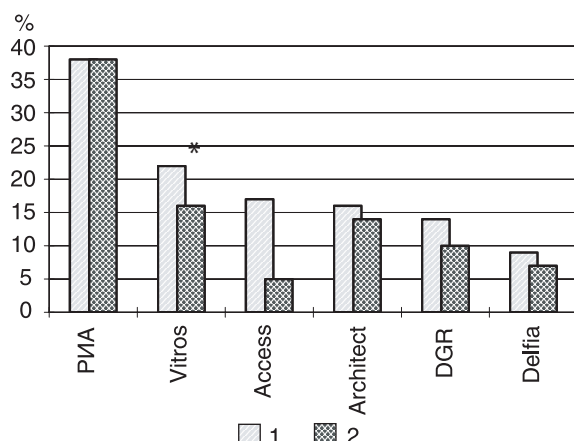


Рис. 2

Частота выявления андрогенного дефицита у 100 обследованных мужчин при сравнении с показателями тестостерона, определенными РИА (1 группа) и при использовании нормативов, указанных в инструкциях (2 группа);

* — после адаптации метода и отработки нормальных значений для группы здоровых мужчин частота выявления дефицита тестостерона повысилась до 26 %

авторов — использование вышеуказанной технологии прямых методов неприемлемо для определения низких концентраций Т у женщин и детей. Аналогичные результаты также опубликованы авторитетной группой авторов США и группой австралийских ученых. Все авторы приходят к выводу о неприемлемости технологии прямых методов, включая ELISA, для определения низких концентраций Т как у мужчин, так и особенно у женщин и детей. Аналогичные результаты были получены нами при сравнении четырех автоматизированных систем со стандартизированным РИА-методом. Неприемлемое завышение результатов у мужчин было получено при определении концентрации общего тестостерона ниже 10 нмоль/л (рис. 1). В результате принципиально снижается процент (до 20 %) выявления дефицита андрогенов, которое возможно требует заместительной коррекции препаратами тестостерона (рис. 2).

В 2004 году в журнале JCEM была опубликована редакционная статья с аналогичными заключениями. И, наконец, в начале 2007 года опубликовано официальное заявление международной ассоциации эндокринологов о недопустимости использования прямых неэкстракционных методов для определения общего Т у женщин и детей, поскольку это ведет к ошибкам в диагностике с последующим назначением неправильного лечения.

МЕТОДЫ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И ИХ ВОЗМОЖНОСТИ

1-2309

Любой из существующих методов иммуноанализа, требует при его конструкции технологических разработок для каждого индивидуального гормона, включая основные компоненты, моноклональные антитела с высокой специфичностью и чувствительностью метода. Особую сложность при создании тест-систем представляет класс стероидных гормонов и их активных метаболитов, близких по химической структуре, многие из которых циркулируют в крови в очень низких концентрациях. Каждая диагностическая компания конструирует свой вариант метода, что затрудняет стандартизацию. Это одна из причин расхождения в результатах определения гормонов.

Появление и развитие современной технологии масс-спектрометрии в тандеме с высокоразрешающим жидкостным хроматографом, обеспечивающей высокую производительность, практически 100% специфичность, необходимую чувствительность и воспроизводимость открывает новую эру в биохимии стероидов. В отличие от прежнего технологически трудоемкого комплекса, газовый хроматограф/масс-спектрометр (GCMS), современная тандем масс-спектрометрия (MS/MS) не требуют трудоемкой процедуры подготовки исследуемого биологического материала. При наличии подготовленного специалиста MS/MS может быть использован и уже используется в развитых странах для рутинной диагностики в эндокринологических лабораториях.

Сравнительно недавно группа авторов из США опубликовала блестящую работу, в которой продемонстрированы возможности технологии MS/MS с использованием масс-спектрометра API-3000 одновременно определять за 11 мин в 0,2 мл сыворотки 12 основных стероидных гормонов — ДГЭА-С, альдостерон, кортизол, кортикостерон, 11-дезоксикортизол, андростендион, эстрадиол, тестостерон, 17-гидроксипрогестерон, ДГЭА, прогестерон и 25-гидроксивитамин D. Четкое хроматографическое разделение близких по химической структуре стероидов с помощью HPLC было достигнуто всего за 11 мин. Продемонстрирована высокая надежность метода. Технология MS/MS более высокопроизводительна и экономична по сравнению с современными автоматическими анализаторами, которые требуют больших затрат на постоянное приобретение дополнительных расходных материалов (Китов). В методе MS/MS расходные материалы сведены к минимуму. По всем вышеуказанным параметрам MS/MS — технология

Таблица 1

Содержание СССГ, общего, свободного и биологически активного Т у детей (стадии по Таннеру)

1-2310

Стадии	n	СССГ, нмоль/л	Общий Т, нмоль/л	Свобод.Т, пмоль/л	Биоакт.Т, нмоль/л
Девочки					
TS 1	147	25–144	<0,588	<7,63	0,010–0,190
TS 2	66	13–106	0,138–1,35	1,39–15,61	0,042–0,519
TS 3	85	10–82	0,346–2,07	4,51–26,02	0,131–0,969
TS 4	77	12–147	0,277–2,18	3,82–53,78	0,097–1,35
TS 5	123	15–150	0,346–2,07	2,77–31,92	0,076–0,796
Мальчики					
TS 1	143	21–144	<0,657	<12,84	0,0104–0,450
TS 2	66	18–141	0,069–5,16	1,04–72,87	0,010–2,04
TS 3	65	11–87	0,242–26,37	3,47–339,95	0,066–10,24
TS 4	98	9–50	5,71–29,54	121–586,24	1,38–16,78
TS 5	42	9–59	6,71–27,09	142–829,06	4,29–20,62

Таблица 2

Содержание СССГ, общего, свободного и биологически активного Т в сыворотке у детей и взрослых разных возрастных групп

Возраст	n	СССГ нмоль/л	Общий Т нмоль/л	Свобод. Т пмоль/л	Биоакт. Т нмоль/л
Женщины					
7–9	103	31–143	<0,519	<6,25	0,0104
10–11	69	15–145	0,069–1,45	0,347–12,14	0,014–0,332
12–13	69	10–108	0,208–2,21	3,12–23,60	0,059–0,650
14–15	70	11–106	0,311–1,70	4,16–26,02	0,104–0,990
16–17	70	16–160	0,277–2,18	4,16–34,35	0,114–0,990
18–30	55	18–203	0,381–2,04	2,78–25,68	0,076–0,713
31–40	43	20–126	0,381–1,90	4,51–31,92	0,142–0,882
41–51	18	26–110	0,311–1,9	3,82–20,13	0,097–0,571
50–62 (менопауза)	16	18–97	0,208–0,865	2,08–13,19	0,052–0,325
Мужчины					
7–9	105	24–170	<0,311	<3,12	0,010–0,097
10–11	68	20–133	0,069–1,97	0,35–21,86	0,003–0,619
12–13	69	15–114	0,242–25,85	1,73–340	0,048–9,96
14–15	70	8–71	1,14–20,24	10,41–479	0,329–11,66
16–17	70	8–50	6,40–30,66	132–600	1,21–17,61
18–30	20	8–54	6,88–27,13	236–770	5,85–19,10
31–52	19	12–49	7,58–22,35	194–489	4,81–12,25

ближайшего будущего в гормональном анализе. Один подготовленный оператор может выполнять до 200 тестов в день. В настоящее время тандем MS/MS получает широкое распространение (преж-

де всего в США) для рутинной диагностики в эндокринологических лабораториях и в первую очередь для определения основного спектра стероидов C21, C19 и C18 ряда, а также их многочисленных мета-

болитов. Уже в настоящее время при выполнении скрининговых программ в развитых странах на выявление ВДКН у новорожденных с использованием в качестве маркера 17α -гидроксипрогестерона метод MS/MS (API-3000) незаменим. Он выступает в качестве «арбитра» при наличии ложноположительных результатов, неизбежных при определении в кровяном пятне 17α -гидроксипрогестерона методом флуоресцентного иммуноанализа (Дельфия). При скрининге на каждый истинный случай ВДКН приходится до 200 ложноположительных результатов, которые требуют внесения ясности с использованием MS/MS — ABI -3000.

В статье доктора Кушнир и соавт. [20] представлен опыт использования метода тандем масс-спектрометрии для определения низких концентраций тестостерона у женщин и детей. Метод по основным параметрам (чувствительность и специфичность) является высоконадежным и адекватным для оценки андрогенного баланса и практически исключает эффект матрикса, присущий всем прямым методам иммуноанализа автоматизированных систем. В приведенных двух таблицах авторы определяют физиологические колебания общего тестостерона в зависимости от возраста мужчин и женщин с использованием оптимальной выборки. Приведенные данные по содержанию свободной фракции Т рассчитаны с использованием математической модели.

Приведенные концентрации об.Т для мужчин молодого и среднего возраста, полученные методом NS/MS противоречат общепринятым критериям нижней границы нормы, которая составляет 11 нмоль/л. Возможно, это связано с малой выборкой для данных возрастных групп. Вместе с тем величина пограничной точки отсчета норма → дефицит тестостерона остается открытым и дискуссионным.

В большой обзорной статье изложены достоинства, преимущества, надежность реальные трудности и проблемы при использовании высокотехнологичного биоаналитического метода, каким является масс-спектрометрия в тандеме с высоко разрешающей жидкостной хроматографией.

СВОБОДНЫЙ ТЕСТОСТЕРОН

Как указывалось выше, тестостерон циркулирует в крови в комплексе со специфическим транспортным глобулином (СССГ) и неспецифическим белком альбумином, который имеет низкую аффинность, но большую емкость за счет его высокой кон-

центрации в крови. И только 1–2 % тестостерона циркулирует в крови в свободном виде. Константа ассоциации тестостерона, связанная с СССР, высокая (10^9 л/моль), тогда как с альбумином она намного ниже ($3,6 \times 10^4$ л/моль). Приведенные параметры детерминируют и скорость диссоциации тестостерона: с СССР — около 20 с, а с альбумином — около 1 с, что определяет его сродство к тканям-мишеням при прохождении через стенку капилляра. Свободный тестостерон и связанный с альбумином тестостерон обозначают как биологически активную форму гормона.

Вопрос о биологической роли комплекса тестостерона с СССР остается открытым, большинство исследователей его рассматривают как буферную систему, препятствующую быстрой деградации тестостерона в печени, а некоторые авторы допускают его биологическое негеномное действие через мембранные рецепторы клетки.

Соотношение между свободным и связанным с белками тестостероном в физиологических условиях поддерживается на постоянном уровне. Однако при целом ряде патофизиологических ситуаций их соотношение нарушается и прежде всего за счет изменения концентрации основного специфического транспортного белка СССР. Стандартное обследование больного с подозрением на дефицит андрогенов начинается с определения общего тестостерона, поэтому неизбежны ошибки в интерпретации полученных результатов, так как остается открытым вопрос о содержании свободного и биологически доступного тестостерона, которые определяют андрогенный статус пациента.

Биологическая значимость СССР до настоящего времени до конца не раскрыта. Например, он продуцируется в печени только приматов (низших и человекообразных обезьян и человека). Его уровень не подчиняется суточному ритму, тогда как для уровня тестостерона характерен такой ритм. Поскольку концентрация циркулирующего СССР влияет на содержание общего и свободного тестостерона и их соотношение, то необходимо помнить о наиболее значимых факторах, изменяющих содержание СССР. Эндогенные и экзогенные эстрогены повышают его концентрацию, а андрогены, наоборот, снижают. Гормоны щитовидной железы увеличивают его продукцию, а при их недостатке концентрация циркулирующего СССР снижается. Его содержание в крови детей выше, чем у взрослых. У мужчин старше 50 лет концентрация СССР нарастает, и тем самым снижается доля свободного биологически активного тестостерона, усугубляя этим формирование возрастного гипогонадизма.

Согласно теории о свободных формах циркулирующих в крови гормонов уровень св.Т отражает андрогенный статус более адекватно, чем содержание в крови об.Т. Именно поэтому идентификация адекватных аналитических методов св.Т, обеспечила бы наиболее оптимальную диагностику андрогенного статуса пациента. Комплекс св.Т/об.Т — термодинамическая система, в которой свободная фракция гормона зависит от концентрации как об.Т, так и содержания связывающих белков, а также уровня ассоциации и диссоциации комплекса, что в свою очередь определяется температурой и рН. Традиционно отделение св.Т от тестостерона связанного с белками проводится методом равновесно диализа или методом ультрафильтрации (УФ), который появился позднее. При этом необходим ультрачувствительный и высокоспецифический метод определения низкой концентрации св.Т в фильтрате.

Технология ультрафильтрации, которая была предложена рядом авторов действительно позволяет точно отделить свободную форму Т и других стероидов. Однако доступная в то время технология РИА не позволяла определять низкие концентрации св.Т с достаточной степенью точности.

В частности Hammond G. et al. [15] приводит результаты определения св.Т (в % от общего Т). используя комбинацию ультрафильтрации с диализом: у мужчин эстрадиол — 2,4 %, тестостерон — 1,97 %, 2,76 прогестерон; у женщин (ф.ф.) — 1,57 % эстрадиол, 0,9 % тестостерон, 2,85 % прогестерон (л.ф.) — 1,52 % эстрадиол, 0,85 % тестостерон, 2,54 прогестерон.

Позже коммерческие диагностические компании разработали прямой безэкстракционный метод определения св.Т в сыворотке, который используется в ряде эндокринологических лабораторий, несмотря на обоснованную и аргументированную критику о недопустимости его использования для оценки андрогенного статуса.

Долгое время метод равновесного диализа определения св.Т и других стероидов рассматривался как «золотой стандарт». Однако с 2003 года Европейский Комитет по Стандартизации диагностических систем и их компонентов принял решение о замене термина «золотой стандарт» другим определением «референсная измерительная процедура» (RMP). Для стероидных гормонов должен быть использован в качестве референсного метода метод тандем-масс-спектрометрии (TD-MS). Принцип данного метода гарантирует точность, специфичность и снижение эффекта матрикса при количественном измерении Т или любого другого стероида. А для разделения комплекса об.Т/св.Т предложено использовать технологию ультра-

фильтрации или равновесного диализа. Группа авторов, выполнив большое сравнительное исследование, рекомендовала использовать в качестве метода разделяющего св.Т/об.Т прямую более простую технологию ультрафильтрации вместо диализа с последующим количественным измерением концентрации свободного Т референсным методом масс-спектрометрии. При такой комбинации методов авторы определяли в сыворотке мужчин содержание св.Т как 1,8 % от общего Т, а при использования диализа — 2,2 %.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНОГО ТЕСТОСТЕРОНА В СЛЮНЕ

Неудовлетворительные и зачастую неприемлемые результаты определения об.Т автоматизированными системами послужили для нас основанием 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.

Однако прямое определение свободной формы тестостерона в крови сопряжено с определенными технологическими трудностями. Поэтому мы обратились к альтернативной биологической жидкости — слюне, куда поступают только свободные формы стероидов, включая тестостерон.

Слюна, как биологическая жидкость, привлекла внимание исследователей почти 50 лет назад, так как слюнные железы обладают особым свойством: в слюнный проток проникают соединения только с низким молекулярным весом (< 400 дальтон), к которым относится и тестостерон, не связанный с альбумином и специфическим глобулином. Концентрация жирорастворимых свободных стероидов, таких как тестостерон, не зависит от скорости выделения слюны и соответствует уровню несвязанной формы стероида в сыворотке крови. Если измерить адекватными методами концентрацию свободного тестостерона, который доступен тканям-мишеням и оказывает свое биологическое действие в этой форме, то его уровень в слюне мог бы стать идеальным маркером для определения андрогенного статуса как у мужчин, так и особенно у женщин и детей, у которых уровень Т во много раз ниже.

Сбор слюны прост, не инвазивен и имеет большие преимущества перед традиционными методами определения стероидов в венозной крови, взятие которой требует квалифицированного персонала, и сам по себе является добавочным стрессорным фактором, способным исказить показатели гормональных параметров.

Необходимо отметить, что в процессе развития методов гормонального анализа неоднократно принимались попытки использования слюны в качестве биологической среды для диагностики гормональных нарушений. Однако РИА-методы, а в последующем и традиционные иммуноферментные методы не обеспечивали достаточной чувствительности, необходимой для определения низких концентраций свободных стероидов в слюне. Поэтому для анализа были необходимы большие объемы слюны (до 3 мл), после сбора слюны следовала процедура экстракции диэтиловым эфиром, который является огнеопасным и взрывоопасным растворителем. В результате такую технологию было сложно адаптировать для рутинного использования в гормональных лабораториях для клинической диагностики.

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.

Как известно, группой Vermeulen [36–38] предложена формула для расчета концентрации свободного тестостерона на основе определения общего тестостерона и СССГ в крови. В этом случае корректное определение концентрации свободного тестостерона в крови основано на четком знании истинной концентрации общего тестостерона. Реально это не простая проблема, так как современные автоматизированные технологии для измерения общего тестостерона дают совершенно разные результаты. Кроме того, требуется также оптимальный метод для определения СССГ, что значительно увеличивает стоимость вычисления концентрации свободного тестостерона.

Лишь появление современной технологии иммуноанализа, основанной на усиленной хемилюминесценции, сочетающей ультрачувствительность и высокую специфичность, сделало возможным определение свободных, не связанных с белками, стероидных гормонов в очень малых объемах слюны прямым методом (без экстракции). Высокая аналитическая (6,2 пмоль/л) и функциональная (17,3 пмоль/л) чувствительность позволяет количественно определять очень низкие (2–3 пг/пробе) концентрации тестостерона в слюне, что особенно важно для диагностики андрогенного статуса у женщин и детей.

В наших исследованиях показано, что концентрация свободного тестостерона в слюне хорошо коррелирует и отражает концентрацию несвязанного тестостерона в крови и является допол-

нительным существенным диагностическим критерием для определения андрогенного статуса мужчин.

Были обследовано 35 здоровых мужчин в возрасте 21–57 лет и 30 мужчин с различными формами андрогенной недостаточности в возрасте 22–68 лет. Один пациент — транссексуал-женщина (F→M) — сбор слюны осуществлялся один раз в день утром до и после внутримышечного введения сустанона.

Процедура сбора слюны

Чтобы исследовать колебания концентрации тестостерона, 3 порции слюны были собраны в течение одного часа трижды в день. Порции слюны были собраны по следующей схеме:

Образец 1 — 8.30	Образец 5 — 16.00
Образец 2 — 9.00	Образец 6 — 16.30
Образец 3 — 9.30	Образец 7 — 22.00
Образец 4 — 15.30	Образец 8 — 22.30
Образец 9 — 23.00	

Наш опыт показал, что правильный сбор слюны — ключевой момент в достижении точных и воспроизводимых результатов измерения свободного тестостерона. Для этого мы разработали детальную процедуру сбора слюны.

Образцы слюны необходимо собирать в специальные контейнеры (SaliCaps®, IBL) с трубкой, изготовленные из материала, который не сорбирует стероиды. Слюна должна быть собрана не менее, чем через 30 мин после еды, питья, чистки зубов или жевания жвачки. Требовалось примерно 2 мин, чтобы собрать необходимое количество слюны (0,6–0,8 мл). Образцы с небольшим окрашиванием из-за контаминации кровью необходимо исключить. Все образцы были помечены специальным маркером (имя пациента, дата, время). Собранная слюна могла храниться до 5 дней при 20 °С, 10 дней при 2–8 °С и 6 мес. и более при –20 °С. Свободный тестостерон измерялся в 50 мкл слюны в дубликатах.

Ниже приведены некоторые приемы для быстрого и простого сбора слюны:

- при сборе слюны не рекомендуется делать перерыв и удалять трубочку изо рта и/или из пробирки;
- сбор слюны становится легче, если вы слегка сжимаете зубами верхний конец трубочки;
- рекомендуется собирать слюну перед зеркалом, чтобы контролировать процесс наполнения пробирки.

1-2313

Параллельно проводили определение содержания об.Т и СССГ в сыворотке крови.

1-2314

Определение свободного тестостерона (св.Т) проводилось люминисцентным LIA-методом (фирма IBL-Гамбург, Германия), основанном на принципе конкурентного связывания. Регистрацию люминисцентного сигнала проводили на мультианализаторе Victor (фирма Wallac, Финляндия).

Определение общего тестостерона (об.Т) в образцах крови определяли методом усиленной хемилюминисценции с помощью автоматического анализатора Vitros Eci (Ortho-Clinical Diagnostics, J & J, Великобритания) как наиболее адекватного метода [±].

Определение содержания глобулина, связывающего половые стероиды (СССГ), проводили методом отсроченной по времени флуоресценции с помощью автоматизированной системы Autodelphia (фирма Wallac, Финляндия).

Вычисление концентрации свободного тестостерона в крови определяли с помощью математической формулы, использующей показатели содержания в крови общего тестостерона и СССГ и описанной в работе A. Vermeulen [37] (калькулятор расчетного свободного Т в Интернете <http://www.issam.ch/freetesto.htm>).

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные были обработаны с помощью программы Statistica 6 Windows, StatSoft, Inc. Результаты представлены в виде медианы и 10/90-перцентилей. Для выявления достоверности различий между сравниваемыми параметрами был использован тест Манна—Уитни. Для оценки связи между различными показателями были использован ранговый тест Спирмена и линейный регрессионный анализ. Различия $P < 0,05$ считались статистически достоверными.

Концентрация общего тестостерона (об.Т), уровень СССГ, вычисленный свободный тестостерон (св.Т) в крови и средний возраст здоровых мужчин представлены в табл. 3.

Обнаружено, что сопоставимые по возрасту здоровые мужчины и мужчины с андрогенным дефицитом имели сравнимый уровень СССГ (медиана, соответственно, 36,1 и 33,0 нмоль/л). Однако уровень общего тестостерона был значительно выше в группе здоровых мужчин (18,8 и 6,7 нмоль/л). Концентрация вычисленного св.Т в крови у здоровых мужчин также была в 3 раза выше, чем у пациентов с андрогенным дефицитом (374 и 135 пмоль/л).

Таблица 3

Характеристика исследуемых групп (медиана и 10/90 перцентили)

Группы	n	Возраст, г	Общий тестостерон, нмоль/л	СССГ, нмоль/л	Вычисленный свободный тестостерон, пмоль/л
Здоровые мужчины	35	38 (25–52)	18,8 (12,4–26,1)	36,1 (21–54)	374 (225–544)
Мужчины с андрогенным дефицитом	30	35 (21–54)	6,7 (1,2–10,8)	33,0 (14,7–104,1)	135 (9,3–215)
P =		0,2242	0,0000	0,3958	0,0000

Таблица 4

Суточная динамика свободного тестостерона в слюне (пмоль/л) у здоровых мужчин и мужчин с андрогенным дефицитом (медиана и 10–90 перцентили)

Группы	Время сбора слюны, ч								
	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)
Андрогенный дефицит	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	0,000	0,0000	0,0000	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 ± 15 % и 71 ± 21 % от утренней концентрации (рис. 2, табл. 4).

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 ± 29 % от утреннего уровня (рис. 3, табл. 4).

Концентрация св.Т в слюне и расчетная концентрация св.Т 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. 4), тогда как у пациентов с андрогенным дефицитом концентрация св.Т часто отли-

1-2315

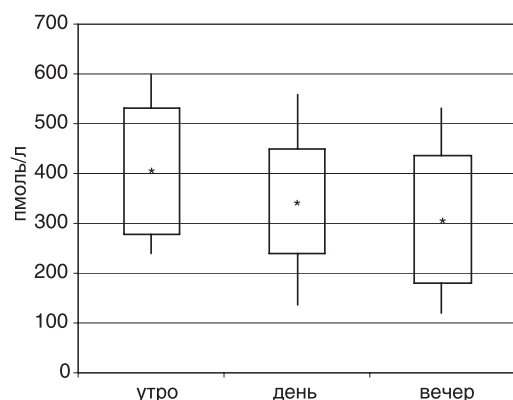


Рис. 3

Суточная динамика свободного тестостерона св.Т в слюне у здоровых мужчин (* — медиана, достоверность разницы – между утром и вечером ($p = 0,0012$), между днем и вечером ($p = 0,0006$))

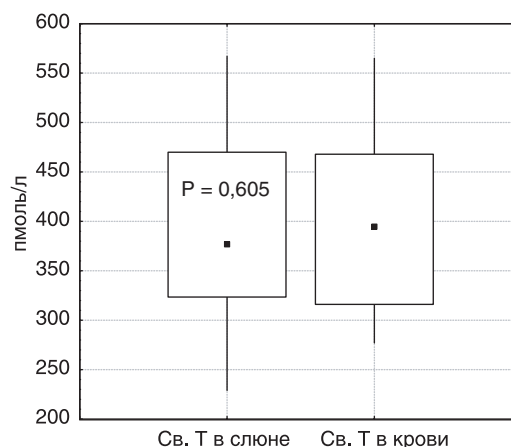


Рис. 5

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

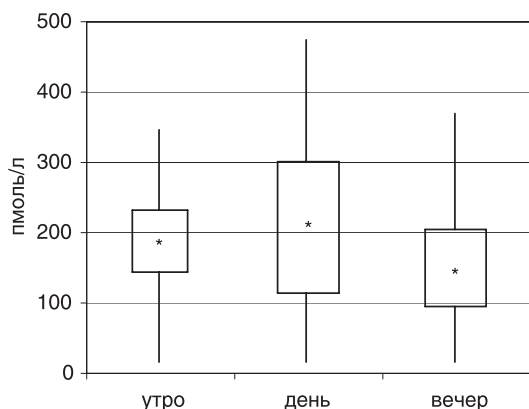


Рис. 4

Суточная динамика свободного тестостерона св.Т в слюне больных мужчин с андрогенным дефицитом (* — медиана, достоверность разницы между утром и вечером $p = 0,583$, между днем и вечером $p = 0,0006$)

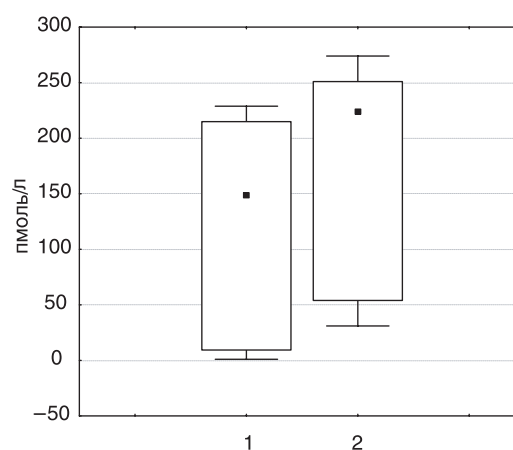


Рис. 6

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

1-2316

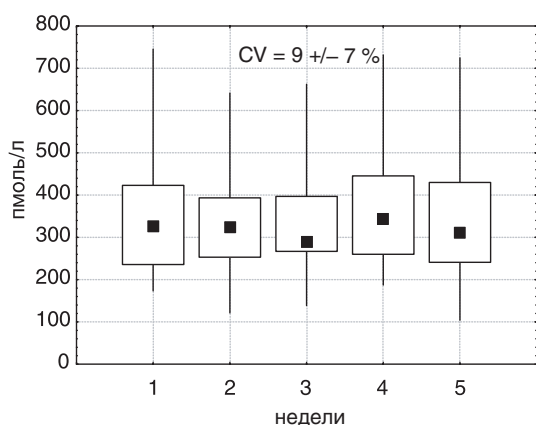


Рис. 7

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

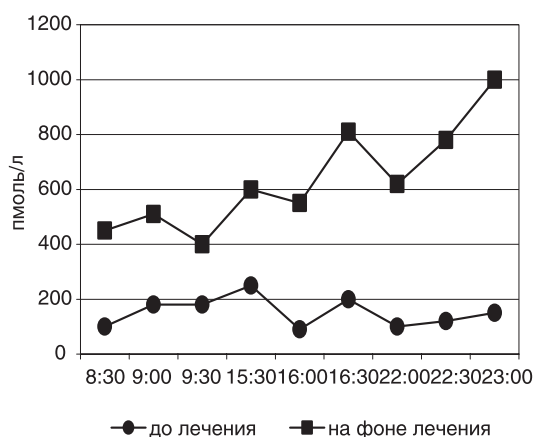


Рис. 8

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

чалась от вычисленной концентрации св.Т в крови. Медиана свободного тестостерона в 3 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. 5).

Чтобы изучить воспроизводимость концентрации свободного тестостерона в слюне во времени, мы собирали слюну в группе здоровых мужчин в течение 5 недель (1 раз в неделю утром). В начале исследования (1-я неделя) концентрация свободного тестостерона у обследуемых была в пределах 180–745 пмоль/л. Последующие определения тестостерона (2–5 недели) показали высокую повторяе-

мость результатов (коэффициент вариации (9 %, разброс от 5–23 %) (рис. 6).

Следующий важный аспект — 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. До лечения уровень общего и вычисленного свободного тестостерона в крови был очень низок (соответственно 3,9 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. 7).

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

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров Н.П. и др. // Вестник акад. мед. наук СССР. 1987. № 10. С. 88–94.
2. Гончаров Н.П., Каця Г.В., Добрачева А.Д. и др. // Пробл. эндокринол. 2007. № 3. С. 30–35.
3. Каця Г.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1984. Т. 97, № 3. С. 285–287.
4. Aldrecht S., Zimmermann T., Brandl H., et al. // J. Lab Med. 1997. Vol. 21. P. 191–204.
5. Carruthers M., Trinick T.R., Wheeler M.J. // Aging Male. 2007. Vol. 10, N 3. P. 165–72.
6. Choi H.H., Gray P.B., Storer T.W., et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005. Vol. 90. P. 1531–1541.
7. Daly W., Seegers C.A., Rubin D.A., et al. // Eur. J. Appl. Physiol. 2005. Vol. 93. P. 375–380.
8. DPC Technicfl Services department. Immulite/immulite, 1000 total testosterone — manufactures instruction. PILK7W-7, 24-4-2005, Los Angeles, USA.
9. Ekins R. // Clin. Chem. 1992. Vol. 38, N 7. P. 1289–93.
10. Goncharov N.P., et al. // Acta Endocrinol. (Copenhagen). 1979. Vol. 90, N 2. P. 372–384.

11. Goncharov N.P., et al. // *Endocrinology*. 1984. Vol. 115, N 1. P. 129–135.
 12. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A., et al. // *Aging Male*. 2005. Vol. 8, N 3–4. P. 194–202.
 13. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A., et al. // *Aging Male*. 2006. Vol. 9. P. 111–122.
 14. Guo T., Taylor R.L., Singh R.J., Soldin S.J., et al. // *Clin. Chemica Acta*. 2006. Vol. 372. P. 76–82.
 15. Hammond G.L., Nikser J.A., Jones L.A., Sitteri R.K. // *J. Biol. Chem*. 1980. Vol. 255. P. 5023–26.
 16. Heikkinen E., Vlikahti R., Roine R., et al. // *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 1996. Vol. 20. P. 711–716.
 17. Herold D.A., Fitzgerald R.L. // *Clinical Chemistry*. 2003. Vol. 49, N 8. P. 1250–1251.
 18. Jeibmann A., Zahedi S., Simoni M., et al. // *Eur. J. Clin. Invest*. 2005. Vol. 35. P. 565–572.
 19. Kley H.K., Bartmann E., Kruskeper H.L. // *Acta Endocrin*. 1977. Vol. 85. P. 212–219.
 20. Kushnir M., Rockwood A.L., Roberts W.L., et al. // *Clin. Chem*. 2006. Vol. 52. P. 120–128.
 21. Lughetti L., Prediezi B., Ferrari M., et al. // *J. Pediatr. Endocrinol. Metabol*. 2000. Vol. 13. P. 709–715.
 22. Matsumoto A.M., Bremner W.J. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2004. Vol. 89. P. 520–524.
 23. Obminski Z. // *Exp. Clin. Endocri. Diabetes*. 1998. Vol. 106. P. 85–88.
 24. Rittmaster R.S., Arab D.M., Lehman L. // *Fertil. Steril*. 1996. Vol. 65. P. 962–965.
 25. Rosner W. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1997. Vol. 82. P. 2014–15.
 26. Rosner W. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2001. Vol. 86, N 6. P. 2903–05.
 27. Rosner W., Auchus R., Azziz R., et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2007. Vol. 92. P. 405–413.
 28. Sarkova T., Eriksson C.J. Testosterone increases in men after a low dose of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003; 682–685.
 29. Schurmeyer T., Nieschlag E. Salivary and serum testosterone under physiological and pharmacological conditions. Ninth Tenovus Workshop — Immunoassays of Steroids in Saliva 1982; 202–209. Alpha Omega Cardiff, Wal.
 30. Sikaris K., McLachlan R.I., Kazlauskas R., et al. Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(11): 5928–36.
 31. Stockl D., Franzini C., Kratochvila J., et al. Analytical specifications of reference methods compilation and critical discussion (from the members of the European EQA-Organizers Working Group B). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 319–37.
 32. Svartberg J., Jorde R., Sundsfjord J., et al. Seasonal variation of testosterone and waist to hip ratio in men: the Troms study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3099–3104.
 33. Taieb J., Mathian B., Millot F., et al. Testosterone measurement by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women and children. *Clin Chem* 2003; 49: 1371–85.
 34. Van Uytvanghe K., Stockl D., Kaufman J.M., et al. Evaluation of a Candidate Reference Measurement Procedure for Serum Free Testosterone Based on Ultrafiltration and Isotope Dilution–Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50: 2101–2110.
 35. Vermeulen A., Kaufman J.M. Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Horm Res* 1995; 43(1–3): 25–8. Review.
 36. Vermeulen A., Kaufman J.M., Giagulli V.A. Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgens levels in aging or obese males. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1821–1826.
 37. Vermeulen A., Verdonc K.L., Kaufman J.M. A critical evaluation of sample methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*; 1999; 84: 3666–72.
 38. Vermeulen A., Kaufman J.M. Diagnosis of hypogonadism in the aging male. *Aging Male* 2002; 5: 170–176.
 39. Waggoner W., Boots L.R., Azziz R. Total testosterone and DHEAS levels as predictors of androgen-secreting neoplasms: a populational study. *Gynecol Endocrinol*. 1999; 13(6): 394–400.
 40. Wall J.R., Jarrett R.J., Zimmet P.Z., et al. Fall in plasma testosterone levels in normal male subjects in response to an oral glucose load. *Lancet* 1973; 1: 967–968.
 41. Wang C., Catlin D.H., Demers L.M., et al. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography — tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 534–543.
 42. Wheeler M.J. Factors that affect the interpretation of testosterone results. *CPD Clinical Biochemistry* 2003; 5: 86–90.
 43. Zhan Sh. Critical review of development, validation and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. *Current Pharm Analysis* 2005; 1: 3–14.
- Goncharov N.P., Katsiya G.V., Malysheva N.M. Age-dependent Androgen Deficit and Its Diagnostics // *Psychopharmacol. Biol. Narcol*. 2008. Vol. 8, N 1–2 (Pt. 1). P. 1-2306–1-2317.
- Federal Scientific Centre of Endocrinology; Moscow, 117036, Russia
- Summary:** The article considers the questions of connections between testosterone level and age-dependent sexual disfunction in men. The methods of modern recognition of testosterone level in blood, saliva and other biological liquors are discussed. The great attention is paid to the methods of immunoenzyme analysis by means of automatic systems, mass spectrometry and radioimmunoassay of testosterone detection.
- Key words:** testosterone; sexual disfunction; methods of investigation; androgenic deficit