

Metode za določanje različnih oblik testosterona v medicinskih laboratorijih

Methods for determining different forms of testosterone in medical laboratories

Barbara Ježek^{1,2}, Kristina Drole³, Aleš Jerin^{2,4}

¹Diagnostični laboratorij Medicare PLUS

²Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

³Univerza v Ljubljani, Fakulteta za šport, Inštitut za kineziologijo

⁴Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Avtor za korespondenco:

Barbara Ježek, mag. lab. biomed.

Diagnostični laboratorij Medicare PLUS, Erbežnikova ulica 2, 1000 Ljubljana

e-pošta: barbara@medicareplus.si

POVZETEK

Testosteron je steroidni hormon, ki se v krvnem obtoku nahaja v prosti obliki in vezan na prenašalne proteine. Za merjenje koncentracije testosterona obstaja širok nabor metod. Pri izbiri metode za določanje testosterona je ključno upoštevati namen merjenja, saj ta vpliva na izbiro oblike testosterona, ki jo bomo analizirali, in določa zahtevane lastnosti metode. V prispevku bomo predstavili izvedbo in omejitve metod za merjenje celokupnega testosterona in njegovih biološko aktivnih oblik. Metode smo primerjali glede na zahtevnost in čas izvedbe analize ter cenovno dostopnost. V medicinskih laboratorijih se večinoma meri celokupni testosteron, za prosto ali biološko razpoložljivo obliko testosterona pa prevladujejo izračuni. Trenutno se za merjenje koncentracije celokupnega testosterona največ uporabljajo imunokemijske metode, vendar lahko v prihodnje pričakujemo, da bodo imele večjo vlogo kromatografske metode, sklopljene z masno spektrometrijo. Meritev koncentracije biološko aktivnih oblik testosterona je pomembna zlasti pri mejno znižanih koncentracijah celokupnega testosterona ali spremenjenih koncentracijah prenašalnih proteinov. Metode za določanje biološko aktivnih oblik so ravnotežna dializa, ultrafiltracija in selektivna precipitacija, vendar so delovno zahtevne in za-

mudne. Posledično so razvili različne izračune za oceno koncentracije prostega in biološko razpoložljivega testosterona. Rezultati, pridobljeni z različnimi metodami, med seboj niso primerljivi, zato je velika potreba po harmonizaciji in standardizaciji metod.

Ključne besede: celokupni testosteron, biološko razpoložljivi testosteron, prosti testosteron, določanje testosterona

ABSTRACT

Testosterone is a steroid hormone found in the bloodstream in both free form and bound to transport proteins. Various methods exist for measuring testosterone concentration, and selecting the appropriate method depends on the purpose of the measurement. This choice affects which form of testosterone will be analyzed and determines the method's required characteristics. The paper presents the description and limitations of methods for measuring total testosterone and its biologically active forms. Methods were compared based on their complexity, analysis time and cost-effectiveness. In medical laboratories, total testosterone is usually measured, while free or bioavailable testosterone is often calculated. Immunochemical meth- >>

ods are currently the most widely used for total testosterone measurement, but chromatographic methods coupled with mass spectrometry are expected to play a larger role in the future. Measuring biologically active forms of testosterone is particularly important when total testosterone levels are borderline low or when concentrations of transport proteins are altered. Methods for determining biologically active forms, such as equilibrium dialysis, ultrafiltration, and selective precipitation, are labor-intensive and time-consuming. Consequently, various calculations have been developed to estimate free and bioavailable testosterone. Due to the lack of comparability between methods, there is a strong need for harmonization and standardization.

Key words: total testosterone, bioavailable testosterone, free testosterone, determination of testosterone

UVOD

Testosteron je analit, pri katerem je pomembna izbira oblike, ki jo bomo določali, in ne le izbira primerne metode za določitev. V prispevku bomo predstavili različne oblike testosterona in metode, s pomočjo katerih lahko izmerimo ali izračunamo koncentracijo določene oblike. Metode bomo med seboj primerjali glede na zahtevnost in čas izvedbe preiskave, cenovno dostopnost ter njeno občutljivost in specifičnost. Pri določanju koncentracije testosterona je namreč ključna izbira metode, ki je med drugim odvisna od oblike testosterona, ki jo bomo določali. Testosteron je steroidni hormon, ki se izloča pretežno iz Leydigovih celic v testisih. Njegovo izločanje je kontrolirano z negativno povratno zanko preko osi hipotalamus-hipofiza-testisi. Na tarčne celice testosteron učinkuje z vezavo na androgenski receptor (1). Testosteron spodbuja spermatogenezo, poleg tega ima tudi anabolni učinek, in sicer povečuje nastanek mišične mase, spodbuja tvorbo kostnine ter povečuje mineralno gostoto kosti. Prav tako spodbuja eritropoezo v kostnem mozgu in močno vpliva na razpoloženje. V času pubertete testosteron pri dečkih povzroči pojav sekundarnih spolnih znakov in poraščenosti (2,3). Testosteron je predhodnik estradiola, v katerega se pretvarja s pomočjo aromataze (4), zato je pomemben tudi pri ženskah, kjer ima vlogo metabolnega, vaskularnega in reproduktivnega hormona.

V krvnem obtoku se testosteron veže pretežno na albumin in spolne hormone vezoči globulin (SHBG, angl. *sex hor-*

mone binding globulin), v manjši meri je vezan tudi na nekatere druge vezavne proteine, le 0,5–2 % testosterona pa se nahaja v prosti obliki (5,6). Prosto obliko testosterona imenujemo tudi prosti testosteron (angl. *free testosterone*). Hipoteza o prostih hormonih pravi, da je biološko aktivna zgolj prosta oblika hormonov (7). Posledično je prosti testosteron biološko aktiven, kar pomeni, da je sposoben vezave na celične receptorje, s čimer sproži učinek v celicah (1,5). Na vezavni protein SHBG je testosteron vezan z veliko afiniteto, zato vezan testosteron ni na voljo za prevzem v celice v večini tkiv. Testosteron, vezan na SHBG, je biološko neaktiven, torej nima androgenega učinka (1). Na albumin je testosteron vezan z manjšo afiniteto, zato se od njega lažje odcepi in veže na tarčne celice, torej je biološko aktiven. Z izrazom celokupni testosteron opisujemo prosto in vezano obliko testosterona v telesu. Izraz biološko razpoložljivi testosteron (angl. *bioavailable testosterone*) pa se nanaša tako na prosto obliko testosterona kot tudi na testosteron, ki je vezan na albumin. Biološko razpoložljivi testosteron torej predstavlja ves biološko aktiven testosteron v telesu (1).

Koncentracijo testosterona merimo predvsem za oceno androgenega statusa tako pri moških kot tudi pri ženskah. Koncentracijo testosterona se najpogosteje izmeri pri diagnostiki hipogonadizma pri moških (8–10) ter za spremljanje nadomestne hormonske terapije s testosteronom (11) in pri diagnostiki hiperandrogenizma pri ženskah; slednji se večinoma pojavi v sklopu sindroma policističnih jajčnikov (12,13). Meritev koncentracije testosterona se uporablja tudi pri diagnostiki zakasnele ali prezgodnje pubertete pri fantih (14), diagnostiki kongenitalne adrenalne hiperplazije (11) in še nekaterih drugih stanjih. V zadnjem času se raziskujejo tudi povezave med testosteronom in različnimi metabolnimi motnjami, kot so debelost, metabolni sindrom, diabetes (15–17) in kardiovaskularne bolezni (18). Testosteron ima pri športnikih ključno vlogo pri oblikovanju fiziološkega odziva na trenajni dražljaj; s svojim anaboličnim učinkom spodbuja rast mišic, razvoj moči in dvig splošne telesne zmogljivosti. Z nivojem testosterona pri športnikih torej spremljamo prilagoditev na trenajno obremenitev ter okrevanje po njej (19,20).

Pri določenih kliničnih indikacijah je treba poleg koncentracije celokupnega testosterona izmeriti še koncentracijo biološko aktivnih oblik testosterona, saj nam pomagajo pri postavitvi pravilne diagnoze. Merjenje le-teh se priporoča predvsem pri mejno znižanih koncentracijah celokupnega testosterona, pri moških za diagnostiko hipogonadizma ter pri različnih stanjih, ki vplivajo na koncentracijo »

SHBG-ja (21). Do spremenjene koncentracije SHBG-ja pride zaradi povišane koncentracije kompetitivnih steroidov predvsem estrogena, debelosti, diabetesa, hipo- ali hipertiroidizma, ciroze, hepatitisa in uporabe glukokortikoidov, androgenih steroidov ali estrogenov (8). Pri odstopanjih v koncentraciji SHBG-ja ni dovolj, če izvedemo zgolj meritev celokupnega testosterona, saj je lahko ta znotraj referenčnega območja, kar ni skladno s klinično sliko preiskovanca. Pri določanju biološko aktivnih oblik testosterona pa so vidna odstopanja, ki sovpadajo tudi s klinično sliko. Posledično se ob sumu na stanja s spremenjeno koncentracijo SHBG-ja priporoča merjenje biološko aktivnih oblik testosterona (5,21).

PREDANALITSKE ZAHTEVE ZA MERITEV KONCENTRACIJE TESTOSTERONA

Za analizo testosterona se večinoma uporabljata vzorca krvne plazme in seruma. Za testosteron je značilno nihanje znotraj dneva, pri čemer so vrednosti najvišje zjutraj, zato se priporoča odvzem krvi v jutranjih urah (22). Različne smernice so med seboj usklajene ter priporočajo odvzem krvi za meritev testosterona med 7. in 11. uro na tešče (21,22). Odvzem krvi na tešče je priporočljiv, saj vnos hrane zniža koncentracijo testosterona (23,24). Za zanesljiv rezultat je priporočljivo odvzem krvi in meritev ponoviti v drugem dnevu, saj testosteron izraža dokaj velike razlike pri posamezniku med različnimi dnevi (21,25). Prav tako lahko nekatera zdravstvena stanja ali zdravilne učinkovine vplivajo na koncentracijo testosterona v krvi (21,26). Med spoloma so velike razlike v koncentraciji testosterona, saj imajo ženske približno 10-krat nižjo koncentracijo celokupnega testosterona kot moški. Posledično je potrebno široko območje merjenja, kar je problematično predvsem pri imunokemijskih metodah (27). Hkrati so pri ženskah prisotni tudi drugi podobni steroidi, ki so problematični z vidika navzkrižne reaktivnosti (28). Za analizo testosterona se lahko uporabi tudi vzorec sline, katerega glavna prednost je neinvaziven odvzem. Prednost sline kot vzorca je tudi dejstvo, da dobimo zgolj prosto frakcijo testosterona. Posledično lahko določimo ves testosteron v vzorcu in ločba proste frakcije od ostalega vzorca ni potrebna. Koncentracija testosterona v slini je nižja kot v krvi, zato

za analizo potrebujemo metode z nižjo mejo detekcije. Slabost sline kot vzorca je problematičen matriks, ki zahteva dodatno obdelavo pred analizo (npr. zamrzovanje in centrifugiranje). Če pri vzorčenju sline pride do kontaminacije s periferno krvjo zaradi ranic v ustih, lahko to povzroči lažno povišane rezultate zaradi mnogo višje koncentracije testosterona v krvi. Slina kot vzorec za določitev testosterona se večinoma uporablja v raziskovalne namene, saj je za diagnostiko pogosto poleg testosterona smiselno izmeriti še nekatere druge analite, za kar potrebujemo vzorec krvi (29). Pomanjkljivost sline kot vzorca za meritev testosterona je tudi pomanjkanje standardizacije metode, saj certificiran referenčni material za prosti testosteron trenutno še ni na voljo. Poleg tega prosti testosteron v serumu tudi ni primerljiv s testosteronom, merjenim v slini (29).

METODE DOLOČANJA KONCENTRACIJE CELOKUPNEGA TESTOSTERONA

Pri merjenju koncentracije celokupnega testosterona izmerimo koncentracijo vsega testosterona, prisotnega v vzorcu, torej proste in vezane oblike. Celokupni testosteron lahko merimo z imunokemijskimi metodami ali s pomočjo kromatografskih metod, sklopljenih z masno spektrometrijo (30).

Imunokemijske metode

Poznamo različne imunokemijske metode, ki temeljijo na protitelesih, ki se vežejo na določen analit, metode pa se razlikujejo predvsem glede na način detekcije (30). V preteklosti je za določitev celokupnega testosterona obstajala zgolj radioimunska metoda, danes pa obstajajo metode, ki temeljijo na detekciji s pomočjo encimov, imunofluorescence ali kemiluminiscence. Testosteron oz. steroidi na splošno so majhne molekule, zato je bil razvoj zanesljivih metod določanja težaven (31). Problematična je bila tudi navzkrižna reaktivnost s podobnimi steroidnimi molekulami (32). V preteklosti je bilo treba pred analizo izvesti še ekstrakcijo in kromatografijo, vendar so kasneje zaradi povečane števila vzorcev za to preiskavo metodo poenostavili. Uvedli so direktne imunokemijske metode, za katere sta bili značilni slabša natančnost in specifičnost (31). Boljše >>

karakteristike metode so želeli doseči z uporabo kompetitivnih testov. Prednosti uporabe imunokemijskih metod za določanje celokupnega testosterona so predvsem široka dostopnost, nizki stroški in visoka zmogljivost zaradi avtomatiziranosti metod (30). Medtem ko pri moških imunokemijske metode zadovoljivo rešujejo problematiko merjenja celokupnega testosterona, so bile izražene skrbi glede njegove natančnosti pri ženskah in hipogonadalnih moških, predvsem zaradi manjše natančnosti rezultatov pri nizkih koncentracijah testosterona (33). Leta 2018 so v članku (34) primerjali različne imunokemijske metode ter ugotovili, da lahko nekatere od teh metod izmerijo tudi nižje koncentracije testosterona dovolj natančno, vendar pričakovano z manjšo natančnostjo kot metode masne spektrometrije. Različne metode med seboj ne dajejo primerljivih rezultatov, zato za zdaj še ne obstaja enotno referenčno območje. Priporočata se potrditev referenčnega območja, ki ga navaja proizvajalec, ali pa postavitev lastnega referenčnega območja (35). Poleg tega obstaja program, ki si prizadeva standardizirati metode za določanje koncentracije celokupnega testosterona, s čimer želi doseči večjo primerljivost med različnimi imunokemijskimi metodami ter zagotoviti čim bolj natančne rezultate (36,37).

Kromatografska metoda, sklopljena z masno spektrometrijo

V medicinskih laboratorijih za merjenje koncentracije celokupnega testosterona prevladujejo imunokemijske metode. Zaradi slabše natančnosti in ponovljivosti imunokemijskih metod, predvsem pri nizkih koncentracijah celokupnega testosterona, so se pojavile metode masne spektrometrije (38). Masna spektrometrija se uporablja za kvantifikacijo analita, ločbo analita od matriksa pa dosežemo s predhod-

no opravljeno kromatografijo. Pri kromatografiji ločimo iskan analit od matriksa vzorca s pomočjo interakcij med analitom in stacionarno fazo. Pri kromatografiji čez sistem teče tekoča faza, ki je lahko plin ali tekočina oz. zmes tekočin, odvisno od tipa kromatografije. Od moči interakcij med analitom, trdo in tekočo fazo je odvisen čas potovanja analita do masnega spektrometra, imenovan retencijski čas, ki je pri stabilnih pogojih kromatografije specifičen za določen analit. Posledično lahko na podlagi retencijskega časa ločimo različne snovi med seboj. Masni spektrometer pri teh metodah služi kot detektor, ki na podlagi molekulske mase in strukture snovi prepozna ter kvantificira analit. Če imamo zaporedno vezana dva masna spektrometra, govorimo o tandemski masni spektrometriji, katere glavna prednost je večja specifičnost (28,39). V masnem spektrometru najprej poteče ionizacija, kar je prikazano na Slika 1: Shematski prikaz kromatografske metode, sklopljene z masno spektrometrijo. S pomočjo kromatografije se loči iskan analit od matriksa. Analit nato potuje v masni spektrometer, kjer najprej poteče ionizacija vzorca, s katero pridobimo nabite molekulske ione. Molekulski ioni se nato na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z) ločijo s pomočjo električnega ali magnetnega polja. Detektor zazna različne molekulske ione, kar računalnik prikaže v obliki masnega spektra. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com. Sliki 1. S pomočjo ionizacije nastanejo molekulske ioni, ki zaradi električnega ali magnetnega polja potujejo v vakuumu z določeno hitrostjo in smerjo do detektorja. Hitrost in smer sta pogojeni z razmerjem med maso in nabojem (m/z), na podlagi česar masni detektor ločuje molekulske ione med seboj. Rezultat masne spektrometrije je masni spekter, ki je značilen za določeno snov, zato služi za identifikacijo analita, hkrati pa lahko analit tudi kvantificiramo (39,40).



Slika 1: Shematski prikaz kromatografske metode, sklopljene z masno spektrometrijo. S pomočjo kromatografije se loči iskan analit od matriksa. Analit nato potuje v masni spektrometer, kjer najprej poteče ionizacija vzorca, s katero pridobimo nabite molekulske ione. Molekulski ioni se nato na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z) ločijo s pomočjo električnega ali magnetnega polja. Detektor zazna različne molekulske ione, kar računalnik prikaže v obliki masnega spektra. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 1: Schematic representation of a chromatographic method coupled with mass spectrometry. Using chromatography, the target analyte is separated from the matrix. The analyte then enters the mass spectrometer, where ionization of the sample occurs, producing charged molecular ions. These molecular ions are separated based on their mass-to-charge ratio (m/z) using an electric or magnetic field. The detector detects different molecular ions, which are displayed by the computer in the form of a mass spectrum. Created with BioRender.com.



Prve tovrstne metode so za določitev celokupnega testosterona uporabljale plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS), vendar je bila predpriprava vzorca zahtevna. Predpriprava vzorca je zagotovila večjo termo stabilnost testosterona, vendar izkoristek postopka ni bil vedno enak. Posledično so razvili različico GC-MS, ki temelji na izotopsko označenih internih standardih, pri katerih se med pripravo vzorca pojavi enak izkoristek kot pri analitu. Kalibracijska krivulja temelji na razmerju med odzivi analita in internega standarda, kar pripomore k bolj natančni kvantifikaciji. Kasneje so za kromatografsko ločbo uporabili tekočinsko kromatografijo, ki je bila sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), pri kateri je prav tako potrebna predpriprava vzorca. Za LC-MS/MS sta značilni nizka meja detekcije posameznega analita in dobra specifičnost (28,39). Metoda omogoča tudi analizo več različnih analitov hkrati, vendar ni mogoče vzporedno analizirati več vzorcev, kot je to mogoče pri imunokemijskih metodah, zato se čas izvedbe preiskave podaljša in je posledično metoda manj primerne za uporabo v rutinskih laboratorijih (25). Ena izmed prednosti hkratne analize več analitov v enem vzorcu je nizka cena na preiskavo, vendar je začetna investicija visoka, zaradi česar se metoda ne uporablja v rutinskih laboratorijih; kljub temu je njena uporaba v porastu. Izziv masne spektrometrije je predvsem potreba po visoko izobraženem in izkušenem osebju zaradi kompleksnosti analizatorja in zahtevnega procesa analize (28,39).

METODE DOLOČANJA BIOLOŠKO AKTIVNIH OBLIK TESTOSTERONA

Ob mejno znižani koncentraciji celokupnega testosterona ali stanjih s spremenjeno koncentracijo SHBG-ja je poleg celokupnega testosterona potrebno določiti tudi koncentracijo biološko aktivne oblike, kamor spadata prosti in biološko razpoložljivi testosteron. Vendar je merjenje le-teh delovno zahtevno in zamudno, predvsem zaradi nizkih koncentracij in vezave na vezavne proteine, zato so razvili različne izračune, s pomočjo katerih ocenimo koncentracijo biološko aktivnih oblik testosterona, ki pri določenih kličnih stanjih zadovoljivo rešujejo to problematiko (21).

Ravnotežna dializa in ultrafiltracija

Ravnotežna dializa je metoda, pri kateri z uporabo polprepustne membrane ločimo prosto in vezano frakcijo analita v vzorcu. Prosto frakcijo analita lahko nato kvantificiramo z imunokemijskimi metodami (npr. radioimunska metoda) ali z masno spektrometrijo (npr. LC-MS/MS) (6,11). Trenutno za referenčno metodo določanja prostega testosterona velja ravnotežna dializa v kombinaciji z LC-MS/MS, vendar se za zdaj zaradi visoke cene ne uporablja v rutinskih laboratorijih, se pa počasi vpeljuje v specializirane laboratorije (41). Ravnotežna dializa je zamudna in delovno zahtevna. Že manjše spremembe v delovnem postopku, kot so na primer redčenje vzorca, razlike v temperaturi, pH pufru ali tipu uporabljene membrane, lahko vplivajo na rezultat (6,11). Zelo pomembna je čistost radioaktivnega označevalca, kadar je ravnotežna dializa sklopljena z radioimunsko metodo, saj lahko nečistoče v njem povzročijo veliko odstopanje v rezultatu, ker se ne vežejo na SHBG. Prednosti ravnotežne dialize sklopljene z LC-MS/MS so predvsem njena dobra občutljivost, specifičnost in pravilnost rezultatov na celotnem merilnem območju, slabost pa je predvsem v težavni izvedbi ravnotežne dialize (42). Posledično je metoda primerna tako za ženske, ki imajo nižje koncentracije celokupnega testosterona, kot tudi za merjenje prostega testosterona ter za odkrivanje hipogonadizma pri moških. Zaradi zahtevnosti ravnotežne dialize je ujemanje med rezultati različnih laboratorijev slabo (33).

Z namenom razvoja delovno manj zamudne metode od ravnotežne dialize so razvili ultrafiltracijo, ki je prav tako sklopljena z imunokemijsko metodo ali masno spektrometrijo. Delovno je manj zahtevna, saj prosta oblika analita iz vzorca prehaja skozi polprepustno membrano s pomočjo centrifugalne sile. Kljub nekoliko hitrejši izvedbi je metoda zahtevna in zamudna (11).

Selektivna precipitacija

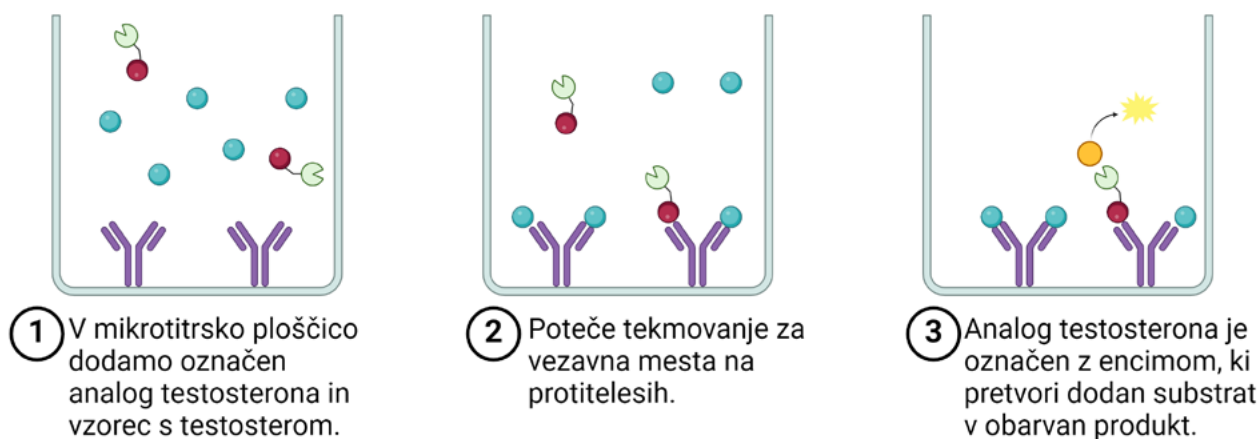
Biološko razpoložljivi testosteron predstavlja prosti in na albumin vezani testosteron, torej ves biološko aktiven testosteron v telesu. Posledično bolje odraža androgeni status kot meritev celokupnega testosterona (43). Biološko razpoložljivi testosteron izmerimo s pomočjo selektivne precipitacije SHBG-ja v vzorcu z amonijevim sulfatom (44). Najprej vzorcu dodamo znano količino testosterona, označenega z radioaktivnim izotopom. Po dodatku označenega testosterona se ta v določeni meri veže na vezavne proteine iz vzorca, >>

torej na SHBG in albumin. Nato pa s pomočjo 50 % amonijevega sulfata oborimo ves testosteron, vezan na SHBG – tako testosteron iz vzorca kot tudi dodan testosteron označen z radioaktivnim izotopom. Vzorec centrifugiramo ter odlijemo supernatant, v katerem se nahajata prosti testosteron in testosteron, vezan na albumin. V supernatantu določimo radioaktivnost, ki je sorazmerna količini označenega testosterona, ki se ni vezal na SHBG. Za izračun koncentracije biološko razpoložljivega testosterona v vzorcu pomnožimo delež radioaktivno označenega testosterona, določenega v supernatantu, s koncentracijo celokupnega testosterona v vzorcu (3,44). Lahko pa izvedemo precipitacijo z amonijevim sulfatom in nato v supernatantu z direktno imunokemijsko metodo določimo koncentracijo biološko razpoložljivega testosterona. Meritev biološko razpoložljivega testosterona v supernatantu s pomočjo LC-MS/MS metode ni mogoča zaradi visoke koncentracije soli amonijevega sulfata. Rezultati so primerljivi meritvam z ravnotežno dializo, vendar je tudi ta metoda delovno zahtevna (11,42).

Direktna imunokemijska metoda

Zahtevnost in zamudnost ravnotežne dialize sta privedli do razvoja različnih testov, ki temeljijo na direktni imunokemijski metodi. Vendar imunokemijske metode niso primerne za kvantifikacijo prostih oblik steroidov direktno v vzorcu zaradi

zelo nizkih koncentracij le-teh ter pomanjkljive specifičnosti, ki ne omogoča merjenja zgolj proste frakcije (5). Posledično direktna imunokemijska metoda temelji na kompetitivnem principu. Pri direktni imunokemijski metodi se uporablja označen analog testosterona, ki ima sposobnost reagirati z eksogenimi protitelesi proti testosteronu, nima pa sposobnosti vezave na prenašalne proteine za testosteron (38). Označen analog testosterona torej ne vpliva na ravnotežje prostega in vezanega testosterona. Vendar tekmuje za vezavna mesta na protitelesih, vezanih na dno mikrotitrne ploščice, s testosteronom prisotnem v vzorcu. V primeru encimsko-immunske metode, prikazane na Sliki 2, dodamo substrat, katerega encim, vezan na analog testosterona, pretvori v barvni produkt. Večja kot je koncentracija prostega testosterona v vzorcu, manj označenega analoga testosterona se lahko veže na vezavna protitelesa in manjši je končni odziv. Ravno nasprotno, ob nizki koncentraciji prostega testosterona v serumu dobimo visok odziv. Težko pa je narediti analog testosterona, ki se ne veže na prenašalne proteine in posledično ne vpliva na vzpostavljeno ravnotežje prostega in vezanega testosterona v vzorcu. Prednosti metode so predvsem v hitrih rezultatih, enostavnem postopku in potrebi po majhnem volumnu vzorca, vendar je metoda nezanesljiva, neobčutljiva in ni primerljiva med laboratoriji, zato v smernicah različnih združenj odsvetujejo njeno uporabo (21,26,33,38).



Slika 2: Direktna imunokemijska metoda. Na dno mikrotitrne ploščice so vezana protitelesa proti testosteronu, na katera se lahko vežeta označen analog testosterona ali testosteron iz vzorca. Število vezavnih mest na protitelesih je omejeno, zato pride do tekmovanja med označenim analogom testosterona in testosteronom iz vzorca. Nevezane snovi se odstranijo s spiranjem. Analog testosterona ima vezan encim, ki ob dodatku substrata omogoči nastanek obarvanega produkta, kar tudi zaznamo. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 2: Direct immunoassay. Antibodies against testosterone are bound to the bottom of the microtiter plate, to which a labelled testosterone analog or testosterone from the sample can bind. The number of binding sites on the antibodies is limited, leading to competition between the labelled testosterone analog and the testosterone from the sample. Unbound substances are removed by washing. The testosterone analog is linked to an enzyme, which, upon the addition of a substrate, enables the formation of a coloured product that can be detected. Created with BioRender.com.

>>

Izračuni biološko razpoložljivih oblik testosterona

Zahtevnost merjenja prostega in biološko razpoložljivega testosterona je privedla do enostavnejših in cenejših rešitev. Tako se je razvila vrsta različnih izračunov, s pomočjo katerih lahko ocenimo koncentracijo prostega testosterona. Izračuni temeljijo na koncentraciji celokupnega testosterona in SHBG-ja, nekateri pa upoštevajo tudi koncentracijo albumina. Poznamo izračune, ki temeljijo na linearnih ali alosteričnih modelih, in tiste, ki temeljijo na empiričnih pristopih (6). Izračuni temeljijo na predpostavki, da se testosteron v telesu normalno veže na proteine. Prav tako bodo vsi izračuni napačno ocenili koncentracijo prostega testosterona v primeru povišane koncentracije kompetitivnih steroidov, večjih odstopanj v koncentraciji vezavnih proteinov ter pri redkih genetskih polimorfizmih, kjer pride do spremenjene afinitete vezave SHBG-ja za testosteron (5,6,45).

Linearni model za izračun prostega testosterona temelji na zakonu o masi, ki predpostavlja, da lahko seštejemo prosto in vezano frakcijo analita ter tako dobimo celokupno količino analita. S pomočjo te predpostavke lahko z uporabo primerne enačbe, konstant afinitete vezave testosterona na prenašalne proteine ter znane koncentracije prenašalnih proteinov izračunamo prosto ali biološko razpoložljivo obliko testosterona (5). Poznamo več različnih enačb za izračun, razlikujejo pa se predvsem v uporabljenih afinitetnih konstantah, ki so sicer pridobljene s pomočjo eksperimentov, vendar za zdaj še niso poenotene (45). Ugotovili pa so, da vezava testosterona na prenašalne proteine ni linearna, kar razvrednoti izračun po linearnem modelu (6). Dejstvo je, da se le-ti, predvsem izračun po Vermeulenu (5), najbolj ujemajo z ravnotežno dializo, kljub napačni predpostavki o afiniteti vezave testosterona na SHBG.

Vermeulena enačba temelji na predpostavki, da je koncentracija celokupnega testosterona enaka vsoti prostega testosterona (označen $[S]$), testosterona vezanega na albumin in na SHBG. Afinitetna konstanta za vezavo na albumin (K_A) znaša $3,6 \times 10^4$ L/mol, za SHBG (K_{SHBG}) pa znaša 10^9 L/mol. V enačbi so izražene množine SHBG-ja, albumina (ALB) in testosterona, ki jih preračunamo iz koncentracije in znane molekulske mase analita. Koncentracijo albumina se vnese v g/L, za testosteron in SHBG pa se uporabi enota nmol/L. Vermeulena enačba je enačba 2. reda, ki je prikazana spodaj (enačba 1).

$$[S]^2 \times (1 + K_A \times [ALB]) \times K_{SHBG} + [S] \times ([SHBG] \times K_{SHBG} - [T] \times K_{SHBG} + (1 + K_A \times [ALB])) - [T] = 0 \quad (1) \gg$$

Za enačbo 2. reda je značilna oblika $ax^2 + bx + c = 0$. Rešitev enačbe 2. reda je zapisana v spodnji enačbi 2, koeficiente pa dobimo iz osnovne oblike enačbe. Rešitev enačbe predstavlja množino prostega testosterona, ki jo s pomočjo molekulske mase pretvorimo v koncentracijo (nmol/L). Enačba ima dve rešitvi, vendar je samo ena izmed njiju mogoča, saj ne moremo imeti negativne koncentracije prostega testosterona.

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (2)$$

Iz prostega testosterona lahko izračunamo tudi biološko razpoložljivi testosteron tako, da seštejemo prosti testosteron in testosteron, vezan na albumin (5).

Slabost izračuna po Vermeulenu enačbi so za 20–30 % previsoki rezultati glede na meritve prostega testosterona z referenčno metodo, vendar je odstopanje konstantno in je posledično problematično zgolj pri primerjavi različnih metod (45,46). Vermeulena enačba ni enako zanesljiva na celotnem območju koncentracije albumina in SHBG-ja, saj na mejnih področjih referenčnega območja predpostavke, na katerih temelji, ne držijo več v celoti (6). Vermeuleno enačbo priporočajo smernice Evropske akademije za andrologijo iz leta 2020, saj je izračunan prosti testosteron dovolj dober približek rezultatom, dobljenim z referenčno metodo. Izpostavljeno je tudi, da je najbolj primeren način za merjenje prostega testosterona ravno ravnotežna dializa, sklopljena z LC/MS-MS, vendar se zavedajo njene nedostopnosti v rutinskih laboratorijih (21).

Koncentracijo prostega testosterona je mogoče določiti tudi s pomočjo enačb, ki temeljijo na empiričnem modelu. Empirični model dobimo s pomočjo regresije s povratnim zankanjem, za kar je treba analizirati veliko številno vzorcev. Modeli dobro opisujejo populacijo, na kateri so bili postavljeni, vendar jih je težko prenesti v drug laboratorij, saj so specifični za določeno populacijo in metodo merjenja (6,11).

Linearni modeli predvidevajo, da vsak dimer SHBG-ja veže dve molekuli testosterona s podobno afiniteto brez alosterije. Novejše študije sklepajo, da se SHBG v krvi nahaja kot homodimer, na posamezno mesto na dimeru SHBG-ja pa se testosteron veže s kompleksno alosterično interakcijo. Posledično se afiniteta med obema vezavnima mestoma značilno razlikuje (47). Alosterični model je bolj skladen z ravnotežno dializo in posledično bolj pravilen za izračun prostega testosterona, vendar za zdaj njegova uporaba še ni tako razširjena (6,47).

Za izračun približne koncentracije prostega testosterona so razvili indeks prostih androgenov (FAI, angl. *free androgen index*), imenovan tudi indeks prostega testosterona (FTI, angl. *free testosterone index*), ki se ga izračuna s pomočjo spodnje enačbe 3, iz koncentracije SHBG-ja in celokupnega testosterona (48).

$$FAI = 100 \times \frac{\text{celokupni testosteron [nmol/L]}}{SHBG \text{ [nmol/L]}} \quad (3)$$

FAI je primeren za oceno koncentracije prostega testosterona pri ženskah, zato ni treba izmeriti koncentracije prostega testosterona z delovno bolj zahtevnimi metodami. Predvsem se FAI pri ženskah uporablja pri diagnostiki stanj, kjer pride do povišane koncentracije androgenov (49,50). Njegova uporaba je pri moških odsvetovana, saj FAI pri moških preceni koncentracijo prostega testosterona zaradi nizke koncentracije SHBG-ja (48).

ZAKLJUČEK

Merimo lahko celokupni, prosti ali biološko razpoložljivi testosteron. Biološko aktivne oblike testosterona pa je mogoče tudi izračunati. Za osnoven vpogled v androgeni status posameznika je načeloma dovolj meritev celokupnega testosterona. Za nadaljnjo diagnostiko pa je treba določiti koncentracijo biološko aktivnih oblik testosterona; izbira posamezne metode je odvisna od namena merjenja. V medicinskih laboratorijih trenutno za merjenje koncentracije celokupnega testosterona prevladujejo imunokemijske metode zaradi možnosti vzporedne analize vzorcev in nizke cene. V prihodnje jih bodo, če bodo postale cenovno ugodnejše in delovno manj zahtevne, v določeni meri nadomestile metode masne spektrometrije, vendar bodo verjetno uporabljane predvsem v specializiranih laboratorijih. Merjenje koncentracije biološko aktivnih oblik testostero-

na je večinoma analitsko zahtevnejše, z izjemo direktne imunske metode, ki pa ni dovolj občutljiva in primerljiva med laboratoriji. Koncentracijo biološko aktivnih oblik lahko tudi ocenimo s pomočjo različnih izračunov, ki trenutno zadovoljivo rešujejo problematiko za večino kliničnih potreb, predvsem pri ženskah. Ker različne metode za merjenje koncentracije celokupnega testosterona ne dajejo primerljivih rezultatov, so zelo pomembna prizadevanja za večjo primerljivost s pomočjo harmonizacije in standardizacije metod.

LITERATURA

1. Krakowsky Y, Grober ED. Testosterone Deficiency - Establishing A Biochemical Diagnosis. *EJIFCC*. 2015;26(2):105–13.
2. Wheeler MJ. The Determination of Bio-Available Testosterone. *Ann Clin Biochem*. 1995;32(4):345–57.
3. Zorn B, Vlasisavljević V, Pfeifer M. Fiziologija moda. V: *Interna medicina*, 5 izdaja. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Slovensko zdravniško društvo, Knjižništvo Buča d.o.o.; 2018. 792–5.
4. Parish SJ, Simon JA, Davis SR, Giraldi A, Goldstein I, Goldstein SW, *et al*. International Society for the Study of Women's Sexual Health Clinical Practice Guideline for the Use of Systemic Testosterone for Hypoactive Sexual Desire Disorder in Women. *Climacteric*. 2021;24(6):533–50.
5. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A Critical Evaluation of Simple Methods for the Estimation of Free Testosterone in Serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3666–72.
6. Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW, Krishna M, Matsumoto AM, Jasuja R. A Reappraisal of Testosterone's Binding in Circulation: Physiological and Clinical Implications. *Endocr Rev*. 2017;38(4):302–24.
7. Mendel CM. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J Androl*. 1992;13(2):107–16.
8. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, *et al*. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2536–59.
9. Kazi M, Geraci SA, Koch CA. Considerations for the diagnosis and treatment of testosterone deficiency in elderly men. *Am J Med*. 2007;120(10):835–40.
10. Dobs AS. The role of accurate testosterone testing in the treatment and management of male hypogonadism. *Steroids*. 2008;73(13):1305–10.
11. Shea JL, Wong PY, Chen Y. Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Adv Clin Chem*. 2014;63:59–84.
12. Nisenblat V, Norman RJ. Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(3):224–31.
13. Sharma A, Welt CK. Practical Approach to Hyperandrogenism in Women. *Med Clin North Am*. 2021;105(6):1099–116.
14. Speiser PW. Interpretation of pediatric endocrine laboratory tests: pitfalls in steroid hormone measurements and genotyping. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2007;5 Suppl 1:578–83.



15. Saboor Aftab SA, Kumar S, Barber TM. The role of obesity and type 2 diabetes mellitus in the development of male obesity-associated secondary hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(3):330–7.
16. Selvin E, Feinleib M, Zhang L, Rohrmann S, Rifai N, Nelson WG, *et al*. Androgens and diabetes in men: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes Care*. 2007;30(2):234–8.
17. Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, *et al*. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1669–75.
18. Rosano GMC, Cornoldi A, Fini M. Effects of androgens on the cardiovascular system. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(3 Suppl):32–8.
19. Lee EC, Fragala MS, Kavouras SA, Queen RM, Pryor JL, Casa DJ. Biomarkers in Sports and Exercise: Tracking Health, Performance, and Recovery in Athletes. *J Strength Cond Res*. 2017;31(10):2920–37.
20. Adlercreutz H, Härkönen M, Kuoppasalmi K, Näveri H, Huhtaniemi I, Tikkanen H, *et al*. Effect of training on plasma anabolic and catabolic steroid hormones and their response during physical exercise. *Int J Sports Med*. 1986;7 Suppl 1:27–8.
21. Corona G, Goulis DG, Huhtaniemi I, Zitzmann M, Toppari J, Forti G, *et al*. European Academy of Andrology (EAA) guidelines on investigation, treatment and monitoring of functional hypogonadism in males. *Andrology*. 2020;8(5):970–87.
22. Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB. The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(3):907–13.
23. Caronia LM, Dwyer AA, Hayden D, Amati F, Pitteloud N, Hayes FJ. Abrupt decrease in serum testosterone levels after an oral glucose load in men: implications for screening for hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(2):291–6.
24. Lehtihet M, Arver S, Bartuseviciene I, Pousette A. S-testosterone decrease after a mixed meal in healthy men independent of SHBG and gonadotrophin levels. *Andrologia*. 2012;44(6):405–10.
25. van der Veen A, van Faassen M, de Jong WHA, van Beek AP, Dijk-Brouwer DAJ, Kema IP. Development and validation of a LC-MS/MS method for the establishment of reference intervals and biological variation for five plasma steroid hormones. *Clin Biochem*. 2019;68:15–23.
26. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, *et al*. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(5):1715–44.
27. Diver M. Laboratory Measurement of Testosterone. *Adv Manag Testosterone Defic*. 2009;37:21–31.
28. Simoni M, Fanelli F, Roli L, Pagotto U. Methodology for measuring testosterone, dihydrotestosterone and sex hormone-binding globulin in a clinical setting. In: *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution*. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2012:60–86.
29. Lewis JG. Steroid Analysis in Saliva: An overview. *Clin Biochem Rev*. 2006;27(3):139–46.
30. Guzelce EC, Galbiati F, Goldman AL, Gattu AK, Basaria S, Bhasin S. Accurate measurement of total and free testosterone levels for the diagnosis of androgen disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(4):101683.
31. Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):3971–3.
32. Handelsman DJ, Jimenez M, Singh GKS, Spaliviero J, Desai R, Walters KA. Measurement of testosterone by immunoassays and mass spectrometry in mouse serum, testicular, and ovarian extracts. *Endocrinology*. 2015;156(1):400–5.
33. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(2):405–13.
34. La'ulu SL, Kalp KJ, Straseski JA. How low can you go? Analytical performance of five automated testosterone immunoassays. *Clin Biochem*. 2018;58:64–71.
35. Montagna G, Balestra S, D'Aurizio F, Romanelli F, Benagli C, Tozzoli R, *et al*. Establishing normal values of total testosterone in adult healthy men by the use of four immunometric methods and liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(11):1936–44.
36. Hormone Standardization Program for Testosterone and Estradiol | CDC [Internet]. 2023 [citrano 2024 Feb 4]. Dostopno na: https://www.cdc.gov/labstandards/csp/hs_host.html
37. Rosner W, Vesper H, Endocrine Society, American Association for Clinical Chemistry, American Association of Clinical Endocrinologists, Androgen Excess/PCOS Society, *et al*. Toward excellence in testosterone testing: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):4542–8.
38. Nader Rifai. *Tietz Textbook of Laboratory Medicine - 7th Edition*. Let. 2022. Saunders.
39. Wang Y, Gay GD, Botelho JC, Caudill SP, Vesper HW. Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2014;436:263–7.
40. Rochat B. Quantitative and Qualitative LC-High-Resolution MS: The Technological and Biological Reasons for a Shift of Paradigm. In: *Recent Advances in Analytical Chemistry*. IntechOpen; 2018.
41. Narinx N, David K, Walravens J, Vermeersch P, Claessens F, Fiers T, *et al*. Role of sex hormone-binding globulin in the free hormone hypothesis and the relevance of free testosterone in androgen physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(11):543.
42. Trost LW, Mulhall JP. Challenges in Testosterone Measurement, Data Interpretation, and Methodological Appraisal of Interventional Trials. *J Sex Med*. 2016;13(7):1029–46.
43. Diver MJ. Clinical Science Reviews Committee of the Association for Clinical Biochemistry. Analytical and physiological factors affecting the interpretation of serum testosterone concentration in men. *Ann Clin Biochem*. 2006;43(Pt 1):3–12.
44. Cumming DC, Wali SR. Non-Sex Hormone-Binding Globulin-Bound Testosterone as a Marker for Hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;61(5):873–6.

45. Fiers T, Wu F, Moghetti P, Vanderschueren D, Lapauw B, Kaufman JM. Reassessing free-testosterone calculation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry direct equilibrium dialysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(6):2167–74.
46. Ly LP, Sartorius G, Hull L, Leung A, Swerdloff RS, Wang C, *et al.* Accuracy of calculated free testosterone formulae in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;73(3):382–8.
47. Zakharov MN, Bhasin S, Travison TG, Xue R, Ulloor J, Vasani RS, *et al.* A multi-step, dynamic allosteric model of testosterone's binding to sex hormone binding globulin. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;399:190–200.
48. Ho CKM, Stoddart M, Walton M, Anderson RA, Beckett GJ. Calculated free testosterone in men: comparison of four equations and with free androgen index. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(Pt 5):389–97.
49. Sever MJ, Janić M, Kocjan T, Kovac V, Pavlic DR, Rakuša M, *et al.* Strokovna priporočila za diagnostiko in zdravljenje sindroma polističnih jajčnikov. 2023.
50. Christ JP, Cedars MI. Current Guidelines for Diagnosing PCOS. *Diagnostics.* 2023;13(6):1113.