

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

**Αθηνά Παππά
Κλινική Χημικός
Υπεύθ. Ενδοκρινολογικού Εργαστηρίου
Νοσ. Έλενα Βενιζέλου**

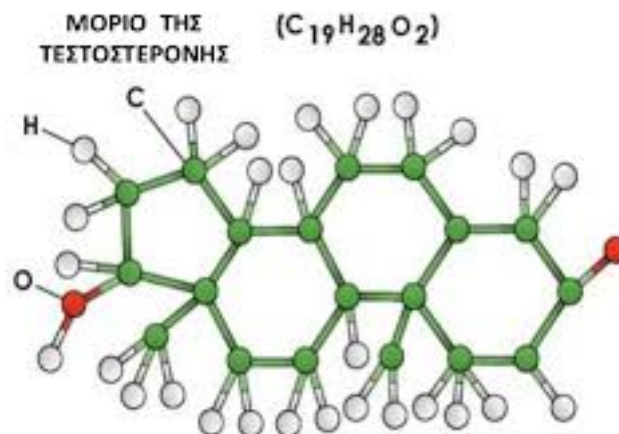
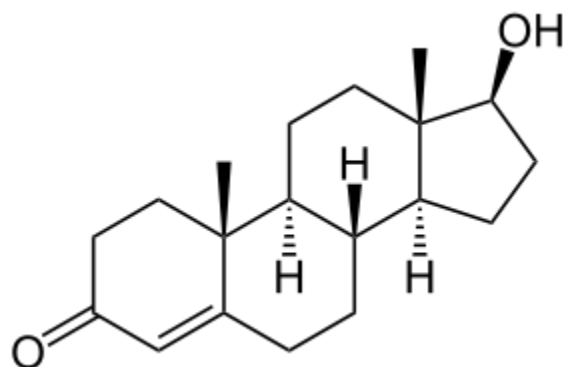
ΔΕΝ ΥΠΑΡΧΕΙ ΣΥΓΚΡΟΥΣΗ ΣΥΜΦΕΡΟΝΤΩΝ



Στεροειδής ορμόνη C-19 (MB 288.43 Da), η κύρια αρσενική ορμόνη του φύλου, πρωταρχικά υπεύθυνη για την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στους άνδρες .

Διεγείρει τη σύνθεση εξειδικευμένων πρωτεϊνών, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη και προσδένοντας σ' έναν υποδοχέα στον πυρήνα, ενεργοποιώντας έτσι ορισμένα γονίδια.

Δομή Τεστοστερόνης

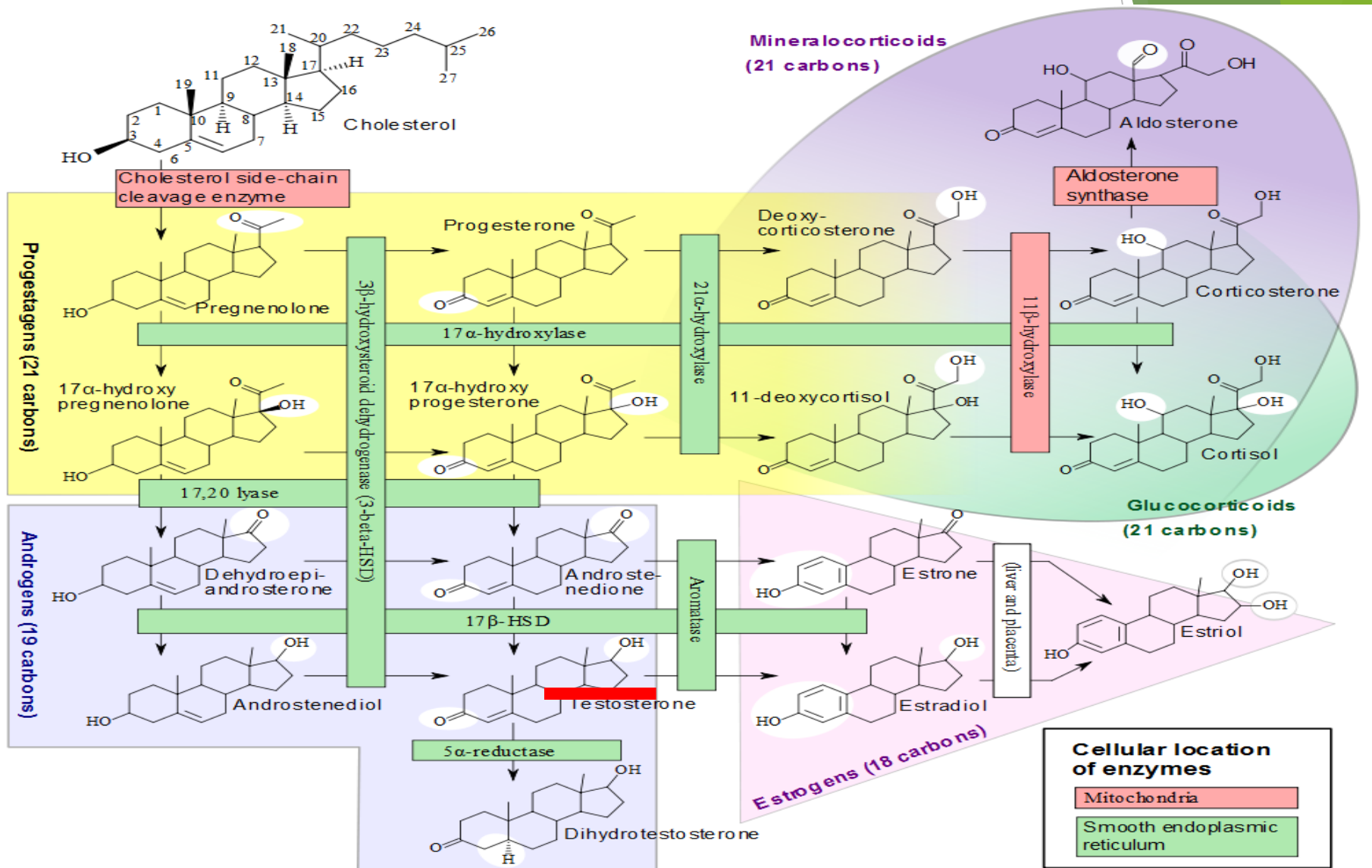


Χαρακτηριστικό : **ο δακτύλιος του στερανίου**

Οι στεροειδείς ορμόνες έχουν λιπόφιλο χαρακτήρα και δεν εναποθηκεύονται στους ενδοκρινείς αδένες.

Στο αίμα μεταφέρονται συνδεδεμένες με πρωτεΐνες.

Human steroid genesis - steroid hormones are fairly complicated structures and are highly interrelated with each



Παραγωγή Τεστοστερόνης

Υποθάλαμος : Παράγει την εντολή έκκρισης γοναδοτρόπων **GnRh**.

GnRh : Αναγκάζει την υπόφυση ν' απελευθερώσει LH και FSH.

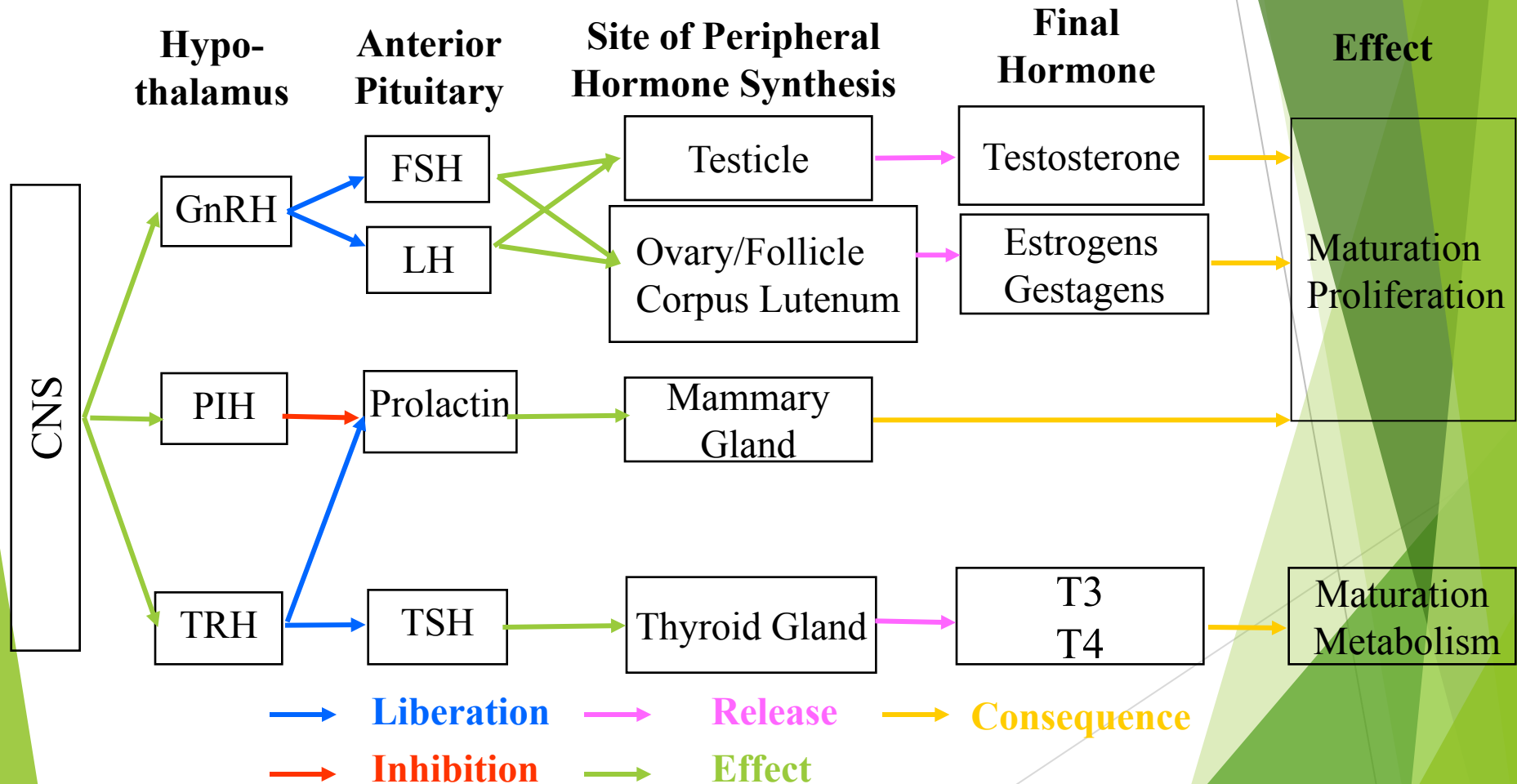
LH & FSH : Φθάνουν στους όρχεις ή στις ωοθήκες.

Γυναίκες : **LH** υποκινεί τις ωοθήκες για **έκκριση T** (25% της ολικής).

Το υπόλοιπο 25% παράγεται στα επινεφρίδια και το 50% σε άλλους ιστούς από τη μετατροπή της Δ4-Ανδροστενδιόνης.

Άνδρες : **LH** ενεργεί στα κύτταρα Leydig των όρχεων, υποκινώντας την **έκκριση T** (90% της ολικής). **FSH & T** : υποκινούν τα κύτταρα Sertoli για παραγωγή σπέρματος.

Endocrine System – it takes up to 5 steps down from the central nervous system to the effect level of the hormone



Ολική – Ελεύθερη Τεστοστερόνη

Η **T που κυκλοφορεί στο αίμα** είναι κυρίως συνδεδεμένη με πρωτεΐνες ειδικά στη δεσμευτική σφαιρίνη των φυλετικών ορμονών **(SHBG) 97%** και σε μικρότερο βαθμό στη λευκωματίνη.

Τα επίπεδά της εξαρτώνται από την ταχύτητα παραγωγής, μετατροπής και μεταβολισμού της και τη συγκέντρωση των δεσμευτικών πρωτεϊνών.

Η **ελεύθερη T** είναι το μεταβολικά ενεργό κλάσμα ικανό να διαχέεται στις κυτταρικές μεμβράνες, να αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς και να ασκεί ανατροφολόγηση (1-2% T).

Σκοπός μέτρησης

Ολική T : επαρκής μέτρηση για το **βασικό έλεγχο του υπογοναδισμού** σε άνδρες και για έρευνα υπερτρίχωσης – αμηνόρροιας, σύνδρομο PCOS ή σοβαρότερα για όγκους επινεφριδίων, ωοθηκών κ.α. σε γυναίκες.

FreeT : μεγαλύτερη ευαισθησία στην εκτίμηση **ήπιων καταστάσεων υπερανδρογοναιμίας & όπου υπάρχουν μεταβολές στη συγκέντρ. SHBG.**

Επίπεδα SHBG μεταβάλλονται: σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις μετά από θεραπευτική αγωγή, από στεροειδή του φύλου και την ινσουλίνη.

Ελεύθερη τεστοστερόνη (free T)

Μελέτες έδειξαν: free T συχνά αυξημένη σε ασθενείς με δασυτριχισμό και με πολυκυστικές ωοθήκες, ενώ τα επίπεδα της ολικής T μπορεί να παραμένουν φυσιολογικά.

Η **άμεση** μέτρηση της free T παρουσιάζει μεθοδολογικά προβλήματα.

Γι' αυτό προτιμώνται :

- Ο δείκτης ελεύθερης τεστοστερόνης **FAI**
- Η υπολογιζόμενη ελεύθερη τεστοστερόνη
- Η βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη

FAI : Free Androgen Index

Τεστοστερόνη ορού x 100 / SHBG

Φαίνεται ως ευαίσθητος δείκτης των PCOS.

Η ακρίβεια στην πρόβλεψη συγκέντρωσης free T αμφισβητείται.

Ανάγκη σωστής μέτρησης της free T

Η αξία της συχνά αμφισβητείται λόγω της ενδοεργαστηριακής αντιφατικότητας.

Μεγαλύτερη εμπιστοσύνη : όταν η free T υπολογίζεται με διάλυση ισοζυγίου (αρκετά δύσκολη μέθοδος και χρονοβόρα μέθοδος) .

Τα αποτελέσματα της free T : πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή.

Μετρήσεις free T εκτελούνται με:

- 1) Τεχνικές διάλυσης (equilibrium dialysis) : Δεν είναι κατάλληλες για χρήση στα περισσότερα εργαστήρια γιατί είναι τεχνικά σύνθετες.
- 2) Direct ραδιοανοσομετρική ανάλυση (RIA) : Μη αξιόπιστος αλλά συχνά εφαρμόσιμος τρόπος ανάλυσης.
- 3) Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούν συγκεντρώσεις ολικής T, SHBG και μερικές φορές αλβουμίνης.
- 4) Μέτρηση της βιοδιαθέσιμης ή μη δεσμευμένης με SHBG τεστοστερόνης.

Ανάλυση της βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης

Άθροισμα της free T και της δεσμευμένης με λευκωματίνες.

✓ Περιλαμβάνει **κατακρήμνιση** με θειικό αμμώνιο για την απομάκρυνση του κλάσματος που είναι συνδεδεμένο με SHBG.

✓ Ακολουθείται είτε από τη **μέτρηση T στο υπερκείμενο**

ή

✓ από την **προσθήκη** μιας ποσότητας ιχνηθέτη (τριτιωμένη T) στον ορό και **προσδιορισμό της ραδιενέργειας** στο υπερκείμενο (RIA –ανταγωνιστική)

Φαίνεται **πιο αξιόπιστος δείκτης για τη μέτρηση free T** από τη FAI, αλλά λόγω της πολυπλοκότητάς της **δεν εφαρμόζεται** στα εργαστήρια .

Βιοδιαθέσιμη τεστοστερόνη

Διαδικασίες μαθηματικού υπολογισμού Ελεύθερης και Βιοδιαθέσιμης T

1) Σύμφωνα με Vermeulen et. al ,1999, (η πιο συνήθης)

CTT : συγκέντρωση Total T

CSHBG: συγκέντρωση SHBG

CALB : συγκέντρωση ALB

CFTcalc : συγκέντρωση υπολογιζόμενης Free T

CBATcalc : συγκέντρωση υπολογιζόμενης Bioavail. T

$$CTT = CFTcalc + CAlb-b,T + CSHBG-b,T$$

$$CBATcalc = CFTcalc + CAlb-b,T$$

Άλλες δημοσιευμένες διαδικασίες μαθηματικού υπολογισμού είναι των:

2) Sodergard et.al.

3) Nanjee et al.

4) Santorius et al. και

5) Lu et al.

Όλες βασίζονται σε υπολογισμούς βάσει της ολικής T, της SHBG και της KD μεταξύ της T, της SHBG και της αλβουμίνης.

Αποτελούν μια **εναλλακτική προσέγγιση**, αφού οι αναλύσεις ελεύθερης και βιοδιαθέσιμης T είναι εργασίες ισχυρής έντασης.

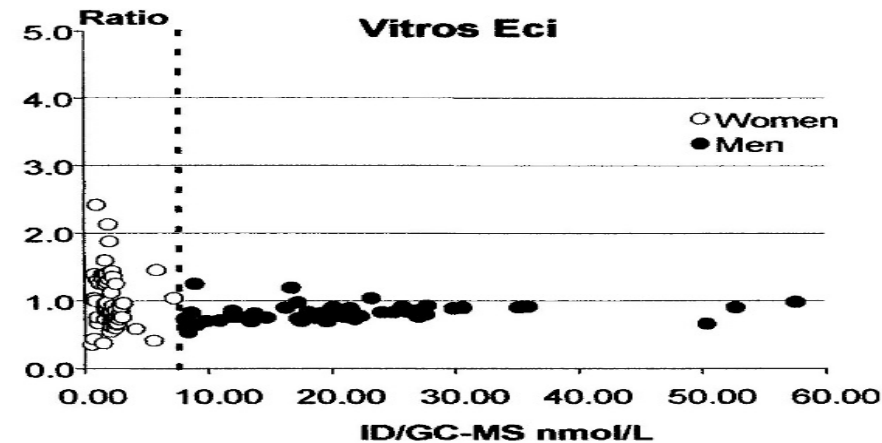
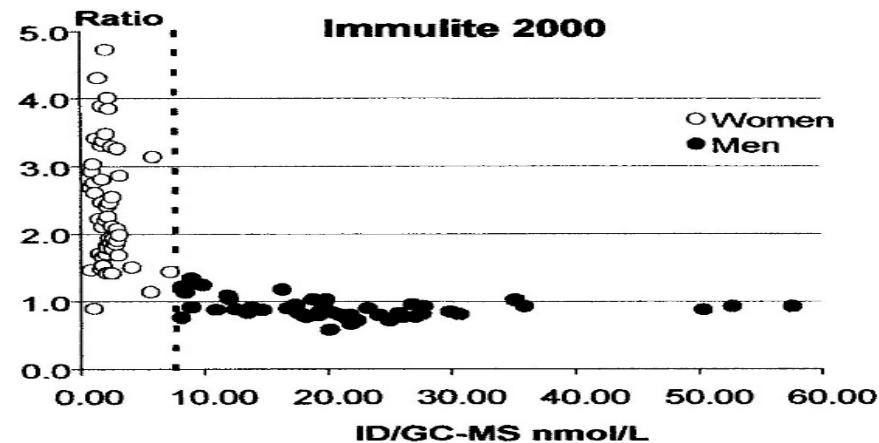
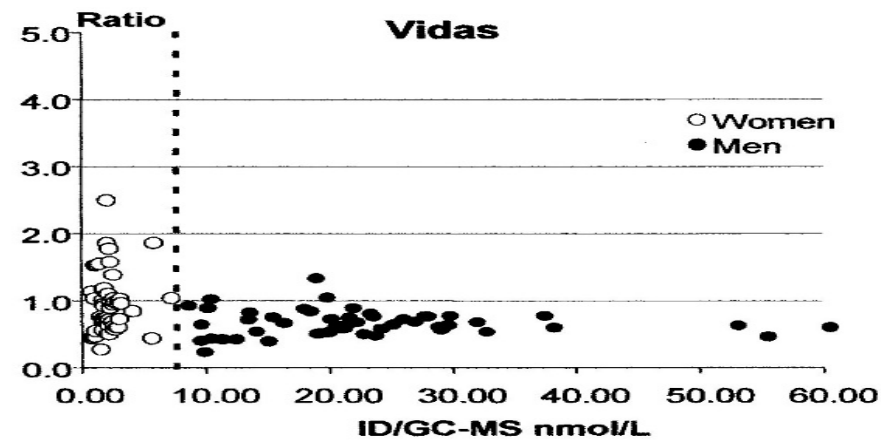
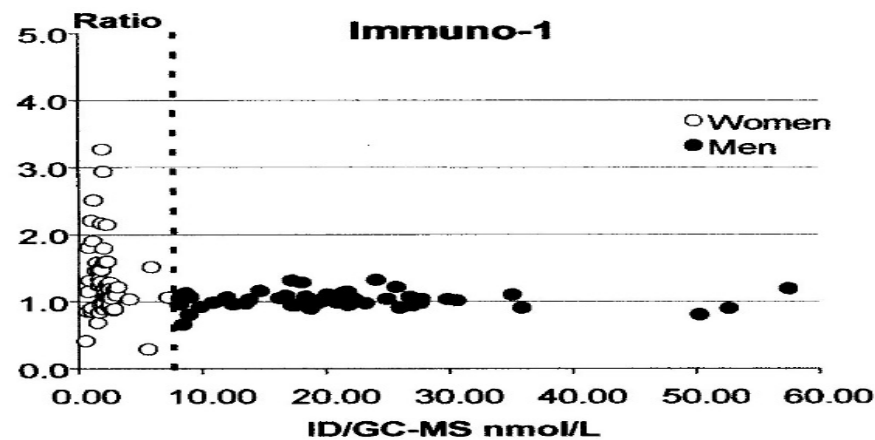
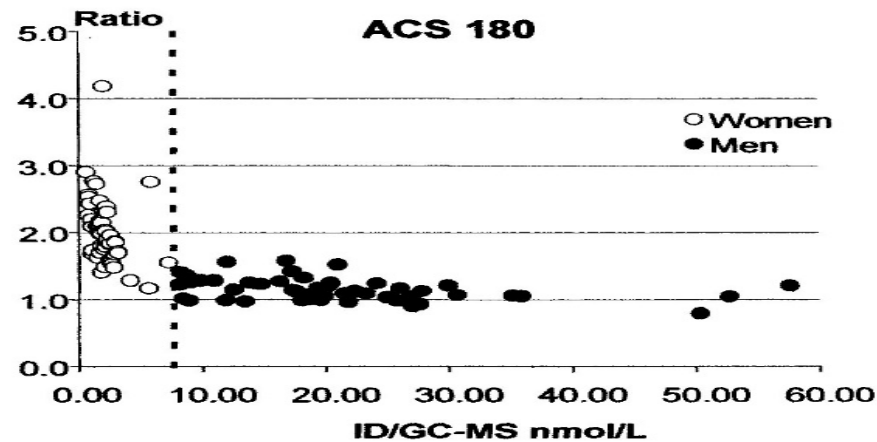
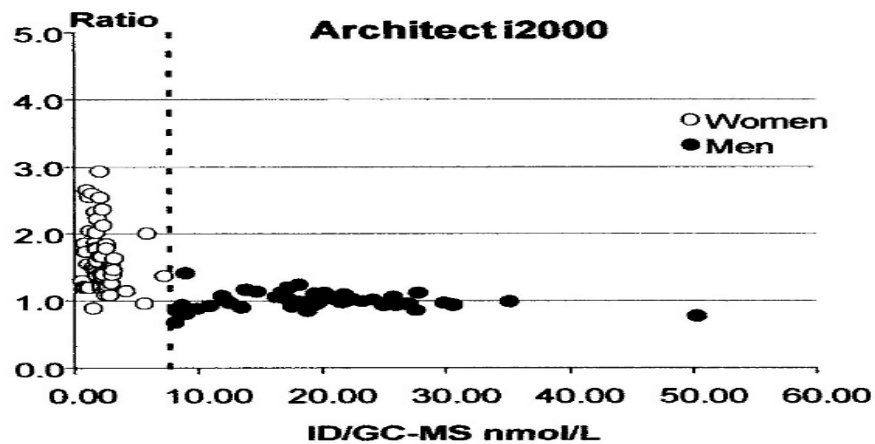
Βιβλιογραφία

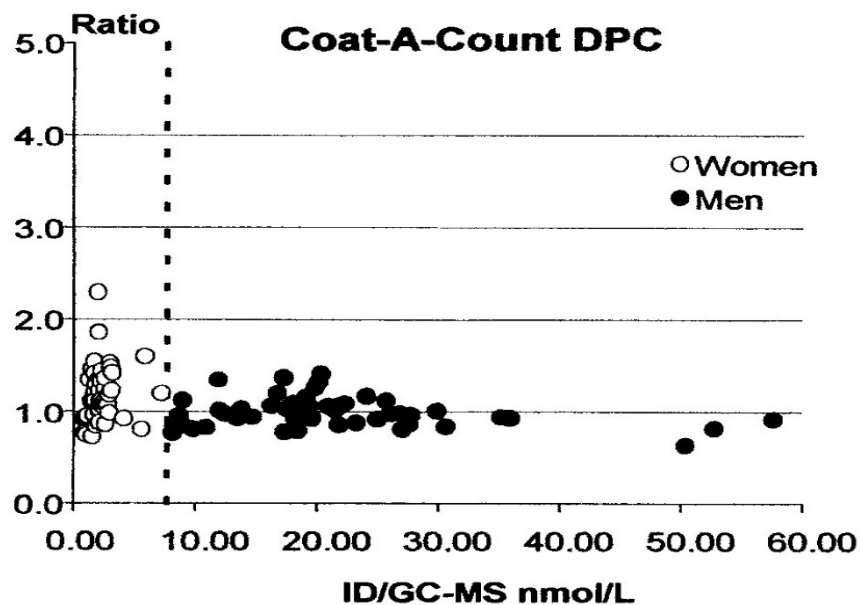
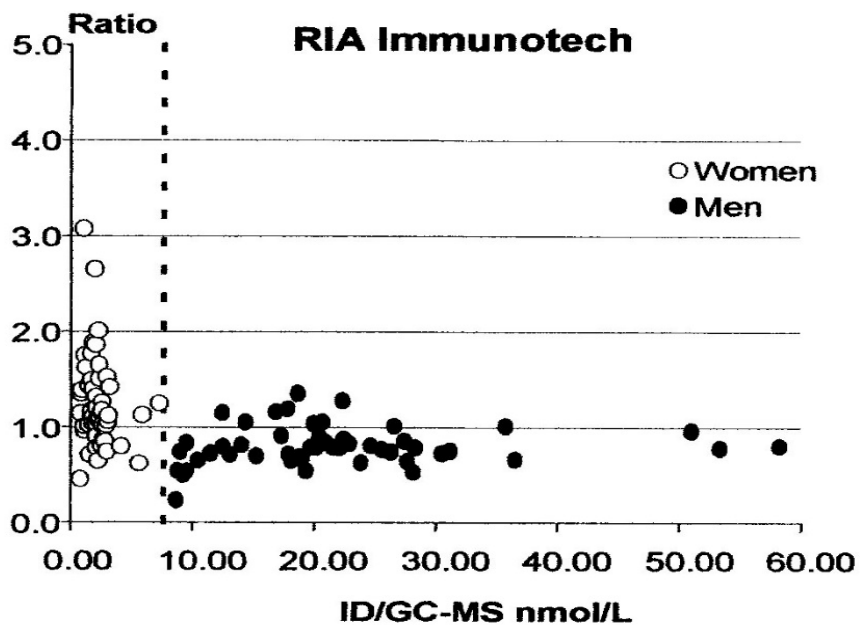
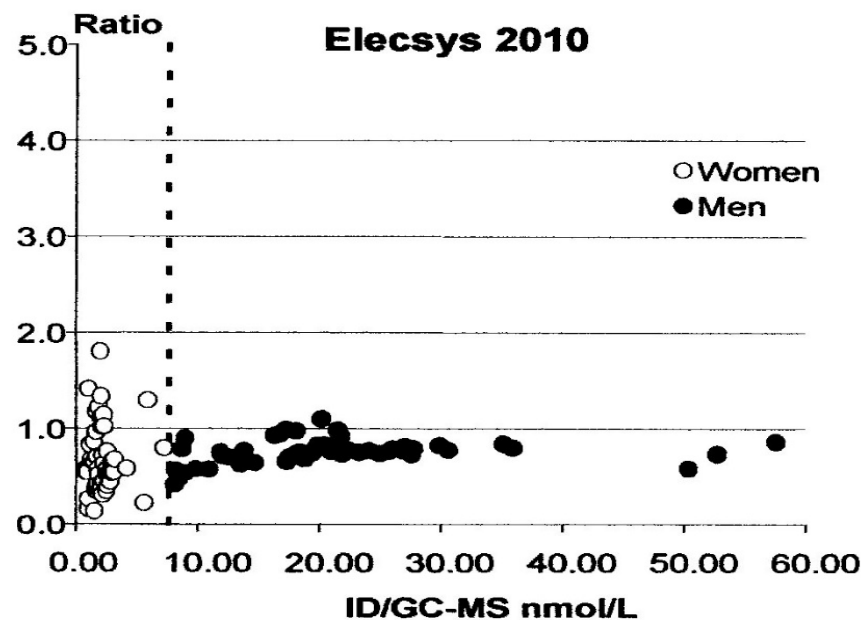
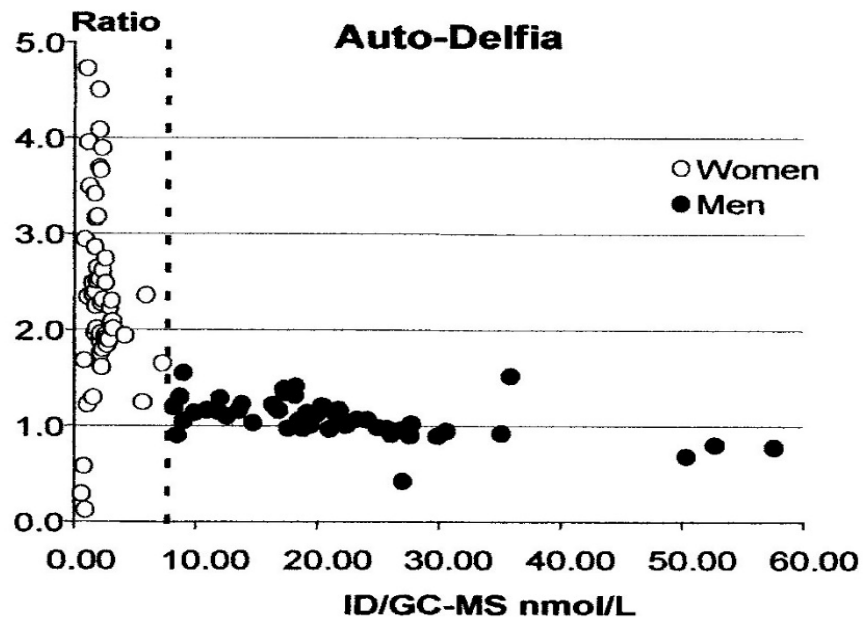
Κάποια δείγματα γυναικών δίνουν ψευδώς υψηλά αποτελέσματα, όταν μετρείται άμεσα η τεστοστερόνη, χωρίς εκχύλιση :

1)Taieb et al. (Clin. Chem. 49:8, 2003)

Μετρήθηκε T ορού γυναικών με **10 ανοσοαναλύσεις** συγκρινόμενες με ID-GCMS, ισοτοπική διάλυση – αερίου χρωματογραφίας και φασματομέτρησης μάζας : μη ανοσοχημική μέθοδος που ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις T .

Συμπέρασμα : καμιά μέθοδος δεν ήταν πραγματικά κατάλληλη για την μέτρηση T ορού γυναικών και παιδιών, με τις περισσότερες να δείχνουν **ισχυρά θετική τάση**.





2) Herold and Fitzgerald (Clin.Chem.49, No8, 2003)

Για πολλές ανοσοανάλυσεις που χάνουν το στόχο κατά 200-500% είναι προτιμότερο να **ΜΑΝΤΕΨΕΙΣ ΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ !!!!!** Είναι φθηνότερη και γρηγορότερη μέθοδος και δεν απαιτείται το αίμα του ασθενούς!!!!!!!!

3) Wang et al. (The Journ. of Clin. End. & Metab., 89, 2, 2004)

Σύγκριναν τη μέτρηση T ορού ανδρών με τρέχουσες εργαστηριακές μεθόδους και LC-MS/MS (υγρή χρωματογραφία - διαδοχική φασματομέτρηση μάζας).

Κακή ακρίβεια και διακρισιμότητα σε συγκεντρώσεις **<3,5 nmol/l.**

Άρα οι τρέχουσες δοκιμασίες δεν είναι κατάλληλες για μέτρηση T ορού σε γυναίκες, παιδιά και υπογοναδικούς άνδρες.

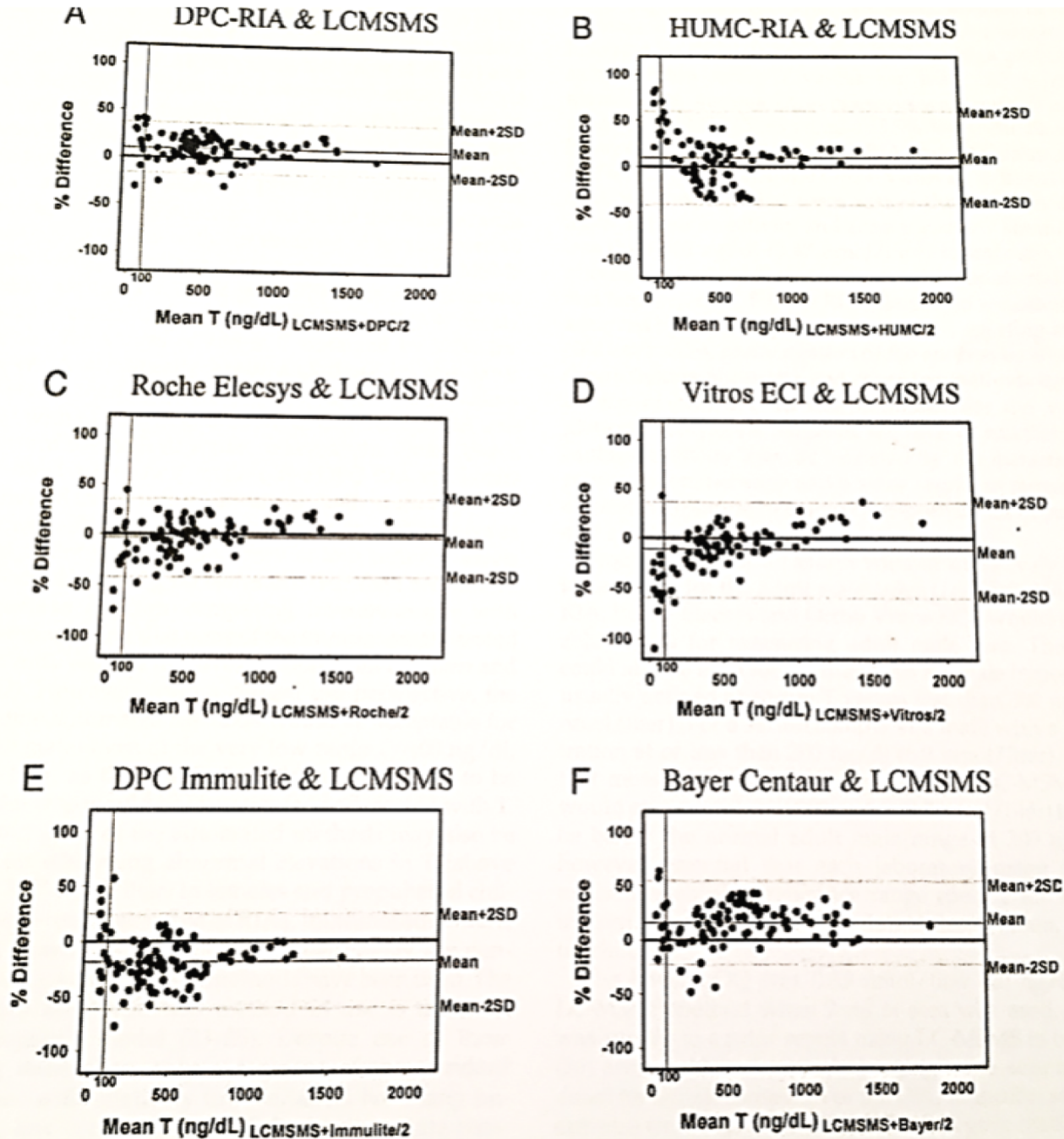


FIG. 3. Plots of percentage differences in serum T levels (test minus LC-MSMS) against the average of the two methods. The **bold solid line** represents 0%, the **light solid line** the mean percentage difference between the methods, and the **dashed lines** 2 SD of the mean percentage difference.

4) Cawood et al. , (Clin. Chem., August 51, 8 , 2005)

Οι ανοσοανάλυσεις είναι μη ικανοποιητικές για τη μέτρηση Τ ορού σε γυναίκες.

Η εναλλακτική τεχνολογία **ID/LC-MS/MS** ισοτοπική αραίωση υγρή χρωματογραφία – διπλή φασματομέτρηση μάζας έχει βελτιώσει την ακρίβεια στη μέτρηση .

Ο μικρότερος όγκος δείγματος, η απλότητα, η ταχύτητα και η “ευρωστία” της μεθόδου την κάνουν κατάλληλη για ανάλυση με **μέγιστη διεκπεραιωτική ικανότητα σε εργαστήρια ρουτίνας!!!! κλινικής χημείας.**

5) Heald AH, Butterworth A. (Ann. Clin. Bioch.,UK, May43,Pt3, 2006)

Οι direct (non extracted) ανοσοαναλύσεις για μέτρηση T μπορεί να δώσουν **ψευδώς ψηλά αποτελέσματα σε γυναίκες**. Οι υποθετικοί παρεμποδιστές απομακρύνονται, εάν η T εκχυλίζεται σε μια οργανική φάση πριν την μέτρηση.

Μελετήθηκαν οι αιτίες ελέγχοντας 1271 θηλυκά δείγματα.

Συμπέρασμα

Η DHEA-S είναι παρούσα σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα

έτσι

ακόμη και με χαμηλή cross-reactivity, η DHEA-S ή ένας από τους μεταβολίτες της μπορεί να **παρεμποδίζει** σημαντικά την ανάλυση T σε ψηλές συγκεντρώσεις,

6) Kushnir MM, Rockwood AI, (Clin.Chem, , USA , Jan.52, 1, 2006)

Οι εμπορικές αναλύσεις για Τ δίνουν **ανακριβή** αποτελέσματα σε **δείγματα γυναικών και παιδιών**.

Έτσι αναπτύχθηκε μια ευαίσθητη & εξειδικευμένη ανάλυση δίδυμης φασματομέτρησης μάζας :

Η Τ εκχυλίζεται με μεθυλικό τριβουτυλικό αιθέρα ώστε να σχηματίζεται μια οξίμη που επανεκχυλίζεται σε στερεή φάση.

Η ενόργανη ανάλυση εκτελείται με API HPLC φασματογράφο μάζας και η μέθοδος **δεν παρεμποδίζεται και έχει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση**.

7) Fernard Labrie et al., (Journ. of Steroid Bioch. and Molec. Biology, France ,vol39, June 2006) :

Τα ανδρογονικά γλυκορονίδια , αντί της T , καινούριοι δείκτες της ανδρογονικής δραστηριότητας γυναικών.

Η μέτρηση ολικού pool ανδρογόνων από τα επίπεδα ορού ADT-G (androsterone glucoronide) και 3^a-diol-G (androstenediol glucoronide) **δεν μπορεί ν' αντικαθίσταται από μια απλή μέτρηση T** ή κάποιου άλλου στεροειδούς όπως DHEA ή DHEA-S .

Τα ευρήματα αυτά έχουν συνέπειες σε γυναίκες με ανδρογονική έλλειψη, οστεοπόρωση, διαβήτη II, παχυσαρκία, σεξ. δυσλειτουργ., απώλεια μυικής δύναμης.

Μετρώντας τα, ταυτοποιούμε περιπτώσεις **αληθινής έλλειψης ανδρογόνων** ώστε να δοθεί κατάλληλη ανδρογονική θεραπεία.

8) J. Kane, J. Middle, M Cawood.(The Association for Clin. Chem. 2007)
Measurement of serum T in women ; What should we do?

Όλες οι ανοσοαναλύσεις για T ορού γυναικών δίνουν **ψευδώς υψηλά** αποτελέσματα σε κάποια δείγματα.

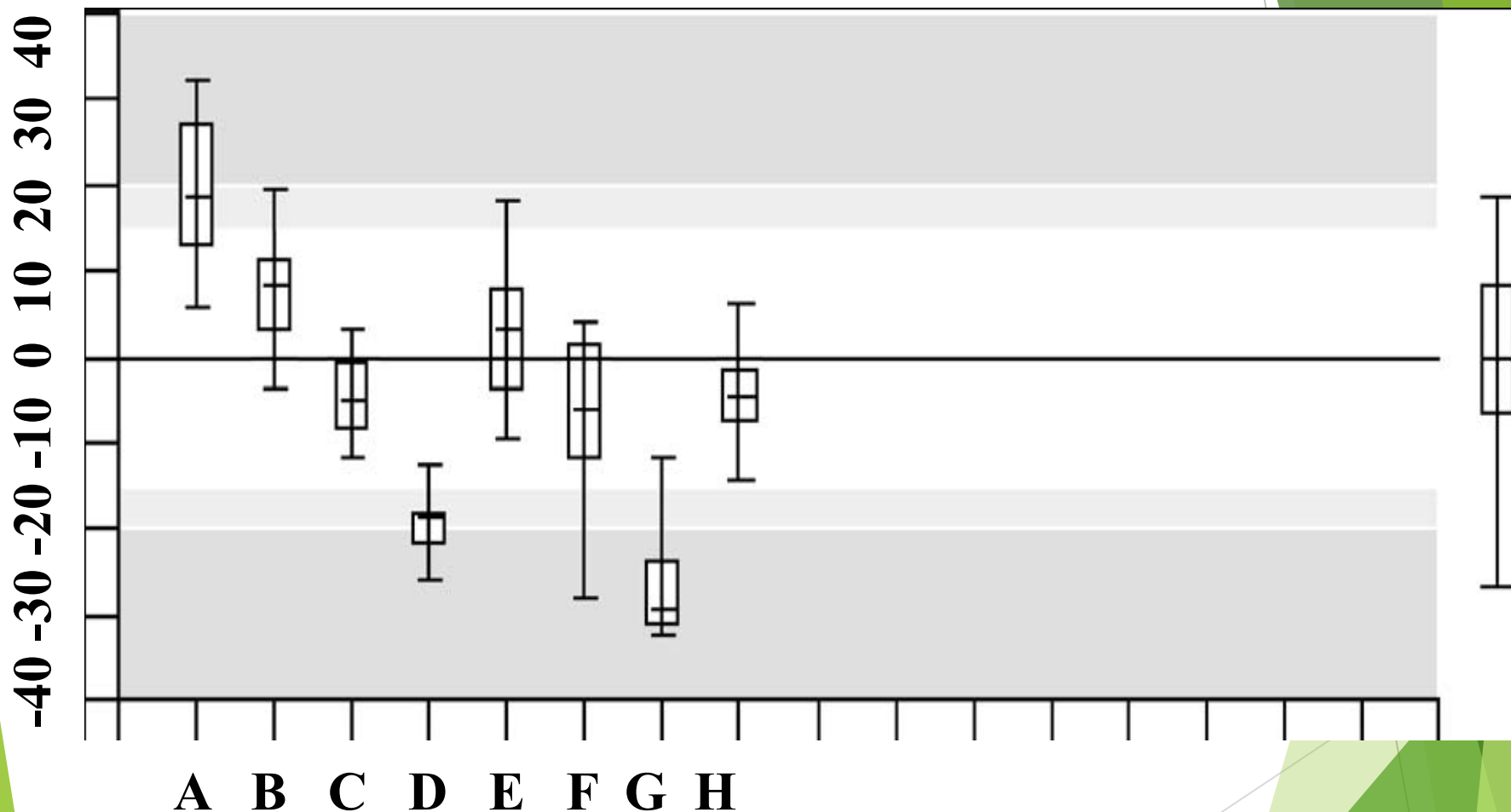
Μεταβλητό και μη προβλέψιμο
πρόβλημα

Αιτίες

Μη ακριβές καλιμπράρισμα και παρεμπόδιση από cross-reacting ουσίες.

Figure 1 : 6 μήνες λήψεις δειγμάτων από UK Neqas (2006) -220.
Bayer (Centauro), **Roche** (E170), **Beckmann** και **DPC** (Immulite) έχουν παρόμοιες τάσεις.
Οι λοιπές μέθοδοι έχουν εντελώς διαφορετικές τάσεις χαρακτηριστικών .
Όλες οι ομάδες έχουν μεταβλητότητα περίπου 10-15% .
Όλες οι μέθ. είναι **direct** (χωρίς εκχύλιση), εκτός F (in-house extraction) και K/κ.

Figure 1



A:Abbott Architect(14u), B:Bayer Centaur(82u), C:Beckmann (16u), D:DPC(6u), E:DPC Immulite(19u), F:In house Extraction(6), G:Orion RIA (5u), H: Roche Elecsys E170(72u).

*Ποια από αυτές τις μεθόδους δίνει το αληθινό αποτέλεσμα ;
Γιατί η συγκρισιμότητα μεταξύ των μεθόδων είναι τόσο φτωχή;*

Στεροειδείς ορμ. : χημικές ολότητες που μπορούν, κατά **99%**, ν' ανακτηθούν καθαρές. Τα πρότυπα διαλύματα ετοιμάζονται με πολύ μικρή αβεβαιότητα για καθορισμένες τιμές.

Ως εκ τούτου:

- ❖ Μέθ. αναφοράς , διαθέσιμες για δεκαετίες, καθορίζουν το περιεχόμενο των βαθμονομητών ορού και των ορών ελέγχου με **ελάχιστο σφάλμα**.
- ❖ **Δίκτυα Εργαστηρίων Αναφοράς Στεροειδών Ορμονών**
Τα μέλη τους ανταλλάσσουν πρωτόκολλα και αποτελέσματα, ώστε να διατηρείται μια αληθινή βάση, την οποία ακολουθούν οι κατασκευαστές.

❖ **JCTLM: Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine**

Συλλέγει μια βάση δεδομένων μεθόδων & υλικών αναφοράς, για να καθορίσει τιμές βαθμονομητών & ορών ελέγχου, ώστε να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις του European Union In Vitro Diagnostic Devices **(EU IVD)**.

❖ Όλες οι αναλύσεις **βαθμονομούνται με ακρίβεια** και η σχέση τους με τις μεθόδους αναφοράς είναι καλά ορισμένη και κατανοητή .

❖ Άρα, οι διαφορές αποτελεσμάτων ειδικά στη μέτρηση T χαμηλών συγκεντρώσεων κυρίως οφείλεται **στις παρεμποδίζουσες ουσίες**, για τις οποίες οι μελέτες είναι ελλιπείς.

Παρεμποδίζουσες ουσίες

- ❖ Τέτοιες ουσίες είναι το **Damazol** (παρεμποδιστής γοναδοτροπίνης με ανδρογονικές και αντιοιστρογονικές ιδιότητες) και άλλα **υδατοδιαλυτά φάρμακα, πρωτείνες πλάσματος, ενδογενή ή συζευγμένα στεροειδή**.
- ❖ Η παρεμπόδιση **οφείλεται** μάλλον σε συζεύξεις στεροειδών παρούσες στον ορό ασθενών, που αντιδρούν με αντισώματα T στις άμεσες αναλύσεις.
- ❖ Είναι **υδατοδιαλυτές** και έτσι δεν απομακρύνονται με δι-αιθυλαιθέρα, επιτρέποντας στο δείγμα με μια απλή διαδικασία εκχύλισης με αιθέρα, να είναι μερικώς καθαρό.
- ❖ Τα **στεροειδή φάρμακα** (συχνά στη θεραπεία PCOS), λόγω της υδροφοβικής τους φύσης, **δεν προκαλούν παρεμπόδιση**.

Ανάλυση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων

Σε διαφορετικές μεθόδους, **προβλήματα με την εξειδίκευση** (scatter στη regression line & μη γραμμικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις) και **με τη βαθμονόμηση** (κλίση σημαντικά διαφορετική από 1), είναι υπαρκτά σε διαφορετικό βαθμό **σ' όλες τις αυτοματοποιημένες αναλύσεις** ακόμη και σ' αυτές που είχαν βαθμονομηθεί χρησιμοποιώντας ID-GCMS υλικά.

Μόνο οι χειροποίητες RIA μέθοδοι (DPC Coat-a-Count, Orion Spectria) & η in house εκχύλιση είναι περισσότερο γραμμικές συγκρινόμενες με τη μέθοδο αναφοράς. Έχουν όμως κακή ανάκτηση και σαφήνεια.

ID-GCMS : isotope dilution - gas chromatography mass spectrometry

LC-MS/MS : liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectr.

Συμπεράσματα

- a. Προβλήματα εξειδίκευσης φαίνεται να υπάρχουν στην **απευθείας μέτρηση T σε γυναικεία δείγματα** και σε **χαμηλής συγκέντρωσης ανδρικά δείγματα**, ενώ υπάρχει καλύτερη συμφωνία στα φυσιολογικά ανδρικά.
- b. Η παρέμβαση οφείλεται μάλλον σε **cross-reacting ενώσεις**, που είναι παρούσες και στις γυναίκες και στους άνδρες, αλλά **συγκαλύπτονται** στους άνδρες από τις μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης T.
- c. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό αν η έλλειψη εξειδίκευσης οφείλεται σε **εξωγενή ή ενδογενή παράγοντα**.
- d. Η παρεμποδίζουσα ουσία ή ουσίες είναι σχετικά αδιάλυτες στον αιθέρα, οπότε είναι προτιμότερο **ένα βήμα εκχύλισης ή χρωματογραφίας πριν την ανοσοανάλυση**.

9) Valerie Moal et al., France (Clin. Chimica Acta, Vol 386, Nov-Dec 2007)

2 Αυτοματοποιημένες μη ισοτοπικές αναλύσεις και 3 χειροποίητες ισοτοπικές συγκρίθηκαν με LC-MS/MS.

Και οι 5 ανοσοαναλύσεις έδειξαν μια μέση θετική διαφορά συγκρινόμενες με LC-MS/MS. Όλες **υπερεκτιμούσαν** τα επίπεδα T σε γυναίκες και παιδιά.

10) Steve Shirashi and Christina Wang, (Clinical Chemistry Vol 54, 11, Sep2008)

Ανέπτυξαν μια επιλεκτική και **ακριβή** μέθοδο για ταυτόχρονη μέτρηση T και DHT ορού, εκχύλιση υγρού-υγρού ακολουθούμενη από υγρή χρωματογραφία - διπλή φασματομέτρηση μάζας (LC-MS/MS).

11) Christina Wang et al., (Steroids Vol 73,13, Dec.2008)

Η συλλογή του αίματος σε σωληνάρια επικαλυμμένα με **φθόριο** έδωσε επίπεδα ορού T και DHT , 20 και 15% χαμηλότερα αντίστοιχα ,από αυτά που έδινε το αίμα που είχε συλλεγεί σε απλά σωληνάρια (χωρίς πρόσθετα).

Προσθήκη ενανθικής T σε αίμα που συλλέχθηκε σε απλά σωληνάρια προκαλεί **μια αύξηση επιπέδων T** οφειλόμενη στη δράση εξειδικευμένης εστεράσης στα κόκκινα κελιά. Αυτή η εστεράση αποφεύγεται με χρήση φθορίου.

Επίπεδα DHT ορού ήταν χαμηλότερα όταν μετρήθηκαν με LC-MS/MS αντί RIA. Οι διαφοροποιήσεις ήταν μικρές όταν χρησιμοποιήθηκε φθόριο.

12) Vesper H.W. & Botelho J.C.(Journ. of Steroid Biochem. and Mol. Biology, 121, 2010) :

Review

“Standardization of testosterone measurements in humans”.

Η ερμηνεία

- ✓ των επιπέδων T έξω από τις περιοχές αναφοράς κατά τις κλινικές δοκιμασίες
- ✓ των κατάλληλων cut-offs για κλινικές κατευθυντήριες γραμμές και
- ✓ των επιδημιολογικών μελετών με επιπτώσεις στη δημόσια υγεία.

εξαρτάται από τη **μεταβλητότητα των μετρήσεων** και την **ευαισθησία της ανάλυσης**.

Αν και η τεχνολογία φασματομέτρησης μάζας υπερκάλυψε κάποιες προκλήσεις και βελτίωσε τις μετρήσεις, αντιμετωπίζει **προβλήματα μεταβλητότητας** παρόμοια με των ανοσοαναλύσεων.

Για υπερκάλυψη των προβλημάτων αυτών :

CDCP : Centers for Disease Control and Prevention

NCHE: National Center for Environmental Health

DLS: Division of Laboratory Sciences

ξεκίνησαν

Τυποποίηση (standardization) στεροειδών ορμονών.

Στόχοι

- ❑ Να δημιουργηθεί βάση ακριβείας με αποτελέσματα μετρήσεων T που να είναι ιχνηλάσιμα, ώστε να είναι **συγκρίσιμα** κατά τη διάρκεια των αναλύσεων και **ανεξάρτητα** του χρόνου και τόπου που διεξάγονται.
- ❑ Να εφαρμοστούν **προ-** και **μετά-** αναλυτικοί έλεγχοι και διακριβώσεις για την επιλογή των tests, ερμηνεία και εφαρμογή των περιοχών αναφοράς.

Δεδομένα : από 1000 και πάνω κλινικά εργαστήρια που συμμετείχαν στο CAP (College of American Pathologists)

Περιορισμός του CAP : η μετατρεψιμότητα των υλικών
χαρακτηριστικό που δείχνει κατά πόσο ένα υλικό συμπεριφέρεται σαν ανθρώπινο δείγμα

Αποτελέσματα

Υψηλή μεταβλητότητα :

μεταξύ των εργαστηρίων που εκτελούσαν την ίδια ανάλυση και μεταξύ εργαστηρίων που εκτελούσαν διαφορετικές .

Υψηλά CVs :

προβλήματα στην ορθότητα & στη σαφήνεια.

Μέγεθος Μεταβλητότητας : $hrv/lrv > 2$ (high ref. value/ low ref. value) > 2

Αιτία : η διαφορετική εκτέλεση της ανάλυσης και τα υλικά.

Η σύγκριση επιλεγμένων ανοσοαν. με χρήση ορού δότη και MS αναλ. ως μέθ. σύγκρισης (**gold standard**) για μέτρ. T σε χαμηλές συγκεντρώσεις.



ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑ

Σε διαφορετικές χώρες & χρόνο υπήρξαν διαφορές σε απόλυτες τιμές.

Οι MS αναπτύσσονται & επικυρώνονται στο εργαστήριο (**in-house**), αντίθετα με τις εμπορικές.

Αν και χρησιμοποιούν την ίδια αρχή επισήμανσης, συχνά διαφέρουν στη συλλογή δειγμάτων, στην προετοιμασία & στο καλιμπράρισμα

Έτσι, ***η σαφήνεια-διακριτότητα σε χαμηλές συγκ. T μπορεί να είναι μικρότερη για τις MS απ' ότι για τις ανοσοαναναλύσεις.***

Προετοιμασία δειγμάτων

Οι επιπτώσεις της ιοντικής καταστολής – συγκάλυψης, που προέρχεται από παρουσία λιγότερο πτητικών ενώσεων στο δείγμα, **διαφοροποιούν την αποδοτικότητα** του σχηματισμού σταγονιδίων ή την εξάτμισή τους στην ιοντική πηγή των MS.

Αυτό με τη σειρά του επιδρά στην ποσότητα των φορτισμένων ιόντων στην αέρια φάση, που τελικά φθάνουν στον ανιχνευτή.

Τέτοιες ουσίες είναι **άλατα, ζευγάρια ιόντων, φάρμακα, μεταβολίτες και πρωτεΐνες.**

Καμιά προετοιμασία δεν είναι τέλεια.

Τυποποίηση T

Ανάγκες για :

1. Συγκρισιμότητα δεδομένων μελετών και συστημάτων μέτρησης.
2. Κατάλληλη εκτέλεση αναλ. ειδικά στις χαμηλές συγκεντρώσεις.
3. Γενικά αποδεκτά εύρη αναφοράς για ανθρώπους όλων των ηλικιών και των δύο φύλων και εθνικοτήτων.
4. Παραδοχή του ελέγχου χρήσης όλων των τύπων στεροειδών, όπως ελεύθερη, βιοδιαθέσιμη και ολική.
5. Μεγαλύτερη επίγνωση των προβλημάτων και των περιορισμών των διαφόρων στεροειδών αναλύσεων στην κλινική & ερευνητική κοινότητα

Διαδικασία Τυποποίησης

- ✓ Αναπτύσσεται μια μέθοδος αναφοράς μέτρησης T ορού, για καθορισμό τιμών ολικής T σε ορούς που υπάρχουν στα εργαστήρια και στους κατασκευαστές αναλύσεων.
- ✓ Συνεργασία με CAP για καθορισμό καλιμπραρίσματος της ανάλυσης. Καλύτερη προσέγγιση με ορό δότη.
- ✓ Απαιτούνται μεγάλες ποσότητες υλικών (pool sera) για να υπάρχει δυνατότητα καλιμπρ., ελέγχων ορθότητας, σχημάτων ακριβείας και εξωτερικού ελέγχου ποιότητας.

- ✓ Εφαρμόζεται Μετρολογική Ιχνηλασιμότητα, που εστιάζει σε μια ανάλυση ή σ' ένα εργαστήριο και περιλαμβάνονται έτσι διεργασίες που εκτελούνται από Εργαστ. Αναφοράς, κατασκευαστές αναλύσεων και εργαστήρια – τελικούς χρήστες.

***M.I.:** Ιδιότητα του αποτελέσματος μιας μέτρησης, μέσω της οποίας το αποτέλεσμα συσχετίζεται με μια συγκεκριμένη αναφορά, διαμέσου μιας αδιάσπαστης αλυσίδας διακριβώσεων, που συνεισφέρουν στη μετρητική αβεβαιότητα.*

- ✓ Η προσέγγιση για τυποποίηση αναλύσεων T βασίζεται και σε άλλες επιτυχημένες προσεγγίσεις (για χοληστερόλη και λιπίδια αίματος).

Επιλογή ανάλυσης

Στόχος :

να απαντώνται εξειδικευμένα κλινικά και ερευνητικά ερωτήματα.

Πώς ??

Κατανοώντας πλήρως και σε βάθος τη **βιολογική μεταβλητότητα** και τους **παράγοντες που επηρεάζουν την ανάλυση** στην ορθότητα, στην ακρίβεια κλπ

ώστε

να επιλεγούν εξετάσεις, που να είναι **ακριβείς & σαφείς** και να **διακρίνεται** μια βιολογική μεταβολή από μια πραγματική φυσιολογική αλλαγή.

Οι Ricos et al. πρότειναν **κριτήρια εκτέλεσης ανάλυσης** :

Επιθυμητή έλλειψη ακρίβειας **4,7% - 6,4%** και **συνολικό σφάλμα <14%** στην ολική Τ ορού, για άνδρες & με μη στανταρισμένες μεθόδους.

Φ.Τ. Τ.Τ.

2,4 - 8,36 ng/ml ή 8,64 - 29,0 nmol/l άνδρες (20-50 ετών)
1,93 - 7,40 ng/ml ή 6,68 - 25,7 nmol/l άνδρες (>50 ετών)
0,058 - 0,476 ng/ml ή 0,29 - 1,67 nmol/l για γυναίκες.

Υψηλή μεταβλητότητα ανάλυσης αιτιολογείται από :

- a) Τη μεταβλητότητα των μετρήσεων και
- b) Τις διαφορές χαρακτηριστικών του πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκε.

Τι ορίζουμε ψηλή T σε γυναίκες και χαμηλή T στους άνδρες :

Γυναικεία δείγματα με **$T > 2,4 \text{ nmol/l}$** ή **$T > 0,72 \text{ ng/ml}$**
Ανδρικά δείγματα με **$T < 8,5 \text{ nmol/l}$** ή **$T < 2,5 \text{ ng/ml}$**

πρέπει να επαναπροσδιορίζονται, αφού προηγηθεί εκχύλιση με αιθέρα (in house) ή μέτρηση με μέθοδο μεγαλύτερης ακρίβειας στα χαμηλά δείγματα, όπως LC-MS/MS.

Υπενθύμιση

Τα επίπεδα T : είναι κατά **25% μεγαλύτερα τις πρωινές** ώρες απ' ότι τις βραδινές .

: αυξάνονται μετά από άσκηση και ελαττώνονται μετά από ακινητοποίηση και λήψη γλυκόζης.

13) W. Owen et al., Clin. Chim. Acta (V 411, 15-16, 08/2010)

Select performance characteristics of The Elecsys T II assay.

Η **T II** έδειξε εξαιρετική **ακρίβεια** συγκρινόμενη με 2 αυτοματοπ. ανοσοαν., συγκρίσιμη **αποδοτικότητα** για τιμές ανδρών & βελτιωμένη για τιμές γυναικών, παιδιών και ανδρών με χαμηλές T.

14) G. Brandhorst et al., Clin. Biochem. (44,2011): Multicenter Evaluation of a new automated ECLIA for the quantification of T compared to LC-MS/MS

Βελτιωμένη συμφωνία της αυτοματοπ. ανάλυσης T των Cobas με LC-MS/MS ειδικά για γυναίκες και άνδρες με χαμηλές τιμές T (**Σ.Συσχ.0,89 -0,99**).

Αποτελεί : Εναλλακτική λύση για εργαστήρια χωρίς πρόσβαση σε MS τεχνικές.

Χαρακτηριστικά

Ενδιάμεση ακρίβεια : 2,8-8,4%

LoD : 0,025 ng/ml (0,042nmol/l)

Εύρος μέτρησης : 0,025-15,0 ng/ml (0,087-52 nmol/l)

15) Rhea J.M., French D., Molinaro R.J. (USA Clin. Bioch.46, 2013)

Μετρήσεις TT και fT με LC-MS με 2 διαφορετικές υποδομές

Free T : 1-2 % of total -- Η πιο δραστική μορφή της T ??

Μόνο αυτή διεισδύει στην κυτταρική μεμβράνη για ν' αλληλεπιδράσει με τον ανδρογονικό υποδοχέα .

Αναζητήθηκε τρόπος μέτρησης της fT και της TT σε όλα τα δείγματα με ευαισθησία, εξειδίκευση και ακρίβεια.

Στόχος

Η ανάπτυξη και σταθεροποίηση των LC-MS/MS μεθόδων για απευθείας μέτρηση της fT και της TT.

Αποτέλεσμα

Η 1^η δημοσιευμένη επικύρωση μεθόδων μέτρησης fT και TT σύμφωνα με 2 αναλυτικά συστήματα διαφορετικών αναλυτικών ευαισθησιών.

Το λιγότερο ευαίσθητο σύστημα δεν προσφέρει αναλυτική ή κλινική ευαισθησία σε απευθείας μέτρηση fT και TT.

Συμπεράσματα

- 1) Η προσθήκη **εκχύλισης** και/ή βημάτων **χρωματογραφίας** αυξάνει σημαντικά την ακρίβεια, απομακρύνοντας και διαχωρίζοντας παρεμποδίζουσες πρωτεΐνες και αλληλεπιδρώντα στεροειδή.
- 2) Ακριβά βήματα και **αυξημένες εργαστηριακές απαιτήσεις**.
- 3) Εμποδίζεται η ευρεία εφαρμογή τους σε κλινικά εργαστήρια που οι βασικές ιδιότητές τους είναι η απλότητα και η οικονομία.
- 4) **LC-MS/MS** : πιο ακριβής μέθοδος για ολική T.
- 5) **Υψηλό κόστος** φασματογράφων μάζας.
- 6) Έχουν όμως πολύ χαμηλό κόστος τρεξιμάτων, οπότε τα ακριβά kits θα μπορούσαν να αντικατασταθούν με αυτήν την τεχνολογία.

Συμπεράσματα CAP

1. Υπάρχει **μεγάλη μεταβλητότητα** μεταξύ των εργαστηρίων που εκτελούν την ίδια ανάλυση T , αλλά και μεταξύ εργαστηρίων που εκτελούν διαφορετικές αναλύσεις.
2. Αυτές οι διαφορές αποδίδονται σε **διαφορές στο καλιμπράρισμα** και στην **προετοιμασία δείγματος**.
3. Ιδανικά, το καλιμπράρισμα εκτελείται μ' ένα μετρολογικά ιχνηλάσιμο Standard, που χρησιμοποιείται για **ν' αντιστοιχίζονται** οι τιμές σ' έναν πίνακα υλικών.
4. **Ανακαλύπτοντας την πηγή της παρεμπόδισης** στις αναλύσεις T θα λυθεί ένα puzzle επιστημονικό πρόβλημα.

Μέθοδοι μέτρησης free T (δημοσιευμένες)

I. Διάλυση ισορροπίας με ραδιενεργά επισημασμένο ιχνηθέτη για έμμεση ποσοτικοποίηση free T, βασιζόμενη στην ποσότητα ολικής T, την ικανότητα σύνδεσης με SHBG και με αλβουμίνη και στις σταθερές συνάφειάς τους μ' αυτήν.

Μειονεκτήματα :

- Οι ρύποι του ιχνηθέτη μπορεί να προκαλέσουν λάθη στη μέτρηση.
- Βαρετή μέθοδος για κλινική εφαρμογή

II. Απευθείας μέτρηση με χρήση έξτρα διήθησης (ultrafiltration-UF), για να διαχωριστεί η σύνδεση πρωτεϊνών από τα ελεύθερα κλάσματα.

Συντομότερο πλάνο (1h για UF αντί για 16 hr ισορρ.διάλ.)

Μειονέκτημα:

- Δεν ικανοποιούνται οι απαιτήσεις ευαισθησίας στα χαμηλά επίπεδα T
- Απαιτούνται καλά εκπαιδευμένοι τεχνικοί.

III. Χρήση ισορρ. διάλυσης, ακολουθούμενη από LC-MS/MS για απευθείας μέτρηση free T. Εξάτμιση T με υδροχλωρίδιο υδροξυλαμίνης έχει ήδη αναφερθεί.

Συνήθεις Διαφορές

- ❖ Τα εργαστ. αναφ. χρησιμοποιούν υγρή χρωματογραφία (HTLC) ισχυρής τυρβώδους ροής για εκχύλιση δειγμάτων μέτρησης T, αντί της εκχύλισης υγρού-υγρού.
- ❖ Τα εργαστ. αναφ. χρησιμοποιούν ισορροπία διάλυσης για καθορισμό της freeT, αντί της απευθείας μέτρησης freeT με LC-MS/MS ακολουθούμενη από ισορροπία διάλυσης.

Συμπεράσματα τεχνικών

- ❖ Διαφορές στην **προετοιμασία** των δειγμάτων, στη **βαθμονόμηση** και στην ίδια τη **μέτρηση** καθορίζουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων free και TT.
- ❖ Το βήμα της ισορροπίας διάλυσης **πλεονεκτεί** έναντι της προσθήκης ραδιενεργού ιχνηθέτη, αλλά **μειονεκτεί** όσον αφορά τις γρήγορες εξαγωγές αποτελεσμάτων σταθερής ανάλυσης.
- ❖ Τα επίπεδα T μετρώνται και σε σάλιο και σε ούρα. Είναι φθηνές και γρήγορες μέθοδοι, αλλά μη ακριβείς .

Μέλλον

Ερευνάται η χρήση προϊόντων ταχείας ισορρ. διάλ., που θα ελαττώσουν αυτό το βήμα σε 2 hr.

Επιλογή της σωστής τεχνικής για μέτρηση T

16. Choosing the Right Testosterone Assay, Ask The Expert, AACC, Jing Chao (Clin.Lab.News,1.12.2016)

Διαθέσιμες τεχνικές για μέτρηση ολικής T

Μέθ. Αναφοράς : Ισοτοπική αραίωση φασματομέτρηση μάζας MS

Συνήθεις μετρήσεις : Απευθείας ανοσοαναλ. χημειοφωταύγειας, που απλώς εκτοπίζουν τις δεσμευμένες, από SHBG και Αλβουμίνη, μορφές της T. Τα αποτελέσματα εξαρτώνται από την αποτελεσματικότητα της εκτόπισης.

Υποφέρουν από περιορισμούς :

- ☐ έλλειψη εξειδίκευσης για διασταυρούμενα αντιδρώντα στεροειδή
- ☐ ανεπαρκή αναλυτική ευαισθησία και
- ☐ ασάφεια σε χαμηλές συγκεντρώσεις

Σε κάποια κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν μεθόδους που περιλαμβάνουν **υγρή χρωματογραφία, δίδυμη MS (LC-MS/MS) και αέρια χρωματογραφία MS.**

Αυτές πρέπει να αντιμετωπίσουν τις προκλήσεις :

- ✓ της τυποποίησης και
- ✓ των κατάλληλων διαστημάτων αναφοράς κατανεμημένων ανάλογα με το φύλο και τις ηλικιακές ομάδες.



Διαθέσιμες τεχνικές για μέτρηση ελεύθερης T

Gold Standard : Ισορροπία διάλυσης με :

- a. Φυσικό διαχωρισμό από τις δεσμευμένες με πρωτεΐνες μορφές.
- b. Με υπερφυγοκέντρωση λόγω μικρότερου χρόνου μεταβολής.

Συνήθεις μετρήσεις : Ραδιοανοσοανάλυση με ανταγωνιστική σύνδεση.
Χρήση θειικού αμμωνίου για να κατακρημνίσει τις δεσμευμένες με SHBG μορφές και μέτρηση της Βιοδιαθέσιμης T.

Ισορροπία διάλυσης

Ισότοπα T εισάγονται στο δείγμα του ασθενούς σε μια εκθετικά χαμηλότερη συγκέντρωση από την ενδογενή T.

Συγκέντρωση freeT υπολογίζεται :

με τη συγκέντρωση ολικής T και της κατανομής των ισοτόπων T κατά μήκος της μεμβράνης διάλυσης.

Έτσι, παρακάμπτεται η ανάγκη για ποσοτικοποίηση των εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων T, όπως και των δυναμικών διαταραχών στην ισορροπία .

Πώς πρέπει τα εργαστήρια να επιλέγουν την καλύτερη μέθοδο για μέτρηση T

Με βάση :

- I. Τις κλινικές ανάγκες του εργαστηρίου***
- II. Τη διαθεσιμότητα οργάνων και προσωπικού***
- III. Την οικονομική κατάσταση***

Όσο για την αναλυτική απόδοση συνιστώνται αναλύσεις που ανιχνεύονται σε διεθνώς αναγνωρισμένα πιστοποιημένα κέντρα αναφοράς, όπως ο CAP.

Για μεθόδους με πραγματική μεταβλητότητα στα εργαστήρια, όπως η μέτρηση της fT και της βιοδιαθέσιμης T, τα εργαστήρια πρέπει να εκτελούν **εντατικά εσωτερικούς ελέγχους** πριν την εφαρμογή της ανάλυσης.

Το **CDCP** διατηρεί πρόγραμμα τυποποίησης για να πιστοποιεί δίκτυο εργαστηρίων που χρησιμοποιούν LC-MS/MS με *απόκλιση <6% από τη μέθοδο αναφοράς*.

Κλινική πρακτική

The Canadian Men's Health Foundation συνιστά για μέτρηση *ολικής T το πρωί*, καθώς το screening για την ανεπάρκεια πρέπει να ακολουθείται από *επιβεβαιωτικά τεστ βιοδιαθέσιμης ή free T* σε ασθενείς με διφορούμενα επίπεδα χαμηλής, ολικής T.

Για γυναίκες ασθενείς

The Endocrine Society αναγνωρίζει αυξήσεις στην ολική, ελεύθερη ή βιοδιαθέσιμη T ως ενδείξεις βιοχημικής περίσσειας ανδρογόνων.

Περίληψη-Συμπεράσματα

- ✓ Η T είναι μια ανάλυση που χρησιμοποιείται για χρόνια στην έρευνα και στη φροντίδα του ασθενούς.
- ✓ Τα προβλήματα στην συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων μέτρησης εμποδίζουν τη χρήση των ευρημάτων της έρευνας στις τρέχουσες κλινικές εφαρμογές.
- ✓ Αυτά τα προβλήματα μπορούν να διευθετοποιηθούν με την τυποποίηση, που στοχεύει όχι μόνο στη διαδικασία της αναλυτικής μέτρησης, αλλά και στην επιλογή της εξέτασης και των περιοχών αναφοράς.
- ✓ Η βελτιστοποίηση των αναλύσεων, ώστε ν' απομακρύνουν τους παρεμποδιστές, σε συνδυασμό με τη διόρθωση προβλημάτων καλιμπραρίσματος, θα ωφελήσει τους ασθενείς αλλά και τους γιατρούς.

The Benefits of Optimal Testosterone



Man with Optimal Testosterone



Man with Deficient Testosterone

Ευχαριστώ πολύ για την προσοχή σας

ΑΘΗΝΑ ΠΑΠΠΑ