

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMON DRUZOVIČ

**DIPLOMSKA NALOGA**

Visokošolski strokovni program  
laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMON DRUZOVIČ

**Korelacija rezultatov določitve prostega testosterona v serumu z  
izračunanin prostim androgenim indeksom**

**Correlation of the results of determining free testosterone in serum with  
calculated free androgenic index**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo.

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za vodenje, svetovanje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem tudi prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in doc. dr. Mitji Kosu za svetovanje in njune koristne pripombe pri pregledu diplomske naloge.

Najlepše pa se zahvaljujem mojima staršema in Lidiji za vso podporo, spodbudo, razumevanje in pomoč v času mojega študija.

**Izjava:**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.

Ljubljana, junij 2011

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Član diplomske komisije: doc. dr. Mitja Kos, mag. farm.

# VSEBINA

1. UVOD .....	1
1.1. HORMONI .....	1
1.1.1 . Delitev hormonov .....	2
1.1.2. Sinteza hormonov.....	2
1.1.3. Izločanje hormonov .....	3
1.1.4. Mehanizem delovanja hormonov .....	4
1.2. ANDROGENI.....	4
1.2.1. Biosinteza androgenov .....	6
1.2.2. Izločanje androgenov .....	8
1.2.3. Transport androgenov.....	9
1.2.4. Mehanizem delovanja androgenov.....	9
1.2.5. Metabolizem androgenov .....	11
1.2.6. Motnje v metabolizmu androgenov.....	12
1.2.7. TESTOSTERON.....	15
1.3. HIPOGONADIZEM .....	17
1.3.1. Opredelitev hipogonadizma .....	17
1.3.2. Zdravljenje hipogonadizma .....	20
1.4. METODE ZA DOLOČANJE HORMONOV IN PROTEINOV .....	21
2. NAMEN DELA.....	23
3. MATERIALI IN METODE .....	24
3.1. PREISKOVANCI .....	24
3.2. STATISTIČNE METODE .....	24
4. EKSPERIMENTALNO DELO.....	26
4.1. METODE DOLOČANJA.....	26
1.5. KONTROLA KAKOVOSTI .....	38
5. REZULTATI.....	43
5.1. Predstavitev celotne preučevane populacije glede na starost v letih: .....	43
5.2. Predstavitev preučevane populacije z znižanim celokupnim testosteronom .....	56
6. RAZPRAVA .....	74
7. SKLEP.....	78
8. LITERATURA.....	79

## POVZETEK

Meritve glavnega moškega spolnega hormona testosterona (prostega in biološko aktivnega) so pomembne pri ocenitvi androgenega statusa pri moških, pri tem pa je bistvena njegova pravilna določitev. Na tem področju so se razvile različne tehnike, med katerimi so nekatere zapletene in tako nezaželjene za rutinsko uporabo v diagnostičnih laboratorijih. Pri enostavnejših imunokemijskih metodah pa obstaja negotovost, katere izmed njih so za androgeni status najbolj reprezentativne, saj se je tu pokazala njihova netočnost. Androgeni status lahko ocenimo z meritvijo prostega testosterona ali z računanjem prostega androgenega indeksa iz molarne koncentracije celokupnega testosterona in spolne hormone vezočega globulina, količnik med koncentracijama nato pomnožimo s številom 100.

Namen naše diplomske naloge je bil ugotoviti ali obstaja korelacija med metodo merjenega prostega testosterona (T/P) in metodo računanja prostega androgenega indeksa (FAI). V obdelavo smo vključili moške s potrjeno diagnozo hipogonadizem in moške, ki so v ambulantno prišli na potrditev diagnoze, skupno 217 moških. Tem smo s pomočjo primernih tehnik v krvi izmerili celokupni testosteron, prosti testosteron, albumin in SHBG ter nato še izračunali FAI.

V prvem delu naloge smo izračunali korelacijo med T/P in FAI pri celotni preučevani populaciji moških ter vpliv starosti in albumina na korelacijo med njima. Nato smo populacijo razdelili v tri podskupine glede na starost ter računali korelacijo znotraj podskupin. V drugem delu naloge smo iz celotne populacije v obdelavo izvzeli rezultate moških, pri katerih je bila celokupna koncentracija testosterona znižana (ti so predstavljali 57,6% celotne preučevane populacije) ter nadaljno postopali na enak način kot pri celotni preučevani populaciji.

Korelacija, ki smo jo izračunali med T/P in FAI je bila pozitivna, pri celotni preučevani populaciji nekoliko višja ( $r = 0,661$  pri  $p < 0.001$ ) kot pri populaciji z znižanim celokupnim testosteronom ( $r = 0,476$  pri  $p < 0.001$ ). Ugotovili smo, da je vpliv starosti in albumina na korelacijo med parametroma v našem primeru zanemarljiv.

Z dobljenimi rezultati lahko zaključimo, da je prosti androgeni indeks v primerjavi z izmerjenim prostim testosteronom dober pokazatelj androgenega statusa predvsem pri celotni preučevani populaciji in sicer pri moških starejših od 60 let ( $r = 0,821$  pri  $p < 0.001$ ).

## SEZNAM OKRAJŠAV

**AMP** - adenzin-monofosfat  
**TBG** - tiroksin vezoči globulin  
**LH** - luteotropni hormon  
**FSH** - folikne stimulirajoči hormon  
**mRNA** - informacijska ribonukleinska kislina  
**DNA** - dezoksiribonukleinska kislina  
**DHEA** - dehidroepiandrosteron  
**DHEA-S** - dehidroepiandrosteron-sulfat  
**DHT** - dihidrotestosteron  
**ACTH** - adrenokortikotropni hormon  
**GnRH** - gonadotropin sproščajoči hormon  
**SHBG** - spolne hormone vezoči globulin  
**CBG** - kortizol vezoči globulin  
**hCG** - humani horionski gonadotropin  
**SD** - standardni odklon  
**KV** - koeficient variacije  
**r** - Pearsonov koeficient korelacije  
**IgG** - imunoglobulin G  
**BSA** - goveji serumski albumin  
**TMB** - tetrametilbenzidin  
**EDTA** - etilen diamin tetraacetna kislina  
**BCG** - bromkrezol zeleno  
**T/P** - prosti testosteron  
**T/T** - celokupni testosteron  
**FAI** - prosti androgeni indeks

## 1. UVOD

Vsakemu večceličnemu organizmu sta se razvila medseboj tesno povezana komunikacijska sistema, ki sta nujna za vzdrževanje homeostaze in mu omogočata preživetje. Prvi je živčni sistem, kjer signal potuje po živcih (prenašalci so nevrottransmiterji) in je namenjen predvsem za hitro, kratkotrajno komunikacijo med posameznimi celicami. Drugi je endokrini sistem, kjer so prenašalci signalov hormoni in je namenjen dalj časa trajajoči komunikaciji med več celicami. Endokrini sistem tvorijo žleze z notranjim izločanjem, ki izločajo svoje produkte (hormone) neposredno v kri, in nekateri organi, ki vsebujejo endokrino tkivo (1,2).

### 1.1. *HORMONI*

Hormoni so kemični medcelični glasniki, ki uravnavajo delovanje sosednjih ali oddaljenih celic. Klasično pojmovanje delovanja hormonov je, da se hormon tvori v določeni celici, se izloči, nato pa po krvnem obtoku potuje do ciljnega organa.

Hormoni uravnavajo razmerja v notranjem okolju organizma, vplivajo na vedenje človeka ter prilagajanje na zunanje okolje; pomembni so pri razvoju, rasti in razmnoževanju. Njihova koncentracija v krvi je majhna, imajo pa zato velike kemične in presnovne učinke. Nekateri vplivajo na več različnih tipov celic v telesu (npr. rastni hormon), nekateri pa samo na določena tarčna tkiva oz. celice, ki imajo na svoji površini receptor za ta hormon (npr. adenokortikotropni hormon).

V krvi so lahko prosto raztopljeni ali vezani na beljakovine (več kot 90%). V krvnem obtoku je lahko hkrati več hormonov, ki istočasno delujejo na eno celico ali tkivo. Učinek je lahko nasprotujoč (prisotnost enega zavira delovanje drugega), dopolnjujoč ali permisiven (prisotnost enega hormona dopušča delovanje drugega).

Hormoni lahko delujejo endokrino (nastanejo v endokrini celici in po krvi potujejo do oddaljene ciljne celice), nevrokrino (izločajo jih živčne celice), parakrino (nastanejo v celici določenega tipa in z difuzijo preko intercelularne tekočine delujejo na sosednje celice drugega tipa) in avtokrino (delovanje na sosednjo celico enakega tipa ali delovanje na samo izvorno celico) (1).

### 1.1.1 . Delitev hormonov

Glede na mesto nastanka in način delovanja delimo hormone v skupine:

- a) nevrosekrecijski hormoni;
- b) žlezni hormoni;
- c) izvenžlezni hormoni;
- d) mediatorji.

Po kemijski strukturi hormone delimo v razrede:

- a) peptidni hormoni  
(adrenokortikotropni hormon, angiotenzin, holecistokinin, eritropoetin, gastrin, insulin, somatostatin, oksitocin, parathormon, antidiuretični hormon, prolaktin,...);
- b) proteinski hormoni  
(folikle stimulirajoči hormon, luteotropni hormon, humani horionski gonadotropin, tireotropin,...);
- c) aminokislinski hormoni in amini  
(adrenalin, noradrenalin, tiroksin, trijodtironin);
- d) steroidni hormoni  
(testosteron, estradiol, progesteron, aldosteron, kortizol, vitamin D...) (3).

### 1.1.2. Sinteza hormonov

- a. Sinteza peptidnih in proteinskih hormonov poteka na zrnatem endoplazmatskem retikulumu, enako kot pri večini proteinov. Prvotno običajno nastanejo preprohormoni, ki niso biološko aktivni in se v endoplazmatskem retikulumu razcepijo na manjše prehormone. Nato poteče prenos v Golgijev aparat, kjer se shranijo v sekretorne vezikle. Tu jih encimi razcepijo v manjše biološko aktivne hormone in neaktivne fragmente. Ti vezikli shranjeni čakajo po citoplazemski membrani, dokler s procesom eksocitoze niso izločeni ali v intersticijsko tekočino ali v krvni obtok. Eksocitozo običajno povzroči zvišana koncentracija citosolnega kalcija, ki se poviša pri depolarizaciji plazemske membrane, v drugem primeru pa izločanje hormona iz površine endokrine celice povzroči povišan ciklični AMP. Ker so peptidni in proteinski hormoni vodotopni, se do tarčnih tkiv z lahkoto prenesejo po krvnem obtoku.



- b. Aminski hormoni so derivati aminokislina tirozina. Dve skupini hormonov nastali iz tirozina (hormoni ščitnice in sredice nadledvične žleze), nastaneta s serijo zaporednih encimskih reakcij v citoplazmi žleznih celic. Hormoni ščitnice so vključeni v makromolekule tiroglobulina, ki je shranjen v ščitničnih foliklih. Po odcepitvi od tiroglobulina hormoni difundirajo v kri, kjer se ponovno vežejo na plazemske proteine, posebno na tiroksin vezoči globulin (TBG), ki počasi sprošča hormone tarčnim tkivom. Adrenalin in noradrenalin nastajata v nadledvični žlezi, kjer shranjena v preoblikovalnih veziklih čakata na eksocitozo.
- c. Steroidni hormoni so po kemični strukturi zelo podobni holesterolu in so v večini primerov iz njega tudi sintetizirani. Ker je zaloga hormonov v steroid-proizvajajočih celicah majhna, se steroidi po potrebi hitro sintetizirajo iz holesterolnih estrov in, ker so visoko lipofilni, z lahkoto prehajajo skozi celično membrano v kri (4).

### 1.1.3. Izločanje hormonov

Nekateri hormoni (npr. adrenalin ali noradrenalin) se po stimulaciji žleze izločijo v nekaj sekundah ali minutah in v tem času tudi dosežejo poln učinek. Drugi hormoni (npr. tiroksin ali rastni hormon) pa dosežejo svoj polni efekt v nekaj mesecih (4).

Izločanje hormonov je lahko stalno ali pa v različnih časovnih intervalih. Zelo enakomerno izločanje preko dneva, meseca pa tudi leta lahko vidimo na primeru ščitničnih hormonov  $T_4$  in  $T_3$ , medtem ko ima izločanje luteotropnega hormona (LH) in folikle stimulirajočega hormona (FSH) pri ženskah v menstrualnem ciklusu značilno ciklično krivuljo. Primer dnevnega izločanja hormonov lahko vidimo pri testosteronu, kjer so zgodnje jutranje vrednosti večje od nočnih (3).

Osnovni mehanizem za kontrolo delovanja hormonov je t.i. povratna zveza ali zanka. Tak mehanizem skrbi za ohranjanje določenega ravnovesja oz. za stanje homeostaze v organizmu. Poznamo redko pozitivno in pogosto negativno povratno zanko.

Negativna povratna zanka preprečuje prekomerno aktivnost endokrinega sistema in s tem zagotavlja primerno količino hormonov v določenem tkivu. Sistem deluje tako, da hormon sam ali produkt njegovega delovanja zavre nadaljno izločanje prvega, torej ima negativni povratni efekt. Do tega pride takrat, kadar bi lahko prišlo do prevelike aktivnosti samega

tarčnega tkiva. Primer povratne zanke je kontrola izločanja hormonov na osi hipotalamus-hipofiza-ščitnica (3,4).

#### **1.1.4. Mehanizem delovanja hormonov**

Pogoj za delovanje hormona je, da se le-ta veže s specifičnim receptorjem tarčne celice. To ponavadi sproži zaporedje reakcij v celici, kjer je vsaka naslednja stopnja hormona aktivacijsko močnejša, zato imajo že zelo majhne koncentracije hormona velik efekt. Tarčna celica ima ponavadi nekaj tisoč zelo specifičnih receptorjev in vsak je specifičen za svoj hormon (4).

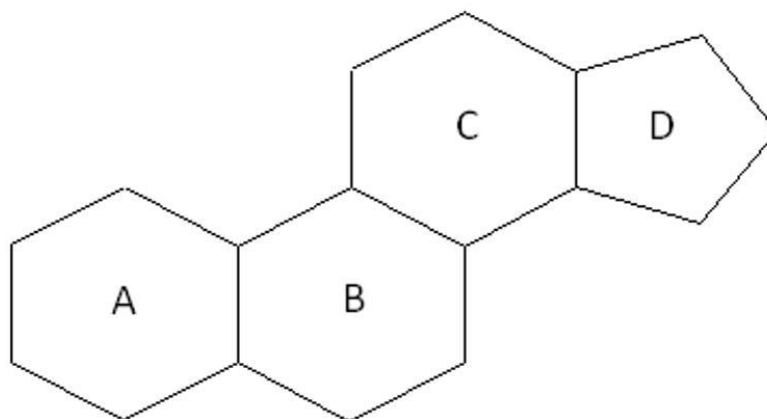
Hormoni (peptidni, proteinski in kateholaminski), ki niso lipofilni, ne morejo prehajati skozi celično membrano tarčnih celic, zato se vežejo na specifične receptorje na celični površini imenovane protein G, s čimer sprožijo aktivacijo sekundarnega prenašalca v citoplazmi, najbolj pogost je ciklični AMP. Hormoni, ki se vežejo z receptorji na zunanji strani celične membrane, vplivajo na metabolične procese v celici in nanjo nimajo direktnega vpliva.

Lipofilni hormoni, posebno steroidni, prehajajo skozi membrane v citoplazmo celic, kjer se vežejo s specifičnimi receptorji v komplekse (ali direktno z receptorji v jedru celice). Ti kompleksi nato prehajajo v celična jedra, kjer aktivirajo DNA (prepis določenih genov za tvorbo mRNA), sledi sinteza novih proteinov (5).

### **1.2. ANDROGENI**

Ženske in moške spolne žleze ter skorja nadledvične žleze izločajo moške spolne hormone androgene. Ti vplivajo na razvoj in vzdrževanje tkiv, ki so posredno ali neposredno povezana z razmnoževanjem (6).

Androgeni so spojine C-19 (ciklopentaperhidrofenantrenski derivati) in so lahko tudi prekurzorji estrogenov. Imajo značilno steroidno strukturo iz treh šestčlenskih (A,B,C obroči) in enega petčlenskega obroča (D obroč) (slika 1).



**Slika 1:** Skeletna struktura ciklopentaperhidrofenantrenskega obroča

Adrenalni androgeni so predvsem dehidroepiandrosteron (DHEA), njegov sulfat (DHEA-S), testosteron ter androstendion in predstavljajo pomembne prekurzorje aktivnih androgenov in estrogenov. Celice testisov izločajo predvsem testosteron, ki je najpomembnejši moški androgen, v manjši meri pa dihidrotestosteron (DHT), DHEA in androstendion. Ovarijske celice proizvajajo pomemben androstendion in ostale androgene, ki prehajajo v estrogene (3).

### BIOLOŠKI UČINKI ANDROGENOV

Učinke androgenov lahko razdelimo v dve glavni skupini, pri katerima delujeta podobna znotrajcelična mehanizma:

1. Učinki, ki vplivajo izrecno na reproduktivne funkcije in sekundarne spolne značilnosti – androgeni učinki;
2. Učinki, ki nasplošno vplivajo na stimulacijo nereproduktivnih tkiv; rast in razvoj – anabolni učinki.

Fiziološke koncentracije androgenov so pomembne za pravilno oblikovanje notranjih in zunanjih moških genitalij v določenem obdobju fetalnega razvoja. V puberteti spodbujajo spermatogenezo in spolno dozorevanje dečkov ter razvoj in vzdrževanje moških sekundarnih spolnih značilnosti (6).

### 1.2.1. Biosinteza androgenov

Biosinteza androgenov se običajno začne iz holesterola, ki je izvzet iz plazme (iz LDL frakcije lipoproteinov sintetiziranih v jetrih), v manjših količinah pa je lahko sintetiziran direktno iz acetil koencima A (Acetil-CoA). Biosinteza poteka podobno v testisih, ovarijih in skorji nadledvične žleze.

Prva in odločilna stopnja pri sintezi vseh steroidnih hormonov je konverzija holesterola v pregnenolom. V skorji nadledvične žleze jo uravnava adrenokortikotropni hormon (ACTH) in angiotenzin II, v ovariju FSH in LH ter v testisu LH.

Večina reakcij, iz holesterola do aktivnih hormonov, se dogaja pod vplivom encima citokrom P-450, ki katalizirajo steroidne hidroksilacije.

Encim P-450<sub>sc</sub> (*side chain cleavage*), ki se nahaja na notranji mitohondrijski membrani, povzroči hidroksilacijo na mestih 20 in 22 ter cepitev holesterolove verige na mestu C 20-22. Zmanjšana aktivnost P450<sub>sc</sub> povzroči zmanjšano sintezo vseh steroidnih hormonov.

Iz pregnenolona oz. progesterona lahko po 17 $\alpha$ -hidroksilaciji nastaneta 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon oz. 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron, ki sta začetni točki za sintezo androgenov in estrogenov. V naslednji stopnji pride do cepitve vezi C 17-20 (17,20-liaza) in nastaneta DHEA iz pregnenolona in androstendion iz progesterona. DHEA je glavni prekurzor vseh spolnih hormonov. Te reakcije katalizirajo encimi P450<sub>c17</sub>, katerih razmerje v testisu in nadledvični žlezi je različno.

Hidroksilacijo na položaju C 21 povzroči P450<sub>c21</sub>, ki je po zgradbi podoben P450<sub>c17</sub>. Nastaneta 11-dezoksikortikosteron oz. 11-dezoksikortizol, ki sta prekurzorja glukokortikoidov.

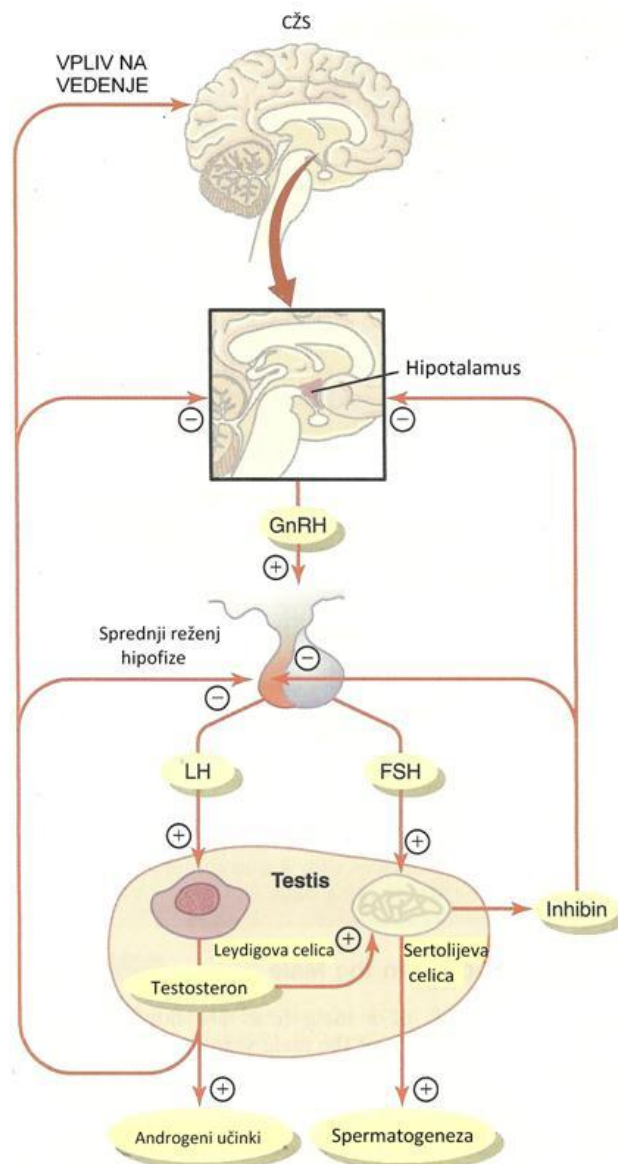
Konverzija pregnenolona preko 17-hidroksipregnelona in DHEA v androstendion, ki je glavni prekurzor testosterona, zahteva oksidacijo 3 $\beta$ -hidroksilne skupine v ketoskupino. Temu sledi premik dvojne vezi z mesta C 5-6 na C 4-5. Obe pretvorbi potekata pod vplivom encima 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (3 $\beta$ -HSD).

Konverzija androstendiona do testosterona poteka pod vplivom 17 $\beta$ -OH-steroid dehidrogenaze (17 $\beta$ -HSD) in se tako kot 3 $\beta$ -HSD nahaja v endoplazmatskem retikulumu.



### 1.2.2. Izločanje androgenov

Izločanje androgenov uravnava hipofizna hormona LH in FSH, katera stimulira GnRH nastal v hipotalamusu, ki se sprošča v zagonih. Izločanje tega (pri moškem) uravnava testosteron in inhibin B, ki ga izločajo Sertolijeve celice v testisih. Pri ženskem spolu FSH spodbuja tvorbo foliklov (in jajčeca) ter stimulira izločanje estrogenov, pri moškem spolu pa spodbuja spermatogenezo. LH zavira ovulacijo in spodbuja izločanje estrogenov in progesterinov ter tako pripravi žensko telo za možno nosečnost, pri moških pa stimulira izločanje androgenov v testisih.



**Slika 3:** Povratna zanka na osi hipotalamus-hipofiza-testis pri moškem. Prirejeno po Guyton AC, Hall JE (4).

### 1.2.3. Transport androgenov

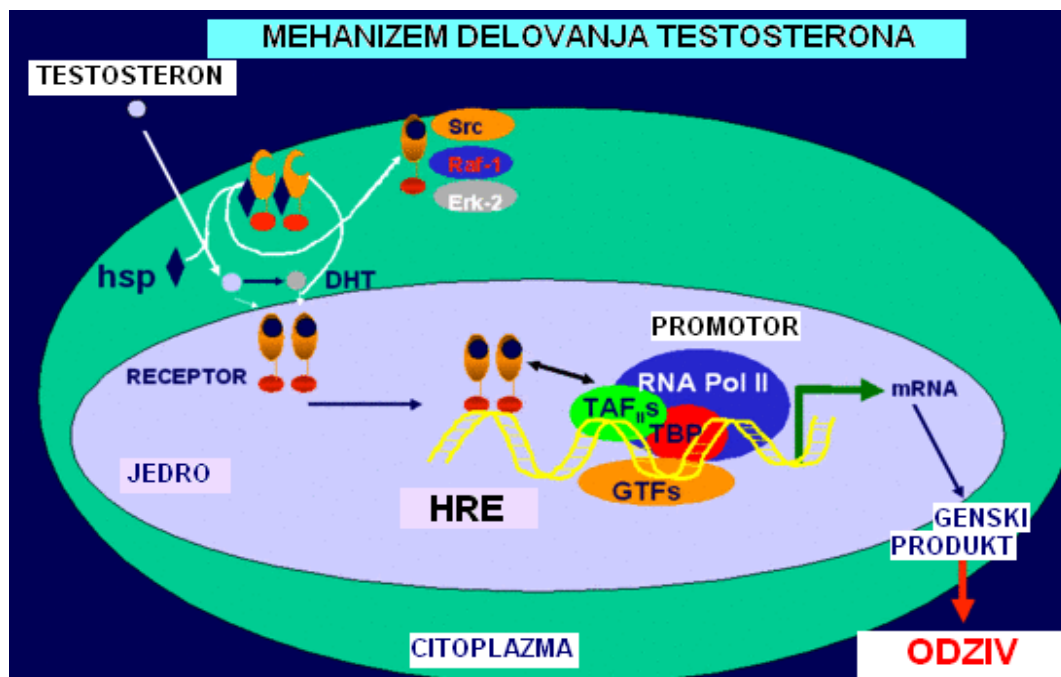
Androgeni so maščobotopni steroidi in so nizkomolekularne snovi, po krvi se prenašajo ali vezani na plazemske beljakovine (nastale v jetrih) ali prosti. Plazemske beljakovine predstavljajo rezervoar hormonov, ki so tako varovani pred metabolizmom in izločanjem preko ledvic. Albumin, ki ima veliko vezavno kapaciteto, predstavlja 60 odstotkov plazemskih beljakovin, vezavna afiniteta steroidov do albumina pa je majhna. Steroidi se z večjo afiniteto vežejo na druge vezalne beljakovine, ki se v plazmi nahajajo v manjših koncentracijah in imajo eno specifično vezavno mesto, takšna sta SHBG in CBG. Na SHBG se vežejo predvsem DHT, testosteron in v majši meri estradiol, ki je pri moških šibko vezan na albumin, na CBG pa kortikosteroidi in progesteron.

Spolni hormoni lahko v ciljno celico vstopajo v prosti nevezani obliki, celicam pa so dostopni tudi šibko vezani na albumin, raven prostih je odvisna predvsem od serumske koncentracije SHBG in CBG (3,6).

### 1.2.4. Mehanizem delovanja androgenov

Po vstopu androgena oz. steroida s pasivno difuzijo v citoplazmo celice se ta z veliko afiniteto veže na hormon-vezavno domeno visoko specifičnega receptorja - ta se po zadnjih ugotovitvah nahaja v jedru (slika 1). Pred vezavo je receptor združen s stresnim proteinom (HSP, ang: *heat shock protein*), ki po vezavi z androgenom nastali kompleks disociira. Receptor-androgen kompleks se potem lahko homodimerizira in veže na hormon odzivni element HRE (*hormone response element* - palindromsko zaporedje DNK) specifičnih genov. Ta interakcija, skupaj s tkivnospecifičnimi transkripcijskimi faktorji, vodi v regulacijo transkripcije genov. Sledi translacija steroid specifične mRNA na poliribosome v citoplazmi, kar predstavlja sintezo genskih produktov (proteinov) kot končni produkt delovanja androgenov (7,9).

Steroidni oziroma androgeni receptorji so identični v vseh tarčnih celicah, vendar androgeni povzročijo različne odzive v različnih tipih celic. To je odvisno od relativne vezalne afinitete androgena za receptor (kar je pogoj za biološko aktivnost), modularne strukture androgenih receptorjev (vsak modul ima svojo funkcijo, od njega je odvisna specifičnost receptorja in vrsta odziva) in koaktivatorjev, ki se aktivirajo ob vezavi hormona na receptor – specifična konformacijska oblika (ti dovolijo stik s kontrolnimi regijami ciljnih genov in spodbudijo prepis) (6).

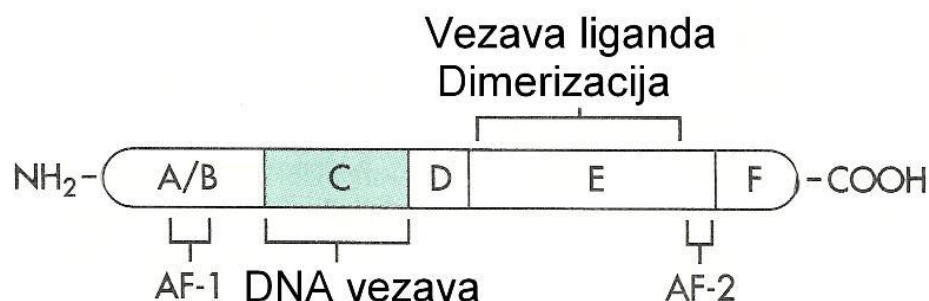


**Slika 4:** Mehanizem delovanja testosterona.

Prirejeno po: (<http://www.endotext.org/male/male3/index.html>) (8).

Struktura jedrnega receptorja:

Zelo variabilen (od receptorja do receptorja) N-terminalni del regije A/B vsebuje od liganda neodvisen aktivacijski segment AF-1. Centralni C del vsebuje 2 cinkova prsta (prvi služi za prepoznavanje določenega dela DNA, drugi pa je vpleten pri dimerizaciji) in predstavlja DNA povezovalno domeno, ki je do 50 % homologna med receptorji. Sledi regija D, ki povezuje dela C in E/F in med njima služi kot tečaj (rotacija okoli osi). C-terminalni del regije vsebuje ligand vezavno domeno. Regija E vsebuje od liganda odvisen aktivacijski segment AF-2 in predstavlja pomembno vlogo pri vezavi hormona; transaktivaciji, dimerizaciji, nastanitvi v jedru in vezavi s stresnimi proteini. Regija F olajšuje dimerizacijo receptorja (7).



**Slika 5:** Prirejeno po Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA (7).

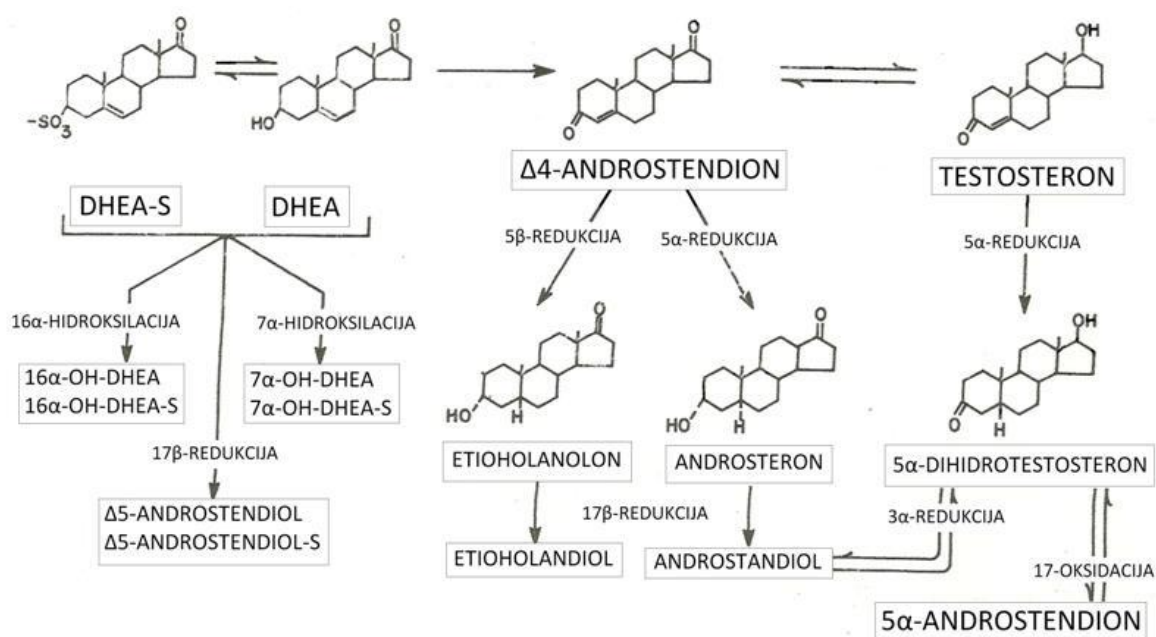


### 1.2.5. Metabolizem androgenov

Androgeni se pretežno izločajo iz telesa kot konjugati z urinom, manjša količina pa se jih izloča z žolčem in nato iz telesa preko črevesja. Katabolizem androgenov poteka pretežno v jetrih (50 do 70%), kjer se pri enem prehodu iz krvi odstrani oziroma pretvori več kot 80% androstendiona in 44% testosterona, ostalo pa v drugih perifernih tkivih. Testosteron se v tarčnih tkivih pod vplivom 5 $\alpha$ -reduktaze pretvori v DHT (ali z aromatazo v estradiol), ki se ga večino reverzibilno inaktivira v 3 $\alpha$ -androstendiol, ostalo pa v 5 $\alpha$ -androstendion. Pri obeh lahko poteče konverzija v androsteron.

Adrenalni DHEA-S se lahko izloči nespremenjen, lahko pa se skupaj z jetrnim in ledvičnim nadaljno metabolizira s hidroksilacijo na mestih 7 in 16 ali transformacijo 17-keto skupine v 17 $\beta$ -hidroksilno skupino. Iz DHEA ireverzibilno nastane androstendion, iz tega nastane testosteron (večinoma v izvenjetrnih celicah) ali pa se njegova 4,5 dvojna vez reducira in nastane androsteron ali etioholanolon. Tidva steroida sta lahko nadaljno reducirana v androstendiol in etioholandiol.

Vsi ti metaboliti so nadaljno konjugirani do glukuronidov in se jih večina metabolizira v sulfatne derivate, ki so bolj vodotopni in se počasi izločajo iz telesa. Približno 1% dnevno proizvedenega testosterona se (dnevno) izloči v obliki glukuronida, večino ostalega pa v 17-ketosteroidni obliki (9).



**Slika 6:** Pomembnejše poti v metabolizmu androgenov. Prirejeno po Felig P (9).

### 1.2.6. Motnje v metabolizmu androgenov

Na hitrost oziroma potek metabolizma androgenov lahko vplivajo številne bolezni, droge in drugi hormoni.

Pomanjkanje encima 21-hidroksilaze:

- Je ena od najbolj pogostih prirojenih napak metabolizma in je posledica mutacije gena, ki kodira ta nadledvični encim (P450c21). Odsotnost tega encima vodi do pomanjkanja aldosterona in kortizola. Nizke koncentracije kortizola v fetusu povzročajo povečano sintezo in izločanje ACTH iz hipofize, ki povzroči adrenalno hiperplazijo (*CAH-congenital adrenal hyperplasia*) in stimulira transkripcijo genov za vse steroidogene encime, posebno za P450scc. Vse skupaj privede do androgenizma (prevelike sinteze androgenov), ki se pri novorojenkah kaže z virilizacijo zunanjih genitalij.

Pomanjkanje encima 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze:

- Je redek vzrok pomanjkanja glukokortikoidov in mineralkortikoidov. Pomanjkanje tega encima pri ženskem zarodku vodi do klitoromegalije in virilizacije zunanjih genitalij, ker nadledvična žleza proizvaja velike količine DHEA, ki je v perifernih tkivih pretvorjen v testosteron. Zmanjšana je produkcija testosterona, pri moškem spolu se genitalije slabo razvijejo, v času pubertete se pokaže hipergonadotropni hipogonadizem z ginekomastijo, brez spermatogeneze.
- Obstajata dva tipa: 3 $\beta$ -HSD tipa I, ki se nahaja oz. izraža v placenti, koži in maščobnem tkivu; 3 $\beta$ -HSD tipa II, ki se nahaja v nadledledvični žlezi in spolnih žlezah.

Pomanjkanje encima P450c17 (17 $\alpha$ -hidroksilaza/17,20 liaza):

- P450c17 je encim, ki ga najdemo v nadledvičnih in spolnih žlezah in ima aktivnost 17 $\alpha$ -hidroksilaze in 17,20 liaze. Pomanjkanje tega encima je zelo redka motnja, zmanjšana je sinteza kortizola, povečano je izločanje ACTH.

Pri moškem spolu se zmanjšana aktivnost encima 17 $\alpha$ -hidroksilaze kaže s slabo ali nerazvitimi zunanjimi genitalijami (z dokaj razvitimi testisi), pri ženskem spolu pa so

notranje in zunanje genitalije dobro razvite. Pri obeh spolih v puberteti pride do napake v spolnem zorenju, pri dečkih se običajno pojavi ginekomastija.

- 17,20-desmolaza je skupaj s  $17\beta$ -HSD potrebna za sintezo testosterona. Pomanjkanje teh encimov se pri nekaterih kaže kot neprimerna virilizacija moškega spola (z ženskimi zunanjimi genitalijami) z odsotnim pubertalnim razvojem in nezmožnostjo sinteze testosterona, pri nekaterih pa s slabo virilizacijo. Pri popolnem pomanjkanju encima P450c17 je preprečena sinteza spolnih hormonov.

Pomanjkanje encima  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze:

- $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza je encim, ki katalizira konverzijo testosterona iz androstendiona, pa tudi konverzijo estradiola iz estrona. V človeškem telesu obstaja 5 izoencimov z manjšo medsebojno podobnostjo. Encim tipa I najdemo v ovariju in placenti in je potreben za konverzijo estrona v estradiol. Encim tipa III najdemo samo v testisih, kjer je potreben za konverzijo androstendiona v testosteron. Novorojenci (s pomanjkanjem encima  $17\beta$ -HSD) se rodijo z ženskimi eksternimi genitalijami, v puberteti nastopi virilizacija, hirsutizem in akne, poveča se falus ter poglobi se glas.

-

Pomanjkanje encima  $5\alpha$ -reduktaze:

- Konverzija testosterona v DHT s  $5\alpha$ -reduktazo je ključna reakcija pri delovanju androgenov in je bistvena tako za tvorbo moškega fenotipa v embrionalnem razvoju, kot za razvoj in rast prostate.
- Obstajata dva izoencima  $5\alpha$ -reduktaze. Encim tipa I se primarno nahaja v jetrih in koži, v fetusu se ne izraža, ima manjši vpliv na kožo novorojenca in se ponovno izraža po puberteti. Encim tipa II se nahaja v koži genitalij, prostati in lasnih foliklih.

Pomanjkanja encima  $5\alpha$ -reduktaze tipa II je avtosomno recesivno obolenje in je posledica mutacije na genu SRD5A2, ki kodira ta encim. Homozigotni moški imajo v popubertalnem obdobju v serumu normalne ali rahlo povečane vrednosti LH in FSH, testosteron je normalen ali rahlo povečan, razmerje med testosteronom in DHT, ki je pri zdravem moškem 1:2, pa je porušeno, kar je posledica pomanjkanja DHT.

Bolniki, ki nimajo 5 $\alpha$ -reduktaze v ciljnih organih, razvijajo obliko nepopolnega moškega psevdohermafroditizma, ki je klinično razvidna po psevdovaginalni perineoskrotalni hipospadiji. Tipične značilnosti ob rojstvu vključujejo zakrnele zunanje genitalije (penis, skrotum, bulbouretralne žleze, prostata), ki se zaradi pomanjkanja DHT niso razvile. Večina teh bolnikov je vzgojena kot ženske, katerim v puberteti nastopi virilizacija, poveča se koncentracija testosterona v serumu in s tem od testosterona odvisne značilnosti (poveča se falus in testisi, zveča se mišična masa, glas se poglobi, nastopi lahko spermatogeneza), vendar od DHT odvisne značilnosti ne nastopijo (rast prostate, akne, rast obraznih in telesnih dlak, plešavost).

Pomanjkanje encima aromataze:

- Aromataza je encim citokrom P450, katerih funkcija je aromatizacija androgenov in proizvodnja estrogenov. Ta pomemben encim, ki se nahaja na endoplazmatskem retikulumu, katalizira konverzijo testosterona v estradiol in konverzijo androstendiona v estron. Aromatazo lahko najdemo v različnih tkivih vključno v placenti, gonadah, možganih, maščevju in dojkah.

Pomanjkanje encima aromataze je redko avtosomno recesivno obolenje, kjer se v fetusu kopičijo nadledvični androgeni, ki se s placentnim 3 $\beta$ -HSD in 17 $\beta$ -HSD pretvorijo v androstendion in testosteron. Posledica tega hiperandrogenizma je virilizacija tako matere kot ploda ženskega spola med nosečnostjo. Prizadete deklice imajo klitoromegalijo, notranje genitalije so normalne vendar z možnimi velikimi cističnimi ovariji, v puberteti ni rasti prsi. Pri moškem spolu lahko v puberteti pride do osteoporoze, kar je posledica pomanjkanja estrogenov, ki so potrebni za normalno rast in razvoj kosti.

Laboratorijske preiskave kažejo nizek estradiol, visok DHEA-S, androstendion in testosteron ter zvišan LH in FSH. Pri nosečnicah je nizek estriol v urinu (9).

### 1.2.7. TESTOSTERON

Testosteron, najpomembnejši moški androgen, je steroid z 19-C atomi. Na mestu med C4 in C5 se nahaja dvojna vez, na mestu C3 keto skupina in na mestu C19 hidroksilna skupina (10).

Pri odraslem moškem več kot 95% testosterona pod vplivom LH izločajo Leydigove celice v modih, manjši del nastane v nadledvičnih žlezah, nekaj pa ga nastane s periferno konverzijo iz androstendiona. Pri ženskah 50% testosterona nastaja znotraj ovarijev (s sintezo ali s pretvorbo iz predhodnikov) in polovica v nadledvičnih žlezah.

66-78 odstotkov testosterona je v krvnem obtoku močno vezanega na SHBG, 20-32 odstotkov je šibko vezanega na albumin in le 1 do 3 odstotke je prostega. (10)

#### Vloga testosterona v organizmu

Testosteron lahko deluje na tarčne organe direktno preko receptorjev za testosteron, lahko pa je pod vplivom  $5\alpha$ - reduktaze pretvorjen v biološko aktivnejši DHT (predvsem v eksternih genitalijah fetusa in prostati odraslega moškega), ali z aromatazo v estradiol. Ima androgene in anabolne učinke:

- Hormon testosteron je kot tak pomemben za rast in razvoj moških reproduktivnih tkiv pri zarodku oziroma plodu. Pomemben je za razvoj Wolffianovih izvodil, semenovoda in seminalnih veziklov ter za spust mod v modnik. S konverzijo v DHT je pomemben za razvoj penisa, modnika, sečnice in prostate;
- med in po puberteti povečano izločanje testosterona povzroči do osemkratno povečanje penisa, modnika in mod, ter spodbuja spermatogenezo;
- testosteron vpliva na povečanje larinksa in na odebelitev glasilk (glas postane globlji);
- z estradiolom deluje na kosti; povečuje gostoto, moč in dolžino kosti (zmanjšano tveganje za nastanek osteoporoze), spodbuja reabsorpcijo kalcija in natrija ter vpliva na zapiranje epifiz dolgih kosti (končna telesna višina);
- vpliva na bazalni metabolizem, zadržuje dušik in tako povečuje sintezo proteinov ter s tem mišično maso (za 50 odstotkov);

- vpliva na metabolizem maščob (povečuje HDL holesterol in zmanjšuje LDL holesterol);
- pozitivno vpliva na spolne funkcije; povečuje libido, potenco in vpliva na erektilne funkcije;
- deluje na androgene receptorje znotraj možganov, kjer (s konverzijo v DHT in estradiol) pozitivno vpliva na kognitivne funkcije, načrtovanje, reflekse, vedenje, budnost, spomin in na razpoloženje;
- vpliva na razpored dlak po telesu (pubično področje, po prsih, po licu), na bolj grobo in mastno kožo (pojav aken) ter plešavost;
- stimulira eritropoezo v kostnem mozgu in s tem povečuje hematokrit;
- z estradiolom in DHT zavira sintezo SHBG, CBG, TBG in sproščanje gonadotropinov (11).

### **Prosti testosteron**

Prosti testosteron je v organizmu biološko najaktivnejša oblika testosterona. V krvnem obtoku ga je 1-3 % in predstavlja, zraven testosterona vezanega na albumin, biološko aktiven testosteron.

#### **1.2.7.1. SPOLNE HORMONE VEZOČI GLOBULIN (SHBG)**

SHBG (*sex hormone binding globulin*) znan tudi kot testosteron-estrogen vezoči globulin (TeBG - *testosterone-estrogen binding globulin*) in spolne steroide vezoči protein (SBP- *sex steroid binding protein*) je dimerni glikoprotein, ki ga v največjem obsegu tvorijo jetra. Njegov gen leži na krajšem kraku kromosoma 17 in je zgrajen iz dveh transkripcijskih enot, katerih prva služi za sintezo plazemskega SHBG v hepatocitih jeter. Vsebuje 4 bistvene cisteinske ostanke, ki so medsebojno povezani z disulfidnimi vezmi (dvodimenzionalna struktura).

Ima eno vezavno mesto in specifično veže  $17\beta$ -hidroksisteroide kot so testosteron, DHT in estradiol, največjo afiniteto ima do DHT. SHBG uravnava koncentracije prostih spolnih steroidov v krvi in njihovo dostopnost ciljnim tkivom, je pa tudi integralni del membranske steroidne signalne poti v odzivnih tkivih kot sta prostata in dojke.

Koncentracijo SHBG povečujejo estrogeni (5 do 10 krat), starost, hipertiroidizem, ciroza jeter, hipogonadizem,.. Znižujejo pa jo androgeni in njihovi metaboliti (2-kratno), glukokortikoidi, akromegalija,..(12,13).

### **1.3. HIPOGONADIZEM**

Hipogonadizem lahko obravnavamo kot samostojno bolezensko sliko ali v sklopu pozne pubertete pri moških in ženskah. Označuje ga nezadosten ali nikakršen razvoj spolnih organov in odsotnost sekundarnih spolnih znakov, kar je posledica pomanjkanja androgenov (testosterona) pri moških in estrogenov pri ženskah (6).

#### **HIPOGONADIZEM PRI MOŠKEM**

Hipogonadizem je stanje o katerem govorimo, kadar moda ne delujejo zadostno, ne izloča se dovolj testosterona in/ali se ne tvori dovolj semenčic. Nastop motnje pomanjkljivega delovanja androgenov med puberteto privede do evnuhoidnega sindroma, kar pomeni, da imajo bolniki visok glas, zmanjšana je mišična masa in s tem moč, so pomanjkljivo poraščeni in imajo tanjšo in mehkejšo kožo, prisotna je evnuhoidna skeletna gradnja, spolni organi so slabo razviti, odsotni so libido, erekcija in potencia. Če motnja nastopi po puberteti (pri odraslem moškem), so sekundarni spolni znaki že razviti, v ospredju so zmanjšan libido, impotenca in izguba moči (1).

#### **1.3.1. Opredelitev hipogonadizma**

Hipogonadizem pri moškem opredelimo kot primarni, sekundarni in pozni nastali.

##### **1.3.1.1. Primarni (hipergonadotropni) hipogonadizem**

Vzrok primarnega (hipergonadotropnega) hipogonadizma je prizadetost mod, v krvi so povečane koncentracije gonadotropinov (LH in FSH), testosteron pa je znižan (ponavadi pod 100ng/L). Najpogostejše oblike so prirojena ali pridobljena okvara v delovanju mod, Klinefelterjev sindrom s kariotipom 47,XXY, ki pogosto vodi v ginekomastijo, defekti genov, ki kodirajo pomembne encime v biosintezi testosterona (gen CYP17A1, HSDB3) . Pogosta je duševna zaostalost in socialna neprilagodljivost (10,14).

### **1.3.1.2. Sekundarni (hipogonadotropni) hipogonadizem**

Kadar je znižan testosteron in znižani gonadotropini, govorimo o sekundarnem (hipogonadotropnem) hipogonadizmu. V povprečju prizadene enega na 10,000 moških in povzroči, da je spermatogeneza slaba ali je sploh ni, pa tudi motnje v steroidogenezi. Najpogosteje so vzrok okvare hipotalamusa ali hipofize; hipofizni tumorji in posledice njihovega zdravljenja, idiopatski hipogonadotropni hipogonadizem (mutacije genov KAL1, FGFR1 in GNRHR) ali redki hipotalamični sindromi. Vzrok za nastanek sekundarnega hipogonadizma z znižanim testosteronom so lahko tudi kronična obolenja: sladkorna bolezen, revmatizem, ateromatoza, okvara jeter, ledvic in pljuč (6,16).

### **1.3.1.3. Pozno nastali hipogonadizem ali andropavza**

Pozno nastali hipogonadizem je skupek simptomov, ki se pojavljajo pri zrelih moških kot posledica usihanja moškega spolnega hormona testosterona. Začne se pojavljati po 40. letu, njegova pojavnost pa narašča z naraščanjem starosti. Večina simptomov je nespecifičnih, saj se lahko pojavijo tudi pri različnih drugih boleznih ali stanjih. Glede na to, da se pozno nastali hipogonadizem pri moški in menopavza pri ženskah razlikujeta predvsem po nastanku (menopavza nastopi hitro, simptomi so bolj opazni, intenzivni in moteči), andropavza ni primeren izraz (6,14).

Zmanjšano izločanje testosterona, ki je vzrok pozno nastalega hipogonadizma, nastopi okrog 35. leta. Izločanje se vsako leto zmanjša za 1,6 %, prostega testosterona pa je manj za 2-3 %, kar je posledica zvišane ravni SHBG. To pomeni, da se biološki učinki testosterona zmanjšujejo bolj kot se zmanjšuje koncentracija celokupnega testosterona, ki ga ponavadi merimo.

Klinični znaki hipogonadizma pri odraslem moškem:

- Zmanjšan libido in slabše ali odsotne erekcije, manjše število semenčic v izlivu in posledično zmanjšana plodnost
- Zmanjšana mišična masa in moč
- Zmanjšana mineralna kostna gostota (osteopenija in osteoporoza - povečana nevarnost zlomov)



- Manjša telesna poraščenost, tanjša suha kuža (zmanjšano izločanje loja)
- Povečano kopičenje visceralnega maščevja (predvsem v trebuhu)
- Povečana neodzivnost na inzulin
- Anemija
- Nihajoče razpoloženje, depresija, razdražljivost, nespečnost, motnje pomnjenja in pozornosti, utrujenost
- Navali vročine, ki lahko nastopijo, kadar so koncentracije testosterona izredno nizke.

Nižje koncentracije testosterona so pri moških povezane z večjo splošno in srčno-žilno umrljivostjo in večjim zbolevanjem za sladkorno boleznijo tipa 2.

#### Opredelitev hipogonadizma

Ob prisotnih simptomih (bistven je upad libida) in kliničnih znakov hipogonadizma se zdravljenje začne, kadar je serumska koncentracija testosterona znižana pod 8 oz. 10 nmol/L. Simptome semikvantitativno opredelimo s vprašalnikom AMS, ki ga uporabimo tudi za oceno učinkov nadomestnega zdravljenja s testosteronom. Kri za določitev se vzame med 7. in 11. uro zjutraj, ker so koncentracije testosterona zjutraj najvišje (izločanje v značilnem dnevno-nočnem ritmu, zjutraj ob 8. so za 25% višje od 8. zvečer). Znižane koncentracije moramo potrditi vsaj dvakrat. Kadar je znižan celokupni testosteron, določimo v serumu ali slini še prosti testosteron ali SHBG in prosti testosteron izračunamo.

Vzrok znižane koncentracije testosterona opredelimo z določitvijo gonadotropinov, izključimo hiperprolaktinemijo, ki je lahko zaradi zaviranja hipofizno-gonadne osi vzrok hipogonadizma. Pri pozno nastalem hipogonadizmu je moteno delovanje hipotalamusa, ki izloča manj GnRH, posledično je zmanjšano izločanje LH v hipofizi (14).

Mesto okvare določimo z dinamičnimi testi. Uporabljamo preskus s hCG (humanim horionskim gonadotropinom), preskus z GnRH in klomidinski preskus. Ko je potrebno opravimo še radiološke preiskave hipofize in kosti, kromosomske analize, preskus vonja, spermogram in teste za oceno hipotalamično-hipofizne funkcije (1).

### 1.3.2. Zdravljenje hipogonadizma

Zdravljenje z gonadotropini:

Bolnike s hipogonadotropnim hipogonadizmom zdravimo s hCG, analogi LH; humanim menopavznim gonadotropinom (hMG), ali prečiščenim FSH. Uporablja se tudi dajanje GnRH s črpalko, ki v zagonih sprošča majhne odmerke hormona v kri.

Zdravljenje z androgeni:

Ker se testosteron iz prebavil slabo absorbira, pri prehodu skozi jetra pa se ga večina metabolizira, uporabljamo za zdravljenje njegove estre v obliki intramuskularnih preparatov. Večina vnešenega testosterona se aromatizira v estradiol, ki negativno vpliva na sproščanje GnRH, LH in FSH, zato večje odmerke testosterona uporabljamo za kontracepcijo, saj spermatogenezo zavirajo in ne spodbujajo.

Za zdravljenje (predvsem pozno nastalega hipogonadizma) najpogosteje uporabljamo injekcije testosteron undekanoata in gel za lokalno aplikacijo z 1 % testosteronom. Bolniki prejemajo undekanoat na 10 do 14 tednov globoko v mišice, gel pa si nanesejo na nadlahti vsako jutro. Odmerki so prilagojeni vsakemu posamezniku posebej, glede na koncentracije testosterona med zdravljenjem.

Zdravljenje pacientov s hipogonadizmom je odvisno od »njihove želje do plodnosti«. Če te želje ni, je dovolj zdravljenje z nadomeščanjem testosterona. Pomembno je tudi, da zaradi tveganja okvare jeter ne uporabljamo C17 alkiliranih androgenov.

Ker nadomeščanje testosterona povečuje nevarnost razraščanja raka na prostati, se pred zdravljenjem opravi pregled pri urologu, ultrazvok prostate in določitev specifičnega prostatičnega antigena (PSA), da se izključi možnost raka na prostati. Ker testosteron spodbuja eritropoezo, je pomembno, da se določi izhodiščna vrednost hematokrita, ki potem med zdravljenjem ne sme preseči meje 0,52 (zaradi povečane viskoznosti krvi se lahko poslabša mikrocirkulacija, kar lahko vodi do zamašitev majhnih in tromboze večjih žil) (6,15).

#### **1.4. METODE ZA DOLOČANJE HORMONOV IN PROTEINOV**

Najbolj pogoste in uporabne metode za merjenje hormonov so kompetitivni in nekompetitivni imunski testi (ang. *immunoassay*), ki temeljijo na reakciji med antigenom in protitelesom. Protitelesa reagirajo z določenimi hormoni, ki se v plazmi, serumu, seču ali slini, nahajajo v zelo majhnih koncentracijah (od mikromolarnih pa do pikomolarnih). Na tem področju so se razvile različne tehnike, kjer se eden od reaktantov (antigen ali protitelo) označi z radioaktivnim izotopom, z encimom ali izoluminolom ali derivatom (kemiluminiscenčne reakcije). Te tehnike se ponavadi lahko naredijo dovolj občutljive in dovolj specifične za določene hormone, ki jih razlikujejo od prekurzorjev in hormonskih metabolitov (3,7).

Za določanje naših parametrov v serumu so se razvile naslednje metode:

A. Za celokupni in prosti testosteron:

- IMUNOKEMIČNE METODE (EIA, RIA)  
(Opis metode: Kaplan A.: Clinical Chemistry, 4th edition; 109-112)
- IMUNOMETRIČNE METODE (ELISA) (Opis metode:  
<http://sl.wikipedia.org/wiki/ELISA>)
- KROMATOGRFSKE METODE (tekočinska in plinska kromatografija v kombinaciji z masno spektrometrijo (GC/MS)) (Opis metode: Kaplan A.: Clinical Chemistry, 4th edition; 74-83)
- ABSORBCIJSKA SPEKTROFOTOMETRIJA (UV, IR) (Opis metode: Kaplan A.: Clinical Chemistry, 4th edition; 66-70)
- Precipitacijska metoda z amonijevim sulfatom (Opis metode:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Ammonium\\_sulfate\\_precipitation](http://en.wikipedia.org/wiki/Ammonium_sulfate_precipitation))
- ravnotežna dializa (referenčna metoda za prosti testosetron) (Opis metode:  
<http://cebp.aacrjournals.org/content/11/10/1065.full.pdf+html>)

## B. Za SHBG:

- IMUNOKEMIČNE METODE
- IMUNOMETRIČNE METODE (IRMA, ELISA)
- Precipitacijska metoda z amonijevim sulfatom

## C. Za albumin:

- KOLORIMETRIČNA METODA (bromkrezol zeleno)
- NEFELOMETRIČNE METODE (Opis metode: Kaplan A.: Clinical Chemistry, 4th edition; 120-121)
- TURBIDIMETRIČNE METODE (Opis metode: Kaplan A.: Clinical Chemistry, 4th edition; 120-121)
- RADIOIMUNSKI IN ENCIMSKI IMUNSKI TESTI
- RADIALNA IMUNODIFUZIJA (Opis metode: Kaplan A.: Clinical Chemistry, 4th edition; 118)

## 2. NAMEN DELA

Prosti testosteron in testosteron vezan na albumin, predstavljata edino obliko biološko aktivnega testosterona, ki je dostopna celicam organizma. Prosti testosteron se v plazmi nahaja v izjemno nizkih koncentracijah in ga zaradi dolgotrajnih in dragih metod, ki morajo biti zadostno specifične in občutljive, določajo le nekateri laboratoriji.

V diplomsko nalogo bomo vključili moške, ki bodo obravnavani v endokrinološki ambulanti s potrjeno diagnozo hipogonadizem (so na zdravljenju) in moške, kateri so prišli na potrditev diagnoze (prvi obisk v ambulanti). Tem pacientom bomo izračunali prosto frakcijo androgenov v plazmi po eni izmed uporabljenih formul in jih primerjali z določitvijo proste frakcije testosterona v serumu. To bomo storili pri celotni preučevani populaciji v prvem delu in pri preiskovancih, kjer je bila serumska koncentracija celokupnega testosterona pod referenčnimi vrednostmi (torej nižja od 10,0nmol/L) z ozirom na hipogonadizem, v drugem delu. Obe populaciji, tako celotno populacijo moških (N=217) kot populacijo moških z znižanim celokupnim testosteronom, bomo razdelili v tri starostne podskupine glede na intervale pričakovanih vrednosti za prosti testosteron, saj želimo ugotoviti ali se korelacija spreminja tudi znotraj teh podskupin in v kolikšni meri se to kaže.

Preverili bomo tudi odstotek ujemanja in sicer v koliko odstotkih je znižan FAI (pod spodnjo mejo orientacijskih ref. vrednosti), kadar je znižan prosti testosteron (pod spodnjo mejo pričakovanih vrednosti posameznih starostnih skupin).

Z metodo delne korelacije bomo preverili tudi, kakšen je vpliv starosti in albumina na korelacijo med preučevanima parametroma.

Želimo ugotoviti ali obstaja korelacija med prostim testosteronom v serumu in izračunanim androgenim indeksom.

Dobra korelacija izračunanih androgenih indeksov z določeno koncentracijo prostega testosterona v serumu bi omogočila izračun biološko aktivnega testosterona tudi laboratorijem, ki prostega testosterona ne določajo.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. PREISKOVANCI

V preiskavo smo vključili 217 moških, katerim so v letu 2009 v endokrinološki ambulanti na Njegoševi 4 v Ljubljani odvzeli vzorce krvi in jim v serumu določili celokupni testosteron, prosti testosteron, SHBG in albumin. Preiskovanci so bili stari od 15 do 84 let, s povprečno starostjo 50 let in mediano 53 let.

#### 3.2. STATISTIČNE METODE

Zbrane podatke smo statistično obdelali s programoma Windows Excel in s statističnim programom SPSS 15.0 za Windows.

Vsem izmerjenim in izračunanim vrednostim (T/T, T/P, FAI, SHBG in albumin) smo izračunali aritmetično sredino ( $\bar{x}$ ), standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV). Za preverjanje hipoteze o normalni porazdelitvi vrednosti koncentracij za celokupni in prosti testosteron smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Povezavo med določenimi parametri smo prevereli z metodo korelacije dveh spremenljivk in metodo delne korelacije, podatke pa prikazali na razsevnem grafikonu z regresijsko premico.

**KORELACIJA IN REGRESIJA:** - sta statistični metodi, ki proučujeta povezavo in medsebojno odvisnost dveh ali več spremenljivk. Korelacija opredeljuje moč povezave, regresija pa obliko. Kadar je odnos med dvema zveznima spremenljivkama linearen, je najbolj znan in pogost Pearsonov koeficient korelacije  $r$ . Ta zaseda vrednosti med -1 in +1, pri čemer njegova negativna vrednost označuje negativno korelacijo, kjer pri porastu ene spremenljivke druga upada, pozitivna vrednost pa pozitivno korelacijo, kjer pri porastu ene spremenljivke narašča tudi druga, vrednost 0 označuje ničelni vpliv ene spremenljivke na drugo.

**Tabela:** Lestvica za korelacijski koeficient:

Absolutna vrednost Indeks korelacije	Stopnja linearne korelacije
0.0 – 0.3	ni korelacije
0.3 – 0.5	nizka korelacija
0.5 – 0.7	srednja korelacija
0.7 – 0.9	visoka korelacija
0.9 – 1.0	zelo visoka korelacija

(Vir: Pfajfar L., Arh F.: Statistika 1, stran 195)

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1. METODE DOLOČANJA

#### A) Določanje celokupnega testosterona:

Metoda EIA - encimsko imunski test (DSL-10-4000 ACTIVE<sup>®</sup> Testosterone EIA, Diagnostic Systems Laboratories)

Princip testa:

Gre za tekmovanje med encimsko označenim in neoznačenim antigenom (testosteronom) v standardih ali vzorcih za vezavo na protitelo. Količina encimsko označenega antigena vezanega na protitelo je obratno sorazmerna koncentraciji neoznačenega analita. Po odstranitvi nevezanih delcev izmerimo absorbanco, ki je obratno sorazmerna koncentraciji merjenega testosterona v serumu. Iz standardov testosterona v setu narišemo umeritveno krivuljo v odvisnosti absorbance od koncentracije testosterona, iz katere lahko odčitamo neznane koncentracije merjenega testosterona v vzorcu.



REAGENTI:

- GARG mikrotitrna plošča s 96. vdolbinicami iz polistirena, ki so prekrte s kozjimi IgG protitelesi proti zajčjim (GARG-Coated Microtitration Strips);
- Raztopine s standardnimi koncentracijami; raztopine s približnimi koncentracijami testosterona 0, 0.1, 0.5, 2.5, 5.0, 10.0 in 25.0 ng/mL;
- Kontrolni serum; dve kontroli z nizko in visoko koncentracijo;
- Koncentrat konjugata; raztopina s hrenovo peroksidazo konjugiranega testosterona v BSA pufri (*protein-based buffer*);
- Diluent; steklenička s pufrom;
- Antiserum; zajčji poliklonski serum proti testosteronu v BSA pufri;
- Kromogen; raztopina tetrametilbenzidina v citratnem pufri z vodikovim peroksidom;



- Koncentrat za spiranje; puferirana solna raztopina z neionskim detergentom;
- Stop raztopina; 0.2 molarna žveplena VI kislina.

Pripomočki in materiali, ki so potrebni, a niso v kompletu:

- spektrofotometrični čitalec za merjenje absorbance pri 450 nm, s korekcijo valovne dolžine pri 600 in 620 nm;
- deionizirana voda;
- pipete: 50  $\mu$ L, 100 $\mu$ L;
- stresalnik za mikrotitrsko ploščo (500-700 obratov na minuto);
- vpojni material za osušitev vrstic mikrotitrskе plošče;
- papir za risanje grafa.

Odvzem in priprava vzorcev:

Uporabimo serum iz venske krvi, ki je lahko shranjen do 24 ur pri 2-8 °C in do 6 mesecev pri -20°C. Izogibamo se ponovnim zamrznitvam vzorcev, ne uporabljamo hemoliziranih in lipemičnih vzorcev.

#### PRIPRAVA REAGENTOV

	Priprava/redčenje	Shranjevanje/stabilnost
RAZTOPINA ZA SPIRANJE	Koncentrat za spiranje razredčimo z deionizirano vodo (25-kratna redčitev)	1 mesec pri sobni temperaturi ~25°C (tesno zaprto)
RAZTOPINA KONJUGATA	Koncentrat konjugata razredčimo z diluentom v razmerju 1:50	/
MIKROTITRSKE VDOLBINICE	Neuporabljene zaščitimo pred vlago z desikantom	/

## IZVEDBA

Vse vzorce in reagente pred izvedbo pustimo stati na sobni temperaturi, da se ogrejejo na približno 25°C in jih nato narahlo premešamo.

- V odgovarjajoče vdolbinice označene mikrotitrsko ploščo napipetiramo 50  $\mu\text{L}$  standardov, kontrol in neznanih vzorcev v duplikatu
- V te vdolbinice dodamo 100  $\mu\text{L}$  predhodno pripravljene raztopine konjugata
- Nato vsem dodamo 100  $\mu\text{L}$  antiseruma
- Mikrotitrsko ploščo potem inkubiramo in stresamo na stresalniku (*microplate shaker*) pri 500 do 700 obratih na minuto pri sobni temperaturi eno uro
- Po inkubaciji vdolbinice izpraznimo in jih spiramo z raztopino za spiranje (0.35 mL), to ponovimo 5 krat, zatem jih obrnemo in položimo na vpojni papir, da jih osušimo
- V vdolbinice dodamo 100  $\mu\text{L}$  raztopine kromogena tetrametilbenzidina (TMB)
- Nato mikrotitrsko ploščo inkubiramo in stresamo pri 500 do 700 obratih na minuto na stresalniku pri sobni temperaturi 30 minut. Izogibamo se direktni sončni svetlobi
- Po inkubiranju v vdolbinice dodamo 100  $\mu\text{L}$  stop raztopine
- S čitalcem mikrotitrskih ploščic v roku 30 minut odčitamo absorbanco pri 450 nm.

## IZRAČUN REZULTATOV

- Izračunamo srednje vrednosti (duplikatov) absorbanc standardov, kontrol in neznanih vzorcev
- Nato narišemo graf, na abscisno os naneseemo logaritme koncentracij standardov, na ordinatno os pa absorbance standardov, potem narišemo umeritveno krivuljo ter s pomočjo interpolacije določimo koncentracijo vzorca

REFERENČNE VREDNOSTI:

MOŠKI: 10,0 – 30,0 nmol/L

ŽENSKE: 0,3 – 3,5 nmol/L

**nmol T/L =  $\mu\text{g T/L} \cdot 3.47$**

## **B) Določanje prostega testosterona**

Metoda EIA - encimsko imunski test (DSL-10-49100 ACTIVE<sup>®</sup> Free Testosterone EIA, podjetja Diagnostic Systems Laboratories)

Princip testa:

Neoznačen in z biotinom označen antigen (testosteron) tekmujeta z vezavo na številčno omejena mesta protiteles. Po inkubaciji je količina vezanega z biotinom označenega antigena obratno sorazmerna koncentraciji neoznačenega analita. Izmerjena absorbanca označenega testosterona je obratno sorazmerna koncentraciji merjenega testosterona. Neznano koncentracijo analita odčitamo iz umeritvene krivulje, ki smo jo narisali iz standardov v setu.

REAGENTI:

- Mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami iz polistirena, prekritimi s kozjimi IgG proti zajčjim protitelesom (GARG);
- Raztopine s standardnimi koncentracijami prostega testosterona: steklenička (A) s koncentracijo 0 pg/mL in šest stekleničk (B–G) s približnimi koncentracijami 0.25, 1.0, 2.5, 10, 25 in 100 pg/mL;
- Kontrolni serum: dve steklenički z nizko in visoko koncentracijo;
- Koncentrat konjugata: z biotinom konjugiran prosti testosteron v BSA pufri;
- Antiserum: zajčji poliklonski serum proti testosteronu v BSA pufri;
- Diluent (topilo) konjugata: BSA puffer;

- Koncentrat s hrenovo peroksidazo konjugiranega streptavidina (streptavidin-encim) v BSA pufru
- Diluent koncentrata streptavidin-encim: BSA pufer z EDTA;
- Raztopina kromogena TMB: raztopina TMB v citratnem pufru z vodikovim peroksidom
- Koncentrat za spiranje: puferirana solna raztopina z neionskim detergentom;
- Stop raztopina: 0.2 molarna žveplena VI kisline.

#### Odvzem in priprava vzorcev

Uporabimo lahko serum iz venske krvi, ki je lahko shranjen pri 2 - 8°C do 24 ur in zamrznjen pri -20°C ali manj do dva meseca. Ne uporabljamo hemoliziranih in lipemičnih vzorcev, izogibamo se ponovnim zamrznitvam vzorcev.

Pripomočki in materiali, ki so potrebni, a niso v kompletu:

- spektrofotometrični čitalec za merjenje absorbance pri 450 nm, s korekcijo valovne dolžine pri 600 in 620 nm;
- deionizirana voda;
- pipete: 50  $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L;
- vibracijski mešalnik (»VORTEX«);
- Avtomatiziran spiralnik mikrotitrsko plošče;
- stresalnik za mikrotitrsko ploščo (500-700 obratov na minuto);
- vpojni material za osušitev vrstic mikrotitrsko plošče;
- papir za risanje grafa.

## PRIPRAVA REAGENTOV

	Priprava/redčenje	Shranjevanje/stabilnost
RAZTOPINA ZA SPIRANJE	Koncentrat za spiranje razredčimo z deionizirano vodo 25-krat	1 mesec pri sobni temperaturi ~25°C (tesno zaprto)
RAZTOPINA KONJUGATA	Koncentrat konjugata razredčimo z diluentom v razmerju 1:50	/
RAZTOPINA STREPTAVIDIN-ENCIM	Koncentrat konjugata (streptavidin-encim) razredčimo z diluentom konjugata (streptavidin-encim) v razmerju 1:50	/
MIKROTITRSKE VDOLBINICE	Neuporabljene zaščitimo pred vlago z desikantom	2-8°C

## IZVEDBA

Vse vzorce in reagente pred izvedbo pustimo stati na sobni temperaturi, da se ogrejejo na približno 25°C in jih nato narahlo premešamo.

- V odgovarjajoče vdolbinice označene mikrotitrsko ploščo napipetiramo 50  $\mu$ L standardov, kontrol in neznanih vzorcev v duplikatu.
- V te vdolbinice dodamo 50  $\mu$ L predhodno pripravljene raztopine konjugata.
- Nato vsem dodamo 100  $\mu$ L antiseruma.
- Mikrotitrsko ploščo potem inkubiramo in stresamo na stresalniku (*microplate shaker*) pri 500 do 700 obratih na minuto pri sobni temperaturi 60 minut.
- Po inkubaciji vdolbinice izpraznimo in jih spiramo z raztopino za spiranje z avtomatiziranim spiralniki mikrotitrskih plošč (to ponovimo 5 krat), zatem jih obrnemo in položimo na vpojni papir, da jih osušimo.

- V vdolbinice nato dodamo 200  $\mu\text{L}$  predhodno pripravljene raztopine konjugata (streptavidin-encim).
- Nato mikrotitrsko ploščo inkubiramo in stresamo pri 500 do 700 obratih na minuto na stresalniku pri sobni temperaturi 30 minut.
- Po inkubaciji vdolbinice izpraznimo in jih spiramo z raztopino za spiranje z avtomatiziranim spiralnikom mikrotitrskih plošč (to ponovimo 5 krat), zatem jih obrnemo in položimo na vpojni papir.
- V vdolbinice dodamo 100  $\mu\text{L}$  raztopine kromogena TMB
- Ponovno inkubiramo pri sobni temperaturi na stresalniku pri 500 do 700 obratih na minuto 30 minut, izogibamo se direktni sončni svetlobi (pazimo na razvoj barve, ki lahko glede na temperaturo v prostoru nastane hitreje ali pozneje)
- Po inkubiranju v vdolbinice dodamo 100  $\mu\text{L}$  stop raztopine
- S čitalcem mikrotitrskih ploščic v roku 30 minut odčitamo absorbanco pri 450 nm.

## IZRAČUN REZULTATOV

- Izračunamo srednje vrednosti (duplikatov) absorbanc standardov, kontrol in neznanih vzorcev
- Narišemo graf, na abscisno os naneseemo logaritme koncentracij standardov (koncentracije prostega testosterona), na ordinatno os pa absorbance standardov, nato narišemo umeritveno krivuljo ter s pomočjo interpolacije določimo koncentracijo vzorca.

### Pričakovane vrednosti:

Moški: 20–39 let: 31,4 – 94,0 pmol/L  
40–59 let: 25,0 – 80,0 pmol/L  
60–80 let: 19,0 – 66,0 pmol/L

Ženske: 20–39 let: 0,19 – 8,9 pmol/L  
40–59 let: 0,14 – 7,0 pmol/L  
60–80 let: 0,09 – 5,4 pmol/L

### C) Določanje SHBG

#### Metoda ACTIVE<sup>®</sup> SHBG ELISA

Gre za encimsko imunski »sendvič« test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Na protitelesa proti SHBG, ki so fiksirana na stene v mikrotitrski plošči, se vežejo molekule SHBG. Po inkubaciji in spiranju nevezanih delcev se doda z encimom označeno detekcijsko protitelo proti molekulam SHBG, ki po ponovnem inkubiranju, spiranju in dodatku kromogena povzročijo obarvanje raztopine. Merimo absorbanco (pri 450 nm in med 600 in 630 nm), ki je premosorazmerna koncentraciji SHBG v vzorcih. Iz standardov v setu narišemo umeritveno krivuljo, iz katere lahko odčitamo koncentracije SHBG.

#### REAGENTI:

- Mikrotitrski plošča s 96 vdolbinicami iz polistirena, prekrita s protitelesi proti SHBG;
- SHBG standard A/diluent vzorca: tekočina s koncentracijo SHBG 0.0 nmol/L v BSA pufru z <0.1% NaN<sub>3</sub>;
- SHBG standardi: pet stekleničk označenih B-F s približnimi koncentracijami 5, 25, 150 in 300 nmol/L, v BSA pufru z <0.1% NaN<sub>3</sub>;
- Kontrola: dve steklenički z nizko in visoko koncentracijo SHBG v BSA pufru z <0.1% NaN<sub>3</sub>
- Koncentrat konjugata : raztopina s hrenovo peroksidazo konjugiranih protiteles proti SHBG v BSA pufru z <0.05% ProClin\*300 in <2% MOPSO (biološki pufer);
- Testni pufer A: BSA pufer z <0.05% ProClin 300
- Raztopina kromogena TMB v citratnem pufru s hrenovo peroksidazo;
- Koncentrat za spiranje B: puferirana solna raztopina z neionskim detergentom;
- Stop raztopina A: 0.2 M žveplena VI kislina.

Pripomočki in materiali, ki so potrebni, a niso v kompletu:

- spektrofotometrični čitalec za merjenje absorbance pri 450 nm, s korekcijo valovne dolžine pri 600 in 620 nm;
- deionizirana voda;
- pipete: 10-350  $\mu\text{L}$ ;
- vibracijski mešalnik (»VORTEX«);
- spiralnik mikrotitrne plošče;
- stresalnik za mikrotitrsko ploščo (500-700 obratov na minuto);
- vpojni material za osušitev vrstic mikrotitrne plošče;
- papir za risanje grafa.

Odvzem in priprava vzorcev:

Uporabimo serum iz venske krvi, ki ga po centrifugiranju v roku 2. ur ločimo od celic. Lahko ga hranimo v hladilniku pri 2-8°C ali zamrznjenega pri -20°C ali manj, ne shranjujemo redčenih vzorcev. Izogibamo se ponovnemu zamrzovanju in odtajanju. Za test niso primerni hemolizirani in lipemični vzorci.



## PRIPRAVA REAGENTOV:

	Priprava/redčenje	Shranjevanje/stabilnost
RAZTOPINA ZA SPIRANJE	Koncentrat za spiranje razredčimo z deionizirano vodo 25-krat	1 mesec pri sobni temperaturi ~25°C (tesno zaprto)
RAZTOPINA Z ENCIMOM KONJUGIRANIH PROTITELES PROTI SHBG	Koncentrat konjugata razredčimo s testnim pufrom v razmerju 1:50	/
MIKROTITRSKE VDOLBINICE	Neuporabljene zaščitimo pred vlago z desikantom	2-8°C
VZORCI SERUMA	Vzorci razredčimo z diluentom vzorca v razmerju 1:100, vzorce nosečnic pa v razmerju 1:500	/

## IZVEDBA:

Vse vzorce in reagente pred izvedbo pustimo stati na sobni temperaturi, da se ogrejejo na približno 25°C in jih narahlo premešamo.

- V odgovarjajoče vdolbinice označene mikrotitrsko ploščo napipetiramo 20 µL razredčenih standardov, kontrol in neznanih vzorcev v duplikatu.
- Dodamo 50 µL testnega pufr A.
- Mikrotitrsko ploščo inkubiramo in stresamo na stresalniku (*microplate shaker*) pri 500 do 700 obratih na minuto pri sobni temperaturi 2 uri.
- V te vdolbinice dodamo 100 µL predhodno pripravljene raztopine konjugata.

- Nato inkubiramo pri sobni temperaturi na stresalniku pri 500 do 700 obratih na minuto 30 minut.
- Vdolbinic nato izpraznimo in jih spiramo z raztopino za spiranje s spiralnikom mikrotitrskih plošč (to ponovimo 5 krat), zatem jih obrnemo in položimo na vpojni papir, da jih osušimo.
- V vdolbinice dodamo 100  $\mu$ L raztopine kromogena TMB, izogibamo se direktni sončni svetlobi.
- Ponovno inkubiramo na stresalniku pri 500 do 700 o/min pri sobni temperaturi 10 minut in pazimo na razvoj barve.
- Nato dodamo 100  $\mu$ L stop raztopine
- V roku 30 minut izmerimo absorbanco pri 450 nm.

#### IZRAČUN REZULTATOV

- Izračunamo srednje vrednosti (duplikatov) absorbanco standardov, kontrol in neznanih vzorcev
- Narišemo graf, na abscisno os nanesemo logaritme koncentracij standardov SHBG (v nmol/L), na ordinatno os pa absorbanco standardov, nato narišemo umeritveno krivuljo ter s pomočjo interpolacije določimo koncentracije SHBG v vzorcih. Vzorce, katerih izmerjena absorbanca je bila večja od najvišjega standarda, razredčimo z diluentom in jim ponovno izmerimo absorbanco.

#### Refrenčne vrednosti za SHBG:

MOŠKI: 13 – 71 nmol/L

ŽENSKE: 18 – 114 nmol/L

## D) Določanje albumina

Metoda albumin BCG, podjetja *cobas (Roche)* na HITACHI analizatorju

Gre za kolorimetrični test z »endpoint« metodo z bromkrezol zelenim. V kislem mediju pri pH 4.1 postane albumin pozitivno nabit in se veže z negativno nabitim bromkrezol zelenim. Nastane albumin-BCG kompleks modrozelenne barve, katerega intenziteta barve je premo sorazmerna koncentraciji albumina v vzorcu, kar lahko določimo fotometrično.



REAGENTI (pripravljeni za uporabo, v analizatorju uporabni 28 dni):

- R1: citratni pufer: 95 mmol/L, pH 4.1;
- R2: citratni pufer (substrat): 95 mmol/L, pH 4.1; bromkrezol zeleno: 0.66 mmol/L;

Odvzem in priprava vzorcev:

- Uporabljamo lahko serum ali plazmo. Primerna antikoagulanta sta heparin (Li-, Na-, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-) in EDTA, fluorid ni primeren
- Uporabimo serum iz venske krvi, ki ga po centrifugiranju v roku 2. ur ločimo od celic. Lahko ga hranimo v hladilniku pri 2-8°C ali zamrznjenega pri -20°C ali manj, ne shranjujemo redčenih vzorcev. Izogibamo se ponovnemu zamrzovanju in odtajanju. Za test niso primerni hemolizirani in lipemični vzorci.

Pripomočki in materiali, ki so potrebni, a niso v kompletu:

- Kalibrator: C.f.a.s. (kalibrator za avtomatiziran sistem);
- Kontrola: Precinorm U, e.g. ali Precinorm U plus ali Precipath U, e.g. ali Precipath U plus;
- 0.9% raztopina NaCl;
- Splošna laboratorijska oprema.

**Referenčne vrednosti:**

32 – 55 g/L

## E) Izračun FAI

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

### Orientacijske referenčne vrednosti:

MOŠKI: 30 - 150

ŽENSKE: 7 - 10

## 1.5. KONTROLA KAKOVOSTI

### Specifičnost

Specifičnost je sposobnost metode, da razlikuje med merjeno snovjo in drugimi snovmi.

### Linearnost

Linearnost je opredeljena kot sposobnost metode, da v danem območju dobi sprejemljivo linearno korelacijo med rezultati in koncentracijo merjene snovi v vzorcih.

### Točnost

Točnost metode je opredeljena kot stopnja, do katere je določena vrednost merjene snovi v vzorcu skladna s sprejemljivo referenčno vrednostjo.

**Natančnost** je opredeljena kot stopnja skladnosti med dobljenimi rezultati iz neodvisnih preskusov pri predpisanih pogojih.

**Ponovljivost:** Natančnost pri pogojih ponovljivosti, t. j. pri pogojih, ko isti izvajalec v kratkih časovnih razmakih z isto metodo, na enakem poskusnem materialu, na isti opremi in v istem laboratoriju dobi neodvisne testne rezultate.

### A. DOLOČANJE CELOKUPNEGA TESTOSTERONA

- **Občutljivost metode** ali meja zaznavnosti, dobljena z interpolacijo srednjih vrednosti minus dve standardni deviaciji 20 ponovitev standarda s koncentracijo 0 ng/mL, znaša 0.04 ng/mL.

- **Natančnost metode:**

- Ponovljivost v seriji (določena iz srednjih vrednosti 16 ponovitev pri vsakem od treh vzorcev serumov):

VZOREC	N	SR. VRED.	SD (ng/mL)	KV (%)
I	16	0.63	0.03	5.3
II	16	1.38	0.09	6.8
III	16	2.42	0.12	4.8

- Ponovljivost med serijami (določena iz povprečij duplikatov za 10. ločenih serij s 3. vzorci serumov preko 8 dni):

VZOREC	N	SR. VRED.	SD (ng/mL)	KV (%)
I	10	0.66	0.03	4.8
II	10	1.40	0.07	4.9
III	10	7.61	0.21	2.8

- **Linearnost metode** (vzorec redčen s standardom s koncentracijo 0 ng/mL)

VZOREC	FAKTOR REDČITVE	PRIČAKOVANA VREDNOST (ng/mL)	DOLOČENA VREDNOST (ng/mL)	UJEMANJE (%)
I	---	---	6.02	---
	1:2	3.10	3.17	102
	1:4	1.55	1.70	110
	1:8	0.78	0.83	107
	1:16	0.39	0.37	95
	1:32	0.19	0.17	88

## B. DOLOČANJE PROSTEGA TESTOSTERONA

- **Občutljivost metode**, dobljena z interpolacijo srednjih vrednosti minus dve standardni deviaciji 12 ponovitev standarda s koncentracijo 0 ng/mL, znaša 0.19 pg/mL.

- **Natančnost metode:**

- Ponovljivost v seriji (določena iz srednjih vrednosti 12 ponovitev pri vsakem od treh vzorcev serumov):

VZOREC	N	SR. VRED.	SD (pg/mL)	KV (%)
I	12	5.55	0.42	7.5
II	12	8.71	0.47	5.4
III	12	10.20	0.70	6.8

- Ponovljivost med serijami (določena iz povprečij duplikatov za 9 ločenih serij):

VZOREC	N	SR. VRED.	SD (ng/mL)	KV (%)
I	9	2.87	0.64	0.22
II	9	5.02	0.64	1.28
III	9	67.73	4.18	6.18

## C. DOLOČANJE SHBG

- **Občutljivost metode**, dobljena z interpolacijo srednjih vrednosti minus dve standardni deviaciji 18 ponovitev standarda A s koncentracijo 0 nmol/L z intervalom zaupanja 95%, znaša 0.61nmol/L.

- **Natančnost metode:**

- Ponovljivost v seriji (določena iz povprečnih vrednosti 12. posamezno redčenih alikvotov vsakega vzorca)

VZOREC	N	SR. VRED. (nmol/L)	SD (nmol/L)	KV (%)
I	12	53.7	2.4	4.5
II	12	77.7	4.8	6.2
III	12	168.9	10.6	6.3
IV	12	238.0	13.7	5.8

- Ponovljivost med serijami (določena iz 12. ločenih serij):

VZOREC	N	SR. VRED. (nmol/L)	SD (nmol/L)	KV (%)
I	12	53.2	2.2	4.2
II	12	52.2	2.1	4.0
III	12	181.1	4.6	2.6
IV	12	256.1	10.8	4.2

## D. DOLOČANJE ALBUMINA

- **Občutljivost metode**, dobljena kot vrednost najnižjega standarda 1 plus dve standardni deviaciji 21. ponovitev v seriji, znaša 2g/L.
  
- **Natančnost metode:**
  - Ponovljivost v seriji (določena iz vzorcev krvi in kontrolnih vzorcev v 21. ponovitvah)

VZOREC	N	SR. VRED. (g/L)	KV (%)
SERUM	21	27	0,39
Precinorm U	21	30	0,85
Precipath U	21	30	0,63

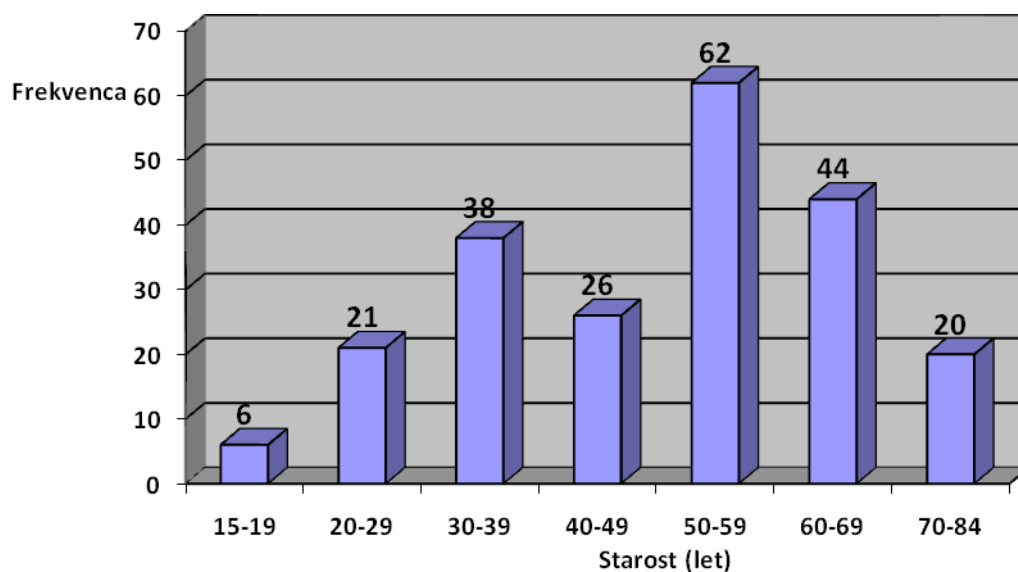
- Ponovljivost med serijami (določena iz vzorcev krvi in kontrolnih vzorcev v 10. ponovitvah)

VZOREC	N	SR. VRED. (g/L)	KV (%)
SERUM	10	32	1,71
Precinorm U	10	30	1,99
Precipath U	10	28	1,37



## 5. REZULTATI

### 5.1. Predstavitev celotne preučevane populacije glede na starost v letih:



Rezultati testiranja normalne porazdelitve vrednosti koncentracij skupnega in prostega testosterona v serumu:

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		T/T	T/P
N		217	217
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	9,9336	35,2668
	Std. Deviation	5,66191	26,01399
Most Extreme Differences	Absolute	,085	,120
	Positive	,085	,120
	Negative	-,049	-,089
Kolmogorov-Smirnov Z		1,254	1,770
Asymp. Sig. (2-tailed)		,086	,004

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Korelacija med T/P, FAI in posameznimi kliničnimi parametri (starost, albumin)

**Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v celotni skupini moških:**

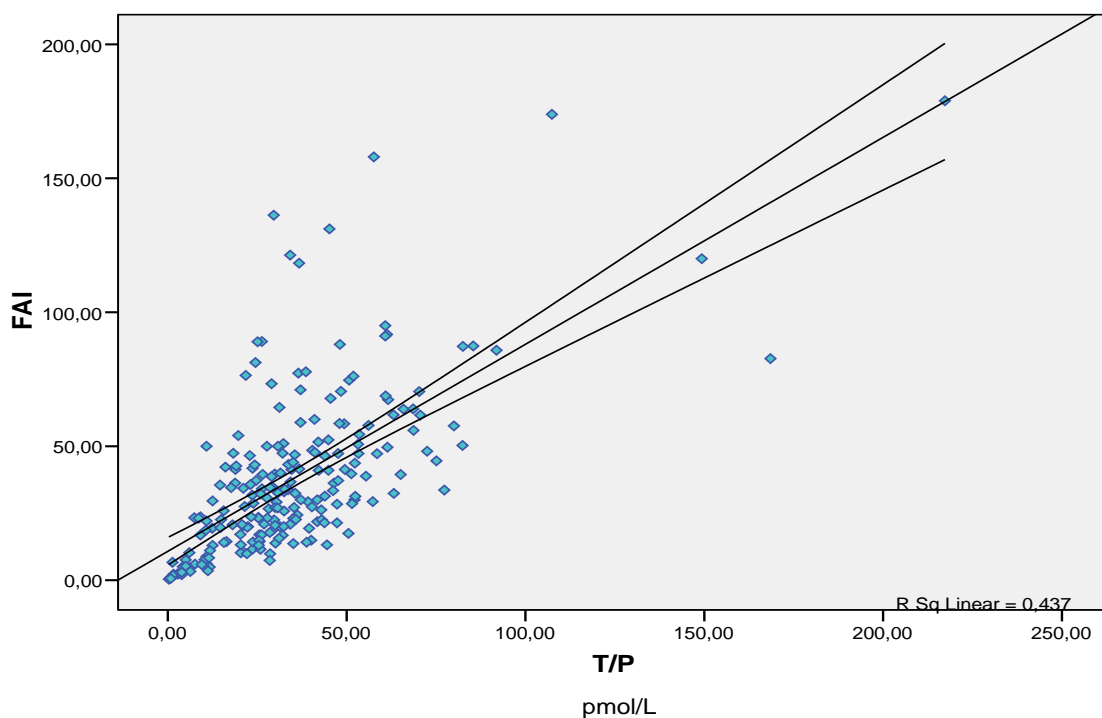
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Testosteron	217	,20	34,00	9,9336	,38436	5,66191	32,057
Testosteron-prosti	217	,30	217,30	35,2668	1,76594	26,01399	676,728
FAI	217	,36	178,95	38,0187	2,06492	30,41811	925,261
SHBG	217	8,00	124,00	34,3779	1,26309	18,60643	346,199
Albumin	217	35,00	54,00	45,9447	,22013	3,24275	10,515
Valid N (listwise)	217						

**Correlations**

		T/P	FAI
T/P	Pearson Correlation	1	<b>,661(**)</b>
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	217	217
FAI	Pearson Correlation	<b>,661(**)</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	217	217

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:



## Korelacija med FAI, T/P in starostjo

a) Korelacija med T/P in starostjo:

**Correlations**

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	<b>-,135(*)</b>
	Sig. (2-tailed)		,047
	N	217	217
starost	Pearson Correlation	<b>-,135(*)</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,047	
	N	217	217

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

b) Korelacija med FAI in starostjo:

**Correlations**

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	<b>-,320(**)</b>
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	217	217
starost	Pearson Correlation	<b>-,320(**)</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	217	217

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI:

**Correlations**

Control Variables			T/P	FAI
starost	T/P	Correlation	1,000	<b>,658</b>
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	214
	FAI	Correlation	<b>,658</b>	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	214	0

Korelacija med T/P, FAI in albuminom:

a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	<b>,088</b>
	Sig. (2-tailed)		,199
	N	217	217
Albumin	Pearson Correlation	<b>,088</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,199	
	N	217	217

b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	<b>,333(**)</b>
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	217	217
Albumin	Pearson Correlation	<b>,333(**)</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	217	217

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			T/P	FAI
Albumin	T/P	Correlation	1,000	<b>,672</b>
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	214
	FAI	Correlation	<b>,672</b>	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	214	0

### Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v starostni skupini od 15 do 39 let:

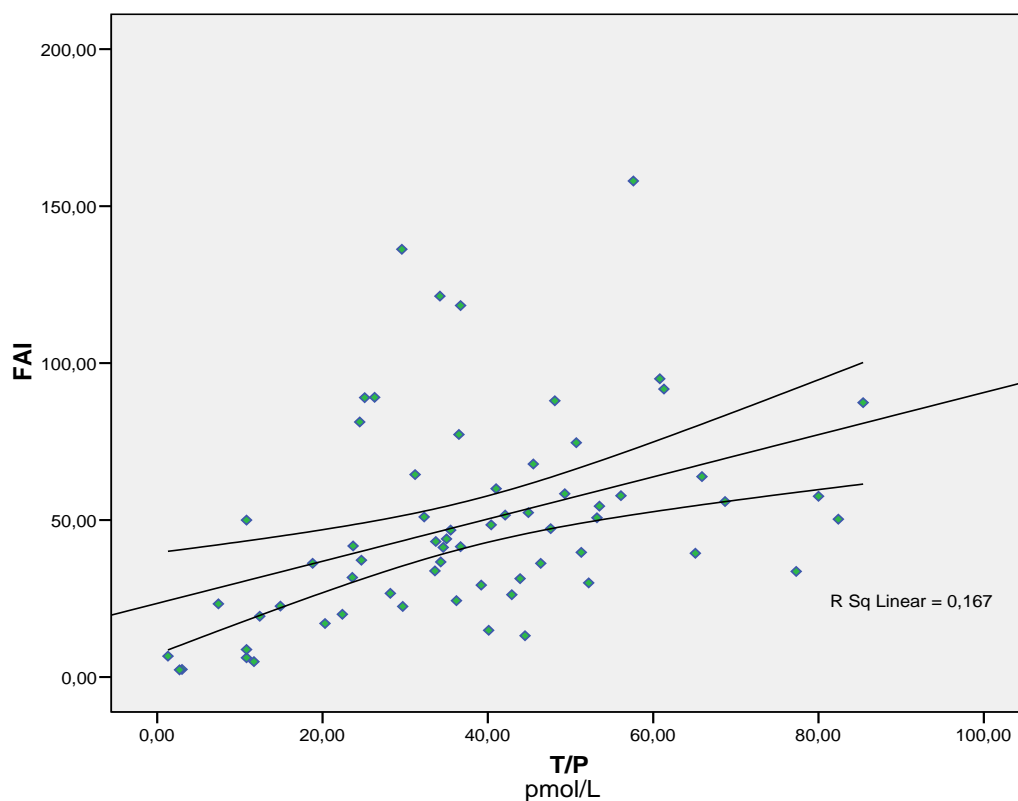
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Testosteron	65	,60	23,70	10,7169	,68008	5,48297	30,063
T/P	65	1,30	85,40	38,0092	2,43533	19,63426	385,504
FAI	65	2,31	158,00	48,9978	4,00454	32,28561	1042,361
SHBG	65	8,00	65,00	26,6923	1,53828	12,40202	153,810
Albumin	65	35,00	54,00	47,5231	,40615	3,27446	10,722
Valid N (listwise)	65						

#### Correlations

		FAI	T/P
FAI	Pearson Correlation	1	<b>,408(**)</b>
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	65	65
T/P	Pearson Correlation	<b>,408(**)</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	65	65

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:



## Korelacija med T/P, FAI in starostjo

## a) Korelacija med T/P in starostjo

## Correlations

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	<b>-,103</b>
	Sig. (2-tailed)		,415
	N	65	65
starost	Pearson Correlation	<b>-,103</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,415	
	N	65	65

## b) Korelacija med FAI in starostjo

## Correlations

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	-,048
	Sig. (2-tailed)		,702
	N	65	65
starost	Pearson Correlation	-,048	1
	Sig. (2-tailed)	,702	
	N	65	65

## c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI

## Correlations

Control Variables			FAI	T/P
starost	FAI	Correlation	1,000	<b>,406</b>
		Significance (2-tailed)	.	,001
		df	0	62
	T/P	Correlation	<b>,406</b>	1,000
		Significance (2-tailed)	,001	.
		df	62	0

Korelacija med T/P, FAI in albuminom:

a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	<b>,058</b>
	Sig. (2-tailed)		,647
	N	65	65
Albumin	Pearson Correlation	<b>,058</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,647	
	N	65	65

b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	<b>,322(**)</b>
	Sig. (2-tailed)		,009
	N	65	65
Albumin	Pearson Correlation	<b>,322(**)</b>	1
	Sig. (2-tailed)	,009	
	N	65	65

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
Albumin	FAI	Correlation	1,000	<b>,412</b>
		Significance (2-tailed)	.	,001
		df	0	62
	T/P	Correlation	<b>,412</b>	1,000
		Significance (2-tailed)	,001	.
		df	62	0

**Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v starostni skupini od 40 do 59 let:**

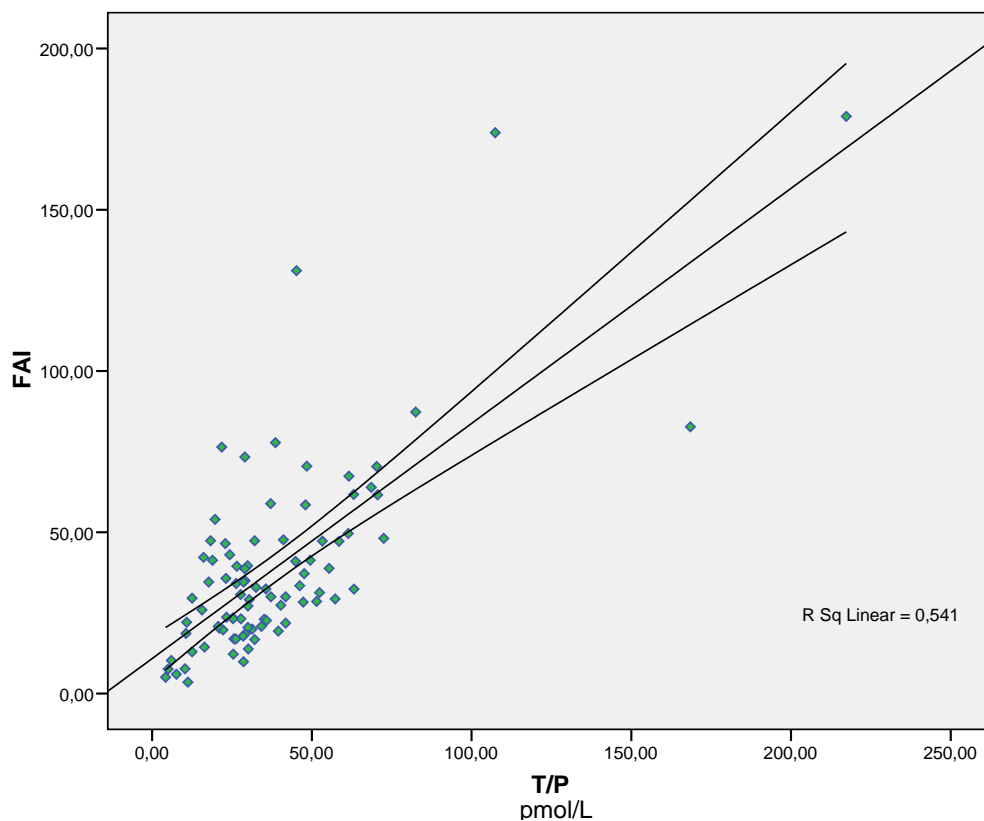
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
				Statistic	Statistic		
Testosteron	88	2,50	34,00	10,7318	,60003	5,62876	31,683
T/P	88	4,20	217,30	38,4068	3,24676	30,45729	927,646
FAI	88	3,53	178,95	38,8478	3,21680	30,17627	910,607
SHBG	88	9,00	119,00	34,8523	2,01494	18,90177	357,277
Albumin	88	35,00	51,00	45,4318	,28448	2,66866	7,122
Valid N (listwise)	88						

**Correlations**

		FAI	T/P
FAI	Pearson Correlation	1	,736(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	88	88
T/P	Pearson Correlation	,736(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	88	88

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:





## Korelacija med T/P, FAI in starostjo

## a) Korelacija med T/P in starostjo

## Correlations

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	,046
	Sig. (2-tailed)		,674
	N	88	88
starost	Pearson Correlation	,046	1
	Sig. (2-tailed)	,674	
	N	88	88

## b) Korelacija med FAI in starostjo

## Correlations

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	-,094
	Sig. (2-tailed)		,382
	N	88	88
starost	Pearson Correlation	-,094	1
	Sig. (2-tailed)	,382	
	N	88	88

## c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI

## Correlations

Control Variables			FAI	T/P
starost	FAI	Correlation	1,000	,744
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	85
	T/P	Correlation	,744	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	85	0

## Korelacija med T/P, FAI in albuminom

## a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	,042
	Sig. (2-tailed)		,697
	N	88	88
Albumin	Pearson Correlation	,042	1
	Sig. (2-tailed)	,697	
	N	88	88

## b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	,287(**)
	Sig. (2-tailed)		,007
	N	88	88
Albumin	Pearson Correlation	,287(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,007	
	N	88	88

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## c) Vliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
Albumin	FAI	Correlation	1,000	,756
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	85
	T/P	Correlation	,756	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	85	0

**Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v starostni skupini od 60 do 84 let:**

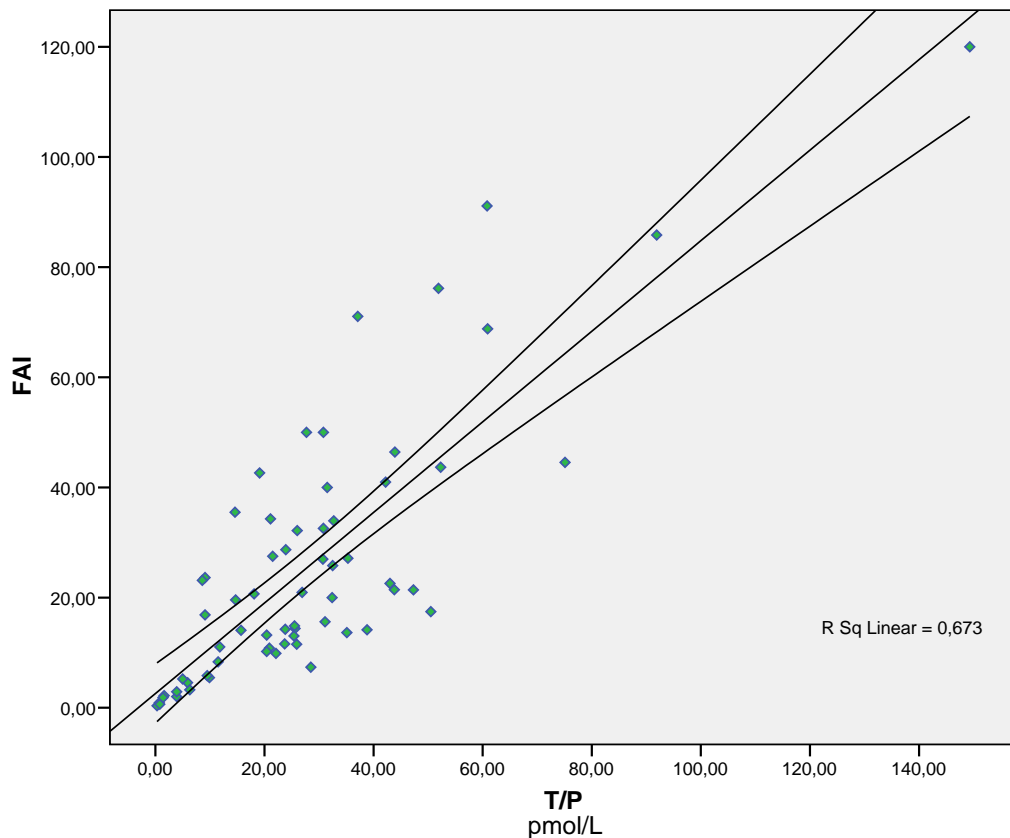
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Testosteron	64	,20	26,40	8,0406	,68982	5,51856	30,455
T/P	64	,30	149,30	28,1641	2,99679	23,97435	574,769
FAI	64	,36	120,00	25,7280	3,00292	24,02340	577,124
SHBG	64	11,00	124,00	41,5313	2,57419	20,59355	424,094
Albumin	64	36,00	54,00	45,0469	,42517	3,40135	11,569
Valid N (listwise)	64						

**Correlations**

		FAI	T/P
FAI	Pearson Correlation	1	,821(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	64	64
T/P	Pearson Correlation	,821(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	64	64

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:



Korelacija med FAI, T/P in starostjo

## a) Korelacija med T/P in starostjo

**Correlations**

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	-,114
	Sig. (2-tailed)		,369
	N	64	64
starost	Pearson Correlation	-,114	1
	Sig. (2-tailed)	,369	
	N	64	64

## b) Korelacija med FAI in starostjo

**Correlations**

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	-,383(**)
	Sig. (2-tailed)		,002
	N	64	64
starost	Pearson Correlation	-,383(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,002	
	N	64	64

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
starost	FAI	Correlation	1,000	,846
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	61
	T/P	Correlation	,846	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	61	0

## Korelacija med T/P, FAI in albuminom

## a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	,100
	Sig. (2-tailed)		,433
	N	64	64
Albumin	Pearson Correlation	,100	1
	Sig. (2-tailed)	,433	
	N	64	64

## b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	,214
	Sig. (2-tailed)		,089
	N	64	64
Albumin	Pearson Correlation	,214	1
	Sig. (2-tailed)	,089	
	N	64	64

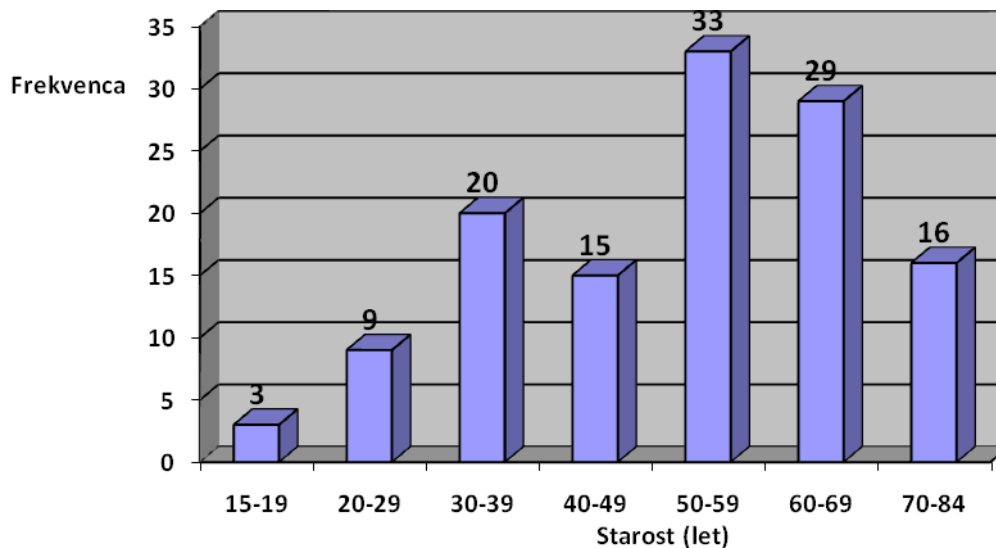
## c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
Albumin	FAI	Correlation	1,000	,822
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	61
	T/P	Correlation	,822	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	61	0

## 5.2. Predstavitev preučevane populacije z znižanim celokupnim testosteronom glede na starost v

letih:



Rezultati testiranja normalne porazdelitve vrednosti koncentracij skupnega in prostega testosterona v serumu:

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		T/T	T/P
N		125	125
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	6,2584	22,4464
	Std. Deviation	2,55189	12,59018
Most Extreme Differences	Absolute	,115	,073
	Positive	,077	,073
	Negative	-,115	-,039
Kolmogorov-Smirnov Z		1,284	,819
Asymp. Sig. (2-tailed)		,074	,514

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Korelacija med T/P, FAI in posameznimi kliničnimi parametri (starost, albumin)

### Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v celotni skupini moških:

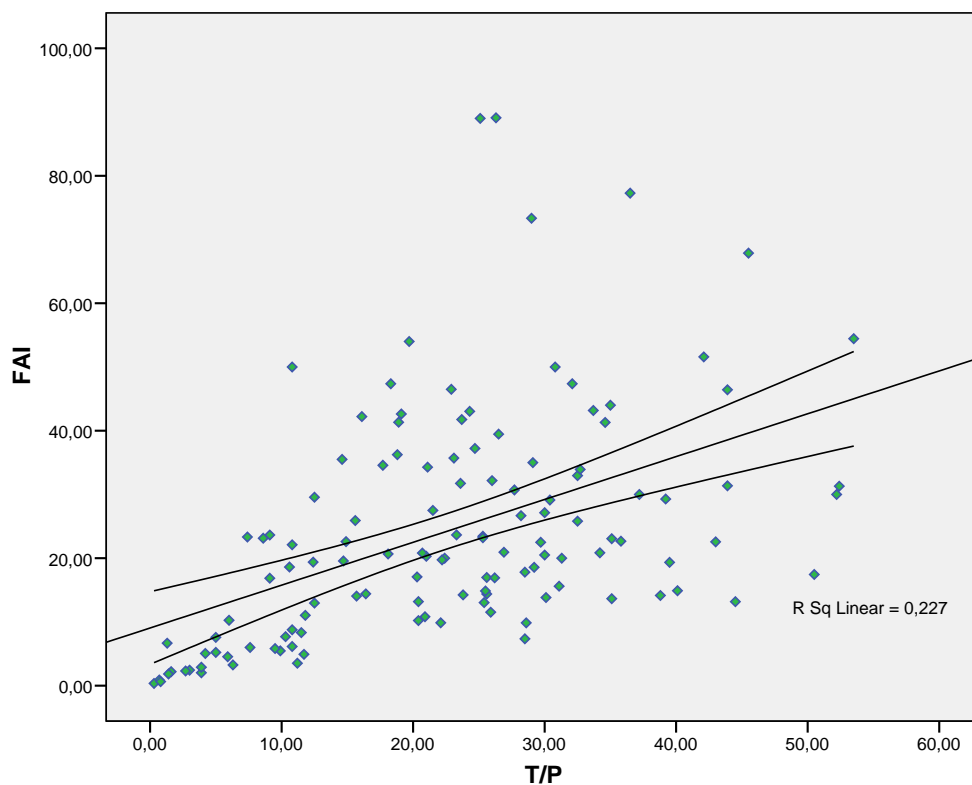
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Testosteron	125	,20	9,90	6,2584	,22825	2,55189	6,512
Testosteron.prosti	125	,30	53,50	22,4464	1,12610	12,59018	158,513
FAI	125	,36	89,09	24,1386	1,58880	17,76337	315,537
SHBG	125	9,00	124,00	35,7840	1,80696	20,20244	408,138
Albumin	125	35,00	54,00	45,7600	,29521	3,30054	10,894
Valid N (listwise)	125						

### Correlations

		T/P	FAI
T/P	Pearson Correlation	1	,476(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	125	125
FAI	Pearson Correlation	,476(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	125	125

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:



## Korelacija med FAI, T/P in starostjo

a) Korelacija med T/P in starostjo:

**Correlations**

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	-,238(**)
	Sig. (2-tailed)		,007
	N	125	125
starost	Pearson Correlation	-,238(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,007	
	N	125	125

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

b) Korelacija med FAI in starostjo:

**Correlations**

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	-,428(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	125	125
starost	Pearson Correlation	-,428(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	125	125

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI:

**Correlations**

Control Variables			T/P	FAI
starost	T/P	Correlation	1,000	,427
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	122
	FAI	Correlation	,427	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	122	0



Korelacija med T/P, FAI in albuminom:

a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	,278(**)
	Sig. (2-tailed)		,002
	N	125	125
Albumin	Pearson Correlation	,278(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,002	
	N	125	125

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	,424(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	125	125
Albumin	Pearson Correlation	,424(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	125	125

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			T/P	FAI
Albumin	T/P	Correlation	1,000	,412
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	122
	FAI	Correlation	,412	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	122	0

**Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v starostni skupini od 15 do 39 let:**

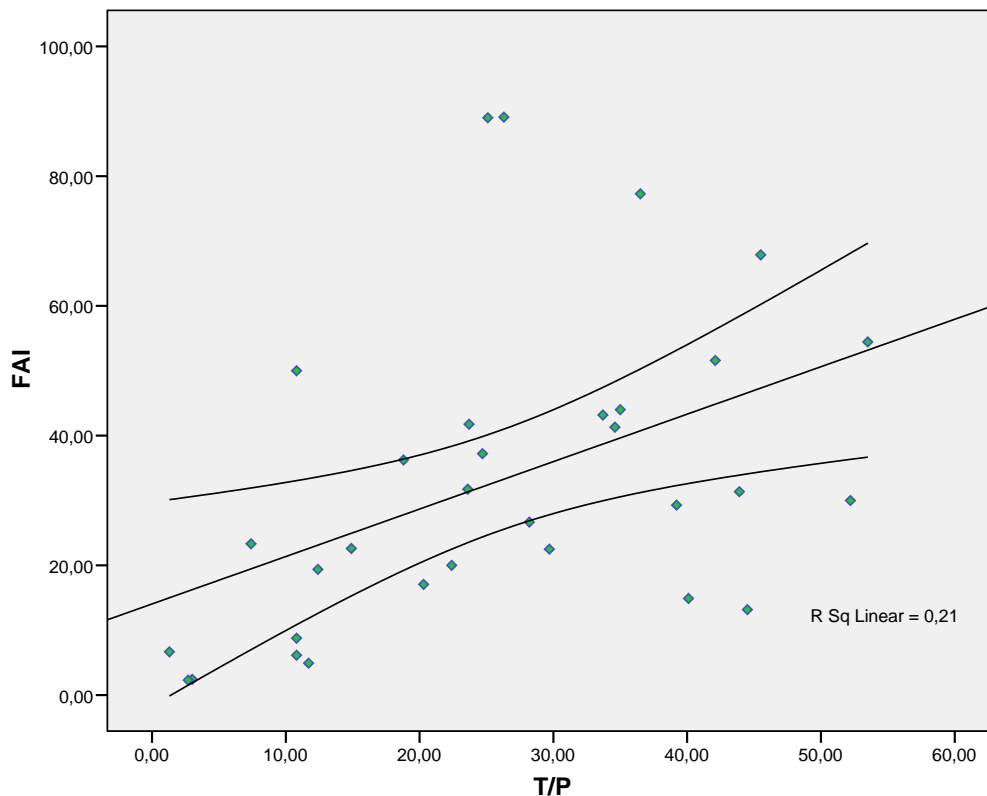
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
				Statistic	Statistic		
Testosteron	32	,60	9,80	6,4187	,47713	2,69904	7,285
T/P	32	1,30	53,50	25,9187	2,61920	14,81643	219,527
FAI	32	2,31	89,09	33,0078	4,17875	23,63859	558,783
SHBG	32	9,00	65,00	26,6563	2,55804	14,47046	209,394
Albumin	32	35,00	54,00	47,2500	,69125	3,91028	15,290
Valid N (listwise)	32						

**Correlations**

		T/P	FAI
T/P	Pearson Correlation	1	,458(**)
	Sig. (2-tailed)		,008
	N	32	32
FAI	Pearson Correlation	,458(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,008	
	N	32	32

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:



## Korelacija med T/P, FAI in starostjo

## a) Korelacija med T/P in starostjo

**Correlations**

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	,037
	Sig. (2-tailed)		,841
	N	32	32
starost	Pearson Correlation	,037	1
	Sig. (2-tailed)	,841	
	N	32	32

## b) Korelacija med FAI in starostjo

**Correlations**

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	,012
	Sig. (2-tailed)		,946
	N	32	32
starost	Pearson Correlation	,012	1
	Sig. (2-tailed)	,946	
	N	32	32

## c) Vpliv starosti na korelacijo med FAI in T/P

**Correlations**

Control Variables			T/P	FAI
starost	T/P	Correlation	1,000	,458
		Significance (2-tailed)	.	,010
		df	0	29
	FAI	Correlation	,458	1,000
		Significance (2-tailed)	,010	.
		df	29	0

Korelacija med T/P, FAI in albuminom:

a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	,251
	Sig. (2-tailed)		,166
	N	32	32
Albumin	Pearson Correlation	,251	1
	Sig. (2-tailed)	,166	
	N	32	32

b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	,449(**)
	Sig. (2-tailed)		,010
	N	32	32
Albumin	Pearson Correlation	,449(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,010	
	N	32	32

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
Albumin	FAI	Correlation	1,000	,400
		Significance (2-tailed)	.	,026
		df	0	29
	T/P	Correlation	,400	1,000
		Significance (2-tailed)	,026	.
		df	29	0

**Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v starostni skupini od 40 do 59 let:**

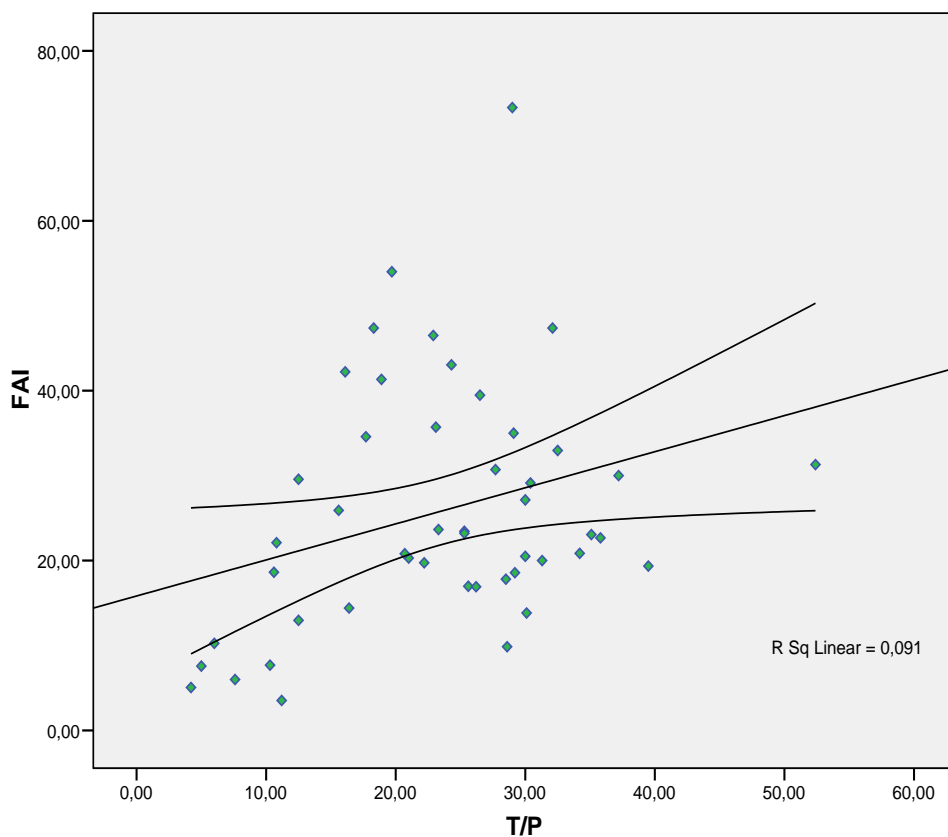
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
				Statistic	Statistic		
Testosteron	48	2,50	9,90	7,0313	,26877	1,86207	3,467
T/P	48	4,20	52,40	23,3854	1,44489	10,01050	100,210
FAI	48	3,53	73,33	25,7590	2,03273	14,08316	198,335
SHBG	48	12,00	119,00	34,7292	2,83027	19,60866	384,500
Albumin	48	40,00	51,00	45,4792	,35479	2,45807	6,042
Valid N (listwise)	48						

**Correlations**

		T/P	FAI
T/P	Pearson Correlation	1	,302(*)
	Sig. (2-tailed)		,037
	N	48	48
FAI	Pearson Correlation	,302(*)	1
	Sig. (2-tailed)	,037	
	N	48	48

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:



## Korelacija med T/P, FAI in starostjo

## a) Korelacija med T/P in starostjo

**Correlations**

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	-,231
	Sig. (2-tailed)		,115
	N	48	48
Starost	Pearson Correlation	-,231	1
	Sig. (2-tailed)	,115	
	N	48	48

## b) Korelacija med FAI in starostjo

**Correlations**

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	-,362(*)
	Sig. (2-tailed)		,011
	N	48	48
starost	Pearson Correlation	-,362(*)	1
	Sig. (2-tailed)	,011	
	N	48	48

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
starost	FAI	Correlation	1,000	,241
		Significance (2-tailed)	.	,103
		df	0	45
	T/P	Correlation	,241	1,000
		Significance (2-tailed)	,103	.
		df	45	0

## Korelacija med T/P, FAI in albuminom

## a) Korelacija med T/P in albuminom

## Correlations

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	,343(*)
	Sig. (2-tailed)		,017
	N	48	48
Albumin	Pearson Correlation	,343(*)	1
	Sig. (2-tailed)	,017	
	N	48	48

\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## b) Korelacija med FAI in albuminom

## Correlations

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	,433(**)
	Sig. (2-tailed)		,002
	N	48	48
Albumin	Pearson Correlation	,433(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,002	
	N	48	48

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

## Correlations

Control Variables			FAI	T/P
Albumin	FAI	Correlation	1,000	,181
		Significance (2-tailed)	.	,223
		df	0	45
	T/P	Correlation	,181	1,000
		Significance (2-tailed)	,223	.
		df	45	0

## Opisna statistika in korelacija med T/P in FAI v starostni skupini od 60 do 84 let:

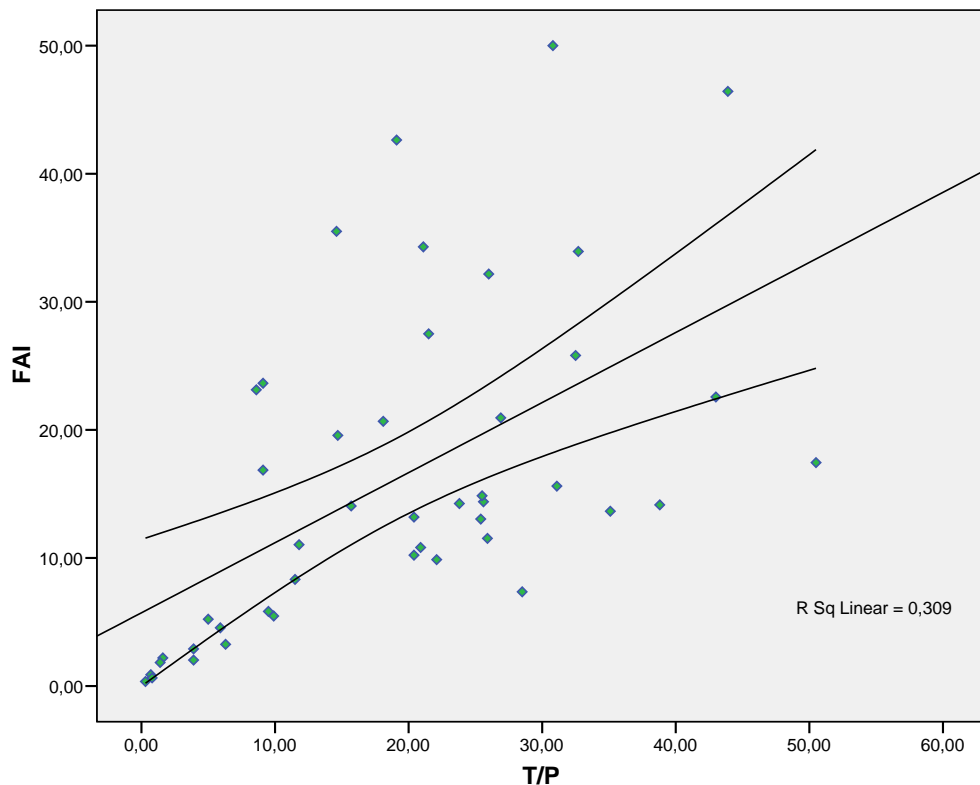
	N	Minimum	Maximum	Mean		Std. Deviation	Variance
				Statistic	Std. Error		
Testosteron	45	,20	9,50	5,3200	,42019	2,81874	7,945
T/P	45	,30	50,50	18,9756	1,90296	12,76546	162,957
FAI	45	,36	50,00	16,1033	1,87135	12,55343	157,588
SHBG	45	11,00	124,00	43,4000	3,23466	21,69876	470,836
Albumin	45	36,00	54,00	45,0000	,49848	3,34392	11,182
Valid N (listwise)	45						

## Correlations

		T/P	FAI
T/P	Pearson Correlation	1	,556(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	45	45
FAI	Pearson Correlation	,556(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	45	45

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Razsevni diagram z regresijsko premico med T/P in FAI s 95% intervalom zaupanja:





## Korelacija med T/P, in FAI starostjo

## a) Korelacija med T/P in starostjo

**Correlations**

		T/P	starost
T/P	Pearson Correlation	1	-,131
	Sig. (2-tailed)		,389
	N	45	45
starost	Pearson Correlation	-,131	1
	Sig. (2-tailed)	,389	
	N	45	45

## b) Korelacija med FAI in starostjo

**Correlations**

		FAI	starost
FAI	Pearson Correlation	1	-,501(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	45	45
starost	Pearson Correlation	-,501(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	45	45

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## c) Vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
starost	FAI	Correlation	1,000	,571
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	42
	T/P	Correlation	,571	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	42	0

## Korelacija med T/P, FAI in albuminom

## a) Korelacija med T/P in albuminom

**Correlations**

		T/P	Albumin
T/P	Pearson Correlation	1	,166
	Sig. (2-tailed)		,275
	N	45	45
Albumin	Pearson Correlation	,166	1
	Sig. (2-tailed)	,275	
	N	45	45

## b) Korelacija med FAI in albuminom

**Correlations**

		FAI	Albumin
FAI	Pearson Correlation	1	,227
	Sig. (2-tailed)		,134
	N	45	45
Albumin	Pearson Correlation	,227	1
	Sig. (2-tailed)	,134	
	N	45	45

## c) Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI

**Correlations**

Control Variables			FAI	T/P
Albumn	FAI	Correlation	1,000	,540
		Significance (2-tailed)	.	,000
		df	0	42
	T/P	Correlation	,540	1,000
		Significance (2-tailed)	,000	.
		df	42	0

## POVZETEK REZULTATOV

## 1. povprečne vrednosti preučevanih parametrov:

- a) v celotni preučevani populaciji moških (N=217) in razdeljeni populaciji na tri starostne podskupine

	celotna preučevana populacija N=217	starostna podskupina od 15 do 39 let N=65	starostna podskupina od 40 do 59 let N=88	starostna podskupina od 60 do 84 let N=64
T/T (nmol/L)	9,93±0,38	10,72±0,68	10,73±0,60	8,04±0,69
T/P (pmol/L)	35,27±1,77	38,01±2,44	38,41±3,25	28,16±3,00
FAI	38,02±2,06	49,00±4,00	38,85±3,22	25,73±3,00
SHBG (nmol/L)	34,38±1,26	26,70±1,54	34,85±2,01	41,53±2,57
Albumin (g/L)	45,94±0,22	47,52±0,41	45,43±0,28	45,05±0,42

b) v populaciji moških z znižanim celokupnim testosteronom (N=125) in razdeljeni populaciji na tri podskupine

	populacija z znižanim celokupnim testosteronom	starostna podskupina od 15 do 39 let N=32	starostna podskupina od 40 do 59 let N=48	starostna podskupina od 60 do 84 let N=45
T/T (nmol/L)	6,26±0,23	6,42±0,48	7,03±0,27	5,32±0,42
T/P (pmol/L)	22,45±1,13	25,92±2,62	23,39±1,44	18,98±1,90
FAI	24,14±1,59	33,01±4,18	25,76±2,03	16,10±1,87
SHBG (nmol/L)	35,78±1,81	26,66±2,56	34,73±2,83	43,40±3,23
Albumin (g/L)	45,76±0,30	47,25±0,69	45,48±0,35	45,00±0,50

## 2. koeficienti korelacije:

## a) CELOTNA STAROSTNA SKUPINA

PREUČEVANI PARAMETRI	<b>r</b> (celotna preučevana populacija) N=217	<b>r</b> (populacija z nižanim celokupnim testosteronom) N=125
T/P - FAI	0,661	0,476
T/P - starost	-0,135	-0,238
FAI - starost	-0,320	-0,428
Vpliv starosti na T/P - FAI	0,658	0,427
T/P - albumin	0,088 (p>0,05)	0,278
FAI - albumin	0,333	0,427
Vpliv albumina na T/P - FAI	0,672	0,412

## b) STAROSTNA SKUPINA OD 15 DO 39 LET

PREUČEVANI PARAMETRI	<b>r</b> (celotna preučevana populacija) N=65	<b>r</b> (populacija z nižanim celokupnim testosteronom) N=32
T/P - FAI	0,408	0,458
T/P - starost	-0,048 (p>0,05)	0,037 (p>0,05)
FAI - starost	-0,103 (p>0,05)	0,012 (p>0,05)
Vpliv starosti na T/P - FAI	0,406	0,458
T/P - albumin	0,322	0,251 (p>0,05)
FAI - albumin	0,058 (p>0,05)	0,449
Vpliv albumina na T/P - FAI	0,412	0,400

## c) STAROSTNA SKUPINA OD 40 DO 59 LET

PREUČEVANI PARAMETRI	<b>r</b> (celotna preučevana populacija) N=88	<b>r</b> (populacija z znižanim celokupnim testosteronom) N=48
T/P - FAI	0,736	0,302
T/P - starost	-0,094 (p>0,05)	-0,231 (p>0,05)
FAI - starost	0,046 (p>0,05)	-0,362
Vpliv starosti na T/P - FAI	0,744	0,241 (p>0,05)
T/P - albumin	0,287	0,343
FAI - albumin	0,042 (p>0,05)	0,433
Vpliv albumina na T/P - FAI	0,756	0,181 (p>0,05)

## d) STAROSTNA SKUPINA OD 60 DO 84 LET

PREUČEVANI PARAMETRI	<b>r</b> (celotna preučevana populacija) N=64	<b>r</b> (populacija z znižanim celokupnim testosteronom) N=45
T/P - FAI	0,821	0,556
T/P - starost	-0,383	-0,131 (p>0,05)
FAI - starost	-0,114 (p>0,05)	-0,501
Vpliv starosti na T/P - FAI	0,846	0,571
T/P - albumin	0,216 (p>0,05)	0,166 (p>0,05)
FAI - albumin	0,100 (p>0,05)	0,227 (p>0,05)
Vpliv albumina na T/P - FAI	0,822	0,540

3. Odstotki ujemanja (odstotek pod mejo znižanih vrednosti FAI, kadar je pod spodnjo mejo pričakovanih vrednosti znižan tudi T/P)

a) CELOTNA PREUČEVANA POPULACIJA

STAROSTNA PODSKUPINA	UJEMANJE
Od 15 do 39 let T/P < 31,4 pmol/L FAI < 30	76,9 %
Od 40 do 59 let T/P < 25,0 pmol/L FAI < 30	63,6 %
Od 60 do 84 let T/P < 19,0 pmol/L FAI < 30	59,4 %
<b>SKUPNO UJEMANJE (N=217)</b>	<b>66,4 %</b>

b) POPULACIJA Z ZNIŽANIM CELOKUPNIM TESTOSTERONOM

STAROSTNA PODSKUPINA	UJEMANJE
Od 15 do 39 let T/P < 31,4 pmol/L FAI < 30	68,5 %
Od 40 do 59 let T/P < 25,0 pmol/L FAI < 30	50 %
Od 60 do 84 let T/P < 19,0 pmol/L FAI < 30	57,8 %
<b>SKUPNO UJEMANJE (N=125)</b>	<b>57,6 %</b>

## 6. RAZPRAVA

Meritve prostega ali biološko aktivnega testosterona so bistvene za postavitev diagnoze hipogonadizma, pri tem pa je pomembna pravilna določitev le-tega. V ta namen so se razvile različne tehnike, s katerimi lahko prosto frakcijo androgenov izmerimo ali pa izračunamo po eni izmed uporabljenih formul.

Glavni cilj moje diplomske naloge je bil ugotoviti ali obstaja korelacija med prostim testosteronom in prostim androgenim indeksom (FAI), ki bi lahko bila pokazatelj androgenega statusa pri moških. Prosti testosteron smo s pomočjo encimsko imunske metode (*ACTIVE Free Testosterone EIA*) izmerili, FAI pa smo izračunali tako, da smo molarno koncentracijo celokupnega testosterona delili z molarno koncentracijo SHBG, kvocient pa nato pomnožili s faktorjem 100.

V obdelavo smo vključili 217 moških starih od 15 do 84 let. Nekateri so imeli diagnozo hipogonadizem že potrjeno in so bili na zdravljenju (spremljanje zdravljenja), drugi pa so v ambulantno prišli prvič z namenom potrditve diagnoze (pacienti z nizkimi vrednostmi testosterona). V prvem delu smo se lotili izračunov pri celotni preučevani populaciji (N=217), v drugem delu pa smo iz celotne preučevane populacije izvzeli rezultate moških, kjer so bile serumske koncentracije T/T znižane (N=125) z ozirom na hipogonadizem. Povprečna starost celotne preučevane populacije je bila 50 let, največ jih je zastopalo interval od 40 do 59 let (40,6%).

Kot prvo smo v celotni preučevani populaciji izračunali korelacijski koeficient med T/P in FAI ter dobili vrednost  $r=0,661$ , kar pomeni, da gre za pozitivno in srednjo korelacijo med preučevanima parametroma. Povprečna koncentracija T/P v plazmi je znašala  $35,27 \pm 1,77$  pmol/L, povprečna vrednost FAI pa  $38,02 \pm 2,06$ .

Glede na to, da na količino celokupnega, prostega in biorazpoložljivega testosterona v organizmu človeka vplivajo nekateri dejavniki, smo preverili, kako na T/P in FAI ter korelacijo med njima, vplivata starost in albumin. Vpliv starosti oziroma albumina na korelacijo med T/P in FAI smo preverili z metodo delne korelacije, kjer izključimo vpliv tretjega faktorja.



Kot je znano iz večih študij, se koncentracija celokupnega testosterona z leti pri moških zmanjša, še bolj pa se zmanjša koncentracija prostega testosterona in s tem tudi njegovi biološki učinki. Vzrok za to je povišana koncentracija SHBG, saj se prosti testosteron v krvi v večji meri veže na ta globulin. V našem primeru smo tako izračunali korelacijo med starostjo in T/P, starostjo in FAI ter vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI. Dobljena korelacija med starostjo in T/P je bila negativna, kar smo lahko pričakovali, saj se prosti testosteron s staranjem zmanjšuje. Enako negativno korelacijo smo dobili med starostjo in FAI. Ko smo preverili vpliv starosti na korelacijo med T/P in FAI, smo ugotovili, da se korelacija rahlo zniža (iz 0,661 na 0,658), kar pomeni, da je vpliv starosti na korelacijo med parametroma zanemarljiv.

Približno tretjina testosterona je v krvi človeka šibko vezanega na albumin in je ta skupaj s prostim testosteronom dostopen celicam organizma ter tako predstavlja BAT (*bioavailable testosterone*), zato smo preverili kakšen je njegov vpliv na naše izračune. Vse izmerjene koncentracije albumina so pri naši celotni populaciji padle v interval referenčnih vrednosti, ki znaša od 32 do 55g/L.

Iz izračunov vidimo, da je povezava med FAI in albuminom pozitivna, medtem ko povezave med T/P in albuminom ni (dobljeni korelacijski koeficient kaže na zelo nizko povezanost med parametroma, signifikanca, ki kaže tveganje oz. zmotljivost ob trditvi, da sta parametra med seboj povezana, je izredno visoka;  $p > 0,05$ ). Vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI se kaže z zvišanjem le-te. Sklepamo lahko, da ima albumin zelo majhen vpliv na T/T, kar pomeni, da vključitev albumina v ocenitev androgenega statusa preiskovancev v našem primeru nebi privedla do bistveno drugačnih rezultatov.

Po teh izračunih smo celotno preučevano populacijo (N=217) razdelili v tri podskupine glede na starost z namenom, da ugotovimo ali se korelacija med njimi spreminja ter v kolikšni meri se to kaže. Razdelitev populacije na tri intervale je bila pogojena z ozirom na intervale pričakovanih vrednosti za prosti testosteron, ki jih uporablja Laboratorij za analitiko hormonov in tumorskih markerjev na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, v katerem so meritve tudi izvedli. Prva podskupina je predstavljala moške, stare od 15 do 39 let, druga od 40 do 59 let, tretja pa od 60 do 84 let.

Prvo starostno podskupino je predstavljalo 65 preiskovancev (29,9% celotne populacije) povprečne starosti  $29,7 \pm 0,8$  let. Korelacijski koeficient, ki smo ga izračunali med T/P in FAI je bil nizek in pozitiven. Pri drugi podskupini, ki je predstavljala 88 (40,6%) moških povprečne starosti  $52,2 \pm 0,6$  let, smo glede na prvo podskupino dobili večjo povezavo med parametroma. Visoko in največjo povezanost med T/P in FAI smo izračunali pri zadnji podskupini, ki je obsegala 64 (29,5%) preiskovancev povprečne starosti  $67 \pm 0,7$  let. Iz teh rezultatov med podskupinami lahko opazimo, da se je korelacijski koeficient do zadnje podskupine, kjer je dosegel najvišjo vrednost, vedno večal.

V drugem delu naloge smo iz celotne preučevane populacije izvzeli rezultate meritev preiskovancev, pri katerih je bila koncentracija T/T nižja od referenčnih vrednosti (nižja od 10,0nmol/L). Pri tej skupini, ki predstavlja 57,6% naše celotne preučevane populacije, smo dobili naslednje rezultate: količine T/T, T/P in FAI so znižane za kar 37%, 36,3% in 36,5%, medtem ko je albumin znižan le za 0,4% in SHBG povišan za 4,1%. Nato smo z izračuni postopali na enak način, kot pri celotni preučevali populaciji.

Dobljena korelacija med T/P in FAI je bila pozitivna, vendar v primerjavi z izračunanim korelacijskim koeficientom pri celotni populaciji (kjer je šlo za srednjo korelacijo), le nizka. Vzrok za nižjo korelacijo bi lahko pojasnili tudi s tem, da imamo v izvzeti populaciji nižjo število moških kot v celotni populaciji. Enako negativni (kot pri celotni populaciji) toda močnejši povezavi smo dobili tudi pri izračunih korelacij med T/P in starostjo ter še večjo med FAI in starostjo. Ko smo preučili vpliv starosti na korelacijo med tema parametroma, smo opazili, da se korelacija zmanjša. Prav tako pozitivni in močnejši povezavi smo izračunali med T/P in albuminom ter FAI in albuminom, vpliv albumina na korelacijo med T/P in FAI se kaže v znižanju le-te, kar je ravno nasprotno glede izračuna pri celotni populaciji in zanemarljivo.

Enako kot celotno preučevano populacijo smo tudi populacijo z znižanimi vrednostmi T/T razdelili v enake tri podskupine glede na starost, največ jih je zastopalo interval od 40 do 59 let (38,4%). Izračuni v prvi podskupini pokažejo pozitivno povezavo med T/P in FAI, v drugi podskupini enako pozitivno, vendar precej nižjo korelacijo med parametroma, medtem, ko je korelacijski koeficient v tretji podskupini največji.

Pri pregledu izračunanih korelacijskih koeficientov znotraj posameznih podskupin, lahko vidimo, da povezava med nekaterimi parametri ni statistično značilna, kar lahko pojasnimo z zelo šibko korelacijo in slabo povezavo med njimi.

Kot zadnje smo pri moških, kjer so bile koncentracije prostega testosterona pod spodnjo mejo pričakovanih vrednosti, preverili v koliko odstotkih je bil pod spodnjo mejo orientacijskih vrednosti tudi prosti androgeni indeks (FAI). Pri celotni populaciji smo ugotovili 66,4 odstotno ujemanje, pri populaciji z znižanim celokupnim testosteronom pa 57,6 odstotno ujemanje, kar je srednje dobro ujemanje. Višjih vrednosti ne moremo pričakovati, saj je znotraj te skupine kar nekaj nejasnosti glede terapije, po drugi strani pa na razlike vpliva tudi status proteinov (visoke vrednosti SHBG, ki so lahko posledica hipogonadizma, hipertiroidizma, povečanih estrogenov,...).

Če povzamemo rezultate korelacij med T/P in FAI za vse tri starostne podskupine pri celotni preučevani populaciji, ugotovimo, da je povezava med tema parametroma pozitivna in dokaj visoka z vrednostjo signifikance pod 0,05. Ugotovimo tudi, da korelacija pri celotni populaciji iz podskupine v podskupino narašča in je v tretji podskupini (od 60 do 84 let) tudi največja ( $r=0,821$ ), medtem, ko pri populaciji z znižanim T/T iz prve podskupine v drugo pade, ter spet v tretji podskupini naraste, kjer je spet tudi največja.

## 7. SKLEP

Namen naše diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšna je korelacija med dvema metodama pri določanju sprememb v androgenem statusu moških, katerim je bila postavljena diagnoza hipogonadizem.

Korelacijo smo ugotavljali med metodo direktnega merjenja prostega testosterona v serumu in metodo računanja prostega androgenega indeksa (FAI).

Z izračuni in rezultati, ki smo jih dobili, smo ugotovili:

- pozitivno in srednjo povezavo med metodama pri celotni preučevani populaciji;
- pozitivno in nizko povezavo med metodama pri populaciji z znižanim celokupnim testosteronom
- da je korelacijski koeficient najvišji pri celotni preučevani populaciji in sicer pri starostni podskupini od 60 do 84 let in najnižji pri populaciji z znižanim celokupnim testosteronom in to pri drugi starostni podskupini od 40 do 59 let;
- da se korelacijski koeficient pri celotni populaciji od prve (15 - 39 let) do tretje (60 – 84 let) starostne podskupine povečuje
- da je vpliv starosti oziroma albumina na korelacijo med T/P in FAI zelo majhen oziroma zanemarljiv
- srednje ujemanje med znižanimi vrednostmi T/P in FAI.

Glede na naše izračune in rezultate lahko zaključimo, da je FAI izračunan iz T/T in SHBG, v primerjavi z izmerjenim prostim testosteronom dober pokazatelj androgenega statusa pri moških. Iz naših rezultatov lahko sklepamo tudi, da bi bil FAI dober pokazatelj spremenjenega androgenega statusa predvsem pri starejših moških s tako imenovanim pozno nastalim hipogonadizmom.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno nerediti izračune na višjem številu vzorcev, saj bi verjetno dobili rezultate z višjim koeficientom korelacije.

## 8. LITERATURA

1. Krajnc I, Pečovnik Balon B.: Interna medicina. Univerza v Mariboru, Visoka zdravstvena šola. Maribor, 2000; 223-226, 283-284
2. Barovič V.: Patologija, patološka fiziologija in osnove interne medicine. Učbenik za srednjo zdravstveno šolo. DZS, 2008; 217-218
3. Osredkar J.: Izbrana poglavja iz klinične kemije. Učno gradivo za študente farmacije. Ljubljana, maj 2008.
4. Guyton AC, Hall JE: Textbook of Medical Physiology. Eleventh edition. Elsevier Inc., Philadelphia, 2006; 905-916, 1003-1009.
5. Martini FH, Bartholomew EF: Essentials of Anatomy and Physiology. Third edition. Pearson Education. New Jersey, 2003; 314-317.
6. Meden Vrtovec H.: Zdravljenje s hormoni v ginekologiji in andrologiji. Slovensko društvo za reproduktivno medicino, Klinični center, Ljubljana 2002; 75, 76, 83-85, 141-143, 230-232, 237-243.
7. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA: Physiology. Fifth edition. Mosby. 2003; 719-740, 884, 942-946.
8. <http://www.endotext.org/male/male3/index.html>
9. Felig P, Frohman LA: Endocrinology & metabolism. Fourth edition. McGraw-Hill, ZDA, 2001; 420, 654-682, 800-815.
10. <http://www.labor-limbach.de/freies-testosteron.331.0.html>
11. Bain J: The many faces of testosterone. Clinical Interventions in Aging. Volume 2, december 2007; 567-576.
12. [http://en.wikipedia.org/wiki/Sex\\_hormone-binding\\_globulin](http://en.wikipedia.org/wiki/Sex_hormone-binding_globulin)
13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/10/59>
14. Pfeifer M.: Andropavza ali pozno nastali hipogonadizem. 51. tavčarjevi dnevi, zbornik prispevkov. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta-Katedra za interno medicino., 2009; 361-368.
15. Tamler R.: Andrology. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. Volume 36/2., junij 2007; 283-344.
16. [http://www.urologija.si/gradivo.php?subaction=showfull&id=1178345943&archive=&start\\_from=&ucat=&](http://www.urologija.si/gradivo.php?subaction=showfull&id=1178345943&archive=&start_from=&ucat=&)