

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

MOJCA HERMAN

**DIPLOMSKA NALOGA**

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ  
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE**

Ljubljana, 2012

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**MOJCA HERMAN**

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOLOČANJE SPOLNE  
HORMONE VEZOČEGA GLOBULINA (SHBG)**

**COMPARISON OF TWO METHODS TO DETERMINE SEX  
HORMONE BINDING GLOBULINE (SHBG)**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo UKC Ljubljana pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

### **Zahvala**

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

Zahvaljujem se mojima otrokoma Klemnu in Isabelli za potrpežljivost, mojim domačim, ki so me spodbujali, ter vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastajanju diplomske naloge.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, spec. med. biokem.

Mojca Herman

Ljubljana, 13. september 2012

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

# VSEBINA

POVZETEK .....	III
ABSTRACT .....	IV
1 UVOD .....	1
1.1 Sinteza hormonov .....	1
1.2 Delovanje hormonov na celice.....	2
1.3 Sproščanje hormonov.....	3
1.4 Plazemski prenos hormonov .....	3
1.5 Uravnavanje tvorbe hormonov .....	4
1.6 Steroidni hormoni .....	5
1.6.1 Estrogeni .....	5
1.6.2 Progesteron.....	6
1.6.3 Androgeni.....	7
1.6.3.1 Biosinteza androgenov .....	7
1.6.3.2 Metabolizem androgenov.....	10
1.6.3.3 Testosteron.....	11
1.7 Spolne hormone vezoči globulin (SHBG) .....	12
1.7.1 Biološka regulacija SHBG .....	13
1.7.2 SHBG v patofizioloških stanjih.....	15
1.7.2.1 Zmanjšanje plazemske koncentracije.....	15
1.7.2.2 Povečane plazemske koncentracije.....	19
1.7.3 Analitika SHBG .....	20
2 NAMEN DELA .....	22
3 MATERIALI, METODE IN OPREMA .....	23
3.1 Preiskovani vzorci.....	23
3.2 Metode .....	23
3.3 Reagenti .....	23
3.3.1 SHBG reagenčni kit Immulite® 1000.....	24
3.3.1.1 Priprava reagentov .....	24
3.3.2 SHBG reagenčni kit Elecsys .....	24
3.3.2.1 Priprava reagentov .....	25
3.4 Analizator.....	25
3.4.1 Imunološki analizator Immulite® 1000 .....	25
3.4.2 Imunološki analizator Roche Elecsys 1010/2010 .....	27
4 EKSPERIMENTALNO DELO .....	31
4.1 Priprava vzorcev .....	31
4.2 Statistične metode .....	31
5 REZULTATI .....	33
6 RAZPRAVA .....	40
7 SKLEP .....	42
8 LITERATURA .....	43
9 PRILOGE.....	45

## POVZETEK

Izboljšave tehnik za izolacijo in merjenje spolne hormone vežočega globulina (sex hormone binding globulin – SHBG) vodijo k boljšemu razumevanju vloge, ki jo ima SHBG pri transportu in mehanizmu delovanja steroidnih hormonov. Klinično določanje koncentracije SHBG daje zelo uporaben podatek pri proučevanju stanj, ki nastanejo pri hormonskih motnjah. Koncentracija SHBG v serumu se v zadnjem času določa z imunokemijskimi metodami.

Koncentracijo SHBG v serumu smo določili z dvema metodama. Obstoječa metoda sloni na kemiluminiscenčni reakciji (LIA – luminiscence immunoassay), nova, primerjalna metoda pa na elektroluminiscenčni reakciji (ECLIA – electro chemiluminescence immunoassay).

Primerjalno smo analizirali skupino preiskovancev, pri katerih nismo ugotovili endokrinoloških motenj oziroma motenj v metabolizmu proteinov. Dobljene rezultate smo analizirali ločeno po spolu, saj se izmerjene vrednosti kot tudi razponi referenčnih vrednosti med spoloma močno razlikujejo.

Korelacijo rezultatov, dobljenih z metodama, smo izračunali s Pearsonovim koeficientom. Izračunali smo tudi delež posameznih rezultatov, ki so zunaj referenčnih vrednosti, in signifikantnost razlike med metodama. Skladnost med metodama smo z uvrščanja meritev v mejah referenčnih vrednosti prikazali z navzkrižno tabelo in ocenili s Cohenovim koeficientom kapa.

Skladnost med metodama smo dodatno analizirali z grafičnim postopkom Blanda in Altmana (metoda meja skladnosti). Pokazalo se je, da sta metodi na splošno primerljivi.

## **ABSTRACT**

Improved techniques for isolation and measurement of sex hormone binding globulin (SHBG) leads on better knowledge of SHBG role in transport and mechanism of steroide hormones, while measurements of SHBG can indicate several hormonal abnormalities. Nowadays determinations of serum SHBG are based on immunochemical assays.

For determination of plasma SHBG concentrations we used two methods. Existent method is LIA immunoassay, and new method, is electrochemiluminiscence immunoassay - ECLIA.

Data have been evaluated from healthy adoult without any endocrinological or protein methabolism disorders. We evaluated results separately for females and males, because SHBG plasma concentrations and reference levels are much different between sexes.

The correlation of our results were calculated with the Pearsons coefficient. We also evaluated the data of the individual results that are outside of the reference values and the significant difference between both methods.

The simmetry between those methods was shown by cross index confirmed with Choens coefficient kappa.

The corelation between both methods that was analised with the graphical Bland and Altman method showses that both of the methods are comparable.

## KAZALO SLIK

SLIKA 1: Osnovna struktura steroidnih hormonov .....	5
SLIKA 2: Estradiol.....	6
SLIKA 3: Progesteron.....	6
SLIKA 4: Biosinteza androgenov .....	9
SLIKA 5: Metabolizem androgenov .....	10
SLIKA 6: Testosteron .....	11
SLIKA 7: Negativna povratna zanka: hipotalamo-hipofizno-testikularna os (7) .....	12
SLIKA 8: Princip metode LIA .....	25
SLIKA 9: Analizator Immulite® 1000 .....	26
SLIKA 10: Imunološki analizator Roche Elecsys 1010/2010 .....	28
SLIKA 11: Kalibracijska krivulja za SHBG .....	28
SLIKA 12: Graf meritev z metodama ECLIA in LIA pri preiskovankah (n = 25).....	34
SLIKA 13: Graf meritev z metodama ECLIA in LIA pri preiskovancih (n = 140).....	35
SLIKA 14: Diagram Blanda in Altmana pri preiskovankah .....	39
SLIKA 15: Diagram Blanda in Altmana pri preiskovancih.....	39

## KAZALO TABEL

TABELA I: SHBG v bolezenskih stanjih (9).....	15
TABELA II: Rezultati določanja ponovljivosti v seriji za sistem Immulite® 1000 (17).....	26
TABELA III: Rezultati določanja ponovljivosti zunaj serije za sistem Immulite® 1000 (17)	27
TABELA IV: Ponovljivost meritev reagentov, narejenih na analizatorju Roche Elecsys 1010/2010: 10 (16) .....	29
TABELA V: Ponovljivost meritev reagentov, narejenih na analizatorju E 170: 21 (16) .....	30
TABELA VI: Vrednosti koncentraciji SHBG pri 165 preiskovancih obeh spolov, dobljenih po metodah LIA in ECLIA (glej prilogo 1).....	33
TABELA VII: Vrednosti koncentraciji SHBG pri 25 preiskovankah, dobljenih po metodah LIA in ECLIA (glej prilogo 2) .....	33
TABELA VIII: Vrednosti koncentracij SHBG pri 140 preiskovancih, dobljenih po metodah LIA in ECLIA (glej prilogo 3) .....	33
TABELA IX: Korelacija med meritvami .....	36
TABELA X: Ocenjeni parametri linearnega regresijskega modela SE – standardna napaka ocene .....	36
TABELA XI: Opisne statistike in primerjava povprečij med metodama .....	36
TABELA XII: Skladnost med metodama z analizo meritev v mejah referenčnih vrednosti pri preiskovankah .....	37
TABELA XIII: Skladnost med metodama z analizo meritev v mejah referenčnih vrednosti pri preiskovancih .....	37
TABELA XIV: Koeficient kapa za skladnost med metodama z analizo meritev v mejah referenčnih vrednosti .....	38



## SEZNAM KRATIC

- A** – androstendion
- AMP** – adenzin monofosfat
- cAMP** – ciklični adenzin monofosfat
- ATP** – adenzin trifosfat
- CBG** – kortizol vežočni globulin
- DHEA** – dehidroepiandrosteron
- DHEA-S** – dehidroepiandrosteron sulfat
- DHT** – dehidrotosteron
- DNK** – dezoksiribonukleinska kislina
- EBG** – estradiol vežočni globulin
- ECLIA** – imunološko elektrokemiluminiscenčna metoda
- FAI** – prosti androgeni indeks
- FSH** – folikle spodbujajoči hormon
- 3 $\beta$ -HSD** – 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze
- 17 $\beta$ -OH-BG** – 17 $\beta$ -hidroksisteroide vežočni globulin
- HRE** – hormonsko odziven element
- IGFBP1** – rastni faktor vežočni protein
- LH** – luteinizirajoči hormon
- LIA** – imunološko kemiluminiscenčna metoda
- NO** – dušikov oksid
- PCO** – sindrom policističnih ovarijev
- PTH** – paratiroidni hormon
- RNK** – ribonukleinska kislina
- SHBG** – spolne hormone vežočni protein
- sSBP** – spolne steroide vežočni protein
- T** – testosteron
- TeBG** – testosteron estradiol vežočni globulin
- TSH** – tirotropi

# 1 UVOD

Endokrinologija je veda o kemičnih glasnikih in hormonih, ki jih tvorijo endokrine celice in endokrini nevroni. Ti delujejo lokalno ali na oddaljene cilje in tako uravnavajo delo različnih celic ter zagotavljajo pogoje za vse potrebne življenjske funkcije.

Za vzdrževanje homeostaze sta potrebna živčni in endokrini sistem, ki sta medsebojno prepletena. Nevrotransmiterji (npr. noradrenalin) krožijo v krvnem obtoku kot hormoni, medtem ko živčni dražljaji vplivajo na tvorbo in izločanje hormonov, npr. inzulina in testosterona. Povezava med obema je najizrazitejša v hipotalamusu.

Hormoni in kemični glasniki se tvorijo v somatičnih endokrinih celicah, ki se lahko združujejo v žleze, ali v nevrosekrecijskih celicah, ki lahko tvorijo možganska jedra. Poti, po katerih hormoni oziroma kemični glasniki pridejo do ciljnih celic ali tkiv, so različne.

Hormon ali celični glasnik:

1. lahko deluje parakrino – lahko prehaja v sosednje celice in uravnava njihovo delovanje,
2. lahko deluje avtokrino – lahko deluje že v celici, v kateri je nastal,
3. lahko se tvori v eni celici, se izloči in nato potuje po krvnem obtoku do ciljnega organa,
4. lahko deluje lumokrino – lahko potuje od mesta tvorbe do mesta delovanja po svetlini črevesja (npr. gastrin),
5. lahko deluje neuroendokrino – endokrini nevroni tvorijo hormone, ki se sproščajo v krvni obtok,
6. kot nevrotransmitter spreminja procese v sinapsah. (1)

## 1.1 Sinteza hormonov

Hormone lahko uvrstimo v tri glavne skupine:

- peptide ali proteine (npr. inzulin, glukagon, FSH),
- steroide (npr. kortizol, estradiol, testosteron),
- amine (npr. tiroksin, adrenalin).

**Peptidni hormoni** se tvorijo tako, da geni odgovorijo sekundarnemu glasniku (mRNK). Nastali protein vsebuje signalno beljakovino. Imenujemo ga prehormon, ki se pod vplivom encimov cepi že v endoplazemskem retikulumu. Najprej se odcepi signalna beljakovina. Tak hormon je lahko biološko aktiven (prohormon). Nekateri pa za biološko aktivnost potrebujejo dodatne spremembe, npr. dodatek sladkorjev za dokončno obliko glikoproteinskih hormonov. Drugi potujejo v Golgijev aparat, kjer se cepijo do biološko aktivnih hormonov. Ti se uskladiščijo v sekrecijskih granulah in čakajo, da se sprostijo iz celice. (1)

**Steroidni hormoni** se tvorijo iz holesterola in iz 7-dehidroholesterola (vitamin D<sub>3</sub>). Za pretvorbo holesterola v aktivno obliko hormona je potrebna dolga vrsta encimskih reakcij. Steroidni hormoni se v celici tvorijo v citoplazmi, endoplazemskem retikulumu in mitohondrijih. V celici se ne kopičijo, ampak se takoj izločijo. (1)

**Aminski hormoni** se sintetizirajo podobno kot steroidi. Razlika je, da so prekursorji aminokislina. Sem spadajo kateholamini in ščitnični hormoni.

Značilnost kateholaminske sinteze je, da se v citoplazmi tirozin pretvori v dopamin, ki se nato v sekrecijskih granulah pretvori v noradrenalin. Tvorba adrenalina iz noradrenalina je možna samo v celicah sredice nadledvične žleze.

Sinteza ščitničnih hormonov se razlikuje v tem, da se prohormon (tiroglobulin) izloči v ščitnične folikle in se uskladišči kot koloid. Hormon dobi aktivno obliko šele po eksocitozi in fagocitozi tiroglobulina. (1)

## **1.2 Delovanje hormonov na celice**

Hormoni delujejo na celice tako, da se vežejo na specifične makromolekule, ki so na celični membrani ali v citoplazmi. Posebne makromolekule, ki prepoznavajo hormone, imenujemo receptorji. Hormoni imajo veliko afiniteto do receptorjev. Tako je možen natančen odgovor ciljne celice na manjše količine hormona. (1)

### **1.3 Sproščanje hormonov**

Steroidni hormoni se iz celic, kjer se tvorijo, takoj izločijo. Peptidni hormoni se v majhnih količinah kopičijo v citoplazemskih granulah. Zaloge zadoščajo samo za kratek čas, z izjemo noradrenalina, ki ga je na živčnih končičih za nekaj dni.

Nekateri hormoni se pred sproščanjem cepijo in spremenijo fizikalno-kemijske lastnosti – iz netopnih se spremenijo v topne. Peptidni hormoni, ki so uskladiščeni v granulah, se izločijo z eksocitozo. Steroidni hormoni lahko prehajajo v sosednje celice.

Večina hormonov se sprošča periodično ali ritmično. Pulzatilno sproščanje gonadotropinov pri odraslih se spreminja iz minute v minuto in ima hkrati dnevni in sezonski cikel. Kortizon se sprošča nepretrgano z izrazitim dnevno-nočnim ritmom. Sproščanje ščitničnih hormonov se spreminja sezonsko. (1)

### **1.4 Plazemski prenos hormonov**

Hormoni potujejo od mesta tvorbe do mesta delovanja po krvi, limfi ali medcelični tekočini. Večina peptidnih hormonov in aminov je topna v plazmi. Njihova življenjska doba je kratka (razpolovna doba je 3 do 7 minut). Glikoproteinski hormoni imajo daljšo življenjsko dobo. Steroidni in ščitnični hormoni niso topni v vodi in potujejo v plazmi skoraj v celoti vezani na proteine. Vežalni proteini so lahko specifični za določen hormon (npr. TeBG – testosteron estradiol vežoč globulin). Hormone vežejo tudi nespecifične vezalne beljakovine, kot so albumini in prealbumini (npr. vezava testosterona z albumini). Hormon, ki je vezan na protein, ne more vstopiti v celico in je biološko neaktiven.

Ko se hormon veže na receptor (protein), se ta konformacijsko spremeni (npr. disociira, polimerizira ali fosforilira) in prenese v jedro. Aktivirani receptor se nato veže na specifični del DNK, imenovan hormonsko odzivni element (HRE), in povzroči (ali prepreči, saj lahko deluje kot aktivator ali kot inhibitor) prepis določenih genov.

Vezani hormoni so zaloga hormonov in se lahko takoj sprostijo ter delujejo na ustreznih mestih. Razmerje med količino vezanega in prostega hormona v plazmi je odvisno od

koncentracije hormona, koncentracije vezalnega proteina in afinitete hormona do vezalnega proteina.

Ko določamo koncentracije hormonov v plazmi, zajamemo celotno koncentracijo vezanih in prostih hormonov, zato moramo pri vrednotenju rezultatov upoštevati, da lahko sprememba proteinske slike bistveno vpliva na dobljeni rezultat. S posebnimi laboratorijskimi postopki je možno določiti samo proste hormone v plazmi. (1)

## 1.5 Uravnavanje tvorbe hormonov

Tvorba in izločanje hormonov sta pod vplivom regulacijskih mehanizmov. Posebnost endokrinega sistema je, da hormoni sami ali s svojimi metabolnimi učinki v povratnih zvezah uravnavajo lastne regulacijske mehanizme. Povratne zveze so lahko negativne ali pozitivne in opredeljene kot dolge, kratke ali ultrakratke zanke.

**Dolga zanka povratne zveze.** Tipičen primer za dolgo zanko povratne zveze je regulacijski sistem hipotalamus–prednji režanj hipofize–periferni endokrini organ (ščitnica, nadledvična žleza, gonade). V nevronih hipotalamusa in v preoptičnem predelu se tvorijo sprožilni in zaviralni dejavniki, ki potujejo po aksonih do mediane eminence. Tam so uskladiščijo, dokler ne pride impulz in se sprostijo v hipofizni portalni obtok. Tako dosežejo receptorje na celičnih membranah adenohipofize ter sprožijo izločanje in tvorbo specifičnih tropnih hormonov (TSH, ACTH, LH, FSH). Ti delujejo na periferne žleze in sprožijo izločanje perifernih hormonov, ki v dolgi povratni zvezi zavrejo izločanje tropnih hormonov adenohipofize in izločanje hipotalamičnih dejavnikov.

Večina povratnih zvez je negativna.

Primer pozitivne povratne zveze je zveza med veliko koncentracijo estrogena v sredini menstrualnega ciklusa in izločanjem LH.

**Kratka zanka povratne zveze.** Povratne zveze delujejo tudi med sprožilnimi in zaviralnimi dejavniki hipotalamusa in prednjega režnja hipofize.

O **ultrakratki zanki povratne zveze** govorimo, kadar hormoni lokalno, na mestu nastajanja, zavirajo lastno sintezo – tvorba inzulina je odvisna od koncentracije krvnega sladkorja.

Zaradi regulacijskih mehanizmov, ki temeljijo na načelu povratnih zvez (pozitivnih ali negativnih), določanje plazemske koncentracije enega hormona večinoma ne zadošča za opredeljevanje hormonskega stanja. Določeno plazemsko koncentracijo enega od hormonov

periferne endokrine žleze lahko vrednotimo samo skupaj s koncentracijo ustreznega regulacijskega hormona ali ustrezne regulacijske snovi. (1)

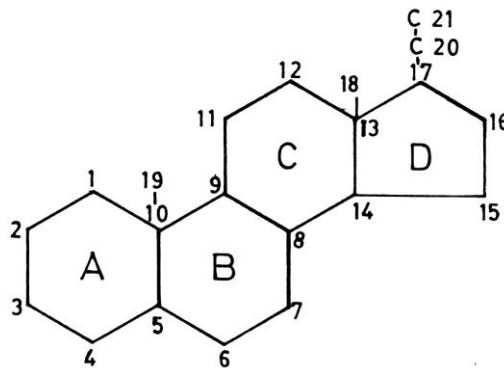
## 1.6 Steroidni hormoni

Osnovna struktura steroidnih hormonov je sestavljena iz ciklopentanofenantrenskega obroča. Med steroidne hormone spadajo spolni hormoni in kortikosteroidi. (4)

Steroidni hormoni, med katere spadajo kortizol in aldosteron (iz skorje nadledvične žleze), estradiol (ženski hormon, ki nastaja v ovariju in posteljici), testosteron (v testisih) in progesteron (v ovariju), so vsi derivati holesterola.

Glavne skupine spolnih hormonov so:

- estrogeni,
- gestageni (progesteron),
- androgeni (testosteron). (2, 3)

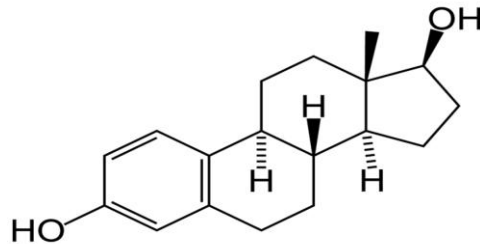


SLIKA 1: Osnovna struktura steroidnih hormonov

### 1.6.1 Estrogeni

Estrogeni so ženski spolni hormoni, ki vplivajo na razvoj ženskih spolnih organov, sekundarnih spolnih znakov, na menstrualni ciklus in na nosečnost. Po kemijski strukturi so steroidi z 18 C-atomi. Od številnih estrogenov, ki so v telesu, je največ estrona,  $17\beta$ -estradiola in estriola. Fiziološko najbolj aktiven je  $17\beta$ -estradiol.

Estrogeni se pri ženskah izločajo iz ovarijskih foliklov, v nosečnosti pa iz placente. Nekaj estrogena nastaja v suprarenalni žlezi in pri moških v testisih. Določanje koncentracije estrogena ima v nosečnosti velik klinični pomen za oceno delovanja placente in pri neplodnih ženskah za oceno delovanja jajčnikov. (4)

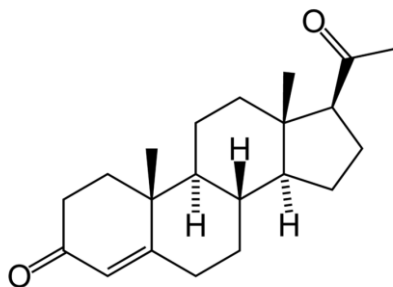


SLIKA 2: Estradiol

### 1.6.2 Progesteron

Progesteron je steroid z 21 C-atomi. Je ženski spolni hormon, ki skupaj z estrogeni sodeluje pri uravnavanju menstrualnega ciklusa. (4)

Progesteron (gestagen) proizvajajo celice rumenega telesca, zato se njegove ravni zvišajo neposredno po ovulaciji. Gestagene uporabljamo pri hormonskem zdravljenju. (2)



SLIKA 3: Progesteron

### 1.6.3 Androgeni

Androgeni so moški spolni hormoni. Najpomembnejši med njimi je testosteron. Odgovorni so za moško spolno diferenciacijo v embrionalnem razvoju, za sekundarni spolni razvoj v puberteti, za rast in dozorevanje prostate, semenjaka in mošnje, vzdrževanje libida, za spermatogenezo, mišično maso in moč, mineralno gostoto kosti in eritropoezo (tvorjenje rdečih krvničk) pri odraslih moških. (1, 2)

Androgeni so spojine C-19 (ciklopentanoperhidrofenantrenski derivati), ki se sintetizirajo v nadledvični žlezi in spolnih žlezah obeh spolov. Adrenalni androgeni so predvsem dehidroepiandrosteron (DHEA) in njegov sulfat (DHEA-S), androstendion (A) in testosteron (T). Testikularne celice izločajo predvsem testosteron, v manjšem obsegu pa tudi androstendion, DHEA in dihidrotestosteron (DHT), medtem ko ovarijske celice proizvajajo pomembne količine androstendiona in ostalih androgenov, ki v zrnatih celicah prehajajo v estrogene. (5)

#### 1.6.3.1 Biosinteza androgenov

Biosinteza poteka podobno v ovariju, testisu ali skorji nadledvične žleze. Holesterol je običajen predhodnik vseh steroidnih hormonov. Za biosintezo se lahko uporabi holesterol iz plazme, in sicer iz LDL-frakcije lipoproteinov, ali pa nastane prek mevalonata, skvalena in lanosterola iz acetata. Pretvorba holesterola v pregnenolon je prva in odločilna stopnja pri sintezi vseh steroidnih hormonov, ki jo v skorji nadledvične žleze uravnava adrenokortikotropni hormon (ACTH) in angiotenzin II, v testisu luteinizirajoči hormon (LH) ter v ovariju folikle spodbujajoči hormon (FSH) in LH.

Vse te pretvorbe se dogajajo pod vplivom citokroma P450 encima P450<sub>scc</sub> (angl. side chain cleavage), ki povzroči hidroksilacijo na položajih 20 in 22 ter cepitev holesterolove verige na položaju C20-22. Zmanjšanje aktivnosti P450<sub>scc</sub> povzroči zmanjšano sintezo vseh steroidnih hormonov.

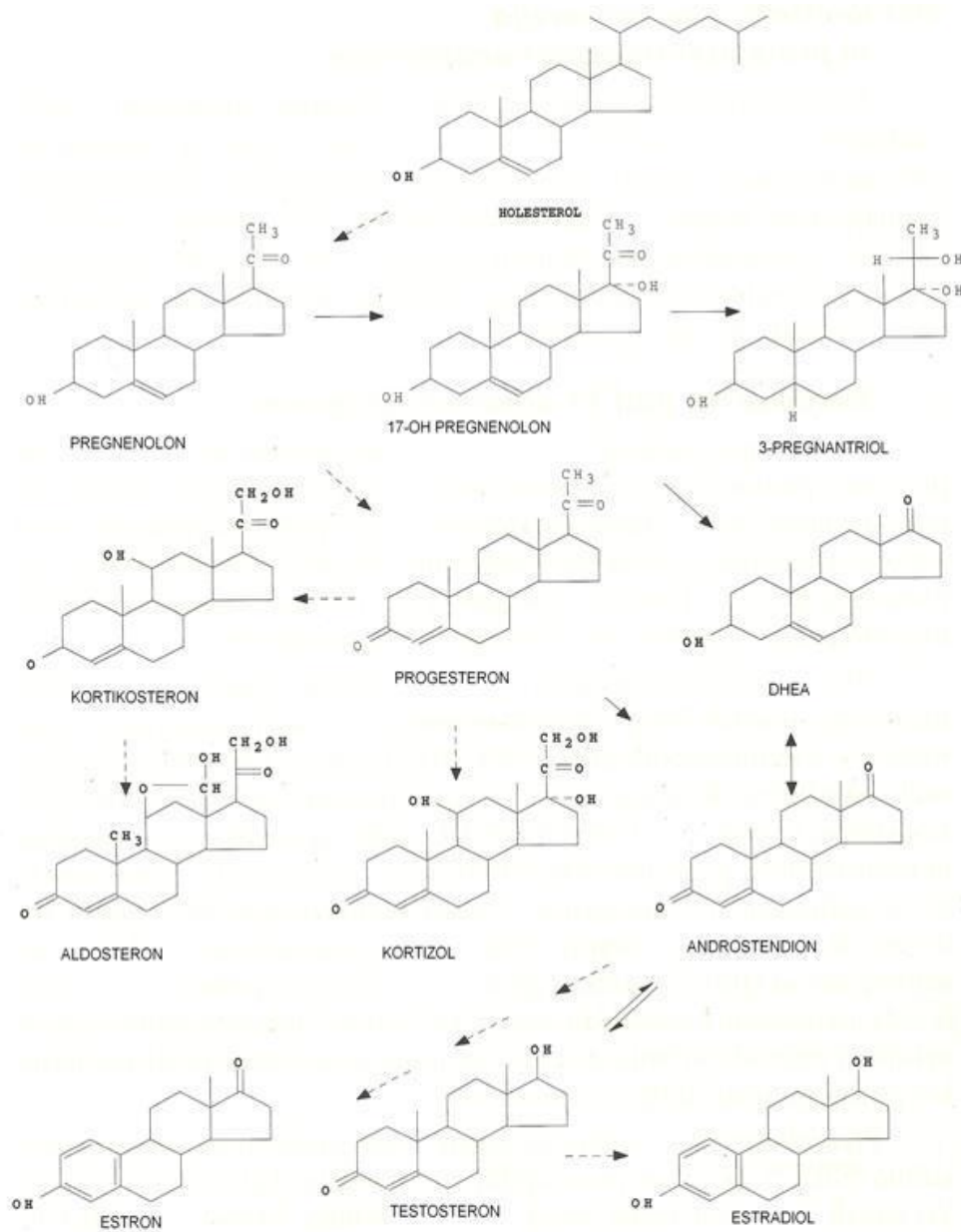
Iz pregnenolona oziroma progesterona lahko po 17 $\alpha$ -hidroksilaciji nastaneta 17 $\alpha$ -hidroksipregnenolon oziroma 17 $\alpha$ -hidroksiprogesteron. V naslednji fazi pride do cepitve vezi C17-20 (17,20-liaza) z nastankom DHEA iz pregnenolona in androstendiona iz progesterona. Encima 17 $\alpha$ -hidroksilaza in 17,20-liaza predstavljata P450<sub>c17</sub>. Njuno razmerje je različno v nadledvični žlezi in testisu, zato je različna tudi sinteza encimov.



P450c21, ki je po zgradbi podoben P450c17, povzroči hidrolizacijo na položaju C21 z nastankom dezoksikortikosterona oziroma 11-dezoksikortizola.

Pretvorba pregnenolona v androstendion prek 17-hidroksipregnenolona in DHEA zahteva oksidacijo  $3\beta$ -hidroksilne skupine v ketoskupino, čemur sledi premik dvojne vezi s položaja C5-6 na C4-5. Obe pretvorbi potekata pod vplivom encima  $3\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze ( $3\beta$ -HSD). Zmanjšana aktivnost  $3\beta$ -HSD vodi do zmanjšane sinteze kortizola in aldosterona ter povečane sinteze DHEA, kar povzroči virilizacijo eksternih genitalij pri ženskem zarodku in zmanjšano produkcijo testosterona, zaradi česar pride v puberteti do ginekomastije.

Pretvorba androstendiona do testosterona se odvija pod vplivom 17-ketosteroid reduktaze, ki jo prav tako poimenujemo 17-oksireduktaza ali  $17\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza ( $17\beta$ -HSD). Necitokromski encim  $17\beta$ -HSD se podobno kot  $3\beta$ -HSD nahaja v endoplazemskem retikulumu. Pomanjkanje tega encima je redko in se kaže kot pojav eksternih ženskih spolnih organov pri moškem oziroma z virilizacijo v puberteti z ginekomastijo ali brez nje. (5)

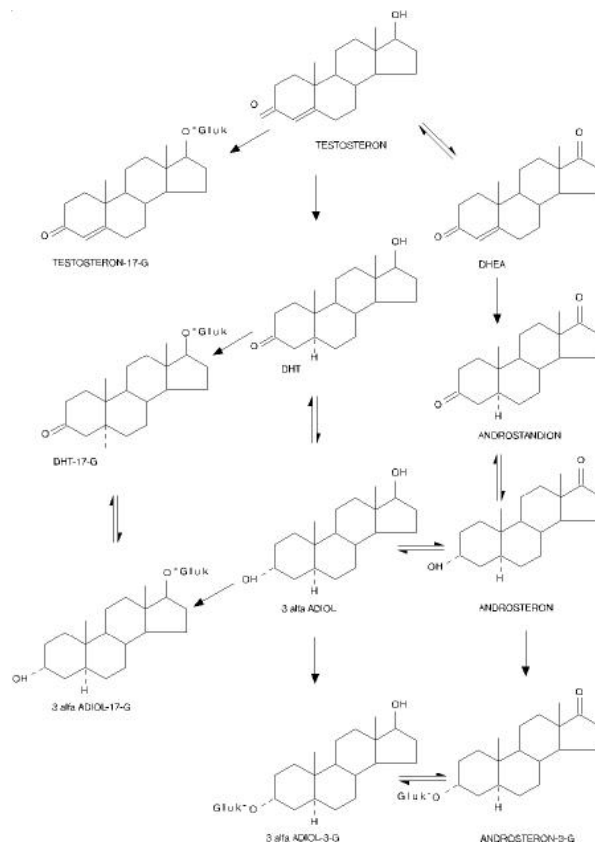


SLIKA 4: Biosinteza androgenov  
(polna črta predstavlja enostopenjsko pretvorbo, prekinjena pa večstopenjsko)

### 1.6.3.2 Metabolizem androgenov

Ko se androgeni in njihovi predhodniki sintetizirajo v skorji nadledvične žleze ali spolnih žlezah, pridejo v krvni obtok. Po njem pridejo do odzivnih celic in ostalih organov, ki imajo celice bogate z encimi za metabolizem steroidov. Ta metabolna aktivnost je pomembna zaradi dveh razlogov: prvič deluje kot mehanizem inaktivacije androgenov in priprava za izločanje, drugič pa deluje kot mehanizem aktivacije nizkoaktivnih predhodnikov.

Pred izločanjem se večina androgenov veže z glukuronsko ali žveplovo kislino. Ta vezava povečuje topnost v vodi in olajša izločanje v seču. Vsi metaboliti v seču razen testosteronglukuronidov  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diola in  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diolglukuronida prispevajo k celotnim 17-ketosteroidom. Celotne 17-ketosteroide lahko delimo na 11-dezoksi (DHEA, androstendion) in 11-oksisteroide (11-ketoandrostendion, 11-hidroksiandrostendion). (5)

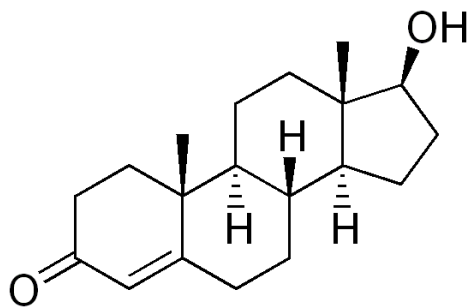


SLIKA 5: Metabolizem androgenov

### 1.6.3.3 Testosteron

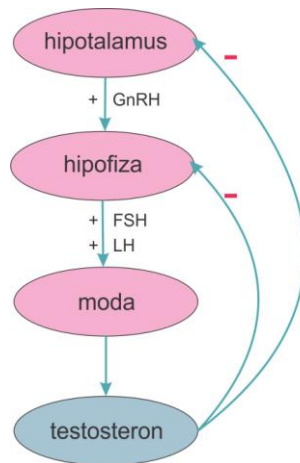
Testosteron je biološko najučinkovitejši androgen, ki primarno deluje na mišice, hipofizne gonadotropne hormone in Wolffianovo izvodilo. Pod vplivom  $5\alpha$ -reduktaze iz testosterona nastaja prav tako biološko aktiven androgen DHT, ki deluje predvsem lokalno na kožo ob spolovilih in na lasne folikle. (5)

Testosteron izločajo intersticijske celice v modih pod vplivom LH. Uravnava rast in razvoj moških spolovil, spermatogenezo (razvoj semenčic) in je odgovoren za sekundarne spolne znake.



SLIKA 6: Testosteron

Količina sintetiziranega testosterona se uravnava prek tako imenovane hipotalamo-hipofizno-testikularne osi. Ko raven testosterona v krvi pade, se v hipotalamusu sprosti gonadotropni hormon, ki spodbudi hipofizo, da sprosti LH in FSH. Tadvata pa spodbujata moda (testise), da sintetizirajo testosteron. Ko krvna raven testosterona naraste, se prek negativne povratne zanke zavre izločanje gonadotropin sproščajočega hormona iz hipotalamusa in FSH/LH iz hipofize. (7)



SLIKA 7: Negativna povratna zanka: hipotalamo-hipofizno-testikularna os (7)

V krvi je 98 % do 99 % cirkulirajočega testosterona vezanega na spolne hormone vežočič globulin (SHBG) in na albumine. Pri odraslih moških je porazdelitev med albuminom in SHBG enakomerna, medtem ko je pri ženskah okoli 80 % testosterona vezanega na SHBG, preostanek pa na albumin. Pri obeh spolih je majhna količina testosterona vezana na kortizol vežočič globulin (CBG).

Izračun prostega androgenega indeksa (FAI) zagotavlja primerno merjenje biološko aktivnega testosterona. Izračunamo ga kot razmerje med celotnim testosteronom v primerjavi s koncentracijo SHBG. (6, 8)

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

## 1.7 Spolne hormone vežočič globulin (SHBG)

V zadnjih letih so odkrili ekstracelularne makromolekule, ki vežejo androgene in se razlikujejo od intracelularnih androgenskih receptorjev. To frakcijo  $\beta$ -proteinov danes najpogosteje imenujemo spolne hormone vežočič globulin ali uporabimo kratico SHBG (sex hormone binding globulin). Je cirkulirajočič plazemski protein, ki poleg androgenov veže tudi estrogene, zato so različni avtorji uporabili različna imena:

- estradiol vežočič globulin (estradiol binding globulin – EBG),

- testosteron in estradiol vežočni globulin (testosteron estradiol binding globulin – TeBG)
- spolne steroide vežočni protein (sex steroid binding protein – sSBP) in
- 17 $\beta$ -hidroksisteroid vežočni globulin (17 $\beta$ -hydroxysteroid binding globulin – 17 $\beta$ -OH-BG). (9)

Z elektroforezo so ugotovili, da molekula SHBG nastopa kot naključna mešanica lahkih in težkih verig in da prevladuje dimerna oblika dveh težkih verig.

Molekula SHBG ima eno vezalno mesto za steroide. V razredčeni plazmi ima SHBG pri nizki temperaturi približno trikrat večjo afiniteto za testosteron kot za estradiol. Na splošno sta za vezavo potrebna skupina 17 $\beta$ -OH na obroču D in ravninski obroč A. (9)

Med androgeni obstaja navidezna povezava med biološko aktivnostjo in njihovo sposobnostjo vezave na SHBG. Bolj ko je androgen biološko aktiven, močnejša je vezava na SHBG. Tako se dihidrotestosteron skoraj trikrat bolj veže kot testosteron, estradiol pa se kot biološko najbolj aktiven estrogen bolje veže na SHBG v primerjavi z estronom ali estriolom. (3)

### 1.7.1 Biološka regulacija SHBG

SHBG je glikoprotein z molekulsko maso okoli 95 kDa. Nastaja v jetrih. Njegova biološka funkcija v krvnem obtoku je transport steroidnih hormonov testosterona in estradiola. SHBG ima zelo visoko vezalno afiniteto za oba steroida in tako se pri zdravem odraslem moškem na SHBG veže približno 44 % do 65 % testosterona. Pri zdravih ženskah se ga veže 66 % do 78 %, v zadnjih treh mesecih nosečnosti pa 95 %. Ekvivalentno je pri zdravih odraslih moških na SHBG vezanega 20 % estradiola, pri ženskah 37 % in pri nosečnicah 88 %. Nekaj testosterona je vezanega na kortizol vežočni globulin (CBG). Preostala količina testosterona in estradiola je delno vezana na albumin in delno prosta. Biološko aktivna oblika testosterona (BAT) je prosta frakcija, ki znaša 1 % do 2 % celotnega testosterona in delno tudi na albumin vezana frakcija (non SHBG bound T – NSBT). (6, 9, 16)

Razmerje med posameznimi frakcijami je odvisno od koncentracije SHBG. SHBG tako vzdržuje enakomerno koncentracijo proste frakcije androgenov in estrogenov v krvni plazmi. Kompleks med steroidnim hormonom in SHBG lahko zapusti krvni obtok in vstopi

v intersticijski prostor. Takoj ko ta kompleks pride v neposreden stik z bližnjimi membranami, lahko vstopi v celice prek specifičnega prenašalnega mehanizma s pomočjo membranskega receptorja za SHBG.

SHBG ima torej v plazmi dvojno vlogo:

- uravnava odstotek prostega testosterona in estradiola ter nadzira njun metabolični očistek,
- omogoča specifični transport teh steroidov prek plazemske membrane specializiranih celic, ki vsebujejo steroidne receptorje.

Več raziskav je pokazalo, da dajanje androgenov pri obeh spolih povzroči padec koncentracije SHBG, po dajanju estrogenov pa se koncentracija SHBG poveča. Koncentracija SHBG pri otrocih je večja kot pri odraslih. Pri dečkih koncentracija SHBG med puberteto pada bolj očitno kot pri deklicah. Nivo plazemskega SHBG je pri odraslem moškem približno za polovico nižji kot pri ženski iste starosti. Vzrok za to razliko je v nasprotnem učinku androgenov in estrogenov na sintezo SHBG v jetrih. V obdobju pred puberteto je tvorba testosterona in estradiola pri obeh spolih majhna in sinteza SHBG ni pod vplivom spolnih hormonov, temveč le delno pod vplivom ščitničnih hormonov. Pri deklicah se med puberteto uravnoteženo zvišata ravni androgenov in estrogenov, zaradi česar sledi le majhen padec koncentracije SHBG. Pri dečkih pa se koncentracija testosterona poveča precej bolj kot koncentracija estradiola, čemur sledi občutnejši padec koncentracije krožečega SHBG. Koncentracije SHBG se občutno povečajo med nosečnostjo v zadnjih treh mesecih dosežejo tudi pet- do desetkratno povečanje. (9)

## 1.7.2 SHBG v patofizioloških stanjih

TABELA I: SHBG v bolezenskih stanjih (9)

Znižanje	Zvišanje
hirzutizem (ženske)	hipertiroidizem
virilizem (ženske)	ciroza jeter
akne vulgaris (ženske)	hipogonadizem (moški)
bolezen policističnih ovarijev (ženske)	ginekomastija (moški)
hiperandrogenizem (ženske)	nesenzibilnost androgenov (moški)
debelost	pomanjkanje androgenov (moški)
hipotiroidizem (ženske)	anoreksija nervoza (ženske)
akromegalija	zdravila: oralne kontracepcijske tablete, antiepileptiki, hormonska terapija
Cushingov sindrom	
tumorji ovarijev z androgenizacijo	
zdravljenje z ravnimi hormoni	
zdravljenje z glukokortikoidi	

### 1.7.2.1 Zmanjšanje plazemske koncentracije

#### Sindrom policističnih ovarijev

Sindrom policističnih ovarijev (PCO) je najpogostejša endokrinopatija pri ženskah. Klinični znaki PCO ob ultrazvočnih značilnostih vsebujejo še hirzutizem, oligoamenorejo, akne in debelost v različnih kombinacijah.

Značilnost vseh bolnic s PCO je povečana tvorba ovarijskih androgenov, vendar se rezultati preiskav razlikujejo pri debelih bolnicah s PCO in pri bolnicah z normalno telesno težo.

Pri debelih so ugotovili:

- večje koncentracije inzulina, prostega testosterona in estrogena ter
- manjše koncentracije ravnega hormona (RH) in IGFBP1.



Profil hormonskih preiskav se razlikuje tudi pri bolnicah z ovulacijskimi cikli in rednimi menstruacijami, pri katerih so koncentracije LH, FSH, testosterona, androstediona in inzulina manjše kot pri bolnicah s PCO in z menstruacijskimi motnjami. (3)

Tudi sindrom policističnih ovarijev se včasih zamenjuje s celotnim sindromom funkcionalne androgenizacije, čeprav je le ena od njegovih skrajnih oblik. Oznako funkcionalen uporabljamo za razlikovanje tega sindroma od bolezni z organskimi okvarami žlez z androgeno produkcijo (tumorji ovarijev in nadledvičnih žlez), ki lahko v začetku posnemajo sindrom funkcionalne androgenizacije. (9)

### **Hirzutizem**

Hirzutizem je samo eden od simptomov sindroma funkcionalne androgenizacije. Sindrom funkcionalne androgenizacije imenujemo stanje, ko pri ženski ugotovimo zmerno povečanje koncentracije enega ali več androgenih hormonov v plazmi, klinično pa različne kombinacije naslednjih znakov:

- motnje v reprodukciji (sterilnost oz. subfertilnost, menstrualne motnje z anovulacijskimi cikli, predvsem kot oligomenoreje in amenoreje),
- hujše oblike aken, odpornih proti lokalnem zdravljenju, androgena alopecija,
- hirzutizem in seboreja. (3, 9)

### **Cushingov sindrom**

Cushingov sindrom je posledica delovanja čezmernih in neustreznih količin glukokortikoidov, kar pripelje do povečanega katabolizma proteinov in glukoneogeneze. Je redka bolezen, še najpogosteje gre za iatrogeni Cushingov sindrom zaradi zdravljenja v velikimi odmerki glukokortikoidov.

Vzroki:

- 60 % bolnikov ima hipofizni adenom ACTH – Mb. Cushing,
- 30 % jih ima tumor nadledvičnic,
- pri 10 % bolnikih je izvor ektopični ACTH.

Bolezen najpogosteje nastopi med 30. in 50. letom starosti. Pogostejša je pri ženskah.

Etiologija Cushingovega sindroma je različna, zato razlikujemo:

- od ACTH odvisno obliko bolezni, za katero je značilno čezmerno izločanje ACTH iz hipofize ali hipotalamično-hipofiznega območja (bronhialni karcinom, karcinom pankreasa, timom), kar privede do obojestranske nadledvične hiperplazije,
- od ACTH neodvisno obliko bolezni, pri kateri gre za patološki proces v sami skorji nadledvične žleze (ponavadi adenom).

Do iatrogenega Cushingovega sindroma pride zaradi uporabe sintetičnih glukokortikoidov (metilprednizolona, deksametazona, prednizolona, triamcinolona, betametazona) v terapevtske namene. Delovanje hipotalamo-hipofizno-suprarenalne osi je pri bolnikih zavrto, poleg tega imajo tudi simptome in znake, podobne endogenemu Cushingovemu sindromu.

Pri Cushingovem sindromu gre za izgubo cirkadianega ritma izločanja kortizola ter prenehanje normalnega delovanja negativne povratne zveze.

Diagnostika Cushingovega sindroma temelji na določanju koncentracije kortizola v serumu in seču pri več preiskavah:

- določanju dnevnega ritma kortizola (ali samo polnočno vrednost, koncentracije so največje zjutraj),
- izločanju prostega kortizola v seču,
- kratkem 1-miligramskem deksametazonskem testu,
- zaradi možnih lažno pozitivnih rezultatov naredimo pri skupini s pozitivnim rezultatom še visokospecifični dvodnevni 2-miligramski deksametazonski test. Če je pozitiven, sledi nadaljnja etiološka diagnostika.

Pri Cushingovem sindromu zasledimo zelo majhne koncentracije SHBG in povečano razmerje med T in SHBG, kar je deloma lahko posledica povečane sinteze adrenalnih androgenov, delno pa povečane sinteze glukokortikoidov, kar zavira sintezo SHBG. Koncentracije SHBG se po adrenalektomiji približajo normalnim. (1, 3, 9)

## **Hipotiroza**

Hipotiroza je posledica funkcijskih ali strukturnih motenj, ki povzročijo nezadostno sintezo ščitničnih hormonov.

Najpogostejši vzroki:

- nezadostno delovanje ščitnice (primarna hipotiroza), ki je prisotno v 90 % primerov,

- propad parenhima zaradi vnetja (Hashimotov tiroiditis), kar je najpogostejši vzrok novo odkrite bolezni,
- uničenje tkiva z operacijo, radioaktivnim jodom, obsevanjem vratu,
- razvojna okvara,
- pomanjkanje joda,
- posledica blokirajočih protiteles proti receptorju za TSH,
- motnja v uravnavanju izločanja ščitničnih hormonov:
  - moteno delovanje hipofize,
  - moteno delovanje hipotalamusa.
- prehodna hipotiroza:
  - po ukinitvi supresijskega zdravljenja,
  - po subakutnem tiroiditisu,
  - vpliv zdravil (tirostatiki, litij).

Hipotiroza redko poteka skupaj z drugimi avtoimunskimi boleznimi. Huda hipotiroza je endemski kretinizem, ki se pojavi v krajih, kjer je prisotno pomanjkanje joda.

Diagnostika hipotiroze temelji na klinični oceni funkcijskega stanja ščitnice, ki ga potrdimo z naslednjimi laboratorijskimi preiskavami:

- osnovni parameter je serumska koncentracija TSH,
- pri vrednostih TSH, ki so zunaj normalnih vrednosti, določimo še koncentraciji prostega T4 in T3,
- biopsija ščitnice pri sumu, da gre za maligni tumor ščitnice. (13)

### **Ostala endokrina obolenja**

Koncentracije SHBG v plazmi so pri miksedemu majhne in se po zdravljenju s ščitničnimi hormoni vrnejo v meje normalnih vrednosti. Majhne koncentracije SHBG se pojavijo tudi pri akromegaliji, verjetno kot posledica neposrednega učinka rastnega hormona. (9)

## 1.7.2.2 Povečane plazemske koncentracije

### Hipertiroza

Hipertiroza je sklop kliničnih, patofizioloških in biokemijskih ugotovitev, ki so posledica izpostavljenosti tkiv čezmernim količinam ščitničnih hormonov in sposobnosti tkiv, da na to odgovorijo.

Najpogostejši vzroki hipertiroze

- Čezmerno delovanje ščitnice:
  - protitelesa, ki se vežejo na receptor za TSH, in vzpodbudijo čezmerno delovanje žleze,
  - čezmerno izločanje TSH ali TSH-ju podobnih snovi.
- Neodzivanje ščitnice na regulacijske mehanizme:
  - lokalizirano in desimirano avtonomno tkivo,
  - hormonsko aktivna oblika folikularnega adenoma,
  - ektopično tkivo (struma ovarii).
- Čezmerno izplavljanje shranjenih hormonov (poškodba ščitnice):
  - Hashimotov tiroiditis (hipertirotična faza),
  - virusni tiroiditis,
  - radiacijski tiroiditis,
  - zaradi amiodarona.
- Zunanji dejavniki:
  - obremenitev z jodom (rentgenska kontrastna sredstva),
  - preveliki odmerki ščitničnih hormonov.

Diagnostika hipertiroze temelji na klinični oceni funkcijskega stanja ščitnice, ki ga potrdimo z naslednjimi laboratorijskimi preiskavami:

- osnovni parameter je serumska koncentracija TSH,
- pri vrednostih TSH, ki so zunaj normalnih vrednosti, določimo še koncentraciji prostega T4 in T3,
- biopsija ščitnice pri sumu, da gre za maligni tumor ščitnice. (13).

## **Hipogonadizem in testikularna feminizacija**

Koncentracije SHBG so pri moških s hipogonadizmom v območju koncentracij, ki jih normalno zasledimo pri ženskah. Tudi pri testikularni feminizaciji, kjer so končni ciljni organi odporni proti androgenom, zasledimo koncentracije SHBG v območju vrednosti, ki veljajo za ženske v dobi reprodukcije. (9)

## **Jetrna ciroza**

Več študij je pokazalo, da so plazemske koncentracije SHBG večje pri cirotičnih bolnikih, medtem ko pri ženskah z alkoholno jetrno cirozo zasledimo manjše povečanje. (9)

## **Tireotoksikoza**

Koncentracije SHBG so pri bolnicah s tireotoksikozo zelo velike in padejo v območje referenčnih vrednosti po zdravljenju s tireostatiki. Pri moških opazimo še dodatno povečane koncentracije plazemskega testosterona in plazemskega luteotropnega hormona. To stanje nastopi, ker se kot posledica primarne stimulacije jeter s ščitničnimi hormoni poveča koncentracija SHBG. Sledi padec proste frakcije testosterona in tako se hipofiza odzove s povečano produkcijo luteotropnega hormona. To Leydigove celice stimulira k večji produkciji testosterona in estradiola, dokler nevezani testosteron ne preide zopet v območje normalnih vrednosti. (9)

### **1.7.3 Analitika SHBG**

Določanje koncentracije prostega testosterona v plazmi je v rutinskih laboratorijih težko izvedljivo, računanje proste frakcije pa zamudno. Določitev celotnega T je nezadovoljiva, zato hiperandrogenizacijo ugotavljamo tako, da merimo koncentracijo SHBG v plazmi.

V preteklosti so metode za merjenje ravni SHBG večinoma slonele na določanju vezalne kapacitete radioaktivno označenega steroida, največkrat 3H-dihidrotestosterona. Pri teh metodah lahko vezano in prosto frakcijo steroida ločimo na več načinov:

- z gelsko filtracijo,

- z dekstranovim ogljem (DCC),
- z agar gel elektroforezo,
- s konkanavalinom A,
- z obarjanjem z amonijevim sulfatom,
- z DEAE-celulozo,
- z dializo,
- s pretočno dializo.

Z uporabo teh metod so različni avtorji dobili rezultate, ki so se med seboj razlikovali tudi za 2- do 3-krat. Do teh razlik je prihajalo zaradi različnih separacijskih tehnik.

Tem slabostim se izognemo, če protein določamo direktno. V literaturi je opisanih veliko imunokemijskih metod:

- radialna imunodifuzija,
- elektroimunološki testi,
- radioimunološki testi,
- encimskoimunološki testi,
- imunoradiometrični testi.

Rezultati, ki jih dobimo z imunološkimi testi, so težko primerljivi z rezultati za vezalno kapaciteto, če ne poznamo točne vrednosti molske mase.

Če povzamemo, ugotovimo, da je o biološki in patofiziološki vlogi SHBG še vedno veliko odprtih vprašanj. Mehanizmi za uravnavanje plazemske koncentracije večinoma še niso znani.

(5, 9)

## 2 NAMEN DELA

SHBG ima v plazmi dvojno vlogo: uravnava odstotek prostega testosterona in estradiola ter nadzira njun metabolični očistek in omogoča specifični transport steroidov prek plazemske membrane specializiranih celic, ki vsebujejo steroidne receptorje. Zadnje izboljšave tehnik za izolacijo in merjenje samega proteina vodijo k boljšemu razumevanju vloge, ki jo ima SHBG pri transportu in mehanizmu delovanja steroidnih hormonov. Klinično določanje koncentracije SHBG pa daje podatek, ki je zelo uporaben pri proučevanju stanj, ki nastanejo pri hormonskih motnjah.

Namen diplomske naloge je bil preizkusiti novo imunokemijsko metodo, ki sloni na elektroluminiscenčni reakciji (ECLIA – **e**lectro **chemi**luminescence **immuno**assay) za določanje koncentracije SHBG, v primerjavi z obstoječo imunokemijsko metodo, ki sloni na kemiluminiscenčni reakciji (LIA – **l**uminiscence **immuno**assay), ter ugotoviti, ali dajeta primerljive rezultate koncentracij SHBG.

## 3 MATERIALI, METODE IN OPREMA

### 3.1 Preiskovani vzorci

Odvzem vzorcev in vse analize so bile narejene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v UKC Ljubljana. Koncentracije SHBG smo določili v 169 vzorcih seruma zdravih preiskovancev (moških in žensk), ki so bili napoteni iz ambulante medicine dela in športa. Kri je bila odvzeta v epruvete brez antikoagulanta.

### 3.2 Metode

Koncentracijo SHBG v serumu smo določili po dveh metodah.

#### **Imunološko kemiluminiscenčna metoda (LIA)**

Določanje temelji na kompetitivni osnovi, kjer gre za tekmovanje med zaznamovanim antigenom in nezaznamovanim antigenom za razpoložljiva vezišča na protitelesih. Z dodatkom raztopine luminiscenčnega substrata izmerimo količino iskane snovi v vzorcu.

#### **Imunološko elektrokemiluminiscenčna metoda (ECLIA)**

Določanje temelji na kompetitivni osnovi, kjer gre za tekmovanje med zaznamovanim antigenom in nezaznamovanim antigenom za razpoložljiva vezišča na protitelesih. Primarno protitelo je vezano na kroglice, ki predstavljajo nosilce, sekundarna protitelesa pa so označena z ruterjevimi ioni ( $\text{Ru}^{2+}$ ). Z električnim tokom sprožimo redukcijo  $\text{Ru}^{2+}$  v  $\text{Ru}^+$ , ruterjevi ioni pa nato preidejo v osnovno stanje (v stanje  $\text{Ru}^{2+}$ ) in ob tem oddajajo svetlobo, s katero izmerimo količino iskane snovi v vzorcu.

### 3.3 Reagenti

Uporabljeni so bili tovarniško pripravljene reagenti. Postopek priprave reagentov smo izvedli po navodilih proizvajalca.



### **3.3.1 SHBG reagenčni kit Immulite<sup>®</sup> 1000**

- LSH1: reagenčni nosilci, prevlečeni z monoklonalnimi mišjimi protitelesi proti SHBG,
- LSH2: alkalna fosfataza (goveja), zmešana z zajčjimi poliklonalnimi protitelesi proti SHBG, 1 steklenička, 6,5 ml,
- LSHL, LSHH: kalibracijski raztopini - liofilizirani SHBG nečloveški puferirani proteini, dve steklenički (z majhno in veliko koncentracijo),
- LSHC1-2: kontroli – liofilizirani SHBG nečloveški puferirani proteini,
- LSHZ\*, LSHZ4<sup>+</sup>: razredčevalec vzorcev – nečloveški puferirani proteini brez SHBG za redčenje krvnih vzorcev, 1 steklenička.

#### **3.3.1.1 Priprava reagentov**

Za določanje vrednosti SHBG na analizatorju Immulite<sup>®</sup> 1000 smo vzeli reagente iz hladilnika in jih segreli na sobno temperaturo. Večina reagentov je že pripravljena, pripraviti je bilo treba kontroli in kalibracijski raztopini.

V vsako stekleničko kalibracijske raztopine smo dodali 3 ml destilirane vode in počakali, da se je vsebina raztopila. Razredčeni raztopini smo po uporabi hranili v hladilniku. Pri temperaturi od 2 do 8 °C sta uporabni 30 dni.

V steklenički s kontrolo SHBG smo dodali 2 ml destilirane vode in počakali 30 minut, nato pa vsebino premešali z rahlim obračanjem. Razredčeni kontroli sta pri 2 do 8 °C obstojni 30 dni.

### **3.3.2 SHBG reagenčni kit Elecsys**

- M: mikrodenci, prevlečeni s streptavidinom, 1 steklenička, 6,5 ml,
- R1: mišja protitelesa proti SHBG z biotinom, 1 steklenička, 10 ml,
- R2: mišja protitelesa proti SHBG z rutenijevim kompleksom, 1 steklenička, 10 ml.

### 3.3.2.1 Priprava reagentov

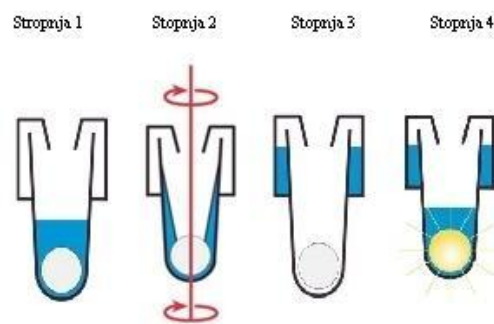
Za določanje vrednosti SHBG na analizatorju Roche Elecsys smo uporabili reagenčni kit SHBG, ki je že pripravljen za uporabo. Reagente smo vzeli iz hladilnika in jih segreti na sobno temperaturo.

Preden jih odpremo, je treba reagente shranjevati v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C. Potem jih je treba hraniti v hladilniku pri 2 do 8 °C, kjer ostanejo uporabni 12 tednov. Če jih pustimo na sobni temperaturi, so uporabni 20 ur.

## 3.4 Analizator

### 3.4.1 Imunološki analizator Immulite<sup>®</sup> 1000

Sistem Immulite (Immulite<sup>®</sup> 1000 immunoassay system) uporablja s specifičnimi protitelesi ali z antigeni prekrute plastične nosilce, z alkalno fosfatazo označen reagent in encimski substrat za kemiluminiscenco. Nosilci so za ta namen shranjeni v testni enoti, v kateri potekajo imunska reakcija, inkubacija, spiranje in določitev rezultata.



SLIKA 8: Princip metode LIA

Po inkubaciji vzorca z reagentom z alkalno fosfatazo v testni enoti (stopnja 1) se po spiranju tekoča zmes med vrtenjem z veliko hitrostjo okoli vertikalne osi (stopnja 2) loči od trdega nosilca. Nato se celotna raztopina, v kateri so vzorec, presežek reagenta in raztopina za spiranje, prenese v odpadno posodo. Na nosilcu ostanejo nevezana protitelesa (stopnja 3). Vezana protitelesa za antigen pa se določi z dodatkom substrata z dioksetanom, ki je vir

svetlobe (stopnja 4). Svetlobno emisijo zazna fotopomnoževalka, sistemski računalnik pa nato za vsak vzorec izpiše rezultate.(19)



SLIKA 9: Analizator Immulinite<sup>®</sup> 1000

**Referenčne vrednosti SHBG**, določene z analizatorjem Immulinite<sup>®</sup> 1000:

- za moške 13–71 nmol/l,
- za ženske 18–114 nmol/l.

**Meja detekcije:** 0,20 nmol/l

#### **Ponovljivost meritev**

Ponovljivost meritev v seriji je bila preračunana iz dobljenih vrednosti vzorcev 20 ponovitev v posamezni seriji.

TABELA II: Rezultati določanja ponovljivosti v seriji za sistem Immulinite<sup>®</sup> 1000 (18)

Ponovljivost v seriji			
vzorec	količina (nmol/l)	SD (nmol/l)	CV (%)
1	4,5	0,31	6,9
2	11	0,85	7,7
3	33	2,0	6,1
4	64	2,6	4,1
5	121	9,1	7,5

Ponovljivost znotraj serije je za vsak posamezen vzorec izražena kot koeficient variacije. Manjši kot je koeficient variacije, boljša je ponovljivost v seriji. Najboljša ponovljivost je bila dosežena pri analizi 4. vzorca, medtem ko je bila najslabša ponovljivost znotraj serije ugotovljena za 2. vzorec.

Ponovljivost zunaj serije je bila preračunana za rezultate vzorcev v 20 različnih serijah analize.

TABELA III: Rezultati določanja ponovljivosti zunaj serije za sistem Immulite<sup>®</sup> 1000 (18)

Ponovljivost zunaj serije			
vzorec	količina (nmol/l)	SD (nmol/l)	CV (%)
1	6,0	0,77	13
2	12	1,1	9,2
3	35	2,8	8,0
4	71	5,3	7,5
5	105	6,1	5,8

Ponovljivost med posameznimi serijami je izražena kot koeficient variacije. Najboljša ponovljivost zunaj serije je dosežena pri analizi 5. vzorca, medtem ko je bila najslabša ponovljivost zunaj serije ugotovljena za 1. vzorec.

### 3.4.2 Imunološki analizator Roche Elecsys 1010/2010

Metoda Roche Elecsys SHBG je:

- avtomatizirana, hitra in natančna,
- vzorcev ni treba redčiti,
- visoka stopnja merljivosti.

Metoda ECLIA temelji na principu sendviča in traja 18 minut.

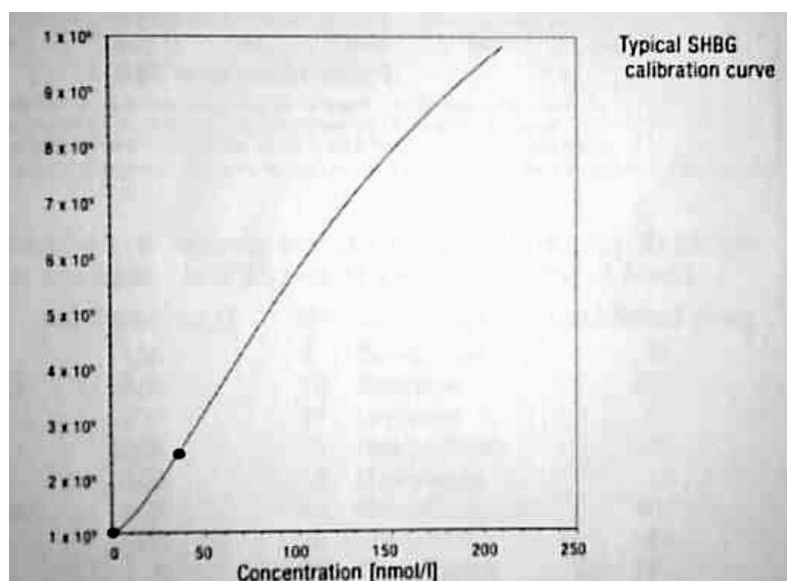
1. inkubacija: 10 µl vzorca biotiliranega monoklonalnega specifičnega protitelesa SHBG in monoklonalnega SHBG – specifičnega protitelesa, označenega z rutenijevim kompleksom v sendviču.

2. inkubacija: po dodatku s streptavidinom prekritih mikrodlecev se kompleks pritrdi na trdo fazo s pomočjo interakcije biotina in streptavidina.
3. Reakcijska zmes se aspirira v merilno celico, kjer se mikrodleci zaradi magneta ujamejo na površino elektrode. Nevezane sestavine se sperejo iz merilne celice. Elektrodi se doda napetost, ki sproži kemiluminiscenčno reakcijo, ki jo izmeri fotopomnoževalka.



SLIKA 10: Imunološki analizator Roche Elecsys 1010/2010

Rezultate dobimo s pomočjo kalibracijske krivulje, ki jo instrument generira preko dvotočkovne kalibracije in glavne krivulje reagenčne kode.



SLIKA 11: Kalibracijska krivulja za SHBG  
(v Roche product information sheet, str. 13) (16)

**Referenčne vrednosti SHBG**, določene z analizatorjem Roche Elecsys 1010/2010:

- za moške 10–80 nmol/l,
- za ženske 20–130 nmol/l.

**Meja detekcije:** 0,35 nmol/l

Meja detekcije predstavlja najnižjo vrednost, ki se jo da izmeriti. Izračunana je kot vrednost med dvema standardnima deviacijama nad najnižjo standardno vrednostjo (glavna kalibracija, standard 1 + 2 SD, ponovljivost v seriji, n = 21).

### **Ponovljivost meritev**

Ponovljivost meritev je bila določena z reagenti Roche Elecsys, človeškimi serumi in kontrolnimi serumi po modificiranem protokolu EP5-A, ki je modifikacija standardnega protokola, ki ga je določila NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Merjenja so bila narejena 6-krat na dan 10 dni zapored. Število vzorcev (n) na analizatorju Roche Elecsys 1010/2010 je bilo 10, na analizatorju E 170 pa 21.

TABELA IV: Ponovljivost meritev reagentov, narejenih na analizatorju Roche Elecsys 1010/2010: 10 (16)

Elecsys 1010/2010		Ponovljivost v seriji		Skupna ponovljivost/ ponovljivost zunaj serije	
Vzorec	količina (nmol/l)	SD (nmol/l)	CV (%)	SD (nmol/l)	CV (%)
človeški serum 1	14,1	0,30	2,1	0,39	2,7
človeški serum 2	44,2	1,05	2,4	1,24	2,8
človeški serum 3	204	5,61	2,7	11,4	5,6
kontrolni serum U1	34,9	0,76	2,2	0,92	2,6
kontrolni serum U2	19,0	0,41	2,2	0,52	2,7

TABELA V: Ponovljivost meritev reagentov, narejenih na analizatorju E 170: 21 (16)

E 170	Ponovljivost v seriji			Skupna ponovljivost/ ponovljivost zunaj serije		
Vzorec	količina (nmol/l)	SD (nmol/l)	CV (%)	količina (nmol/l)	SD (nmol/l)	CV (%)
človeški serum 1	14,9	0,17	1,1	13,7	0,24	1,8
človeški serum 2	45,7	0,60	1,3	42,0	0,89	2,1
človeški serum 3	219	3,76	1,7	189	7,58	4,0
kontrolni serum U1	35,3	0,46	1,3	33,1	0,63	1,9
kontrolni serum U2	19,2	0,21	1,1	18,1	0,42	2,3

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Priprava vzorcev

V raziskavo je bilo vključenih 169 zdravih preiskovancev obeh spolov, pri katerih niso ugotovili endokrinoloških motenj oziroma motenj v metabolizmu proteinov. Napoteni so bili iz ambulante medicine dela in športa. Odvzem vzorcev in vse analize so bile narejene na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v UKC Ljubljana.

165 vzorcev krvi obeh spolov, ki so bili odvzeti v epruvete brez antikoagulant, so pred analizo vzeli iz hladilnika in ogreli na sobno temperaturo (20–25 °C). Pred analizo so vse vzorce 10 minut centrifugirali na 3000 obratih/minuto. Analize vzorcev so bile narejene na dveh analizatorjih, na imunološkem analizatorju Immulite<sup>®</sup> 1000 in na imunološkem analizatorju Roche Elecsys 1010/2010. Dobljene vrednosti SHBG po metodah LIA in ECLIA sem nato statistično obdelala.

### 4.2 Statistične metode

Za analizo podatkov sem uporabila elektronsko preglednico Microsoft Excel 2010 in statistični programski paket IBM SPSS Statistics 20.

Podatke sem analizirala ločeno po spolu, saj se tako izmerjene vrednosti kot razponi referenčnih vrednosti med spoloma močno razlikujejo. Skupna analiza vseh podatkov bi zaradi tega močno precenila dejansko korelacijo med metodama oziroma bi vodila do umetne (angl. spurious) korelacije.

Odnos med meritvami smo prikazali z razsevnim diagramom (ang. scatterplot). Izračunali smo Pearsonov ( $r$ ) in Spearmanov ( $r_o$ ) korelacijski koeficient ter ocenili regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov (angl. least squares).

Povprečje meritev smo med metodama primerjali s testom  $t$  za parne vzorce (odvisne vzorce oz. ponovljene meritve).



Skladnost med metodama smo z uvrščanjem meritev v mejah referenčnih vrednosti prikazali z navzkrižno tabelo (angl. contingency table) in ocenili s Cohenovim koeficientom kapa.

Skladnost med metodama smo dodatno analizirali z grafičnim postopkom Blanda in Altmana (z metodo meja skladnosti – angl. limits of agreement).

## 5 REZULTATI

Za primerjavo vrednosti SHBG v krvi, dobljenih z metodama LIA in ECLIA, sem uporabila 165 vzorcev seruma preiskovancev obeh spolov, pri katerih niso ugotovili endokrinoloških motenj oziroma motenj v metabolizmu proteinov. Preiskovank je bilo 25, preiskovancev pa 140.

TABELA VI: Vrednosti koncentraciji SHBG pri 165 preiskovancih obeh spolov, dobljenih po metodah LIA in ECLIA (glej prilogo 1).

Rezultati določanja koncentracije SHBG z dvema različnima metodama kažejo visoko stopnjo variabilnosti med posameznimi skupinami preiskovancev, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Mnogo manjše število preiskovank pomeni večji delež neskladnih vrednosti (8 %) kot pri preiskovancih (0 %).

TABELA VII: Vrednosti koncentraciji SHBG pri 25 preiskovankah, dobljenih po metodah LIA in ECLIA (glej prilogo 2)

<b>Referenčne vrednosti LIA:</b>	<b>Referenčne vrednosti ECLIA:</b>
<b>18–114 nmol/l</b>	<b>20–130 nmol/l</b>

Na podlagi izmerjenih koncentracij SHBG med vzorci preiskovank, določenih z dvema različnima metodama, lahko pri metodi LIA ugotovimo odstopanje od referenčnih vrednosti pri petih vzorcih (20 %), od katerih je koncentracija SHBG pri štirih vzorcih nad zgornjo referenčno mejo, pri enem vzorcu pa pod spodnjo referenčno mejo. Pri rezultatih, dobljenih z metodo ECLIA, ugotovimo odstopanje nad zgornjo referenčno mejo pri šestih vzorcih, dva vzorca pa sta pod spodnjo mejo referenčnih vrednosti.

TABELA VIII: Vrednosti koncentracij SHBG pri 140 preiskovancih, dobljenih po metodah LIA in ECLIA (glej prilogo 3)

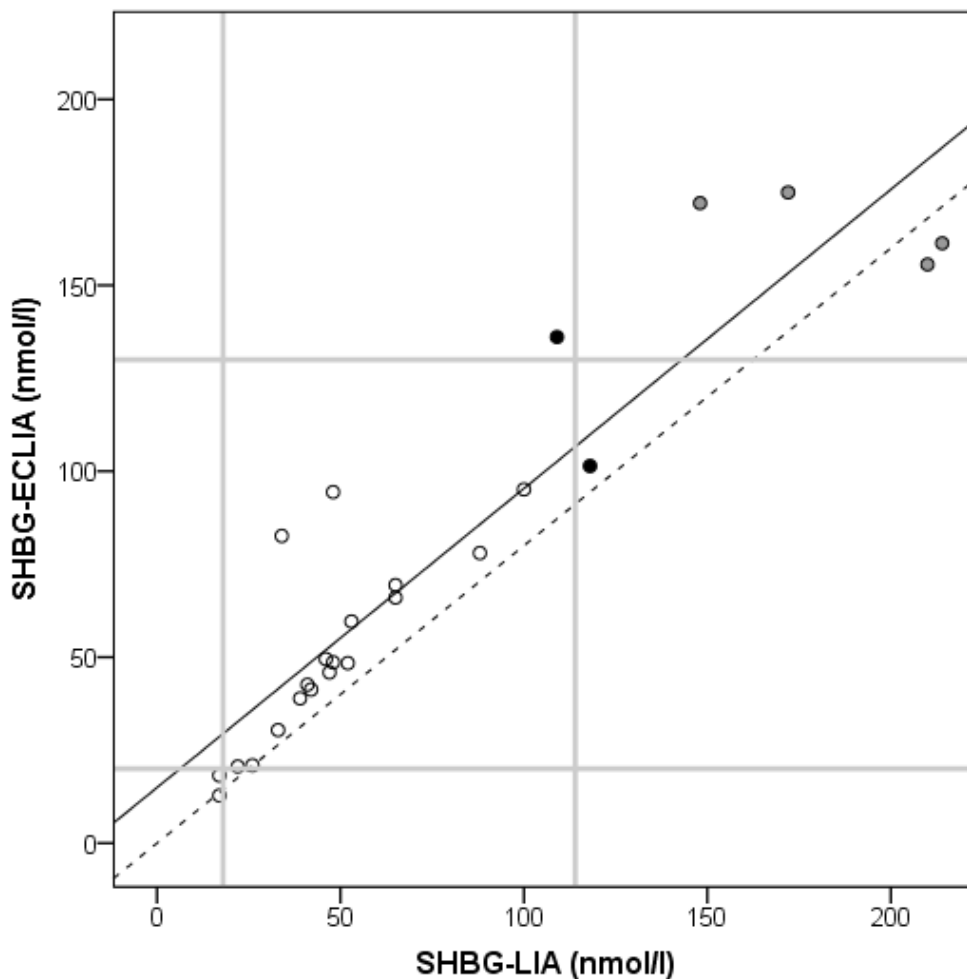
<b>Referenčne vrednosti LIA:</b>	<b>Referenčne vrednosti ECLIA:</b>
<b>13–71 nmol/l</b>	<b>10–80 nmol/l</b>

Na podlagi izmerjenih koncentracij SHBG med vzorci preiskovancev, določenih z dvema različnima metodama, lahko pri metodi LIA ugotovimo odstopanje od referenčnih vrednosti pri šestih vzorcih, od katerih so koncentracije SHBG pri vseh šestih vzorcih nad zgornjo referenčno mejo, nobena vrednost pa ni pod spodnjo referenčno mejo. Pri rezultatih, dobljenih z metodo ECLIA, ugotovimo odstopanje nad zgornjo referenčno mejo pri petih vzorcih in prav tako nobene vrednosti pod spodnjo mejo referenčnih vrednosti.

Variabilnost med rezultati v skupini preiskovancev je na splošno manjša kot v skupini preiskovank.

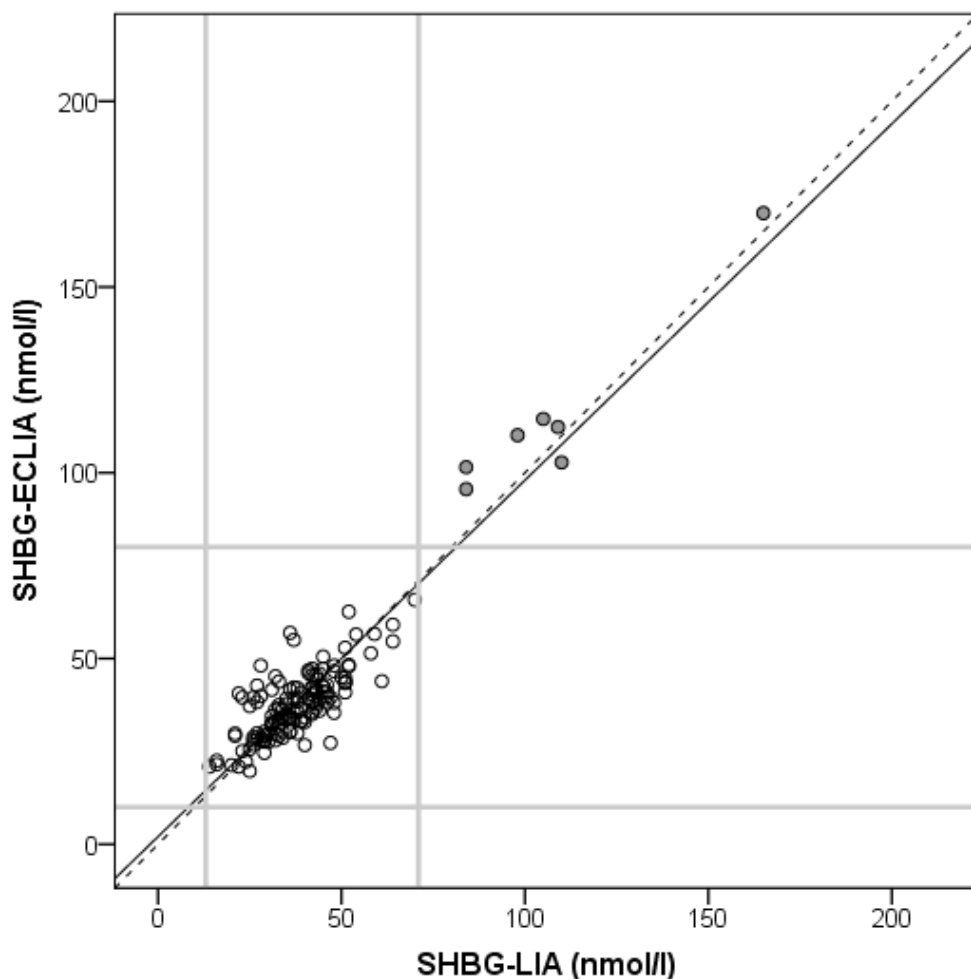
Dobljene rezultate smo analizirali ločeno po spolu, saj se tako izmerjene vrednosti kot razponi referenčnih vrednosti med spoloma močno razlikujejo.

Odstopanje izmerjenih vrednosti, ki smo jih dobili z obema metodama pri preiskovankah in preiskovancih, smo prikazali tudi grafično.



SLIKA 12: Graf meritev z metodama ECLIA in LIA pri preiskovankah (n = 25).

Sive vodoravne in navpične črte prikazujejo razpon referenčnih vrednosti. Črtkana diagonalna črta prikazuje hipotetične meritve v primeru popolne skladnosti med metodama. Polna linearna črta prikazuje linearno regresijo za meritve po metodi ECLIA v primerjavi z meritvami po metodi LIA. Prazni krožci so meritve znotraj referenčnih vrednosti po obeh metodah, črni krožci meritve znotraj referenčnih vrednosti po eni od metod, sivi krožci pa meritve zunaj referenčnih vrednosti po obeh metodah.



SLIKA 13: Graf meritev z metodama ECLIA in LIA pri preiskovancih (n = 140).

Sive vodoravne in navpične črte prikazujejo razpon referenčnih vrednosti. Črtkana diagonalna črta prikazuje hipotetične meritve v primeru popolne skladnosti med metodama. Polna linearna črta prikazuje linearno regresijo za meritve po metodi ECLIA v primerjavi z meritvami po metodi LIA. Prazni krožci so meritve znotraj referenčnih vrednosti pri obeh metodah, črni krožci meritve znotraj referenčnih vrednosti le po eni od metod, sivi krožci pa meritve zunaj referenčnih vrednosti po obeh metodah.

TABELA IX: Korelacija med meritvami

	Pearsonov koeficient		Spearmanov koeficient	
	r	p	ro	p
<b>preiskovanke</b>	0,922	< 0,001	0,916	< 0,001
<b>preiskovanci</b>	0,932	< 0,001	0,741	< 0,001

Korelacijo med meritvami smo ugotavljali s pomočjo Pearsonovega in Spearmanovega koeficienta. Večji vrednosti obeh koeficientov kažeta na večjo stopnjo korelacije med meritvami. Večjo stopnjo korelacije tako ugotovimo pri skupini preiskovancev ( $r = 0,932$ ).

TABELA X: Ocenjeni parametri linearnega regresijskega modela SE – standardna napaka ocene

	regresijski koeficient			regresijska konstanta		
	b	SE	p	a	SE	p
<b>preiskovanke</b>	0,804	0,071	< 0,001	14,948	6,570	0,033
<b>preiskovanci</b>	0,959	0,032	< 0,001	2,053	1,439	0,156

S pomočjo statistične analize smo ocenili tudi parametre linearnega regresijskega modela in določili standardno napako omenjene ocene. Standardni napaki pri določanju regresijskega koeficienta in regresijske konstante sta manjši pri skupini preiskovancev.

TABELA XI: Opisne statistike in primerjava povprečij med metodama

	LIA			ECLIA			p (test t)
	povprečje	SD	razpon	povprečje	SD	razpon	
<b>preiskovanke</b>	72,6	56,9	17–214	78,2	52,4	12,8–175,0	0,415
<b>preiskovanci</b>	41,8	20,0	14–65	42,4	20,4	19,7–169,9	0,531

Analiza parametrov opisne statistike prikazuje manjši standardni odklon rezultatov preiskovancev pri obeh metodah v primerjavi s standardnim odklonom rezultatov preiskovank. Pri preiskovankah ugotovimo manjši standardni odklon meritev, izmerjenih z metodo ECLIA, pri preiskovancih pa manjši standardni odklon meritev, izmerjenih z metodo LIA. Razlika med standardnima odklonoma meritev obeh metod je manjša pri skupini preiskovancev ( $t = 0,531$ ) v primerjavi s skupino preiskovank ( $t = 0,415$ ).

TABELA XII: Skladnost med metodama z analizo meritev v mejah referenčnih vrednosti pri preiskovankah

		Glede na referenčne vrednosti ECLIA			Skupaj	
		pod	znotraj	nad		
Glede na referenčne vrednosti LIA	pod	število	2		2	
		delež vrstice	100 %			
		delež stolpca	100 %		8 %	
		delež tabele	8 %			
	znotraj	število		17	1	18
		delež vrstice		94 %	6 %	
		delež stolpca		94 %	20 %	72 %
		delež tabele		68 %	4 %	
	nad	število		1	4	5
		delež vrstice		20 %	80 %	
		delež stolpca		6 %	80 %	20 %
		delež tabele		4 %	16 %	
Skupaj	število	2	18	5	25	
	delež vrstice	8 %	72 %	20 %		

Pri določanju skladnosti med metodama glede na rezultate pri preiskovankah ugotovimo 8-odstotno skladnost pri rezultatih pod spodnjo mejo referenčnih vrednosti, 72-odstotno skladnost pri rezultatih znotraj referenčnih vrednosti in 20-odstotno skladnost pri rezultatih nad zgornjo mejo referenčnih vrednosti.

TABELA XIII: Skladnost med metodama z analizo meritev v mejah referenčnih vrednosti pri preiskovancih

		Glede na referenčne vrednosti ECLIA			Skupaj	
		pod	znotraj	nad		
Glede na referenčne vrednosti LIA	pod	število				
		delež vrstice				
		delež stolpca				
		delež tabele				
	znotraj	število		133		133
		delež vrstice		100 %		
		delež stolpca		100 %		95 %
		delež tabele		95 %		
	nad	število			7	7
		delež vrstice			100 %	
		delež stolpca			100 %	5%
		delež tabele			5 %	
Skupaj	število		133	7	140	
	delež vrstice		95 %	5 %		

Pri določanju skladnosti med metodama glede na rezultate pri preiskovancih ugotovimo 95-odstotno skladnost pri rezultatih znotraj referenčnih vrednosti in 5-odstotno skladnost pri rezultatih nad zgornjo mejo referenčnih vrednosti.

Na podlagi rezultatov določanja skladnosti med metodama pri preiskovankah in preiskovancih ugotovimo večjo stopnjo skladnosti med metodama pri preiskovancih.

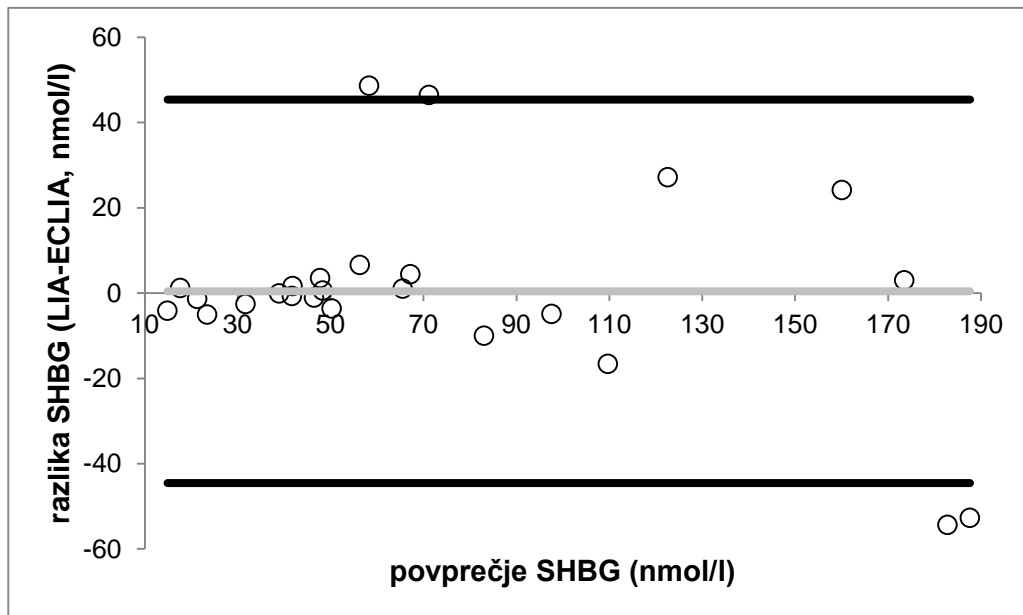
TABELA XIV: Koeficient kapa za skladnost med metodama z analizo meritev v mejah referenčnih vrednosti

	<b>kapa</b>	<b>p</b>
<b>preiskovanke</b>	0,816	< 0,001
<b>preiskovanci</b>	1,000	< 0,001

Skladnost med metodama LIA in ECLIA pri preiskovankah in preiskovancih smo prikazali tudi s koeficientom kapa. Večji koeficient kapa kaže večjo skladnost med metodama in tako lahko potrdimo večjo stopnjo skladnosti med metodama pri preiskovancih (kapa = 1), kar pomeni 100-odstotno ujemanje obeh metod.

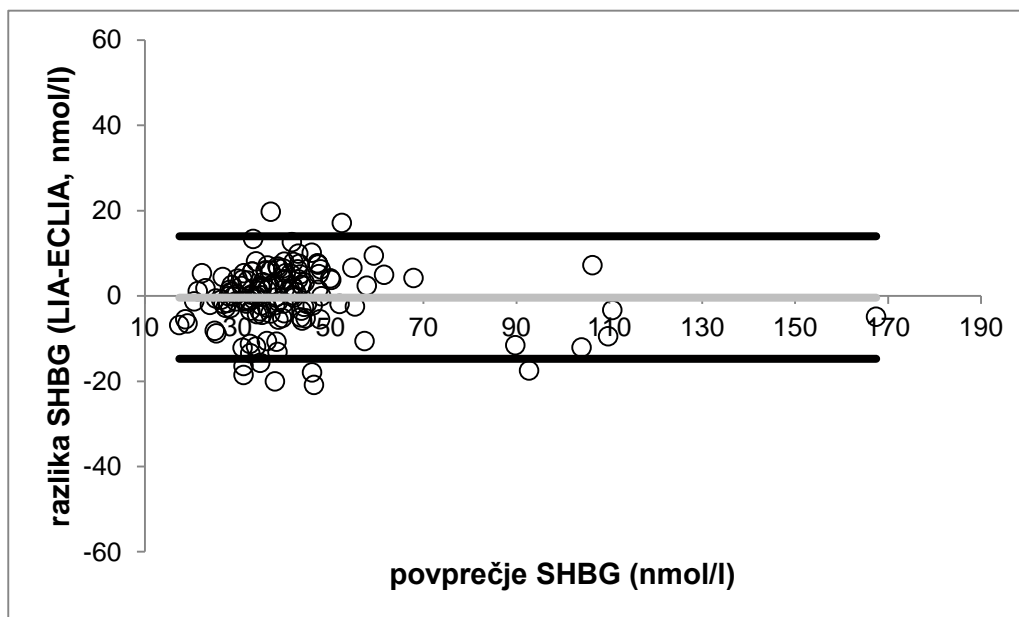
Na podlagi rezultatov statističnega testa primerjave skladnosti rezultatov obeh metod lahko sklepamo, da dajeta metodi med seboj primerljive rezultate tako pri preiskovankah kot tudi pri preiskovancih.

Skladnost med metodama pri preiskovankah in preiskovancih smo prikazali tudi z diagramom Blanda in Altmana. Diagrama nazorno prikazujeta položaj posameznih meritev glede na meje skladnosti.



SLIKA 14: Diagram Blanda in Altmana pri preiskovankah

Diagram prikazuje razlike meritev v odvisnosti od povprečja pri preiskovankah. Siva vodoravna črta prikazuje povprečno razliko, črni vodoravni črti pa meje skladnosti. Točke znotraj meja skladnosti so označene s črnimi krožci.



SLIKA 15: Diagram Blanda in Altmana pri preiskovancih

Diagram prikazuje razlike meritev v odvisnosti od povprečja pri preiskovankah. Siva vodoravna črta prikazuje povprečno razliko, črni vodoravni črti pa meje skladnosti. Točke znotraj meja skladnosti so označene s črnimi krožci.



## 6 RAZPRAVA

Z diplomsko nalogo smo želeli preizkusiti novo metodo za določanje koncentracije spolne hormone vezočega globulina (SHBG). Obstoječa metoda temelji na kemiluminiscenčni reakciji, nova, primerjalna, pa na elektroluminiscenčni reakciji. Primerjalno smo analizirali skupino preiskovancev, pri katerih nismo ugotovili endokrinoloških motenj oziroma motenj v metabolizmu proteinov. Izračunala sem korelacijo rezultatov, dobljenih z obema metodama, delež posameznih rezultatov, ki so zunaj referenčnih vrednosti, in signifikantnost razlike med metodama.

Za primerjavo vrednosti SHBG v krvi, dobljenih z metodama LIA in ECLIA, sem uporabila 165 vzorcev seruma preiskovancev obeh spolov, ki so bili napoteni iz ambulante medicine dela in športa. Analizirali smo 25 vzorcev seruma preiskovank in 140 vzorcev seruma preiskovancev.

Dobljene rezultate smo analizirali ločeno po spolu, saj se tako izmerjene vrednosti kot razponi referenčnih vrednosti med spoloma močno razlikujejo.

Razsevna diagrama (sliki 14 in 15) kažeta, da je tako pri preiskovankah kot pri preiskovancih velika večina meritev primerljivih oziroma blizu idealnih skladnosti.

Pri preiskovankah je razpršenost nekoliko večja in regresijska premica dlje od idealne premice, kar kaže na nekoliko manjšo skladnost med metodama.

Z izračunom Pearsonovega in Spearmanovega koeficienta korelacije smo ugotovili nekoliko večjo primerljivost med metodama pri preiskovancih ( $r = 0,932$ ,  $r_o = 0,741$ ) kot pri preiskovankah ( $r = 0,922$ ,  $r_o = 0,916$ ). Ocenili smo še regresijsko premico, ki služi za oceno vrednosti po metodi ECLIA na podlagi meritve po metodi LIA. Povprečje meritev se med metodama ne razlikuje statistično značilno, kar je osnovni pogoj za primerljivost metod.

Razsevni diagram pri preiskovancih kaže skoraj vse vrednosti znotraj in zunaj meja referenčnih vrednosti po obeh metodah.

Pri preiskovankah je ena meritev znotraj referenčnih vrednosti in ena nad mejo referenčnih vrednosti po metodi LIA. Po metodi ECLIA je ena meritev nad mejo referenčnih vrednosti ter ena meritev znotraj referenčnih vrednosti.

Mnogo manjše število vzorcev preiskovank ( $n = 25$ ) pomeni večji delež neskladnih vrednosti pri preiskovankah (8 %) kot pri preiskovancih (0 %).

Koeficient kapa je tako pri preiskovankah kot pri preiskovancih visok in statistično značilno različen od nič, kar pomeni, da je skladnost med metodama daleč nad naključno. Skladno s tem, kar kažejo tudi drugi rezultati, je ocenjena vrednost kapa nekoliko višja pri preiskovancih (kapa = 1,0) kot pri preiskovankah (kapa = 0,816), kar nam pokaže 100-odstotno ujemanje med metodama pri preiskovancih.

Metoda Blanda in Altmana pokaže, da meje skladnosti tako pri preiskovankah kot pri preiskovancih zajemajo vrednost nič in so glede na njo simetrične (povprečje razlik je enako nič).

Pri preiskovankah so meje skladnosti bistveno širše, zato je skladnost manjša. Tudi delež meritev zunaj meja skladnosti je precej večji pri preiskovankah (4 meritve od 25, to je približno 16 %) kot pri preiskovancih (9 meritev od 140, to približno 6 %, pričakovani delež po naključju pa je približno 5 %).

Metodi sta na splošno primerljivi. Njuna skladnost je nekoliko večja pri preiskovancih, za večjo skladnost med metodama pri preiskovankah pa bi morali uporabiti večje število vzorcev.

Z izračuni in rezultati, ki smo jih dobili pri obeh metodah, smo ugotovili:

1. da je večina meritev pri preiskovankah in preiskovancih primerljiva oziroma blizu idealne skladnosti,
2. da je skladnost med metodama LIA in ECLIA pri preiskovancih 100-odstotna, pri preiskovankah pa nekoliko manjša,
3. da sta metodi LIA in ECLIA primerljivi.

Zaključimo lahko, da se metoda ECLIA prav tako lahko uporablja za določanje koncentracije SHBG v krvnem serumu.

## 8 LITERATURA

1. Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer D.: Interna medicina, druga izdaja, Ljubljana, DZS 1998: 631–635.
2. Pinter B.: Spolni hormoni in njihovi biološki učinki, Medicinski razgledi, 40, 2001: 415-420.
3. Meden Vrtovec H.: Zdravljenje s hormoni v ginekologiji in andrologiji, Slovensko društvo za reproduktivno medicino, Klinični center, Ljubljana 2002: 67-68.
4. Štraus B.: Medicinska biokemija, 2. izdaja, Zagreb 1992: 599–603, 644–645, 654–655.
5. Osredkar J.: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Učno gradivo za študente farmacije, Ljubljana, maj 2008: 19–36.
6. Kelly J.A., Vankrieken L.: Sex Hormone Binding Globulin and the Assessment of Androgen Status. DPC, Los Angeles, CA, November 1997.
7. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Testosteron> (06/2012).
8. [http://en.wikipedia.org/wiki/Free\\_androgen\\_index](http://en.wikipedia.org/wiki/Free_androgen_index) (07/2012).
9. Osredkar J., Vrhovec I., Jesenoec N.: Spolne hormone vezoči globulin (SHBG), Fizikalno-kemijske lastnosti, fiziološka ter patofiziološka vloga in analitika, Farmacevtski vestnik 39, december 1988: 259–266.
10. [http://en.wikipedia.org/wiki/Sex\\_hormone-binding\\_globulin](http://en.wikipedia.org/wiki/Sex_hormone-binding_globulin) (06/2012).
11. Lothar Thomas: Clinical Laboratory Diagnostics, Use and Assessment of Chlinical laboratory Results, First Edition Frankfurt/Main, Germany 1998: 1100–1104.
12. Vermeulen A., Verdonck L., Kaufman J. M.: j. Clin. Endocrinol.;1999 84: 3666–3672.
13. <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=2454> Kelc R.: Interna medicina – izpiski 2009: 177–179 (07/2012).
14. Roche Diagnostics: Product Information – Summary: Elcys SHBG Immunoassay, 2003–07.
15. Norbert W. Tietz, Ph.D.: Texbook of Clinical Chemistry; Philadelphia 1986; 1086-1089.
16. Roche Elecys 1010/2010/MODULAR ANALYTICS E170, SHBG
17. <http://www.roche-diagnostics.co.in/Products/Pages/RocheElecsysSystems.aspx> (07/2012).

18. IMMULITE/IMULITE 1000 SHBG (PILKSH-7, 2003-08-18), For use on the IMULITE and IMULITE 1000 systems
19. [http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q\\_catalogId~e\\_111~a\\_catTree~e\\_100001,1023065,1015817~a\\_langId~e\\_111~a\\_productId~e\\_172963~a\\_storeId~e\\_10001.htm](http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q_catalogId~e_111~a_catTree~e_100001,1023065,1015817~a_langId~e_111~a_productId~e_172963~a_storeId~e_10001.htm) (07/2012).
20. Bland J.M., Altman D.G.: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1(8476); 1986: 307-310.
21. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X98001081> Rosnera W., Hryb J.D., Khan M.S., Nakhla A.M., Romas N.A.: Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate; NY, sept. 1998 (08/2012).

## PRILOGA 1:

TABELA V: Vrednosti koncentracij SHBG pri 165 preiskovankah in preiskovancih (M in Ž),  
dobljenih po metodah LIA in ECLIA

Zap. št.	Vzorec	Spol	SHBG/LIA (nmol/l)	SHBG/ECLIA (nmol/l)
1	3	M	40	26,7
2	19	Ž	172	175,0
3	25	Ž	39	38,9
4	30	M	44	45,9
5	31	M	84	101,5
6	32	M	51	52,9
7	35	Ž	22	20,6
8	36	Ž	42	41,3
9	50	Ž	17	18,2
10	51	M	38	42,1
11	54	M	46	41,0
12	55	M	42	35,6
13	56	M	29	24,6
14	57	M	40	34,1
15	58	M	42	35,1
16	59	M	39	33,0
17	77	Ž	100	95,1
18	81	M	51	43,4
19	82	M	110	102,8
20	83	M	58	51,4
21	85	Ž	48	48,6
22	93	Ž	41	42,6
23	94	M	29	27,6
24	97	M	45	42,5
25	98	M	45	42,5
26	99	M	32	28,0
27	100	M	34	30,4
28	101	M	44	38,8
29	103	Ž	65	66,0
30	113	M	42	47,3
31	115	M	109	112,3
32	116	M	61	43,9
33	134	M	26	26,9
34	135	M	25	25,6
35	136	M	27	28,7
36	137	M	35	39,2
37	138	M	39	40,8
38	139	Ž	109	136,1
39	142	M	35	34,9
40	146	M	45	47,3

41	148	M	48	46,6
42	151	Ž	148	172,1
43	154	M	33	33,8
44	160	M	23	25,1
45	161	M	20	21,3
46	162	M	33	37,5
47	164	M	31	34,5
48	165	M	33	36,6
49	166	M	29	29,2
50	167	M	22	20,9
51	168	M	31	32,8
52	172	M	51	40,9
53	173	M	84	95,6
54	174	M	46	42,9
55	183	M	39	33,2
56	184	M	42	38,1
57	186	Ž	17	12,8
58	188	M	47	27,3
59	190	Ž	34	82,6
60	191	Ž	47	45,9
61	192	Ž	65	69,4
62	193	Ž	53	59,6
63	194	M	36	34,4
64	199	Ž	48	94,4
65	202	M	14	20,9
66	212	M	27	42,7
67	213	M	28	48,1
68	215	M	33	43,8
69	216	M	22	40,6
70	217	M	21	29,2
71	218	M	23	39,5
72	221	M	16	22,5
73	222	M	21	29,8
74	223	M	16	21,5
75	224	M	37	55,0
76	225	M	26	39,5
77	226	M	36	56,9
78	227	M	25	37,2
79	228	M	28	39,9
80	229	M	27	38,3
81	230	M	35	33,9
82	231	M	54	56,5
83	232	M	36	33,8
84	233	M	43	42,1
85	234	M	38	35,7
86	235	M	42	40,4
87	236	M	42	38,3
88	238	M	98	110,1
89	250	M	31	41,6
90	255	M	41	46,8
91	263	M	37	42,2
92	264	M	26	28,8

93	280	Ž	33	30,4
94	281	Ž	52	48,4
95	282	M	42	45,5
96	282	Ž	26	20,9
97	306	M	39	36,4
98	307	M	48	35,4
99	308	M	34	28,7
100	309	M	25	19,7
101	315	M	36	30,3
102	316	M	27	29,9
103	316	M	51	43,6
104	317	M	37	39,2
105	317	M	40	32,9
106	318	M	70	65,8
107	320	M	31	32,1
108	322	M	32	29,7
109	323	M	31	32,3
110	325	M	42	42,4
111	335	M	32	33,1
112	342	M	52	62,6
113	346	M	32	45,2
114	347	M	105	114,5
115	348	Ž	210	155,6
116	349	M	26	27,9
117	350	M	34	36,3
118	351	M	30	29,6
119	352	M	36	33,8
120	352	M	43	45,6
121	353	M	36	41,6
122	369	Ž	214	161,3
123	370	M	50	44,9
124	371	M	59	56,6
125	389	M	28	28,1
126	390	M	48	48,1
127	394	M	38	38,4
128	395	M	45	50,5
129	401	M	43	40,8
130	402	M	43	41,2
131	403	Ž	88	78,0
132	406	M	42	41,9
133	407	M	30	27,5
134	408	M	52	47,9
135	410	Ž	46	49,5
136	413	M	47	39,5
137	418	M	35	37,8
138	419	M	32	36,3
139	421	M	41	46,1
140	425	M	34	34,2
141	427	M	38	39,4
142	439	M	46	38,1
143	440	M	43	37,7
144	441	M	51	43,7



145	442	M	51	44,8
146	443	M	43	36,6
147	444	M	36	30,3
148	446	M	64	59,1
149	447	M	64	54,6
150	455	M	38	29,9
151	456	M	37	33,8
152	457	Ž	118	101,4
153	459	M	48	38,1
154	460	M	165	169,9
155	461	M	46	39,8
156	462	M	52	48,3
157	463	M	41	39,4
158	464	M	45	41,1
159	477	M	37	35,6
160	478	M	33	32,7
161	480	M	29	30,3
162	489	M	29	28,1
163	490	M	33	29,2
164	496	M	24	22,2
165	497	M	44	36,0

## PRILOGA 2:

TABELA VI: Vrednosti koncentracij SHBG pri 25 preiskovankah, dobljenih po metodah LIA in ECLIA

Zap. št.	Vzorec	Spol	SHBG/LIA (nmol/l)	SHBG/ECLIA (nmol/l)
1	410	Ž	46	49,5
2	19	Ž	172	175,0
3	25	Ž	39	38,9
4	35	Ž	22	20,6
5	36	Ž	42	41,3
6	50	Ž	17	18,2
7	77	Ž	100	95,1
8	85	Ž	48	48,6
9	93	Ž	41	42,6
10	103	Ž	65	66,0
11	139	Ž	109	136,1
12	151	Ž	148	172,1
13	186	Ž	17	12,8
14	190	Ž	34	82,6
15	191	Ž	47	45,9
16	192	Ž	65	69,4
17	193	Ž	53	59,6
18	199	Ž	48	94,4
19	280	Ž	33	30,4
20	281	Ž	52	48,4

21	282	Ž	26	20,9
22	348	Ž	210	155,6
23	369	Ž	214	161,3
24	403	Ž	88	78,0
25	457	Ž	118	101,4

### PRILOGA 3:

TABELA VII: Vrednosti koncentracij SHBG pri 140 preiskovancih, dobljenih po metodah LIA in ECLIA

Zap. št.	Vzorec	Spol	SHBG/LIA (nmol/l)	SHBG/ECLIA (nmol/l)
1	250	M	31	41,6
2	263	M	37	42,2
3	264	M	26	28,8
4	282	M	42	45,5
5	316	M	27	29,9
6	317	M	37	39,2
7	323	M	31	32,3
8	322	M	32	29,7
9	325	M	42	42,4
10	335	M	32	33,1
11	342	M	52	62,6
12	352	M	36	33,8
13	389	M	28	28,1
14	390	M	48	48,1
15	394	M	38	38,4
16	395	M	45	50,5
17	418	M	35	37,8
18	421	M	41	46,1
19	425	M	34	34,2
20	427	M	38	39,4
21	3	M	40	26,7
22	30	M	44	45,9
23	31	M	84	101,5
24	32	M	51	52,9
25	51	M	38	42,1
26	54	M	46	41,0
27	55	M	42	35,6
28	56	M	29	24,6
29	57	M	40	34,1
30	58	M	42	35,1
31	59	M	39	33,0
32	81	M	51	43,4
33	82	M	110	102,8
34	83	M	58	51,4
35	94	M	29	27,6

36	97	M	45	42,5
37	98	M	45	42,5
38	99	M	32	28,0
39	100	M	34	30,4
40	101	M	44	38,8
41	113	M	42	47,3
42	115	M	109	112,3
43	116	M	61	43,9
44	134	M	26	26,9
45	135	M	25	25,6
46	136	M	27	28,7
47	137	M	35	39,2
48	138	M	39	40,8
49	142	M	35	34,9
50	146	M	45	47,3
51	148	M	48	46,6
52	154	M	33	33,8
53	160	M	23	25,1
54	161	M	20	21,3
55	162	M	33	37,5
56	164	M	31	34,5
57	165	M	33	36,6
58	166	M	29	29,2
59	167	M	22	20,9
60	168	M	31	32,8
61	172	M	51	40,9
62	173	M	84	95,6
63	174	M	46	42,9
64	183	M	39	33,2
65	184	M	42	38,1
66	188	M	47	27,3
67	194	M	36	34,4
68	202	M	14	20,9
69	212	M	27	42,7
70	213	M	28	48,1
71	215	M	33	43,8
72	216	M	22	40,6
73	217	M	21	29,2
74	218	M	23	39,5
75	221	M	16	22,5
76	222	M	21	29,8
77	223	M	16	21,5
78	224	M	37	55,0
79	225	M	26	39,5
80	226	M	36	56,9
81	227	M	25	37,2
82	228	M	28	39,9
83	229	M	27	38,3
84	230	M	35	33,9

85	231	M	54	56,5
86	232	M	36	33,8
87	233	M	43	42,1
88	234	M	38	35,7
89	235	M	42	40,4
90	236	M	42	38,3
91	238	M	98	110,1
92	255	M	41	46,8
93	306	M	39	36,4
94	307	M	48	35,4
95	308	M	34	28,7
96	309	M	25	19,7
97	315	M	36	30,3
98	316	M	51	43,6
99	317	M	40	32,9
100	318	M	70	65,8
101	320	M	31	32,1
102	346	M	32	45,2
103	347	M	105	114,5
104	349	M	26	27,9
105	350	M	34	36,3
106	351	M	30	29,6
107	352	M	43	45,6
108	353	M	36	41,6
109	370	M	50	44,9
110	371	M	59	56,6
111	401	M	43	40,8
112	402	M	43	41,2
113	406	M	42	41,9
114	407	M	30	27,5
115	408	M	52	47,9
116	413	M	47	39,5
117	419	M	32	36,3
118	439	M	46	38,1
119	440	M	43	37,7
120	441	M	51	43,7
121	442	M	51	44,8
122	443	M	43	36,6
123	444	M	36	30,3
124	446	M	64	59,1
125	447	M	64	54,6
126	455	M	38	29,9
127	456	M	37	33,8
128	459	M	48	38,1
129	460	M	165	169,9
130	461	M	46	39,8
131	462	M	52	48,3
132	463	M	41	39,4
133	464	M	45	41,1

134	477	M	37	35,6
135	478	M	33	32,7
136	480	M	29	30,3
137	489	M	29	28,1
138	490	M	33	29,2
139	496	M	24	22,2
140	497	M	44	36,0