

UPOTREBA PLJUVAČKE ZA HORMONALNE ANALIZE: KONCENTRACIJA TESTOSTERONA U SERUMU I PLJUVAČKI KOD ADOLESCENATA MUŠKOG POLA

UDK 612.313.012:612.43

*Elizabeta Dadić Nikoloska, Ljudmila Efremovska, Lidija Todorovska,
Vesela Maleska Ivanovska, Jasmina Pluncević-Gligoroska*

Institut za medicinsku i eksperimentalnu fiziologiju sa antropologijom,
Medicinski fakultet - Skoplje, Makedonija

Izvod: Monitoring koncentracije steroidnih hormona u pljuvački nudi mnogobrojne prednosti u poređenju sa konvencionalnim serumskim analizama. Metod je neinvazivan, jednostavan i bezbolan, isključuje stres efekat venepunkcije, a daje mogućnosti i za višekratna kolekcioniranja i izvan zdravstvene ustanove. U cilju istraživanja da li pljuvačka predstavlja validnu zamenu za serum, pomoću eseja za određivanje testosterona analizirali smo njegove totalne vrednosti u serumu i pljuvački. Testosteron je androgeni hormon koji učestvuje u mišićno-skeletnom razvitku, sveukupnom zdravlju i libidu. Uvažavajući cirkadijalne i sezonske varijacije testosterona, uzorci su prikupljeni u tačno određeno vreme (između 9.00 i 11.00 časova prepodne, tokom novembra).

Uzorci pljuvačke i krvi uzeti su od 44 adolescenta – volontera (uzrasta 11-19 godina) i analizirani su pomoću visoko specifičnog RIA – DSL 4100 eseja (adaptacijom komercijalnog serumskog kita po Granger-u D.A. 1999. za određivanje u pljuvački). Prosečna vrednost testosterona u pljuvački iznosila je 1.2 % serumske vrednosti. Nađena visoka korelacija testosteroskih koncentracija ($R= 0,73$) među dobijenim vrednostima za oba medijuma govori o značenju i mogućnosti upotrebe pljuvačke u dijagnostičke svrhe. Štaviše, koncentracija testosterona u pljuvački odražava slobodnu biološki aktivnu frakciju testosterona u krvi, ne vezanu za proteinske nosače, čime se obezbeđuju mnogo verodostojnije kliničke informacije.

Gljučne reči: Testosteron, korelacija serum-saliva, adolescenti

Uvod

Krv još uvek predstavlja medijum koji se najviše koristi u serodijagnostici različitih bolesti. Zbog mnogobrojnih nedostataka koji se pre svega odnose na način sakupljanja, deponovanja i mogućnosti transmisije različitih infektivnih agenasa, godinama unazad čine se napore u iznalaženju alternative za krv, odnosno serum kao dijagnostičku tečnost.

Saliva je takoreći gotov uzorak spreman za analizu koji nudi mnogobrojne prednosti. To je adekvatan biološki materijal u kojem se sa velikom preciznošću mogu

određivati različiti parametri, pre svega hormoni, različiti lekovi i njihovi metaboliti, antitela, narkotici itd. (Aquire, 1993; Hofman LF, 2001; Karin, 2000).

85% pacijenata radije daje salivu za analizu nego vensku krv, što je od osobenog interesa kada se radi o pedijatrijskoj populaciji (Gordisher i sar., 1994). Sakupljanje materijala je brzo i bezbolno, neinvazivno i bez stres efekta koji izaziva venepunkcija, što može bitno uticati na rezultate. Saliva može biti višekratno uzimana u toku 24 časa i van zdravstvene ustanove, i ne zahteva posebne uslove za deponovanje i transport. Pri radu sa pljuvačkom izostaje neželjeni efekt hemolize, a predstavlja i mnogo bezbedniji materijal u odnosu na mogućnosti prenošenja infektivnih agenasa (Major i sar., 1991). Ipak, najveća prednost ovog medijuma ogleda se pri analizi steroidnih hormona a odnosi se na mnogo veću preciznost koju omogućava ovaj medijum.

U krvi je 95% do 99% steroidnih hormona vezano za proteinske nosače (SHBG sex hormone binding globulin, CGG kortizol binding globulin i albumin). Ovaj konjugovani oblik hormona biološki je neaktivan. Konvencionalno određivanje steroida u serumu najvećim delom odražava ovu biološki neaktivnu frakciju hormona, a tek mali procenat odnosi se na biološki aktivni oblik (Read, 1989). Saliva predstavlja prirodni ultrafiltrat krvi i nekonjugirani steroidni hormoni (mol. tež. 400 Daltona, relativno nepolarne molekule) slobodno putem difuzije dospevaju u nju. Otuda koncentracije hormona u salivi odražavaju samo nevezanu porciju steroida u krvi zbog čega imaju mnogo veću terapijsku implikaciju od merenih totalnih vrednosti.

Danas se sa značajnom preciznošću u krvi mogu određivati: kortizol, DHAS, estradiol, estriol, progesteron, testosteron (Sreckfus i sar., 2002).

Ovde treba spomenuti i ograničenja ovog medijuma pri izradi hormonalnih analiza:

Hormoni u pljuvački mogu biti degradirani enzimima koji potiču od oralnih mikroorganizama i enzimima iz leukocita u usnoj duplji, a koji su poreklom iz gingivalnih sulcusa.

Uzorci pljuvačke kontaminirane krvlju (oralne bolesti, inflamacije, lezije) neupotrebljivi su za analizu. Primena različitih stimulansa za salivaciju koji sadrže limunsku kiselinu ili šećer takođe može kompromitovati rezultate. Hrana, kafa, sokovi kao i neki lekovi uzeti neposredno pre sakupljanja materijala mogu interferirati sa rezultatima testa i dovesti do lažnih tranzitornih povećanja vrednosti (Groschl, 2001).

Merenje nivoa hormona u salivi može biti od kliničkog značaja samo ako korektno odražava nivo serumskih vrednosti, tj. ako postoji konstantna i očekivana korelacija među salivarnim i serumskim vrednostima za korišćeni metod rada.

Validnost i primenljivost ovog medijuma u dijagnostičke svrhe za potrebe ove studije utvrđivali smo testiranjem korelacije testosterona (17 - Hidroksy-4-androstene-3-one) u oba medijuma.

Testosteron je androgeni hormon koji učestvuje u mišićno-skeletnom razvoju, sveukupnom razviku i libidu. Salivarni testosteron ima potencijalne prednosti u kliničkoj aplikaciji posebno kada se radi o određivanju niskih vrednosti u slučajevima:

Diferencijalne dijagnostike hirzutizma kod žena, evaluacije hormonalnog dizbalansa kod dece i pri diferencijalnoj dijagnostici hipoandrogenizma kod muškaraca.

U pedijatrijskim istraživanjima (Butler, 1989) merenje salivarnog testosterona odlikava funkciju gonada i omogućava određivanje pubertetskog stadijuma (G1-G5).

Salivarni testosteron je nezamenjiv u dijagnostici psihičkih poremećaja somato-vegetativne i seksualne prirode i stanjima depresije.

Određivanje odnosa salivarni testosteron-kortizol najsenzitivniji je kriterijum u određivanju sindroma pretreniranosti.

Testosteron u salivi je dragocen parametar pri proceni gubitka mišićne mase i promene gustine kostiju.

Materijal i metod

U ovoj komparativnoj pilot studiji utvrđivali smo mogućnosti ovog medijuma putem određivanja koncentracije testosterona kod 44 adolescenta muškog pola uzrasta 11-19 godina.

Za određivanje testosterona u serumu korišćen je RIA DSL 4100 –ultrasenzitivni esej čijom se adaptacijom po Granger-u 1999. mogu detektirati mnogo niže vrednosti testosterona u salivi.

Uzimanje materijala

Uz uvažavanje cirkadijalnih i sezonskih varijacija testosterona, uzorci su prikupljeni uvek u isto vreme (9-11 časova) tokom novembra za oba medijuma. Uzorci uzeti ujutro su za 1,5-4 puta viši u odnosu na poslepodnevne vrednosti, ali ne postoji signifikantan jutarnji pik kao u slučaju kortizola. Svi ispitanici ekspertorirali su salivu pre pranja zuba, konzumiranja hrane ili pića. Usna šupljina se ispira nekoliko puta vodom 15 minuta pre sakupljanja materijala. Saliva se sakuplja direktno u sterilne kontejnere 2-5 ml. Budući da su polipropilen i polistiren visoko adsorptivan materijal, bor-silikatno staklo za kolekcioniranje bio je naš izbor (Dabbs, 1991). Sa analitičke tačke gledišta prisustvo mucina je razlog velike vizskoznosti, što otežava manipulaciju materijalom. Uzeti uzorci smrzavaju se na -20C, a neposredno pre izrade eseja centrifugiraju se (6 min na 10000 rpm) čime se uklanjaju mucin i ostale rezidue iz salive (Lac, 1993). Testosteron se određuje u supernatantu.

Određivanje testosterona u serumu napravljeno je po standardnom protokolu proizvođača, a analiza u salivi izvedena je dilucijom postojećih standarda – (adaptacijom po Granger-u 1999).

Adaptacija protokola:

Diluiranje testosteron antiseruma (1:5) 10ml antiserum + 40ml PBS

Diluiranje gotovih standarda (1:100) 50 l st. (A, B, C, D, E, F) + 4950 l PBS

Diluiranje kontrolnih seruma (1:100)

Pipetirati po 400 l diluiranih standarda, kontrola i uzoraka u obeležene epruvete

Piptirati 400 l st.0 u NSB

100 l diluiranog antiseruma, a 100 l PBS u NSB

Vorteksiranje i inkubacija 45 min na 37 C

Dodati 50 l testosteron J125 reagensa i inkubirati 3 sata na 37 C

Dodati 500 l hladnog reagensa za precipitaciju (osim u total)

Vorteksiraj i inkubiraj 30 min na 4C

Centrifugirati na 4C na 4500 rpm./ 30 min

Dekantirati i brojiti na gama brojaču.

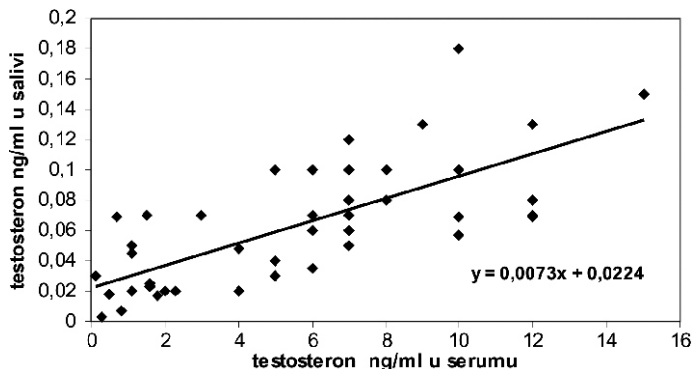
Uzorci se rade u duplikatu, a očitavaju sa konstruirane krive na semi-log papiru.

Rezultati

Nađeni rezultati u ispitivanom uzorku adolescenata uzrasta (11-19 godina) bili su u rangu 0,3-15,0 ng/ml za serum, a 0,003- 0,18 ng/ml za pljuvačku.

Izračunata prosečna sr. vrednost iznosi 1,203 % sa $sd=0.282$ od serumskih vrednosti.

Dobiveni koeficijent korelacije testosterona u salivi i serumu iznosi 0,73 i dat je na grafikonu 1.na istom je prikazana i jednačina linearne regresije



Grafikon 1. Korelacija testosterona saliva-serum

Diskusija

U poslednjih 20 godina mnogobrojna istraživanja u svetu potvrdila su opravdanost salive kao validnog sredstva u određivanju slobodne biološki aktivne frakcije steroidnih hormona (Lac, 2001). Praktično svi steroidni hormoni mogu biti detektovani u salivi sa visokim stepenom korelacije u odnosu na serum (DHEAS $r = 0,51$; testosteron $r = 0,77$; DHEA $r = 0,73$; kortizol $r = 0,74$; androstendione $r = 0,92$) (Bolajii, 1994).

Detekcija testosterona u pljuvački prvi put je izvedena 70-ih godina (Landman, 1976). Metoda nije bila dovoljno senzitivna i nije dala očekivane rezultate. Granger, 1999. predlaže adaptaciju komercijalnog RIA DSL-4100, za serum, kojom postaje moguća i detekcija mnogo nižih vrednosti (salivarnih koncentracija) testosterona, ispod 1 pg/ml.

Rezultati dobijeni u ovoj studiji, rađeni ovom adaptacijom (komercijalnog serumskog kita RIA DSL 4100) na uzorku 44 adolescenata, potvrđuju opravdanost metode, kako zbog jednostavnog izvođenja i prednosti uzimanja materijala, tako i zbog dobijene visoke korelacije koja korespondira sa podacima nađenim u literaturi (Jonson, 1987, $r = 0,83$; Granger, 1999 $r = 0,78$; Khan-Dawood 1984 $r = 0,71$).

Testosteron je važan hormon za oba pola; on ima značajnu ulogu u održavanju kardiovaskularnog sistema i zdravih kostiju. Blagovremena identifikacija niskog nivoa testosterona i pravovremene korekcije dijetama, vežbanjem ili hormonalnom

suplementacijom može umnogome pomoći u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i osteopatiji.

Danas su u teku intenzivna istraživanja u cilju usavršavanja salivarnih testova za hormonalne analize, njihove osjetljivosti i specifičnosti radi jednostavnije upotrebe, što bi ubuduće omogućilo njihovo rutinsko korišćenje i uvođenje u svakodnevnoj praksi.

Literatura

- Aquire A. Sialochemistry: a diagnostic tool? *Crit Oral Biol Med* 1993;4: 343-51.
- Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr* 2001;131:1621-5.
- Karin M. Saliva as a analytical tool in toxicology. *International Journal of drug Testing*; 2000;1-33.
- Gordisher R., Burtin P., Hwang P., Levine M., Koren G. Saliva versus blood sampling for the therapeutic drug monitoring in children: patient and parental preferences and an economic analysis. *Ther Drug Monit*;1994: 16:437-43.
- Major C.V., Read SE., Coates RA. Comparison of saliva and blood for human immunodeficiency virus prevalence testing. *J Infect Dis.* 1991; 163:699-702.
- Read GF. Hormones in saliva. *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology Vol.II*.1989; 147-169.
- Streckfus CF., Bigler LR. Saliva as a Diagnostic fluid. *Oral Diseases* 2002;8 (2), 69-76.
- Groschl M. et al. *J Lab Med.* 2001; 25: 36-42.
- Butler G.E. et al. Salivary Testosterone Levels and Progress of Puberty in the Normal Boy. *Clinical Endocrinology* 30: 587-596, 1989.
- Granger DA. et al. Salivary Testosterone Determination in Studies of Child Health and Development. *Hormones and Behaviour* 35:18-27, 1999.
- Dabbs J. M. Salivary Testosterone Measurements : Collecting, Storing, and Mailing Saliva Samples *Physiology and Behaviour* 49:815-817, 1991.
- Lac G., Lac N., Robert A. Steroid assays in saliva: a method to detect plasmatic contaminations. *Arch. Int Physiol Biochem Biophys* 1993; 101: 257-262.
- Landman AD, Sanford LM, Howland BE, Dawes C, Pritchard ET: Testosterone in human saliva. *Experientia* 1976, 32:940-1.
- Jonson SG., Joplin GF., Burrin JM., Direct assay for testosterone in saliva : relationship with a direct serum free testosterone assay. *Clin Chem acta.* 1987 Mar 30; 163(3):309-18.
- Khan-Dawood FS, Choe JK, Dawood MY, Salivary and plasma bound and free testosterone level in men and women. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148:441-445.

USE OF SALIVA FOR HORMONE EXAMINATIONS: CONCENTRATION OF TESTOSTERONE IN SERUM AND SALIVA IN ADOLESCENT BOYS

Summary

Salivary monitoring of steroid hormone levels has many advantages over the more conventional serum analysis. Non-invasive, simple, safe, stressfree and painless allows for multiple collections outside of hospital settings. To see if saliva is valid substitute for serum in assay of testosterone we determined the concentrations of total testosterone in serum and salivary testosterone. Testosterone is androgen, involved in musculoskeletal development, general health and libido. With respect to circadian and seasonal fluctuations of testosterone the sampling was carried out at a standardized

time of the day (between 9.00-11.00 a.m) all during November. Saliva and blood samples were collected from 44 boys volunteers ageing 11-19 years and assayed using a highly specific RIA-DSL 4100 assay. (by adapting a commercially available serum testosterone kit - Garanger D.A et al. 1999 for saliva). On average salivary testosterone levels were 1.2 % of plasma levels. We found a highly significant correlations between testosterone in serum and salivary testosterone in the examined group ($R=0,73$). This high sero-salivary testosterone correlations makes saliva a useful diagnostic tool. Concentration of testosterone in saliva reflect free testosterone circulating in the blood, not bound with proteins marking of which supplies more reliable clinical information than total plasma concentration.

Key words: Testosterone, sero-salivary correlations, adolescent