

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ****ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕФИЦИТА АНДРОГЕНОВ ПРИ БЕСПЛОДИИ И СНИЖЕННОМ ОВАРИАЛЬНОМ РЕЗЕРВЕ ПО ДАННЫМ ВЭЖХ-МС/МС И ИХЛА**

С.В. Киндышева\*, А.А. Гависова, М.А. Шевцова, Л.Т. Цховребова, Д.А. Бирюкова, Н.Л. Стародубцева, Т.Ю. Иванец, В.Е. Франкевич

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова, 117513, Москва, ул. Академика Опарина, 4, стр 2; \*эл. почта: s\_kindysheva@oparina4.ru.

Дефицит андрогенов и ассоциированные состояния являются важной проблемой, влияющей на качество жизни женщин. Наиболее широко влияние андрогенов исследовано в репродуктивном периоде применительно к синдрому поликистоза яичников, но в случае сниженного овариального резерва у молодых женщин с бесплодием остается открытой дискуссия о лабораторных методах определения влияния дефицита андрогенов и его клинической манифестации. В настоящее время в клинической медицине нет однозначного мнения по поводу перечня маркеров данного состояния и нижних референсных значений. В данной работе показана перспективность использования панели стероидных гормонов для оценки уровня андрогенов у женщин репродуктивного возраста, а также проведено сравнение точности постановки диагноза на основе результатов измерений концентрации гормонов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией и иммунохимическим методом.

**Ключевые слова:** масс-спектрометрия; ИХЛА; дефицит андрогенов

**DOI:** 10.18097/BMCRM00182

**ВВЕДЕНИЕ**

Современные исследования в репродуктивной медицине направлены на поиск предикторов неудачных исходов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Для обеспечения репродуктивной функции в контексте откладывания деторождения на более поздний возрастной период особую значимость приобретает проблема снижения овариального резерва, а также бедный овариальный ответ у женщин с бесплодием: в данных условиях необходимо назначение наиболее оптимальной терапии, что невозможно безкорректной лабораторной диагностики. В многочисленных исследованиях доказано влияние на здоровье женщин как избыточного синтеза андрогенов (гиперандрогении) при синдроме поликистозных яичников (СПЯ), так и их сниженного синтеза [1]. Андрогены имеют доминирующее значение для формирования репродуктивной функции, а также играют важную роль при поддержании гормонального баланса в репродуктивном и постменопаузальном периоде [2]. Мультисистемная роль андрогенов подтверждается наличием экспрессии андрогенных рецепторов не только в репродуктивных органах, но и в органах всего организма, включая молочные железы, центральную нервную систему, костную ткань, мышечный каркас, жировую ткань и даже волосные фолликулы [3]. Андрогены определяют и влияют на метаболизм, когнитивные функции и психоэмоциональную сферу благодаря наличию фракций с различной биологической активностью [4]. Андрогены управляют фолликулогенезом и образованием женских половых гормонов (эстрогенов), в результате чего происходит

атрезия фолликула в присутствии высоких концентраций дигидротестостерона и тестостерона [5]. Требуемые концентрации андрогенов в организме поддерживаются за счет их периферического синтеза, а также синтеза яичниками и надпочечниками. При этом основная часть синтезируется в яичниках и надпочечниках двумя путями: через дельта-5 (преимущественно в надпочечниках) и дельта-4 (преимущественно в яичниках) производные [6].

С возрастом в организме женщины снижается уровень андрогенов, поэтому проблема их дефицита у женщин представляется крайне важной и актуальной. В 35–37 лет данный аспект становится клинически заметнее и к 40 годам отмечается изменение концентраций репродуктивно значимых гормонов еще до нарушения ритма менструаций [6–8]. Андрогены являются инициаторами фолликулогенеза – дирижерами репродуктивной компетентности яичников. Нормальный уровень андрогенов ассоциирован с регулярным ритмом менструального цикла и овуляцией, а изменение их концентрации приводит к развитию патогенетических состояний: от синдрома преждевременного выключения функции яичников до формирования поликистозных состояний [9, 10]. Для оценки многих клинических состояний, а также проведения корректной терапии необходима оценка андрогенного профиля [11–14]. Диагностика дефицита андрогенов у женщин репродуктивного возраста относительно новое направление в медицине [16], на данный момент остаются вопросы, связанные с коррекцией симптомов, так и с причинами [7, 17].

В настоящее время для измерений концентрации стероидных гормонов могут быть использованы несколько



методов измерений [18, 19]: иммуно-ферментный анализ (ИФА), иммунохемилюминисцентный анализ (ИХЛА), газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХМС) и жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Каждая из перечисленных методик имеет свои особенности. Так, использование газовой хроматографии позволяет добиться хорошей чувствительности и специфичности при одномоментном измерении панели стероидных гормонов, но платой за это становится необходимость дериватизации [20–23] тяжелых молекул (к классу которых относятся андрогены), что делает более удобным использование жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией [20, 24–26]. Использование методов иммуно-ферментного анализа при высокой чувствительности сопряжено с возможным завышением полученных значений вследствие влияния кросс-реактивности [11, 27–29].

При дефиците андрогенов их концентрации очень низки, что приводит к значительной ошибке при измерении методом ИХЛА [11, 28–29]. Не каждая региональная клиническая больница может позволить себе измерения методом ВЭЖХ-МС/МС. Метод ИХЛА для анализа стероидных гормонов активно применяется в большинстве медицинских учреждений и сертифицирован Министерством Здравоохранения РФ для постановки клинического диагноза. В данной работе разработаны математические модели (логистические регрессии) для постановки диагноза андрогенного дефицита у женщин разного возраста с помощью данных стероидного профиля сыворотки крови (ВЭЖХ-МС/МС и ИХЛА).

## МЕТОДИКА

В работе использовались образцы крови, полученные от 40 женщин репродуктивного возраста с бесплодием и сниженным овариальным резервом (СОР), обратившихся для проведения программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) ЭКО/ИКСИ в Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова. Все они прошли тестирование на основе опросника андрогенного дефицита у женщин [15] для оценки степени значимости проявления клинических симптомов дефицита андрогенов (ДА). Средний возраст пациенток составил  $37.3 \pm 2.4$  лет. По результатам опросника все пациентки были разделены на две группы:

- группа контроля – женщины, набравшие меньше 27 баллов (15 человек);
- группа с ДА – пациентки, набравшие 27 баллов и выше (25 человек).

Группа контроля состояла из клинически здоровых пациенток (меньше 17 баллов) и тех, кто не имел выраженных симптомов (от 17 до 26 баллов включительно). Группа с ДА состояла из пациенток со слабо выраженными симптомами ДА (от 27 до 36 баллов включительно), пациенток со средней (от 37 до 49 баллов включительно) и высокой степенью выраженности ДА (50 баллов и больше).

Для проведения исследований кровь забирали на 2-3 день менструального цикла утром, натощак из локтевой вены с помощью закрытых систем для взятия венозной крови S-Monovette® («Sarstedt», Германия) с активатором образования сгустка. Для анализа использовали сыворотку, полученную путем центрифугирования при 1207 g 10 мин.

Центрифугирование крови проводили не позднее, чем через 1 ч после взятия. Аликвоты полученных образцов сыворотки крови хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Уровень общего тестостерона определяли в сыворотке крови электрохемилюминесцентным методом на автоматическом иммунохимическом анализаторе Cobas e411 («Roche Diagnostics GmbH», Германия) с использованием коммерческих наборов данного производителя. Концентрацию андростен-3,17-диона, дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭАС) кортизола в сыворотке крови определяли иммунохемилюминесцентным методом на автоматическом иммунохимическом анализаторе IMMULITE®2000 («Siemens», США). Определение 17-а-ОН-прогестерона и дигидротестостерона проводили твердофазным иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов ДРГ 17-а-ОН-прогестерон ИФА («DRG Diagnostic», США) и Dihydrotestosterone (DHT) ELISA («Diagnostics Biochem Canada Inc», Канада).

При подготовке образцов к ВЭЖХ-МС/МС измерениям использовали набор аналитических стандартов стероидных гормонов Steroid Hormones in Serum LC-MS/MS Analysis Kit («JASEM», Турция), который включал в себя 2 оптимизационных смеси, 4 калибровочных смеси и 2 уровня контроля качества в лиофилизированном виде, смесь внутренних стандартов (IS) и чистую сыворотку (Blank). Кроме того, в работе использовали дистиллированную воду Milli-Q, муравьиную кислоту (98%, «Sigma-Aldrich», США), ацетонитрил (99,9%, HPLC Gradient grade, «Fisher Chemical», США), метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ  $\geq 99,5\%$ , HPLC grade, «Fisher Chemical»), метанол (99,9%, HPLC Basic, «Scharlau», Испания).

Стероидные экстракты извлекали из смеси предварительно перемешанных 460 мкл образца и 25 мкл IS методом двойной жидкостно-жидкостной экстракции МТБЭ (по 920 мкл для каждой экстракции) с последующим перемешиванием на вортексе и центрифугированием при 11300 g по 5 мин, отбором 800 мкл и 1000 мкл супернатанта соответственно, его дальнейшей сушкой в токе  $\text{N}_2$  при  $50^{\circ}\text{C}$ , растворением в 100 мкл 50 метанола. Извлеченный аналит переносился в вials со вставкой на 200 мкл для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Разделение стероидных экстрактов осуществляли на хроматографе Agilent 1260 Infinity («Agilent», США) с использованием колонки Poroshel 120 EC-C18 (длина 100 мм, внутренний диаметр 2.1 мм, размером зерна сорбента 2.7 мкм, «Agilent») и следующих элюентов в качестве подвижной фазы: элюент А – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты; элюент В – 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Температуру колонки поддерживали равной  $50^{\circ}\text{C}$ . Градиентное элюирование осуществляли в соответствии со следующей программой: от 0 до 2 мин – 5% В с резким подъемом до 20% В (за 0.1 мин) и медленным ростом до 60% В на 11 мин с последующим резким подъемом до 95 % (за 0.1 мин) при скорости потока 500 мкл/мин, далее скорость мгновенно увеличивали до 800 мкл/мин и сохраняли постоянной до 16 мин с последующим возвратом к элюенту первой ступени для уравнивания колонки вплоть до 20 мин. Объем вводимого образца составлял 45 мкл, время измерения – 20 мин.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием tandemного масс-спектрометрического детектора QTRAP5500 9 («AD SCIEX PTE Ltd.», Сингапур)

**Таблица 1.** Результаты измерения стероидного профиля пациентов с ДА и группы контроля методом ВЭЖХ-МС/МС.

| Показатель                            | Группа контроля     | Группа с ДА       | p-value  |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------|----------|
| кортизол, нмоль/л                     | 215.1(196.2, 300.6) | 344.3(284.5, 410) | 0.003878 |
| 11-деоксикортизол, нмоль/л            | 0.63(0.57, 0.82)    | 0.63 (0.40, 0.79) | 0.6142   |
| кортикостерон, нмоль/л                | 4.27(3.21, 7.80)    | 8.90(5.71, 14.86) | 0.03233  |
| ДГЭАС, мкмоль/л                       | 5.64(4.21, 8.0)     | 3.83(2.78, 5.44)  | 0.03809  |
| тестостерон, нмоль/л                  | 0.93(0.77, 1.04)    | 0.67(0.56, 0.96)  | 0.03931  |
| андростен-3,17-дион, нмоль/л          | 4.52(3.31, 4.99)    | 3.18(2.48, 4.27)  | 0.05872  |
| 17- $\alpha$ -ОН-прогестерон, нмоль/л | 1.24(0.69, 1.87)    | 0.93(0.65, 1.84)  | 0.5225   |
| дигидротестостерон, пг/мл             | 122.4(121.9, 224.4) | 94.3(76.6, 190.8) | 0.246    |
| прогестерон, нмоль/л                  | 0.74 (0.67, 7.55)   | 1.13 (0.82, 4.05) | 0.2805   |

**Таблица 2.** Результаты измерения стероидного профиля пациентов с ДА и группой контроля методом ИХЛА.

| Гормон                                | Группа контроля     | Группа с ДА         | p-value  |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|----------|
| тестостерон, нмоль/л                  | 1.37(0.80, 1.72)    | 0.49 (0.85, 1.16)   | 0.0599   |
| андростен-3,17-дион, нмоль/л          | 10.9(9.66, 12.4)    | 7.43(5.26, 10.06)   | 0.003172 |
| 17- $\alpha$ -ОН-прогестерон, нмоль/л | 3.60(2.80, 4.05)    | 2.60 (2.25, 3.35)   | 0.1307   |
| дигидротестостерон, пг/мл             | 381.9(292.2, 408.3) | 248.1(167.6, 305.5) | 0.006482 |
| ДГЭАС, мкмоль/л                       | 6.60 (5.21, 9.83)   | 4.37 (2.65, 5.54)   | 0.005611 |
| кортизол, нмоль/л                     | 247 (222, 342)      | 354.5 (289 453.3)   | 0.03591  |

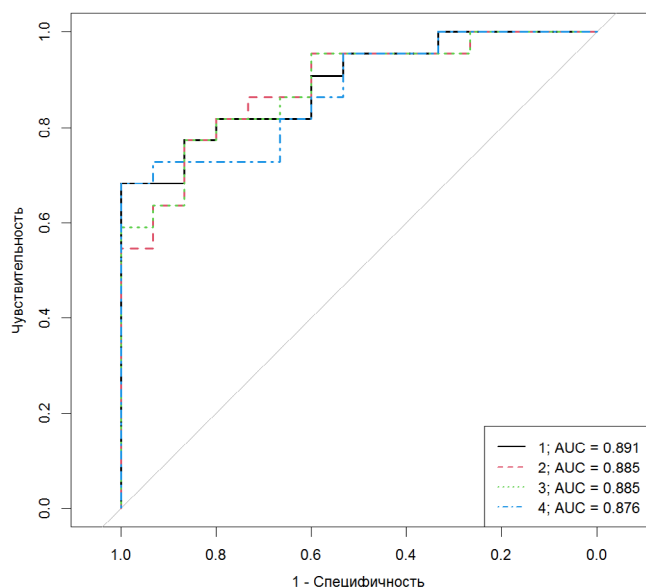
с источником электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов. Оптимизация параметров источника ионов и ионной оптики для мониторинга выбранных реакций (SRM) осуществляли в автоматическом режиме по каждому конкретному соединению отдельно с помощью ввода смеси стандартов через шприц с системой равномерной подачи. Полученные SRM переходы и времена удерживания веществ приведены в дополнительных материалах (табл. S1, S2).

Калибровочная кривая состояла из 7 точек: 4 точки соответствовали четырем калибровочным уровням ( $Cal_1$ – $Cal_4$ ), три дополнительные точки были получены путем смешивания равных объемов соседних калибровочных уровней:  $Cal_{12}$  содержал по 230 мкл уровней  $Cal_1$  и  $Cal_2$ ;  $Cal_{23}$  – по 230 мкл уровней  $Cal_2$  и  $Cal_3$ ;  $Cal_{34}$  – по 230 мкл уровней  $Cal_3$  и  $Cal_4$ . Количество уровней контроля качества также было увеличено до четырех за счет разбавления исходных уровней ( $QC_{1B}$ ,  $QC_{1C}$ ,  $QC_{2B}$  и  $QC_{2C}$ ) чистой сывороткой из набора: уровень  $QC_{1B}$  содержал 160 мкл уровня  $QC_1$  и 300 мкл сыворотки (Blank), уровень  $QC_{2B}$  содержал 300 мкл  $QC_2$  и 160 мкл сыворотки. Концентрации гормонов в точках калибровочной кривой и контролях качества приведены в дополнительных материалах (табл. S3, S4). Доля контролей качества от общего числа проанализированных образцов составляла не меньше 10% (без учета точек калибровочной кривой).

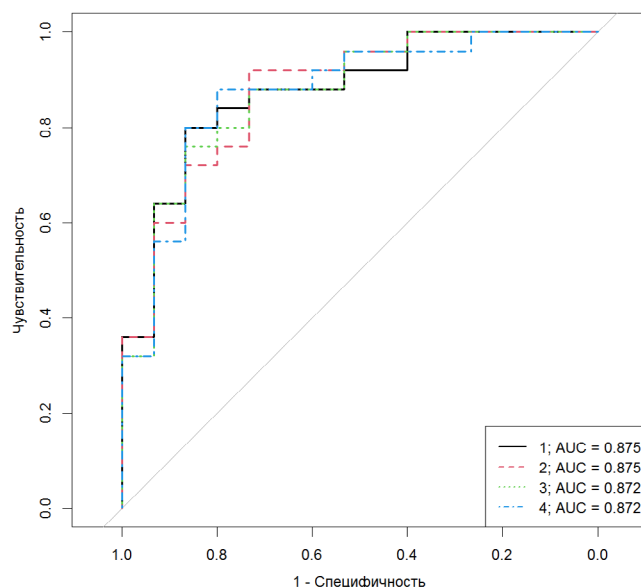
Для контроля отсутствия загрязнения пробы посредством переноса проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ бланка (чистая вода, прошедшая полный цикл пробоподготовки), введенного после контроля качества QC high (дополнительные материалы, рис. S1). Какого-либо отчетливого сигнала на бланке не обнаружено. Для минимизации эффекта

переноса веществ между соседними анализами проводилась дополнительная промывка иглы, колонки (5 мин) и петли, для чего использовали индивидуальную программу закола с дополнительным уравниванием всей системы (4 мин), чтобы избежать изменения времени удерживания соединений и обеспечить постоянство воспроизведения результата. Хроматографические параметры приведены в таблице S5 (дополнительные материалы).

Для статистического анализа полученных результатов использовались скрипты, написанные на языке программирования R [30]. Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка, поскольку численные значения концентраций гормонов не имели нормального распределения, результаты измерений были представлены в форме «медианное значение (Q1, Q3)» в таблицах 1 и 2. Для проверки отличий между несвязанными выборками использовался U критерий Манна-Уитни. С целью исследования возможности постановки диагноза дефицит андрогенов по данным стероидного профиля крови были разработаны модели логистической регрессии. Выбор в сторону логистической регрессии был сделан по следующим причинам: модель строили для небольшого количества данных (менее 20), с помощью данной модели удалось получить хорошее разделение между группами с наличием и отсутствием дефицита андрогенов, кроме того, логистическая регрессия является наиболее применяемой в медицинском сообществе для постановки диагноза. В качестве зависимых переменных в моделях рассматривали все возможные комбинации концентраций стероидных гормонов в крови, измеренных двумя разными методиками. В качестве независимой переменной выступала



**Рисунок 1.** ROC-кривые логистических регрессионных моделей, разработанных на основании данных по концентрациям стероидных гормонов, измеренных методом ИХЛА, при постановке диагноза ДА по результатам опросника. Цифры соответствуют следующим панелям гормонов, используемых для построения модели: 1 – ДГЭАС, кортизол, 17- $\alpha$ -ОН-прогестерон, андростен-3,17-дион; 2 – ДГЭАС, кортизол, 17- $\alpha$ -ОН-прогестерон; 3 – ДГЭАС, кортизол, 17- $\alpha$ -ОН-прогестерон, тестостерон; 4 – ДГЭАС, кортизол, андростен-3,17-дион.



**Рисунок 2.** ROC-кривые логистических регрессионных моделей, разработанных на основании данных по концентрациям стероидных гормонов, измеренных методом ВЭЖХ-МС/МС, при постановке диагноза ДА по результатам опросника. Цифры соответствуют следующим панелям гормонов, используемых для построения модели: 1 – ДГЭАС, кортизол, андростен-3,17-дион, кортикостерон; 2 – кортизол, дигидротестостерон, андростен-3,17-дион, кортикостерон; 3 – кортизол, 17- $\alpha$ -ОН-прогестерон, андростен-3,17-дион, кортикостерон; 4 – кортизол, андростен-3,17-дион, кортикостерон, 11-деоксикортизол.

**Таблица 3.** Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих определить наличие дефицита андрогенов по концентрации стероидных гормонов, измеренных в сыворотке крови методом ИХЛА.

| Показатель                                                                                                                                  | AUC  | Пороговое значение | Чувствительность | Специфичность | Положительная предсказательная ценность |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------|------------------|---------------|-----------------------------------------|
| ДГЭАС <sub>ихла</sub> , кортизол <sub>ихла</sub> ,<br>17- $\alpha$ -ОН-прогестерон <sub>ихла</sub> ,<br>андростен-3,17-дион <sub>ихла</sub> | 0.89 | 0.72               | 0.77(0.55; 1)    | 1(0.73; 1)    | 1(0.81; 1)                              |
| ДГЭАС <sub>ихла</sub> , кортизол <sub>ихла</sub> ,<br>17- $\alpha$ -ОН-прогестерон <sub>ихла</sub>                                          | 0.88 | 0.63               | 0.86(0.55; 1)    | 0.87(0.6; 1)  | 0.91(0.79; 1)                           |
| ДГЭАС <sub>ихла</sub> , кортизол <sub>ихла</sub> ,<br>17- $\alpha$ -ОН-прогестерон <sub>ихла</sub> ,<br>тестостерон <sub>ихла</sub>         | 0.88 | 0.61               | 0.82(0.55; 1)    | 0.93(0.6; 1)  | 0.94(0.79; 1)                           |
| ДГЭАС <sub>ихла</sub> , кортизол <sub>ихла</sub> ,<br>андростен-3,17-дион <sub>ихла</sub>                                                   | 0.88 | 0.72               | 0.73(0.55; 1)    | 1(0.67; 1)    | 1 (0.81; 1)                             |

принадлежность пациентки к группе с симптомами дефицита андрогенов или к группе контроля. Из общего множества моделей для каждого метода измерения выбирали четыре с максимальными значениями площади под ROC-кривой (AUC). Для каждой модели определяли критерий Вальда, ошибки вычисления коэффициентов и  $p$ -value. С целью определения качества разработанных моделей строили ROC-кривые с определением площади под ними, вычисляли чувствительность и специфичность.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерений стероидного профиля методом ВЭЖХ-МС/МС приведены в таблице 1. Статистически

значимые различия между концентрациями стероидных гормонов в группе контроля и группе с симптомами дефицита андрогенов наблюдались для кортизола, кортикостерона, ДГЭАС и тестостерона.

В таблице 2 приведены результаты измерений стероидных гормонов методом ИХЛА для каждой группы пациентов. Статистически значимые отличия концентраций наблюдались для андростен-3,17-диона, дигидротестостерона, ДГЭАС и кортизола.

На рисунке 1 приведен ROC анализ по данным, полученных методом ИХЛА, в случае установки диагноза ДА по результатам опросника. Из всего множества кривых отображены 4 с максимальным AUC. Наилучший результат с AUC=0.891 наблюдался для кривой, обозначенной черным

**Таблица 4.** Параметры моделей логистической регрессии, позволяющей дифференцировать пациенток по концентрации стероидных гормонов, измеренных в сыворотке крови методом ИХЛА.

| № модели | Коэффициент                                   | Величина коэффициента | Ошибка | Критерий Вальда | p-value |
|----------|-----------------------------------------------|-----------------------|--------|-----------------|---------|
| 1        | свободный член                                | 5.0669                | 2.3905 | 2.1196          | 0.034   |
|          | ДГЭАС <sub>ихла</sub> [мкмоль/л]              | -0.6605               | 0.3145 | -2.1            | 0.0357  |
|          | кортизол <sub>ихла</sub> [нмоль/л]            | 0.0037                | 0.0034 | 1.086           | 0.2775  |
|          | 17-α-ОН-прогестерон <sub>ихла</sub> [нмоль/л] | -0.1618               | 0.1659 | -0.9755         | 0.3293  |
|          | андростен-3,17-дион <sub>ихла</sub> [нмоль/л] | -0.2016               | 0.1428 | -1.4124         | 0.1578  |
| 2        | свободный член                                | 4.1178                | 2.0592 | 1.9997          | 0.0455  |
|          | ДГЭАС <sub>ихла</sub> [мкмоль/л]              | -0.725                | 0.2856 | -2.5381         | 0.0111  |
|          | кортизол <sub>ихла</sub> [нмоль/л]            | 0.0029                | 0.0032 | 0.9337          | 0.3505  |
|          | 17-α-ОН-прогестерон <sub>ихла</sub> [нмоль/л] | -0.2309               | 0.1504 | -1.5356         | 0.1246  |
| 3        | свободный член                                | 4.229                 | 2.1403 | 1.9759          | 0.0482  |
|          | ДГЭАС <sub>ихла</sub> [мкмоль/л]              | -0.6673               | 0.3015 | -2.213          | 0.0269  |
|          | кортизол <sub>ихла</sub> [нмоль/л]            | 0.0033                | 0.0034 | 0.9932          | 0.3206  |
|          | 17-α-ОН-прогестерон <sub>ихла</sub> [нмоль/л] | -0.2046               | 0.1571 | -1.3021         | 0.1929  |
|          | тестостерон <sub>ихла</sub> [нмоль/л]         | -0.6472               | 0.9482 | -0.6826         | 0.4949  |
| 4        | свободный член                                | 4.1599                | 2.0398 | 2.0394          | 0.0414  |
|          | ДГЭАС <sub>ихла</sub> [мкмоль/л]              | -0.5396               | 0.2596 | -2.0792         | 0.0376  |
|          | кортизол <sub>ихла</sub> [нмоль/л]            | 0.0037                | 0.0034 | 1.1027          | 0.2701  |
|          | андростен-3,17-дион <sub>ихла</sub> [нмоль/л] | -0.2408               | 0.1355 | -1.7771         | 0.0755  |

**Таблица 5.** Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих определить наличие андрогенодефицита по концентрации стероидных гормонов, измеренных в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

| Показатель                                                                                                                            | AUC  | Пороговое значение | Чувствительность | Специфичность | Положительная предсказательная ценность |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------|------------------|---------------|-----------------------------------------|
| ДГЭАС <sub>мс</sub> ,<br>кортизол <sub>мс</sub> , андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> , кортикостерон <sub>мс</sub>                     | 0.87 | 0.6                | 0.84(0.64; 1)    | 0.87(0.67; 1) | 0.92(0.81; 1)                           |
| кортизол <sub>мс</sub> ,<br>дигидротестостерон <sub>мс</sub> ,<br>андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> ,<br>кортикостерон <sub>мс</sub>  | 0.87 | 0.48               | 0.92(0.6; 1)     | 0.8(0.6; 1)   | 0.89(0.78; 1)                           |
| кортизол <sub>мс</sub> ,<br>17-α-ОН-прогестерон <sub>мс</sub> ,<br>андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> ,<br>кортикостерон <sub>мс</sub> | 0.87 | 0.63               | 0.84(0.6; 1)     | 0.87(0.6; 1)  | 0.91(0.8; 1)                            |
| кортизол <sub>мс</sub> , андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> , кортикостерон <sub>мс</sub> ,<br>11-деоксикортизол <sub>мс</sub>         | 0.87 | 0.55               | 0.88(0.68; 1)    | 0.87(0.6; 1)  | 0.91(0.8; 1)                            |

цветом. Для постановки диагноза по указанной модели требуются данные о концентрации четырех гормонов (измеренных методом ИХЛА): ДГЭАС, кортизол, 17-α-ОН-прогестерон и андростен-3,17-дион.

Параметры и характеристики найденных логистических моделей, приведенных на рисунке 1, представлены в

таблицах 3, 4. В целом для постановки диагноза недостаточно измерения одного гормона – наиболее точная модель должны содержать данные об уровне четырех гормонов: ДГЭАС, кортизол, 17-α-ОН-прогестерон и андростен-3,17-дион.

На рисунке 2 приведен ROC анализ данных, полученных методом ВЭЖХ-МС, в случае установки диагноза ДА

**Таблица 6.** Параметры моделей логистической регрессии, позволяющей дифференцировать пациенток по концентрации стероидных гормонов, измеренных в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

| № модели | Коэффициент                                 | Величина коэффициента | Ошибка | Критерий Вальда | p-value |
|----------|---------------------------------------------|-----------------------|--------|-----------------|---------|
| 1        | свободный член                              | -3.5261               | 2.4364 | -1.4473         | 0.1478  |
|          | ДГЭАС <sub>мс</sub> [мкмоль/л]              | -0.1104               | 0.1512 | -0.7298         | 0.4655  |
|          | кортизол <sub>мс</sub> [нмоль/л]            | 0.029                 | 0.012  | 2.4193          | 0.0156  |
|          | андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> [нмоль/л] | -0.44                 | 0.2559 | -1.719          | 0.0856  |
|          | кортикостерон <sub>мс</sub> [нмоль/л]       | -0.2327               | 0.1166 | -1.9959         | 0.0459  |
| 2        | свободный член                              | -4.6587               | 2.2665 | -2.0555         | 0.0398  |
|          | кортизол <sub>мс</sub> [нмоль/л]            | 0.0324                | 0.0126 | 2.5667          | 0.0103  |
|          | дигидротестостерон <sub>мс</sub> [пг/мл]    | 0.0054                | 0.0061 | 0.8792          | 0.3793  |
|          | андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> [нмоль/л] | -0.5962               | 0.3283 | -1.816          | 0.0694  |
|          | кортикостерон <sub>мс</sub> [нмоль/л]       | -0.2571               | 0.1203 | -2.1374         | 0.0326  |
| 3        | свободный член                              | -4.3722               | 2.1889 | -1.9974         | 0.0458  |
|          | кортизол <sub>мс</sub> [нмоль/л]            | 0.0318                | 0.0119 | 2.6768          | 0.0074  |
|          | 17-α-ОН-прогестерон <sub>мс</sub> [нмоль/л] | 0.1947                | 0.2194 | 0.8873          | 0.3749  |
|          | андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> [нмоль/л] | -0.5659               | 0.295  | -1.9182         | 0.0551  |
|          | кортикостерон <sub>мс</sub> [нмоль/л]       | -0.2637               | 0.117  | -2.2534         | 0.0242  |
| 4        | свободный член                              | -4.3187               | 2.2388 | -1.929          | 0.0537  |
|          | кортизол <sub>мс</sub> [нмоль/л]            | 0.032                 | 0.0122 | 2.6146          | 0.0089  |
|          | андростен-3,17-дион <sub>мс</sub> [нмоль/л] | -0.4637               | 0.2628 | -1.764          | 0.0777  |
|          | кортикостерон <sub>мс</sub> [нмоль/л]       | -0.2386               | 0.1164 | -2.0493         | 0.0404  |
|          | 11-деоксикортизол <sub>мс</sub> [нмоль/л]   | -0.817                | 1.2426 | -0.6575         | 0.5109  |

по результатам опросника. Из всего множества кривых отображены 4 с максимальным AUC. Наилучший результат с AUC=0.875 наблюдался для кривой, обозначенной черным цветом. Для постановки диагноза по оптимальной модели требуется измерение панели из четырех гормонов: ДГЭАС, кортизол, андростен-3,17-дион и кортикостерон.

Параметры и характеристики найденных логистических моделей, построенных на основе данных измерений ВЭЖХ-МС/МС, представлены в таблицах 5, 6. Как и в случае с ИХЛА, для наиболее точной постановки диагноза необходимы данные об уровнях четырех гормонов: ДГЭАС, кортизол, андростен-3,17-дион и кортикостерон.

Среди всех возможных вариантов логистических кривых рассматривали все возможные модели, построенные по всем возможным комбинациям значений гормонов с длиной выборки от одного до четырех. Среди отобранных вариантов нет ни одного, способного выделить группу пациенток с ДА по значениям концентраций только одного или двух гормонов независимо от метода. Для диагностики дефицита андрогенов требуется измерение панели гормонов, при этом можно использовать как ВЭЖХ-МС/МС, так и ИХЛА.

Обе модели для постановки диагноза на основе выраженности симптомов ДА, построенные на основании данных по концентрациям стероидных гормонов,

измеренных методами ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС, имеют одинаковую клиническую значимость (AUC ~ 0.9). В обоих случаях среди ключевых гормонов, вошедших в модель, присутствуют ДГЭАС, кортизол и андростен-3,17-дион. В случае ИХЛА к перечисленным гормонам добавлялся 17-α-ОН-прогестерон, а при измерениях ВЭЖХ-МС/МС – кортикостерон. Для модели на основании ВЭЖХ-МС/МС чувствительность и специфичность составили 84% и 87% соответственно, а для модели на основании ИХЛА – 77% и 100%. Оба метода показывают хорошее согласие при диагностике ДА при использовании панели из четырех гормонов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенные модели логистических регрессий на основании уровня стероидных гормонов у женщин репродуктивного возраста со сниженным овариальным резервом и бесплодием имеют высокую диагностическую значимость (площадь под ROC-кривой составляет 0.9) и одинаково хорошо выделяют группу пациенток с ДА. Однако для корректной постановки диагноза необходимо измерение панели из четырех гормонов, состав которой зависит от метода измерения.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все клинические исследования проводились в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Все пациенты прочитали и подписали информированное согласие, одобренное этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени ак. В.И. Кулакова (протокол №2 от 07.02.2019).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания «Решение проблемы бесплодия в современных условиях путем разработки клиничко-диагностической модели бесплодного брака и использования инновационных технологий в программах вспомогательной репродукции» №121040600410-7.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны на сайте журнала (<https://doi.org/10.18097/BMCR00182>).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Neves, A.R., Montoya-Botero, P., Polyzos N.P. (2022) Androgens and diminished ovarian reserve: the long road from basic science to clinical implementation. *A comprehensive and systematic review with meta-analysis*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, **227**(3), p.401-413. e18. DOI: 10.1016/j.ajog.2022.03.051
2. James, A. (2008) Androgens and Reproductive Aging. *Fertility and Sterility*, **89**(1), 261. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.042>
3. Bonne, C., Saurat, J. H., Chivot, M., Lehuchet, D., Raynaud, J.P. (1977) Androgen receptor in human skin. *The British journal of dermatology*, **97**(5), 501-503. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1977.tb14126.x
4. Davis, S.R., Davison, S.L., Donath, S., Bell, R.J. (2005) Circulating androgen levels and self-reported sexual function in women. *JAMA*, **294**(1), 91-96. DOI: 10.1001/jama.294.1.91
5. Walters, K.A. (2015) Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction*, **149**(4), R193-R218. DOI: 10.1530/REP-14-0517
6. Burger, H.B. (2002) Androgen production and mechanisms. Androgen production in women. *Fertility and Sterility*, **77**(4), 3-5. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)02985-0
7. Mathur, R., Glenn D.B. (2010) Androgen deficiency and therapy in women. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, **17**(4), 342-349. DOI: 10.1097/MED.0b013e32833ab083
8. Butler, L., Santoro, N. (2011) The reproductive endocrinology of the menopausal transition. *Steroids*, **76**(7), 627-635. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.02.026
9. Chernukha, G.E., Naidukova, A.A., Udovichenko, M.A., Kaprina, E.K., Ivanets, T.Yu. (2019) Androgen profile in patients with polycystic ovary syndrome and its association with metabolic dysfunction. *Obstetrics and gynecology*, **11**, 122-128. DOI: 10.18565/aig.2019.11.122-128
10. Tabeyeva, G.I., Shamilova, N.N., Zhakhur, N.A., Pozdnyakova, A.A., Marchenko, L.A. (2013) Premature ovarian failure is an enigma of the 21st century. *Obstetrics and gynecology*, **12**, 16-21.
11. Karashima, Sh., Osaka, I. (2022) Rapidity and Precision of Steroid Hormone Measurement. *Journal of Clinical Medicine*, **11**(4), 956. DOI: 10.3390/jcm11040956
12. Handelsman, D.J. (2017) Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science, **32**(6), 1147-1150. DOI: 10.1093/humrep/dex078
13. Kanakis, G.A., Tsamets, Ch.P., Goulis, D.G. (2019) Measuring testosterone in women and men. *Maturitas*, **125**, 41-44. DOI: 10.1016/j.maturitas.2019.04.203
14. Trabert B., Xu, X., Falk R.T., Guillemette, Ch., Stanczyk, F.Z. and McGlynn, K.A. (2015) Assay reproducibility of serum androgen measurements using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **155**, 56-62. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2015.09.032
15. Gavisova, A.A., Dolgushina, N.V., Frankevich, V.E., Ivanets, T.Yu., Gus, A.I., Nazarenko, T.A., Sukhikh, G.T. (2022) FAD – female androgen deficiency, Russian State Patent Agency Certificate, No. 2022124063 of 13.09.2022.
16. Davis, S.R. (2002) Androgen deficiency states and sequelae. When to suspect androgen deficiency other than at menopause. *Fertility and Sterility*, **77**, 68-71. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)02977-1](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)02977-1)
17. Traish, A.M., Morgentaler, A. (2022) Androgen Therapy in Women with Testosterone Insufficiency: Looking Back and Looking Ahead. *Androgen: Clinical Research and Therapeutics*, **3**(1), 1-13. DOI: 10.1089/andro.2021.0030
18. Jeanneret, F., Tonoli, D., Rossier, M.F., Saugy, M., Boccard, J. (2016) Evaluation of steroidomics by liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry as a powerful analytical strategy for measuring human steroid perturbations. *J. Chromatogr. A.*, **1430**, 97-112. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.008
19. Andrew, R., Homer N.Z.M. (2020) Mass spectrometry: Future opportunities for profiling and imaging steroids and steroid metabolites. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.*, **15**, 71-78. DOI: 10.1016/j.coemr.2020.11.005
20. Ferchaud, V., Courcoux, P., Bizet, B.L., Monteau, F., Andre, F. (2000) Enzymatic hydrolysis of conjugated steroid metabolites: Search for optimum conditions using response surface methodology. *Analyst*, **125**(12), 2255-2259. DOI: 10.1039/b003421p
21. Gomes, R.L., Meredith, W., Snape, C.E., Sephton, M.A. (2009) Analysis of conjugated steroid androgens: Deconjugation, derivatisation and associated issues. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**(5), 1133-1140. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.01.027
22. Fang, K., Pan, X.-J., Huang, B., Liu, J.-L., Wang, Yu, Gao, J.-P. (2010) Progress on Keto Groups Derivatization of Steroid Hormones in Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Chinese J. Anal. Chem.*, **38**(5), 743-751. DOI: 10.1016/S1872-2040(09)60045-1
23. Luque-Córdoba, D., López-Bascón, M.A., Priego-Capote, F. (2020) Development of a quantitative method for determination of steroids in human plasma by gas chromatography-negative chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Talanta*, **220**, 121415. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.12141
24. Son, H.H., Yun, W.S., Cho, S.-H. (2020) Development and validation of an LC-MS/MS method for profiling 39 urinary steroids (estrogens, androgens, corticoids, and progestins). *Biomed. Chromatogr.*, **34**(2), 1-16. DOI: 10.1002/bmc.4723
25. Tudela, E., Deventer, K., Geldof, L., Eenoo, P.V. (2015) Urinary detection of conjugated and unconjugated anabolic steroids by dilute-and-shoot liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Drug Test. Anal.*, **7**(2), 95-108. DOI: 10.1002/dta.1650
26. Deventer, K., Pozo, O.J., Verstraete, A.G., Eenoo, P.V. (2014) Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **55**, 1-13. DOI: 10.1016/j.trac.2013.10.012
27. Dittadi, R., Matteucci, M., Meneghetti, E., Ndreu, R. (2018) Reassessment of the Access Testosterone chemiluminescence assay and comparison with LC-MS method. *J. Clin. Lab. Anal.*, **32**(3), 1-5. DOI: 10.1002/jcla.22286
28. Kanakis, G.A., Tsamets, Ch.P., Goulis, D.G. (2019) Measuring testosterone in women and men. *Maturitas*, **125**, 41-44. DOI: 10.1016/j.maturitas.2019.04.203
29. Taylor, A., Keevil, B., Huhtaniemi, I.T. (2015) Mass spectrometry and immunoassay; how to measure steroid hormones today and tomorrow. *European Journal of Endocrinology*, **173**, D1-D12. DOI: 10.1530/EJE-15-0338
30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved 2018, from: <https://www.R-project.org/>

Поступила: 20.09.2022

После доработки: 31.10.2022

Принята к публикации: 16.11.2022

**IDENTIFICATION OF ANDROGEN DEFICIENCY IN INFERTILITY AND REDUCED OVARIAN RESERVE BASED ON HPLC-MS/MS AND IHLA MEASUREMENTS**

***S.V. Kindysheva\*, A.A. Gavisova, M.A. Shevtsova, L.T. Tskhovrebova, D.A. Biryukova, N.L. Starodubtseva, T.Yu. Ivanec, V.E. Frankevich***

Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,  
4 bld. 2 Oparina str., Moscow, 117513 Russia, \*e-mail: s\_kindysheva@oparina4.ru

The androgen deficiency and associated states represent is an important problem that affects the quality of women live. The most widely the androgen influence has been studied in the reproductive period in relation to polycystic ovary syndrome; however about laboratory methods to determine the impact of androgen deficiency and its clinical manifestation in the case of young women with a reduced ovarian reserve and with infertility are still actively discussed. Clinical medicine still needs generally approved markers of androgen deficiency states and its lower reference values. In this work we illustrate the perspective of measurements of steroid hormones panel to verify the diagnosis on the basis of high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunochemical methods.

**Key words:** HPLC-MS; IHLA; androgen deficiency states

**FUNDING**

This work was performed within state assignment «Solving the problem of infertility in modern conditions with the aid of a clinical diagnostic model of infertile marriage development and innovate technologies in assisted reproduction programs» No.121040600410-7.

*Supplementary materials are available at <http://dx.doi.org/10.18097/BMCRM00182>*

Received: 20.09.2022, revised: 31.10.2022, accepted: 16.11.2022