

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

JURAJ ŽUPANIĆ

**Procjena gonadarhe i adrenarhe u dječaka
određivanjem testosterona i dehidroepiandrosteron-
sulfata u slini**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu za laboratorijsku endokrinologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Saše Kralik Oguić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

Rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „PyrOPECh - Izloženost piretroidnim i organofosfatnim insekticidima u djece - procjena rizika od štetnih učinaka na neuropsihološki razvoj i hormonski status“ (HRZZ IP-2019-04-7193, voditeljica dr.sc. Veda Marija Varnai) te je financiran sredstvima istog.

POPIS KRATICA, SIMBOLA I OZNAKA

17 β -HSD – 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza

3 β -HSD – 5-en-3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza/izomeraza

ACTH – adrenokortikotropni hormon

ADH – antidiuretski hormon

AMH – anti-Müllerov hormon

AR – androgeni receptori

ARE – elementi koji reagiraju na androgene (engl. *androgen-responsive elements*)

AUC – površina ispod krivulje (engl. *Area Under the Curve*)

cAMP – ciklički adenzin-monofosfat

CYP – citokrom P450

CRH – kortikotropin-oslobađajući hormon (engl. *corticotropin-releasing hormone*)

DHEA – dehidroepiandrosteron

DHEA-S – dehidroepiandrosteron-sulfat

DHT – dihidrotestosteron

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

ELISA – engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

FSH – folikulostimulirajući hormon

GnRH – gonadotropin-oslobađajućim hormonom (engl. *gonadotropin – releasing hormone*)

GnRHR – receptor gonadotropin-oslobađajućeg hormona (engl. *gonadotropin-releasing hormone receptor*)

hCG – humani korionski gonadotropin

HSP – proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*)

IGF-1 – inzulinu sličan faktor rasta-1 (engl. *insulin-like growth factor 1*)

IQR – interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)

LC/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LDL – lipoproteini male gustoće (engl. *low-density lipoprotein*)

LH – luteinizirajući hormon

MC2R – melanokortinski receptor tipa 2 (engl. *melanocortin 2 receptors*)

POR – citokrom P540 oksidoreduktaza

PDS – skala pubertetskog razvoja (engl. *Pubertal Development Scale*)

ROC – engl. *Receiver Operating Characteristic*

scc – engl. *side-chain cleavage*

SHBG – globulin koji veže spolne hormone (engl. *sex hormon-binding globulin*)

SMR – ocjena spolne zrelosti (engl. *sexual maturity rating*)

SRY – engl. *sex-determining region Y*

StAR protein – engl. *steroidogenic acute regulatory protein*

SULT2A1 – sulfotransferaza 2A1

TMB – tetrametilbenzidin

TSH – tireostimulirajući hormon, tireotropin

ρ – Spearmanov koeficijent korelacije

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Adrenarha i DHEA-S	1
1.2.	Regulacija adrenarhe	3
1.3.	Testosteron	4
1.4.	Regulacija lučenja testosterona i os hipotalamus-hipofiza-testisi.....	6
1.5.	Androgeni receptori i androgeni učinak u fetalnom razvoju i djetinjstvu.....	7
1.6.	Gonadarha i pubertetski razvoj dječaka	8
1.7.	Tannerovi stadiji pubertetskog razvoja dječaka	10
1.8.	Određivanje androgena u slini.....	11
2.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI	13
3.	MATERIJALI I METODE	14
3.1.	Ispitanici i uzorci	14
3.2.	Određivanje testosterona u slini	15
3.3.	Određivanje DHEA-S u slini.....	17
3.4.	Statistička obrada podataka	19
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	Kriteriji isključivanja i deskriptivna statistika	21
4.2.	Ispitivanje statistički značajne razlike	24
4.3.	Ispitivanje korelacije	24
4.4.	ROC analiza	26
5.	RASPRAVA.....	29
5.1.	Rezultati istraživanja	29
5.2.	Ograničenja istraživanja	32
5.3.	Perspektive i mogućnosti salivarnih androgena	33
6.	ZAKLJUČCI	34
7.	ZAHVALE	35
8.	LITERATURA.....	36
9.	SAŽETAK.....	40
10.	SUMMARY	41
11.	ŽIVOTOPIS	42

1. UVOD

Pubertet možemo definirati kao vrijeme tijekom kojeg dijete razvija sekundarna spolna obilježja i doseže spolnu zrelost. U dječaka započinje između 9. i 14. godine (Breehl i Caban, 2016). Pubertetski razvoj karakterizira postepeno povećanje lučenja muških spolnih hormona – androgena, od kojih je najznačajniji testosteron. Početak lučenja spolnih hormona sintetiziranim u testisima dječaka i posljedični rast genitalija naziva se gonadarha (Bordini i Rosenfield, 2011). Osim u testisima, androgeni se u manjoj mjeri sintetiziraju i u nadbubrežnim žlijezdama. Najznačajniji adrenalni androgeni su dehidroepiandrosteron (DHEA) i dehidroepiandrosteron-sulfat (DHEA-S). Do povećane sinteze androgena u nadbubrežnoj žlijezdi dolazi prije centralnog puberteta i neovisno o njegovom nastupanju. Taj događaj se naziva adrenarha i započinje između 6. i 8. godine života djeteta. (Auchus, 2010; Rosenfield, 2021).

1.1. Adrenarha i DHEA-S

Nadbubrežne žlijezde građene su od srži i kore. Srž na poticaj simpatikusa luči katekolamine adrenalin i noradrenalin. Kora nadbubrežne žlijezde sastoji se od tri sloja: *zona glomerulosa*, *zona fasciculata* i *zona reticularis*, svaki specifičan po sintezi određenih steroidnih hormona. U *zoni glomerulosi* sintetiziraju se mineralokortikoidi od kojih je najznačajniji aldosteron. *Zona fasciculata* mjesto je sinteze glukokortikoida poput kortizola i kortizona, ali u manjoj mjeri i androgena i estrogena. Većina adrenalnih androgena nastaje u *zoni reticularis* (Hall i Hall, 2021; Augsburger i sur., 2024).

Već tijekom fetalnog razvoja unutarjni, fetalni sloj nadbubrežne žlijezde proizvodi DHEA i DHEA-S. Nakon rođenja dolazi do involucije fetalne zone pa se kora nadbubrežne žlijezde neonatusa sastoji samo od *zone glomerulose* i *zone fasciculate*, dok se *zona reticularis* počinje razvijati tek nekoliko godina kasnije u djetinjstvu. *Zona reticularis* raste kako prekursorske stanice iz *zone fasciculate* migriraju i proliferiraju na granici kore i srži, stvarajući otočiće koji se postupno šire. Oko 6. godine u djevojčica i 8. u dječaka *zona reticularis* doseže svoju funkcionalnu zrelost, dolazi do ekspresije ključnih enzima za sintezu androgena te time započinje adrenarha. Kasnije, iza 40. godine, lučenje androgena se smanjuje i nastupa adrenopauza (Rosenfield, 2021; Augsburger i sur., 2024).

Specifičnost sinteze pojedine vrste steroidnih hormona za svaku zonu kore nadbubrežne žlijezde rezultat je različite ekspresije enzima i kofaktora koji sudjeluju u procesu njihove sinteze (Augsburger i sur., 2024). Sinteza androgena u *zoni reticularis* može se odvijati kroz tri sintetska puta. Klasični put uključuje pretvorbu kolesterola u pregnenolon potaknutu StAR proteinom (engl. *steroidogenic acute regulatory protein*). Glavni izvor kolesterola su lipoproteinske čestice male gustoće (LDL-čestice). Nastali pregnenolon se dalje pomoću citokrom P450 17A1 (CYP17A1) s kofaktorom citokrom P540 oksidoreduktazom (POR) konvertira u 17 α -hidroksipregnenolon. Slijedi njegova pretvorba u DHEA također enzimom CYP17A1 uz kofaktore POR i citokrom b5. Visoka ekspresija sulfotransferaze 2A1 (SULT2A1) potiče sulfokonjugaciju DHEA u DHEA-S, koja se osim u nadbubrežnim žlijezdama događa i u jetri. DHEA-S se luči u cirkulaciju kao najzastupljeniji metabolit adrenalnih androgena i smatra se stabilnim biomarkerom adrenarhe (Auchus, 2010; Augsburger i sur., 2024). Uz klasični, postoje još i alternativni (engl. *backdoor*) i 11-oksi sintetski putevi. Alternativni karakterizira pretvorba 17 α -hidroksipregnenolona u potentniji dihidrotestosteron (DHT) zaobilazeći testosteron kao intermedijer, dok u 11-oksi putu pomoću CYP11B1 nastaju adrenalni androgeni 11 β -hidroksiandrostenedion, 11 β -hidroksitestosteron, 11-ketoandrostenedion i 11-ketotestosteron (Auchus, 2010, Witchel i sur., 2020; Augsburger i sur., 2024). Kao i testosteron, DHEA i ostali adrenalni androgeni u plazmi su većinski vezani za proteine – 90% za albumin i 3% za globulin koji veže spolne hormone (SHBG, engl. *sex hormon-binding globulin*), dok je DHEA-S uglavnom u slobodnom, nevezanom obliku (Bertholf i sur., 2023).

DHEA-S je slab androgen i ne može aktivirati androgene receptore. Zato je potrebna periferna konverzija u potentnije androgene, odnosno testosteron i DHT koja se odvija u tkivima zahvaćenih adrenarhom – koži genitalne i aksilarne regije, žlijezdama lojnicama i apokrinim znojnim žlijezdama. Tako se djelovanjem androgena na razvoj žlijezda lojnica povećava masnoća kože i dlaka te se mogu pojaviti akne. Razvoj apokrinih znojnih žlijezda u djeteta manifestira se kao specifični miris znoja aksilarne regije karakterističan za odraslu osobu. Bitan klinički znak djelovanja androgena je i pojava dlaka u genitalnom i aksilarnom području. Pojava dlaka u genitalnom području, odnosno rast stidnih dlaka naziva se i pubarha (Rosenfield, 2021). Osim spomenutih, DHEA-S ima i brojne druge učinke nevezane uz spolni razvoj. Poznati su njegovi neuroaktivni efekti pri čemu modulira neurotransmitterske signalne puteve i promovira neuroplastičnost. U kostima se konvertira u DHT stimulirajući osteoblaste

i rast epifiza. Također, DHEA-S može modulirati endotelnu funkciju, djelovati protuupalno, te povećati inzulinsku osjetljivost (Abdulmaged i sur., 2011; Rosenfield, 2021).

1.2. Regulacija adrenarhe

Dok je za sintezu aldosterona poznato da je pod kontrolom sustava renin-angiotenzin, a sinteza kortizola i drugih glukokortikoida pod kontrolom adrenokortikotropnog hormona (ACTH, engl. *adrenocorticotropic hormone*), regulacija sinteze androgena nije u potpunosti jasna (Hall i Hall, 2021). Poznato je da je ACTH nužan za razvoj *zone reticularis* i održavanje njene funkcije, odnosno da je adrenarha rezultat odgovora na ACTH (Rosenfield, 2021; Augsburg i sur., 2024). ACTH, koji se još naziva i kortikotropin, peptidni je hormon građen od 39 aminokiselina kojeg sintetiziraju i luče kortikotropne stanice adenohipofize. Sinteza ACTH pod kontrolom je kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH, engl. *corticotropin-releasing hormone*) i u manjoj mjeri antiduretskog hormona (ADH, vazopresin). Oba sintetiziraju parvocelularni neuroni hipotalamusa, točnije paraventrikularne jezgre. Novosintetizirani CRH aksonski se transportira do medijalne regije hipotalamusa gdje se luči u portalni krvotok hipofize kojim dolaze do adenohipofize, veže se na CRH-R1 receptore i potiče sekreciju ACTH. ACTH sistemskom cirkulacijom dolazi do adrenalnih kortikalnih stanica i veže se na specifične melanokortinske receptore tipa 2 (MC2R, engl. *melanocortin 2 receptors*) na njihovoj površini. Glavni efekt te interakcije je aktivacija adenilat ciklaze i stvaranje cAMP-a. Time dolazi do aktivacije protein kinaze A koja dovodi do prvog i limitirajućeg koraka u sintezi androgena – pretvorbi kolesterola u pregnenolon. Također, ACTH ima učinak i na aktivaciju drugih enzima koji sudjeluju u steroidogenezi putem aktivacije različitih transkripcijskih faktora (Angelousi i sur., 2020; Hall i Hall, 2021).

Iako je ACTH nužan za njenu pojavu, za vrijeme adrenarhe ne dolazi do značajnog porasta u njegovoj koncentraciji. Unatoč tome, ACTH tijekom razvoja *zone reticularis* dovodi do povećanja aktivnosti SULT2A1 i povećanja 17, 20 – liazne aktivnosti putem CYP17A1. Na taj način mijenja se obrazac steroidogeneze u nadbubrežnim žlijezdama. Ulogu u tome ima i kortizol. Kako rast djeteta zahtjeva više kortizola, na poticaj ACTH dolazi do pojačane sinteze i veće koncentracije kortizola unutar nadbubrežne žlijezde. To dovodi do inhibicije enzima 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 2 (3 β -HSD2) čime steroidogeneza prelazi ka pojačanoj sintezi androgena, upravo na poticaj ACTH. No u ovom procesu nije poznat klasični mehanizam povratne sprege u kojem bi povećane koncentracije adrenalnih androgena značajno

utjecale na inhibiciju lučenja ACTH, ali kako u hipotalamusu postoje androgeni receptori, smatra se da i adrenalni androgeni u manjoj mjeri mogu suprimirati os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde zasad nepoznatim mehanizmom. Također, poznate su brojne druge tvari koje moduliraju efekte ACTH poput interleukina-6, inzulina i inzulinu sličan faktor rasta-1 (IGF-1, engl. *insulin-like growth factor 1*) koji mu pojačavaju učinak. Osim navedenih, poznati su i još neki regulatori adrenalne sinteze androgena poput protein-kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*), signalnih puteva proteina C i D, faktora rasta poput IGF-1, ali i endokrinih faktora poput hormona rasta, prolaktina, estrogena, prostaglandina i β -lipotropina (Rosenfield, 2021; Bertholf i sur., 2023; Augsburger i sur., 2024). Učinak na adrenarhu i koncentracije DHEA-S ima i tjelesna težina djeteta, pa tako pretilost za vrijeme adrenarhe povećava koncentracije DHEA-S, a velika porođajna težina djeteta je povezana s niskim koncentracijama u adrenarhi (Rosenfield, 2021).

Adrenarha se smatra preuranjenom (prematurnom) ako se javi u djevojčica prije 8. godine ili u dječaka prije 9. godine. Prematurna adrenarha je češća u djevojčica nego u dječaka, javljajući se u omjeru 9:1 (Novello i Speiser, 2018). Najčešća manifestacija prematurne adrenarhe je prematurna pubarha. Ta dva pojma često su pogrešno korišteni kao sinonimi, jer su mogući i drugi klinički znakovi prematurne adrenarhe, ali i drugi uzroci prematurne pubarhe. Generalno, prematurna adrenarha je dijagnoza isključenja, jer prije donošenja ove dijagnoze, preuranjeni centralni pubertet, kongenitalna adrenalna hiperplazija, tumori te izlaganje egzogenim androgenima moraju biti isključeni. Kao granica odlučivanja koristi se i koncentracija DHEA-S $> 1 \mu\text{mol/L}$ (Rosenfield, 2021; Augsburger i sur., 2024).

1.3. Testosteron

Testosteron i ostali androgeni prvenstveno se sintetiziraju u Leydigovim stanicama testisa. Ishodišna molekula za sintezu svih steroidnih hormona, uključujući i testosterona, je kolesterol. Većina kolesterola nastaje u Leydigovim stanicama de novo sintezom iz acetil-koenzima A, dok se manji dio unosi u stanicu endocitozom posredovanom receptorom iz LDL-čestica. Sinteza testosterona započinje u mitohondriju gdje se odvija limitirajući korak koji određuje brzinu cjelokupnog procesa – transport kolesterola s vanjske na unutarnju membranu mitohondrija pomoću StAR proteina. Na unutarnjoj membrani mitohondrija nalazi se enzim citokrom P450_{scc} (CPY11A, scc od engl. *side-chain cleavage*) koji katalizira reakcije hidroksilacije na C-20 i C-22 pozicijama molekule uz kidanje veze između njih. Tim reakcijama

se skraćuje bočni lanac kolesterola za 6 ugljikovih atoma i nastaje molekula pregnenolona s 21 ugljikovim atomom. Daljnja pretvorba pregnenolona događa se u endoplazmatskom retikulumu gdje uz CYP17 nastaju brojni intermedijeri. (Nieschlag i sur., 2012). CYP17 katalizira hidroksilaciju na C-17 poziciji te zahvaljujući svojoj 17,20–liaznoj aktivnosti, skraćuje 21-C strukturu za dva ugljikova atoma do konačne 19-C steroidine jezgre. Osim CYP17, u tome sudjeluju i enzimi 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza (17 β -HSD) te 5-en-3 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza/izomeraza (3 β -HSD) koji konačno dovode do testosterona. Sinteza može teći dvama različitim metaboličkim putevima – Δ^5 i Δ^4 putem. Iako uključuju iste enzime, redoslijed reakcija se razlikuje, što rezultira formiranjem različitih intermedijera (Handelsman, 2020).

Novosintetizirani testosteron, kao lipofilna molekula, slobodno difundira kroz staničnu membranu niz koncentracijski gradijent u intersticijsku tekućinu pa zatim u kapilare testisa ili izravno u kapilare koje su u kontaktu s Leydigovim stanicama. U zdravih odraslih muškaraca u prosijeku nastaje 5 – 7 mg testosterona dnevno (Handelsman, 2020; Nieschlag i sur., 2012). Testosteron je u krvotoku većinom vezan za proteine plazme, dok je samo 1–4% slobodni testosteron koji se jedini smatra biološki aktivnim. Najveći udio testosterona (44 – 66%) velikim je afinitetom vezan za SHBG. Manjim afinitetom, ali većim kapacitetom veže se i na albumin (33 – 50% ukupnog testosterona), s kojeg lako disocira i prelazi u tkiva. Zbog toga se slobodna frakcija i ona vezana na albumin zajedno nazivaju biodostupnim testosteronom (Handelsman, 2020; Goldman i sur., 2017).

Većina testosterona ostvaruje svoj biološki učinak izravnim djelovanjem na ciljane tkiva, dok se manji dio pretvara u dva biološki aktivna metabolita – DHT i estradiol. Približno 5 – 10% testosterona u perifernim tkivima reducira se u DHT djelovanjem enzima 5 α -reduktaze u tkivima i organima čija funkcija značajno ovisi o androgenima: prostati, testisima, epididimisu i folikulima dlaka genitalnog područja. Redukcija testosterona u DHT predstavlja mehanizam lokalne amplifikacije androgenog učinka, budući da je DHT 3 do 6 puta potentniji. Iako se oba hormona vežu na androgene receptore (AR), afinitet vezanja DHT je mnogo veći te pokreće drugačije unutarstanične signalne puteve. Manji udio testosterona, oko 0,2%, aromatazom se pretvara u estradiol koji djeluje kao modulator androgenog djelovanja, sudjeluje u regulaciji kognitivnih funkcija i raspoloženja te djeluje neuroprotektivno, a u kostima je važan za mineralizaciju i održavanje koštane mase (Handelsman, 2020; Nieschlag i sur., 2012). Inaktivacija testosterona i drugih androgena odvija se primarno u jetri. U reakcijama I. faze dolazi do redukcije, a zatim u reakcijama II. faze nastaju hidrofilniji metaboliti, uglavnom

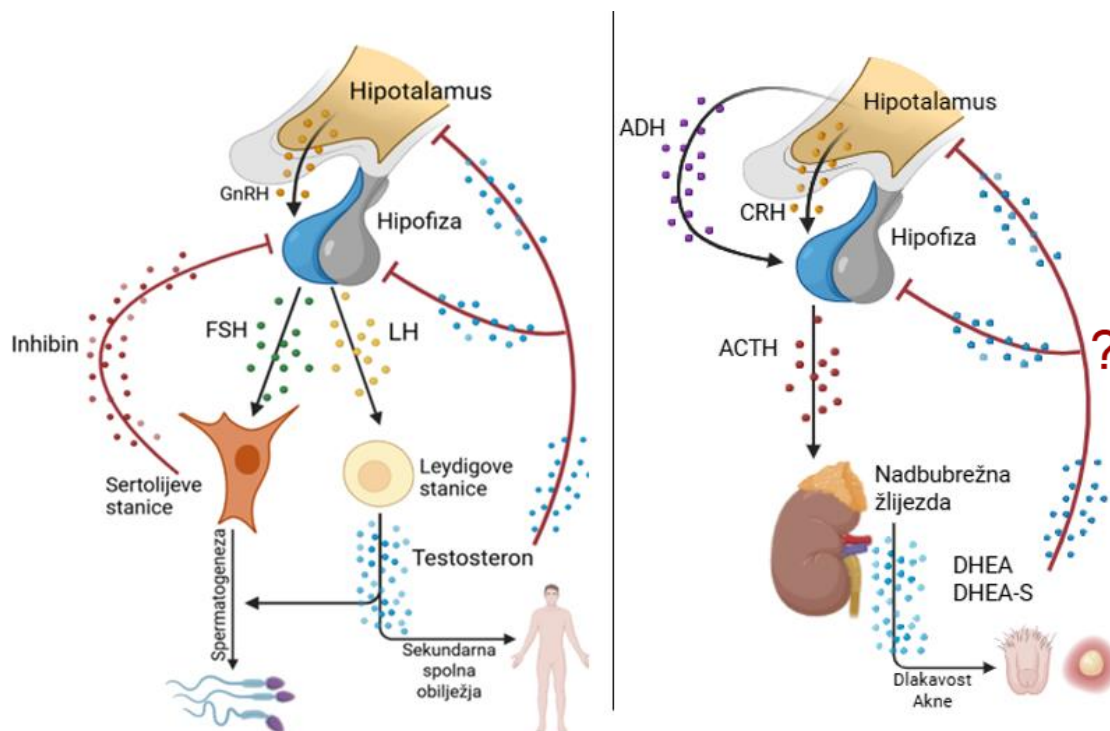
glukuronidi ili rjeđe sulfokonjugati. Nastali spojevi izlučuju se iz organizma većinski putem bubrega, a manjim dijelom putem žuči (Barceloux i Palmer, 2013).

1.4. Regulacija lučenja testosterona i os hipotalamus-hipofiza-testisi

Sinteza i lučenje testosterona, kao i spermatogeneza, odvijaju se pod kontrolom gonadotropina, glikoproteinskih hormona koje luči prednji režanj hipofize, odnosno adenohipofiza. U njih se ubrajaju folikulostimulirajući hormon (FSH) i luteinizirajući hormon (LH). Po strukturi su heterodimeri sastavljeni od α i β -podjedinice. α -podjedinica ista je kod oba gonadotropina, ali i tireotropnog hormona (TSH) i humanog korionskog gonadotropina (hCG), dok β -podjedinice određuju specifičnost svakog hormona (Anderson i sur., 2018). Stvaranje i lučenje gonadotropina regulirano je gonadotropin-oslobađajućim hormonom (GnRH, engl. *gonadotropin-releasing hormone*), dekaeptidom kojeg stvaraju neuroni hipotalamusa. Lučenje GnRH započinje već u fetalnom razvoju i traje tijekom novorođenačke dobi, a nakon toga, gotovo kroz cijelo djetinjstvo nastupa hipogonadotropno stanje sve do puberteta. Ponovnim lučenjem GnRH javlja se centralni pubertet, a rezultat je složenog međudjelovanja raznih neuroendokrinih, genskih, metaboličkih i okolišnih čimbenika (Bhattacharya i sur., 2019; Abreu i Kaiser, 2016). GnRH se na površini gonadotropnih stanica adenohipofize veže na GnRH receptore (GnRHR) i pokreće različite signalne puteve. Kako je obrazac lučenja GnRH pulsatiln, različite frekvencije i amplitude pulsova GnRH stimuliraju lučenje različitih hormona. Tako visoke frekvencije pulsova potiču sintezu LH, dok su niske frekvencije pogodnije za sintezu FSH. Zbog toga je lučenje FSH manje pulsativno i više konstitutivno u odnosu na LH (Stamatiades i Kaiser, 2017).

FSH djeluje na Sertolijeve stanice testisa, uzrokujući njihovu diferencijaciju i proliferaciju čime regulira spermatogenezu. Kada je koncentracija FSH visoka i spermatogeneza prekomjerna, u Sertolijevim stanicama stvarat će se inhibin, glikoprotein važan u negativnoj povratnoj sprezi spermatogeneze, koji inhibira lučenje FSH iz adenohipofize (Hall i Hall, 2021; Kaprara i Huhtaniemi, 2017). S druge strane, LH primarno djeluje na Leydigove stanice testisa, regulirajući njihov broj, diferencijaciju i funkciju, a time i sintezu i lučenje testosterona. Osim LH, na LH receptore može se vezati i hCG budući da su β -podjedinice LH i hCG gotovo identične (Anderson i sur., 2018). Vezanjem na receptor pokreće se cAMP signalni put i aktivira se protein kinaza A čime se inicira translokacija molekule kolesterola s vanjske na unutarnju

membranu mitohondrija (Zirkin i Papadopoulos, 2018). Ako se nastali testosteron u visokim koncentracijama luči u sistemsku cirkulaciju, on mehanizmom negativne povratne sprege može djelovati inhibitorno na adenohipofizu i hipotalamus te dovesti do smanjenog lučenja goandotropina te u konačnici inhibirati vlastitu sintezu. Suprotno tome, niske koncentracije testosterona mogu mehanizmom pozitivne povratne sprege potaknuti hipotalamus na lučenje GnRH, što posljedično povećava razine LH i FSH te na kraju i sintezu testosterona. Na taj način se osigurava regulacija endokrine osi hipotalamus-hipofiza-testisi (Hall i Hall, 2021).



Slika 1. Usporedba regulacije i fizioloških učinaka hormonskih osi hipotalamus-hipofiza-testisi i hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne žlijezde. Upitnikom je označen zasada nejasan mehanizam (napravljeno pomoću BioRender.com prema Hall i Hall, 2021).

1.5. Androgeni receptori i androgeni učinak u fetalnom razvoju i djetinjstvu

Prvi korak u ostvarivanju učinka testosterona i drugih androgena je vezanje za androgeni receptor (Nieschlag i sur., 2012). U svojoj inaktivnoj formi, AR se nalazi u citoplazmi, u obliku multiproteinskog kompleksa sa šaperonima kao što su proteini toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock proteins*). Vezanjem androgena dolazi do konformacijskih promjena receptora koji se oslobađa iz kompleksa sa šaperonima čime se izlaže nuklearni lokalizacijski signal koji potiče translokaciju u jezgru (Rey, 2021). U jezgri AR stvaraju homodimere koji se vežu na palindromske DNA sekvence poznate kao elementi koji reagiraju na androgene (ARE, engl.

androgen-responsive elements) (Nieschlag i sur., 2012). Osim toga, AR može regulirati gensku ekspresiju i putem interakcije s drugim transkripcijskim faktorima, bez izravnog vezanja na DNA. Spomenuti mehanizmi nazivaju se genomskim ili klasičnim, a poznato je da AR mogu djelovati i negenomski. Ti mehanizmi uključuju promjene u staničnim signalnim putevima aktivirajući ili inhibirajući druge transkripcijske faktore što rezultira pojačanom ili smanjenom ekspresijom ciljanog gena (Rey, 2021).

Fiziološki učinak testosterona nije ograničen samo na spolni sustav i razvoj sekundarnih spolnih obilježja. Kako su AR prisutni u brojnim tkivima i organima, spektar djelovanja testosterona je velik i raznolik te prisutan u različitim razdobljima života, od fetalnog razvoja do odrasle dobi (Nieschlag i sur., 2012). Tijekom fetalnog razvoja, za determinaciju spola ključan je SRY gen (engl. *sex-determining region Y*) na Y kromosomu koji kodira SRY protein poznat i kao testis-determinirajući faktor. On inicira razvoj fetalnih testisa, a time i diferencijaciju Leydigovih stanica koje započinju sintezu testosterona oko 7. tjedna trudnoće (Hall i Hall, 2021). Do 15. tjedna ih stimulira hCG posteljice, a kasnije regulatornu ulogu preuzima LH iz hipofize samog fetusa (Rohayem i sur., 2024). Tijekom fetalnog razvoja, testosteron je nužan za diferencijaciju Wollfovog kanala iz kojeg se razvijaju muški spolni organi. Osim testosterona, ključnu ulogu u determinaciji spola ima i anti-Müllerov hormon (AMH) kojeg stvaraju Sertolijeve stanice fetalnog testisa na poticaj FSH. AMH inhibira diferencijaciju Müllerovog kanala i tako sprječava formiranje ženskih spolnih organa. (Nassar i Leslie, 2023; Mäkelä i sur., 2019).

Razdoblje prvih 3 – 6 mjeseci nakon rođenja naziva se i „mini pubertetom“ jer su koncentracije testosterona i dalje velike te dolazi do daljnjeg razvoja spolnih organa. Penis djeteta raste, a testisi se spuštaju u skrotum. Nakon „mini puberteta“, u djetinjstvu nastupa inhibicija lučenja GnRH pa je sinteza spolnih hormona gotovo nepostojeća, sve do puberteta (Rey, 2021; Wood i sur., 2019). Sazrijevanjem središnjeg živčanog sustava smanjuje se inhibicija lučenja GnRH, počinje sinteza gonadotropina i testosterona, a time i gonadarha (Herati i sur., 2016).

1.6. Gonadarha i pubertetski razvoj dječaka

Početak lučenja spolnih hormona na poticaj gonadotropina označava početak gonadarhe (Bordini i Rosenfield, 2011). Od ranog djetinjstva do predpubertetske dobi veličina testisa se

udvostručuje, dok se na kraju puberteta poveća za osam puta (Hall i Hall, 2021). Najintenzivniji rast događa se 6 mjeseci nakon što volumen testisa dosegne 3 mL, što ukazuje na nagli i brz tijek gonadarhe. U djetinjstvu i ranom pubertetu rast testisa događa se zbog produljenja sjemenih kanalića i proliferacije Sertolijevih stanica i spermatogonija pod utjecajem FSH. Sertolijeve stanice počinju eksprimirati zrele androgene receptore te djelovanjem androgena dalje sazrijevaju, pridonose krvno-testisnoj barijeri i osiguravaju pogodan mikrokoliš za spermatogenezu. U kasnijim fazama puberteta daljnjim djelovanjem androgena i FSH javlja se spermatogeneza. Dolazi do rasta broja stanica germinacijske linije koje pune sjemene kanaliće i tako povećavaju njihov promjer, a time i ukupni volumena testisa. Spermatogeneza se smatra najznačajnijim procesom koji pridonosi njihovom rastu, a za njen normalan tijek potrebno je sinergijsko djelovanje FSH i testosterona (Koskenniemi i sur., 2017). Porast intratestikularne koncentracije testosterona smatra se glavnim okidačem spermatogeneze u pubertetu. Uz to, FSH regulirajući proliferaciju Sertolijevih stanica djeluje kao faktor preživljenja germinacijskih stanica, potičući ih zajedno s testosteronom na diferencijaciju iz spermatogonija (Oduwole i sur., 2021).

Tijekom puberteta dolazi do rasta i razvoja prostate. Lokalno nastali DHT potiče proliferaciju luminalnih i bazalnih stanica prostate te počinje proizvodnja sekreta koji je sastavni dio sjemene tekućine, bogat različitim nutrijentima i enzimima važnih za preživljenje spermija (Pletcher i Shibata, 2022). Prva emisija sjemene tekućine javlja se oko 13. godine života i naziva se spermarha. Hormonska regulacija nije jedini faktor u pojavi prve ejakulacije, nego važnu ulogu ima i sazrijevanje središnjeg živčanog sustava (Chad, 2018).

Još jedna od važnih značajki pubertetskog razvoja dječaka je i povećanje mišićne mase. Anaboličko djelovanje testosterona potiče sintezu proteina, a time i rast mišića te dovodi do smanjenja masnog tkiva. Porast mišićne mase djeluje stimulativno na koštani rast, koji kulminira upravo za vrijeme puberteta. Spolni hormoni potiču mineralizaciju, retenciju kalcijevih soli i povećavaju gustoću koštanog matriksa. Osim spolnih hormona, u regulaciji longitudinalnog rasta kosti ključnu ulogu imaju hormon rasta i IGF-1. Njihovu aktivnost mogu potaknuti spolni hormoni, androgeni u manjoj mjeri od estrogena, što ukazuje da su estrogeni nužni za rast i kod djevojčica i kod dječaka (Hall i Hall, 2021; Wood i sur., 2019). Prateći rast cijelog tijela u pubertetu, grkljan i glasnice se povećavaju što uzrokuje produbljivanje glasa. Pod utjecajem androgena koža cijelog tijela postaje deblja i grublja, a pojačana sekrecija lojnih žlijezdi često dovodi do akni u dječaka koje se povlače nakon nekoliko godina kada se

organizam prilagodi visokim koncentracijama testosterona. Nastavlja se rast stidnih dlaka započet u adrenarhi, one postaju tamnije, deblje i kovrčavije. Otprilike 2 godine nakon pubarhe, dlakavost se širi i na područja ispod pazuha, abdomen, lice, prsa i rjeđe drugim dijelovima tijela, poput leđa (Hall i Hall, 2021; Breehl i Caban, 2016). Uz sve navedene fizičke promjene, testosteron ima značajnu ulogu u oblikovanju i održavanju ravnoteže raspoloženja, emocija i ponašanja, dovodeći i do psihološkog razvoja dječaka (Zitzmann, 2020).

1.7. Tannerovi stadiji pubertetskog razvoja dječaka

Tannerovi stadiji sazrijevanja ili ocjena spolne zrelosti (engl. *sexual maturity rating*, SMR) predstavljaju standardiziranu metodu za objektivno praćenje razvoja sekundarnih spolnih obilježja tijekom puberteta. Ovu klasifikaciju su 1960-ih godina razvili pedijatrijski endokrinolozi Tanner i Marshall, temeljeći je na promatranju promjena u veličini testisa i penisa kod dječaka, razvoja dojki kod djevojčica te pojavi i raspodjeli stidnih dlaka kod oba spola. Budući da pubertetski razvoj ima predvidljiv slijed i brzinu odvijanja, Tannerovi stadiji omogućuju praćenje očekivanih tjelesnih promjena tijekom puberteta te olakšavaju prepoznavanje mogućih odstupanja i abnormalnosti u razvoju. Postoji pet stadija, pri čemu stadij I predstavlja predpubertetsko dijete, dok stadij V predstavlja spolno zrelu odraslu osobu. U tablici 1. prikazani su svi stadiji s pripadnim obilježjima stidne dlakavosti i vanjskih genitalija.

Tablica 1. Prikaz Tannerovih stadija s pripadnim obilježjima (izvor ilustracija: BioRender.com)

Stadij	Ilustracija	Stidna dlakavost	Obilježja genitalija
I		Nema stidnih dlaka.	Volumen testisa < 4 mL, tj. duga os testisa < 2,5 cm. Nema rasta penisa, genitalije slične kao u ranom djetinjstvu.
II Početak puberteta		Paperjaste, ravne stidne dlake oko baze penisa.	Volumen testisa 4 – 8 mL → početak gonadarhe! Duljina testisa 2,5 – 3,3 cm Nema rasta penisa.

III		Oskudne terminalne dlake (tamnije, grublje, kovrčave)	Volumen testisa 9 – 12 mL Duljina testisa 3,4 – 4,0 cm Rast penisa u duljinu.
IV		Terminalne dlake popunjavaju cijeli trokut iznad stidnog područja.	Volumen testisa 15 – 20 mL Duljina testisa 4,1 – 4,5 cm Rast duljine i promjera penisa.
V Odrasli muškarac		Terminalne dlake se šire preko ingvinalnog nabora na područje bedara.	Veličina testisa > 20 mL Duljina testisa > 4,5 cm Genitalije veličine i oblika odraslog muškarca.

Pri procjeni pubertetskog statusa preporučuje se prvenstveno oslanjati na veličinu genitalija i druge pokazatelje poput brzine tjelesnog rasta, a manje na stidnu dlakavost jer ona može biti potaknuta i adrenarhom. Stoga se ponekad Tannerovi stadiji odjeljuju posebno na genitalne (G1 – G5) i one temeljene na pubičnoj dlakavosti. (P1 – P5). Od ograničenja je važno napomenuti da se kod Tannerove skale mjere samo određena vanjska obilježja razvoja te stoga Tannerov test nije dobar za procjenu dobi na temelju fizičkih obilježja zbog razlika u vremenu nastupanja i brzini razvoja puberteta. Također, pri procjeni u obzir treba uzeti i rasne i etničke razlike u razvoju. (Guidi i Sapra, 2022; Emmanuel i Bokor, 2022; Marshall i Tanner, 1970).

1.8. Određivanje androgena u slini

Određivanje muških spolnih hormona od velike je važnosti u dijagnostici raznih endokrinoloških poremećaja, ali i u praćenju spolnog razvoja djeteta. Danas se u kliničkim laboratorijima za određivanje androgena najčešće koriste uzorci seruma ili plazme, za koje je i većina analitičkih metoda standardizirana te postoje referentni intervali po dobi i spolu. Uz serum i plazmu, za određivanje steroidnih hormona kao alternativni, neinvazivni uzorak može se koristiti i slina. Slobodni steroidi koji su topljivi u lipidima mogu difundirati kroz membrane acinarnih stanica žlijezda slinovnica i na taj način se izlučiti u slinu. Uz to, mali, nekonjugirani steroid poput testosterona mogu ultrafiltracijom proći između čvrstih spojeva acinarnih stanica i tako dospjeti u slinu. Smatra se da koncentracije testosterona u slini dobro odgovaraju

koncentracijama slobodnog testosterona u serumu ili plazmi te da vrijednosti u slini dobro koreliraju i s ukupnim testosteronom (Wood, 2009; Granger i sur., 2004). S druge strane, polarni konjugati s glukuronidima ili sulfatima poput DHEA-S ne mogu slobodno difundirati kroz stanične membrane nego je njihov put ulaska u acinarne stanice ograničen samo na ultrafiltraciju. Također, konjugirani spojevi više su ovisni o brzini lučenja slina od nekonjugiranih. Zbog toga koncentracija DHEAS u slini predstavlja samo 1% serumskih (Wood, 2009).

Analitičke metode koje se koriste u svrhu određivanja androgena u kliničkim laboratorijima su najčešće imunokemijske metode na automatiziranim analizatorima. Unatoč tome smatra se da bi tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (eng. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC/MS) trebala predstavljati „zlatni standard“ za određivanje steroidnih hormona, pa tako i testosterona i DHEA-S, posebice kod djece ili u uzorcima s niskim koncentracijama, kao što je to slina. LC/MS je znatno osjetljivija metoda koja pruža veću preciznost i točnost u područjima niske koncentracije, specifičnija je i njome je moguće odrediti više analita u uzorku istovremeno. No, zbog visoke cijene opreme i održavanja, potrebe za visokoobrazovanim kadrom i manjka standardizacije još uvijek nije u širokoj primjeni u kliničkim laboratorijima, gdje se prednost daje imunokemijskim tehnikama. Imunokemijskim tehnike poput ELISA-e (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) mogu biti i metode izbora za procjenu hormonskog statusa u istraživačke svrhe, zbog svoje jednostavnosti i dostupnosti (Nerenz i Boha, 2023).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Određivanje androgena u slini predstavlja neinvazivni način evaluacije hormonskog statusa koristan i za praćenje spolnog razvoja – adrenarhe i gonadarhe. U kliničke svrhe, za postavljanje dijagnoze i praćenje pacijenata izbor će biti na invazivnim, ali standardiziranim uzorcima seruma ili plazme. U istraživačke svrhe, posebice u pedijatrijskoj populaciji, javlja se pitanje etičke opravdanosti korištenja invazivnih uzoraka ili fizičkog pregleda s ciljem procjene puberteta. Također, navedene metode zahtijevaju i prisutnost educirane osobe koja će vršiti uzorkovanje i/ili pregled djeteta pa sa sobom nose i potencijalne organizacijske probleme.

S toga je opći cilj ovog rada utvrditi može li se određivanje testosterona i DHEA-S u uzorcima sline koristiti kao neinvazivna metoda procjene gonadarhe i adrenarhe, odnosno spolnog i pubertetskog razvoja dječaka.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- utvrditi postoji li statistički značajna razlika u koncentracijama testosterona i DHEA-S u slini između dječaka predpubertetskog i pubertetskih stadija po Tanneru,
- ispitati povezanost između koncentracija navedenih hormona u predpubertetu i pubertetu,
- odrediti diskriminativnu sposobnost salivarnog testosterona u razlikovanju predpubertetskih od pubertetskih dječaka korištenjem ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) analize
- ispitati postoji li dodatna vrijednost DHEA-S kao markera adrenarhe u ROC analizi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Istraživanje je provedeno na Odjelu za laboratorijsku endokrinologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u sklopu projekta „PyrOPECh - Izloženost piretroidnim i organofosfatnim insekticidima u djece - procjena rizika od štetnih učinaka na neuropsihološki razvoj i hormonski status“ (HRZZ IP-2019-04-7193, voditeljica dr.sc. Veda Marija Varnai). U istraživanju je sudjelovalo 475 dječaka petih razreda osnovne škole u dobi od 10 do 13 godina s područja grada Zagreba i Zagrebačke županije. Ispitanici su regrutirani putem osnovnih škola i nadležnih timova školske medicine koji su se odazvali istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (broj: 02/013 AG), Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (ur. broj: 100-21/19-14) te je dobiveno je pozitivno mišljenje Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ur. broj: 251-62-03-25-93). Također, suglasnost su dali Ministarstvo znanosti i obrazovanja, Agencija za odgoj i obrazovanje i ravnatelji škola u kojima je istraživanje provedeno te su roditelji dječaka potpisali informirani pristanak.

Liječnici specijalisti školske medicine su u sklopu redovitog sistematskog pregleda djece u petom razredu osnovne škole ocijenili stupanj pubertetskog razvoja dječaka po Tanneru, prema standardnom postupku (Tanner 1962; Marshall i Tanner 1970). Korišteni su uzorci slina dječaka sakupljeni na pasivan način, bez provokacije u salivete, najmanje 2 mL. Uzorkovanje je provedeno ujutro, kako bi izbjegle dnevne varijacije u koncentracijama hormona. Ispitanici su trebali biti natašte i sakupiti slinu prije pranja zubi, kako ne bi došlo do kontaminacije uzoraka. Uzorci su prikupljeni u vlastitom domu dječaka prema prethodno dobivenim uputama te su doneseni u školu, te zatim pohranjeni na -80°C do analize. Prije same analize, uzorci slina su odmrznuti i centrifugirani 5 minuta brzinom 5000 okretaja/minuti, kako bi se izdvojili mucini. Za analizu je korišten supernatant. U slučaju da nije bilo dovoljno uzorka za određivanje oba hormona, prednost je dana određivanju salivarnog testosterona.

3.2. Određivanje testosterona u slini

Određivanje koncentracije testosterona u slini provedeno je pomoću komercijalnog ELISA kompleta. ELISA je heterogena enzimaimunkemijska metoda u kojoj se na specifičnu reakciju protutijela i antigena nadovezuje enzimska detekcijska reakcija. Korišten je komplet Salivary Testosteron ELISA (DRG Instruments GmbH, Njemačka) koji se sastoji od:

- Mikrotitarskih pločica s 96 jažica (12x8) s antitestosteronskim monoklonskim protutijelima
- Standarada (Standardi 0-6) koncentracija 0, 10, 40, 80, 160, 400 i 1000 pg/mL, svaki po 1 mL
- Kontrola visoke i niske koncentracije, svaka po 1 mL
- Konjugata s enzimom – testosteron konjugiran s peroksidazom hrena, 14 mL
- Otopine supstrata tetrametilbenzidina (TMB), 25 mL
- Otopine za zaustavljanje reakcije – sadrži 0,5 M H₂SO₄, 14 mL
- Otopina za ispiranje (40x koncentrirana), 30 mL

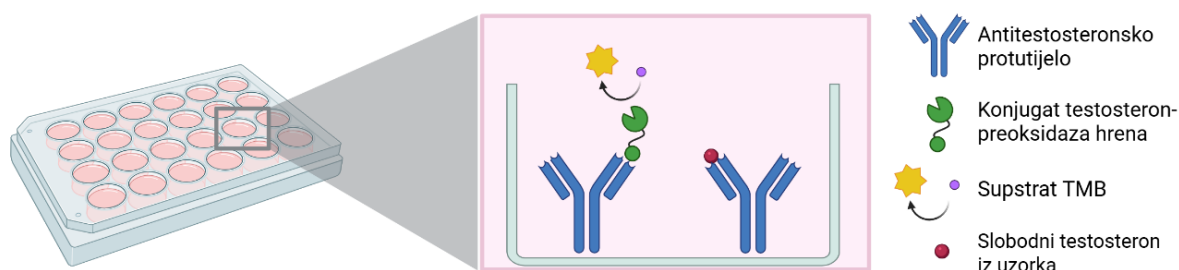
Za provođenje ovog mjerenja korišteni su još i sljedeći materijali i uređaji:

- Automatske pipete i nastavci
- Deionizirana voda
- Staničevina
- Laboratorijska centrifuga
- Čitač mikrotitarskih pločica Multiscan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Štoperica

Čvrsta faza, odnosno jažice mikrotitarske pločice, presvučene su monoklonskim (mišjim) protutijelima usmjerenim na testosteron. Metoda se temelji na kompetitivnom vezanju neobilježenog antigena, u ovom slučaju slobodnog testosterona iz uzorka i obilježenog antigena, tj. testosteron – peroksidaza konjugata za antitestosteronska protutijela. Nevezani konjugati se ispiru i dodaje se supstrat tetrametilbenzidin (TMB). Peroksidaza hrena katalizira pretvorbu kromogena TMB-a u obojeni produkt čiju apsorbanciju mjerimo u svakoj jažici.

Jačina signala, odnosno količina vezanog konjugata testosteron – peroksidaza, je obrnuto proporcionalna koncentraciji testosterona u uzorku.

Postupak ELISA testa započinje dodatkom 75 μL standarada, kontrola i uzoraka u duplikatu u pripadajuće jažice mikrotitarske pločice. U svaku jažicu doda se po 100 μL konjugata s enzimom, pločica se miješa 10 sekundi i inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi. Sadržaj jažica se naglo izlije i 5 puta ispere razrijeđenom otopinom za ispiranje. 30 mL 40x koncentrirane otopine za ispiranje razrijedi se s 1170 mL deionizirane vode do konačnog volumena od 1200 mL. Za svako ispiranje je potrebno po 400 μL razrijeđene otopine po jažici. Nakon ispiranja, pločice se otresu na staničevini kako bi uklonile zaostale kapljice. U svaku jažicu dodaje se 200 μL otopine supstrata i inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi. Enzimska reakcija se zaustavlja dodatkom 100 μL otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu. Pomoću čitača za mikrotitarske pločice u svakoj jažici se odredi apsorbanacija na 450 nm. Korišten je čitač Multiscan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, SAD). Apsorbancija se treba izmjeriti unutar 10 minuta od dodatka otopine za zaustavljanje reakcije.



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz ELISA metode za određivanje testosterona u slini (napravljeno pomoću BioRender.com).

Zatim se izračunaju srednje vrijednosti apsorbancije duplikata za svaki standard, kontrolu i uzorak. U programu Microsoft Office Excel napravi se baždarna krivulja nanoseći srednje vrijednosti apsorbancija standarada na Y-os i vrijednosti pripadajućih koncentracija na X-os. Pomoću jednadžbe dobivene baždarne krivulje i izmjerenih apsorbancija izračunaju se koncentracije testosterona u uzorcima. Za svaku mikrotitarsku pločicu napravljena je zaseban baždarna krivulja i korištena je za određivanje koncentracije uzoraka samo s te pločice. Prema deklaraciji proizvođača mjerni raspon metode iznosi 0,94 – 1000 pg/mL.

3.3. Određivanje DHEA-S u slini

Određivanje koncentracije DHEA-S u slini provedeno je pomoću komercijalnog ELISA kompleta Salivary DHEA-S ELISA (DRG Instruments GmbH, Njemačka) koji se sastoji od:

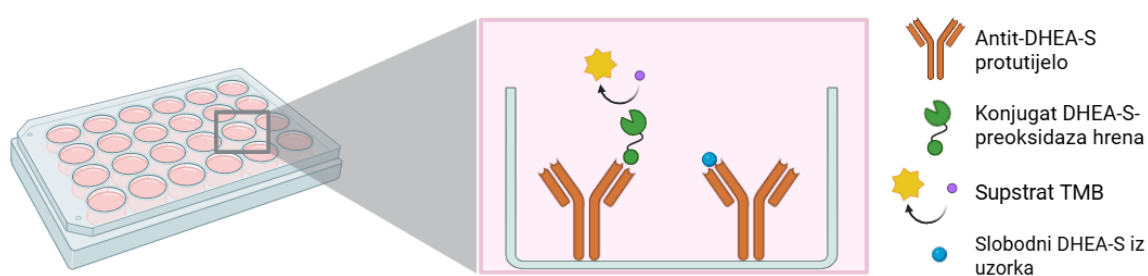
- Mikrotitarskih pločica s 96 jažica (12x8) s anti-DEHA-S protutijelima
- Standarada (Standardi 0 – 4) koncentracija 0, 0,2, 1, 3 i 12 ng/mL, svaki po 1 mL
- Kontrola visoke i niske koncentracije, svaka po 1 mL
- Pufera za inkubaciju – fosfatni pufer (pH 7,5), 30 mL
- Konjugata s enzimom – DHEA-S konjugiran s peroksidazom hrena, 1 mL
- Otopine supstrata – sadrži H₂O₂ i TMB, 15 mL
- Otopine za zaustavljanje reakcije – sadrži 0,15 M H₂SO₄, 15 mL
- Otopine za ispiranje (50x koncentrirana), 20 mL

Za provođenje ovog mjerenja korišteni su još i sljedeći materijali i uređaji:

- Automatske pipete i nastavci
- Destilirana voda
- Staničevina
- Laboratorijska centrifuga
- Čitač mikrotitarskih pločica Multiscan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, SAD)
- Štoperica

Metoda se temelji na kompeticijskoj reakciji između DHEA-S iz uzorka (antigen) i DHEA-S konjugiranog s peroksidazom hrena za limitirani broj anti-DEHA-S protutijela na dnu jažica mikrotitarske pločice. Nevezani konjugati se ispiru, a dodatkom supstrata H₂O₂ i TMB peroksidaza hrena stvara plavo obojeni produkt. Reakcija se zaustavlja dodatkom otopine za zaustavljanje reakcije čime se boja mijenja u žutu te se mjeri apsorbancija u svakoj jažici mikrotitarske pločice. Koncentracija DHEA-S u uzorku slin obrnuto je proporcionalna izmjerenoj apsorbanciji.

U jažice mikrotitarske pločice dodaje se po 50 μL standarada, kontrola i uzoraka u duplikatu. Zatim se dodaje razrijeđena otopina konjugata DHEAS-S-peroksidaza hrena. Razrijeđenje se priprema tako što 10 μL konjugata doda u 1 mL pufera za inkubaciju. Razrijeđeni konjugat se zatim dodaje u volumenu od 150 μL . Mikrotitarska pločica se zatim inkubira 15 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, sadržaj jažica se naglo izlije te se ispere tri puta s 0,3 mL razrijeđene otopine za ispiranje. Sadržaj 50x koncentrirane otopine za ispiranje razrijedi se destiliranom vodom do konačnog volumena od 1000 mL (omjer 1:50). Tijekom izlijevanja i ispiranja, pločica se nježno otrese na staničevini kako bi uklonile zaostale kapljice. U sljedećem koraku dodaje se u svaku jažicu po 100 μL otopine supstrata te inkubira se na sobnoj temperaturi 15 minuta u mraku. Nakon inkubacije dodaje se po 100 μL otopine za zaustavljanje reakcije i pločica se lagano promiješa. Također, priprema se i slijepa proba koja sadrži otopinu supstrata i otopinu za zaustavljanje reakcije. Pomoću čitača za mikrotitarske pločice Multiscan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, SAD) u svakoj jažici se odredi apsorbanacija na 450 nm.



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz ELISA metode za određivanje DHEA-S u slini (napravljeno pomoću BioRender.com).

Izračunaju se srednje vrijednosti apsorbancije duplikata za svaki standard, kontrolu i uzorak. U programu Microsoft Office Excel napravi se baždarna krivulja nanoseći srednje vrijednosti apsorbancija standarada na Y-os i vrijednosti pripadajućih koncentracija na X-os. Pomoću jednadžbe dobivene baždarne krivulje i izmjerenih apsorbancija izračunaju se koncentracije DHEA-S u uzorcima. Za svaku mikrotitarsku pločicu napravljena je zaseban baždarna krivulja i korištena je za određivanje koncentracije uzoraka samo s te pločice. Prema deklaraciji proizvođača mjerni raspon metode iznosi 0,05 – 12,00 ng/mL.

3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata načinjena je u statističkom programu MedClac, verzija 15.8 (MedCalc Software, Belgija). Normalnost razdiobe u svakoj skupini ispitana je Kolmogorov – Smirnovim testom, a podatci su prikazani kao medijani s pripadajućim interkvartilnim rasponima (IQR). Za ispitivanje statistički značajne razlike između koncentracija hormona među skupinama korišten je Mann – Withney test. Postavljena je testirana nulta hipoteza kojom se tvrdi da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama hormona između skupina. Zatim je za procjenu povezanosti koncentracija hormona korištena Spearmanova rang korelacija.

U svrhu procjene diskriminativne sposobnosti salivarnog testosterona u razlikovanju puberteta od prepuberteta, izrađena je ROC krivulja (engl. *Receiver Operating Characteristic*), pri čemu su izračunati površina ispod krivulje (AUC, engl. *Area Under the Curve*), osjetljivost, specifičnost te optimalna granična vrijednost (cut-off). Ista analiza napravljena je i za par hormona testosteron – DHEA-S. Kombinirani prediktor dobiven je binarnom logističkom regresijom. Iz regresijskog modela izračunate su prediktivne vjerojatnosti, koje su zatim korištene za izradu ROC krivulje kombiniranog markera testosteron + DHEAS-S. Za usporedbu ROC krivulje korišten je DeLongov test. Rezultati svih testova interpretirani su na razini statističke značajnosti $p < 0,05$. Tumačenje dobivenih Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ) prikazano je u tablici 2, dok je tumačenje izračunatih površina ispod krivulje u ROC analizi prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Tumačenje vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije (ρ).

Apsolutna vrijednost ρ	Stupanj korelacije
0,00 – 0,19	Nepostojeći/zanemariv
0,20 – 0,39	Slab
0,40 – 0,59	Umjeren
0,60 – 0,79	Jak
0,80 – 1,00	Vrlo jak

Tablica 3. Tumačenje vrijednosti površina ispod krivulje (AUC).

AUC	Značajnost biomarkera
< 0,60	Nedovoljna
0,60 – 0,69	Dovoljna
0,70 – 0,89	Dobra
0,80 – 0,89	Vrlo dobra
0,90 – 1,00	Izvrсна

4. REZULTATI

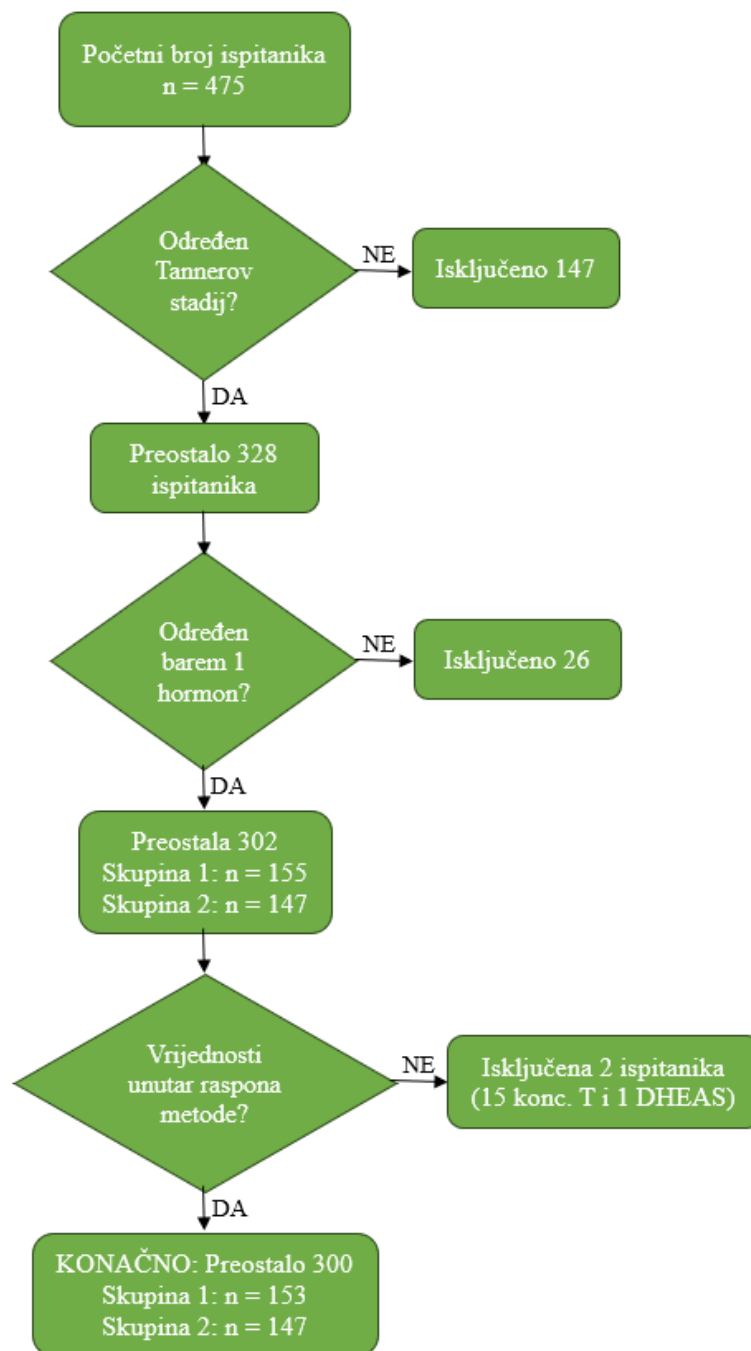
4.1. Kriteriji isključivanja i deskriptivna statistika

U ovome istraživanju sudjelovalo je 475 dječaka. Od 475 ispitanika, njih 147 nije imalo određen Tannerov stadij od strane liječnika školske medicine, pa su stoga isključeni iz istraživanja. Od 328 preostalih dječaka s određenim pubertetskim stadijem, njih 26 nije imalo određenu niti jednu hormonsku koncentraciju, pa su i oni isključeni iz istraživanja. U konačnici je preostalo 302 ispitanika s određenim Tannerovim stadijem i barem jednom hormonskom vrijednosti. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine prema Tannerovim stadijima: prvu skupinu čini 155 dječaka u 1. stadiju (predpubertetu), dok je drugu skupinu čini 147 dječaka u 2. ili višem stadiju, odnosno dječaci u pubertet. Navedena podjela po skupinama s brojem ispitanika i medijanima dobi prikazana je u tablici 4.

Tablica 4. Broj ispitanika po skupinama prema Tannerovim stadijima s medijanom dobi u godinama.

Tannerov stadij / skupina	Broj dječaka	Medijan dobi
1 / Predpubertet (skupina 1)	155	11,3
2 ili više / Pubertet (skupina 2)	147	11,6
UKUPNO	302	11,4

Zatim su vrijednosti hormona koje su bile ispod donje granice mjernog raspona metode ($< 0,94$ pg/mL za testosteron i $< 0,05$ ng/mL za DHEA-S) – ukupno 15 za testosteron i 1 za DHEA-S, izuzete iz statističke analize. Zbog toga su dodatno isključena još dvojica dječaka u predpubertetskoj skupini jer više nisu imali kvantificiranu niti jednu hormonsku koncentraciju. Tako je konačan broj ispitanika čiji su podaci uvršteni u statističku obradu iznosio 300, od čega 153 u skupini 1 i 147 u skupini 2. Tijek isključenja i odabira ispitanika te koncentracija hormona prikazan je grafički dijagramom tijeka na slici 4.



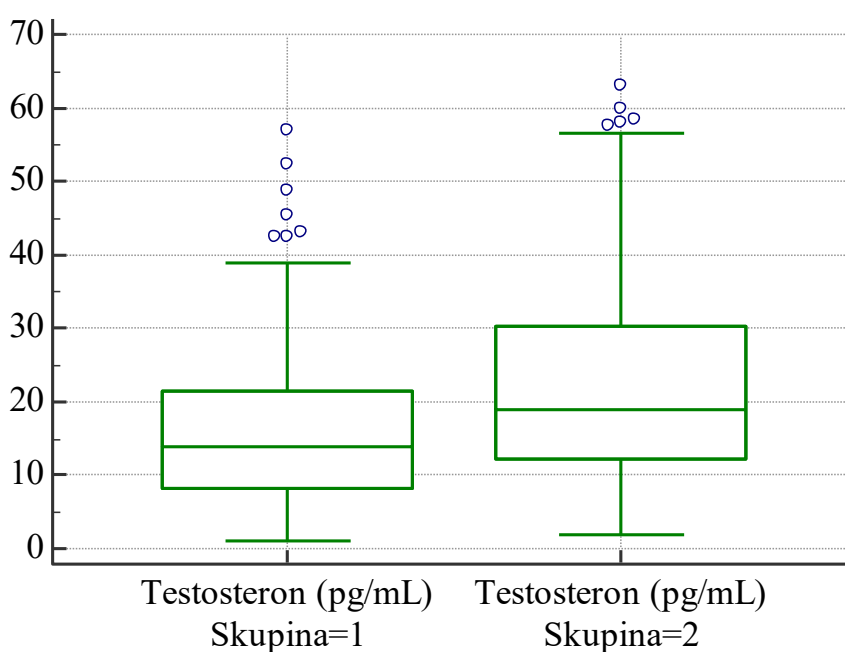
Slika 4. Dijagram tijeka odabira i isključenja ispitanika te hormonskih koncentracija.

Zatim je za svaku hormonsku koncentraciju napravljena podjela po skupinama te je unutar svake testirana normalnost raspodjele Kolmogorov – Smirnovim testom. Za sve skupine dobivena je p – vrijednost $< 0,05$ što ukazuje na odstupanje od normalne razdiobe. Slijedom toga, korišteni su neparametrijski statistički testovi, dok je mjera središnjice prikazana kao medijan, a mjera raspršenosti koncentracija kao interkvartilni raspon (IQR). Izračunate vrijednosti medijana i IQR te p – vrijednosti za svaku skupinu pojedinog hormona prikazane su u tablici 5.

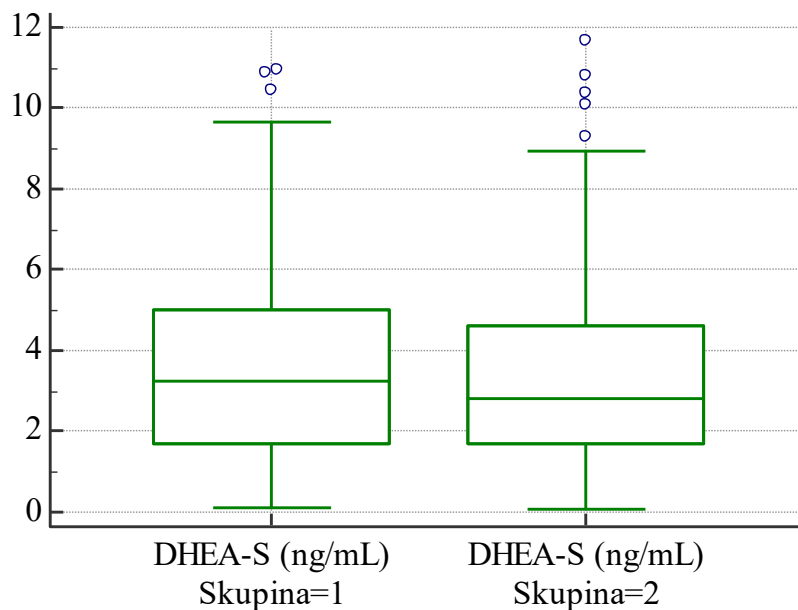
Tablica 5. Prikaz broja ispitanika, medijana koncentracije, IQR i p – vrijednosti svake skupine pojedinog hormona.

Hormon	Skupina	Broj ispitanika	Medijan	IQR	p–vrijednost
Testosteron (pg/mL)	1	147	13,24	8,11 – 23,39	0,002
	2	139	18,94	12,27 – 30,18	< 0,001
	ukupno	286	16,72	9,31 – 25,18	< 0,001
DHEA-S (ng/mL)	1	131	3,24	1,70 – 5,02	0,001
	2	127	2,80	1,70 – 4,63	< 0,001
	ukupno	258	3,02	1,68 – 4,90	< 0,001

Koncentracije hormona grafički su prikazani dijagramima „brkatim kutijama“ (eng. *box plot*) zasebno za svaku skupinu i svaki hormon. Stršeće vrijednosti (eng. *outliers*), odnosno vrijednosti veće od $Q3+1.5 \times IQR$ ili manje od $Q1-1.5 \times IQR$, pri čemu Q1 i Q3 predstavljaju 25. i 75. percentil, odnosno donju i gornju granicu interkvartilnog raspona, označene su kružićima. Ekstremno stršeće vrijednosti, odnosno one veće od $Q3+3 \times IQR$ ili manje od $Q1-3 \times IQR$ nisu opažene. Odlučeno je ne odbacivati stršeće vrijednosti jer ne poprimaju fiziološki nemoguće koncentracije i mogu predstavljati pravo hormonsko stanje andrenarhe i gonadarhe kod pojedinih dječaka. Uz to, njihovo odbacivanje ne utječe značajno na statističke rezultate.



Slika 5. Grafički prikaz koncentracija testosterona u slini u pg/mL prema skupinama s prikazanim medijanom, IQR i stršećim vrijednostima.



Slika 5. Grafički prikaz koncentracija DHEA-S u slini u ng/mL prema skupinama s prikazanim medijanom, IQR i stršećim vrijednostima.

4.2. Ispitivanje statistički značajne razlike

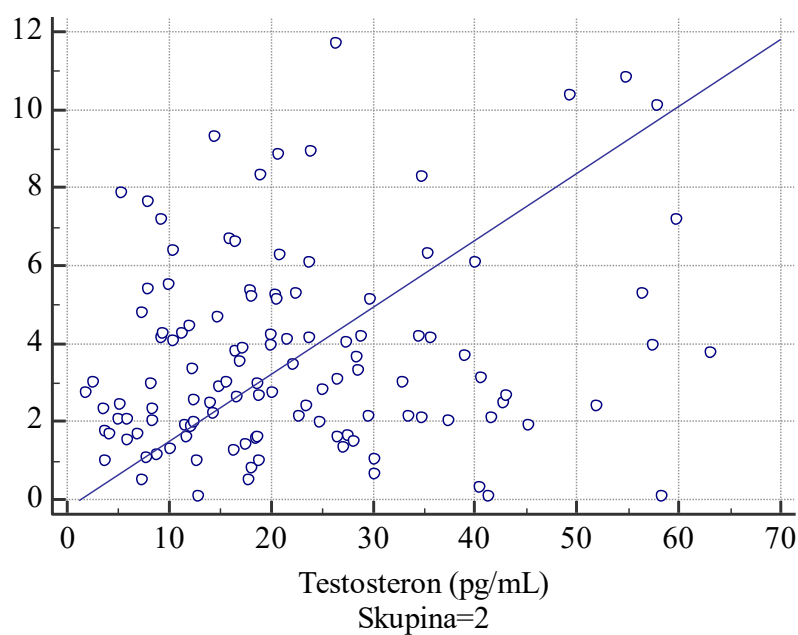
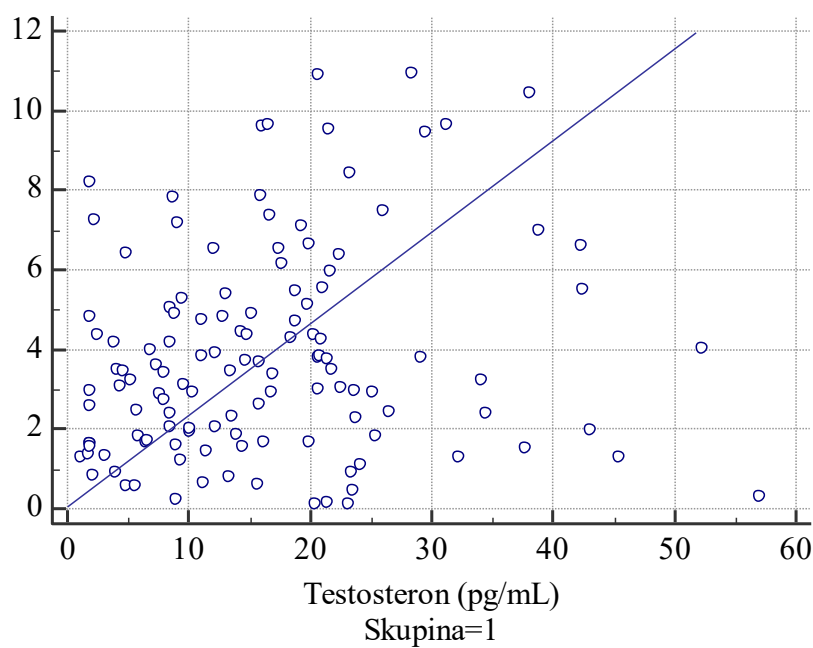
Kako bi se ispitao postoji li statistički značajna razlika u koncentracijama hormona između prepubertetske i pubertetske skupine korišten je Mann – Withney test. Za koncentracije salivarnog testosterona utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike između prepubertetske i pubertetske skupine ($p < 0,001$), odnosno da su koncentracije značajno više u pubertetskoj skupini. Suprotno tome, za koncentracije salivarnog DHEA-S nije utvrđena statistički značajna razlika među skupinama prepuberteta i puberteta ($p = 0,423$).

4.3. Ispitivanje korelacije

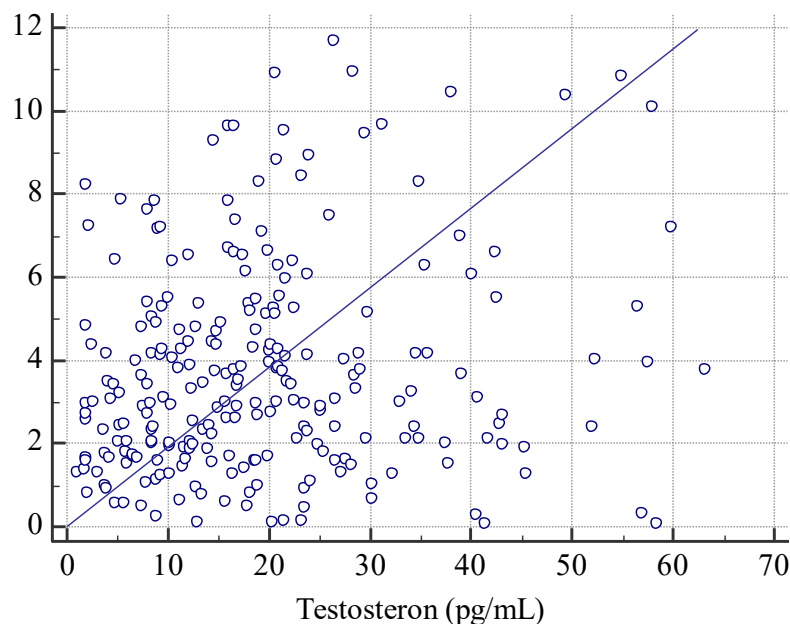
Za procjenu povezanosti između koncentracija testosterona i DHEA-S u slini korištena je Spearmanova rang korelacija. Između koncentracija navedenih hormona u ukupnom uzorku utvrđena je statistička značajnost, no korelacija je zapravo nepostojeća ($\rho = 0,143$; $p = 0,025$). Unutar skupina nije utvrđena značajna korelacija (u prepubertetu: $\rho = 0,172$; $p = 0,055$; u pubertetu: $\rho = 0,138$; $p = 0,134$). Vrijednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije (ρ) i pripadajućih p – vrijednosti prikazane su u tablici 6., a povezanosti koncentracija hormona grafički su prikazane dijagramima raspršenosti (eng. *scatter plot*).

Tablica 6. Prikaz vrijednosti Spearmanovih koeficijenata korelacije i pripadajućih p – vrijednosti između koncentracija hormona ukupno i po skupinama.

Parametri	Ukupno		Predpubertet		Pubertet	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p
Testosteron i DHEA-S	0,143	0,025	0,172	0,055	0,138	0,134



Slika 6. Grafički prikaz povezanosti koncentracija testosterona i DHEA-S po skupinama.



Slika 7. Grafički prikaz povezanosti koncentracija testosterona i DHEA-S u ukupnom uzorku.

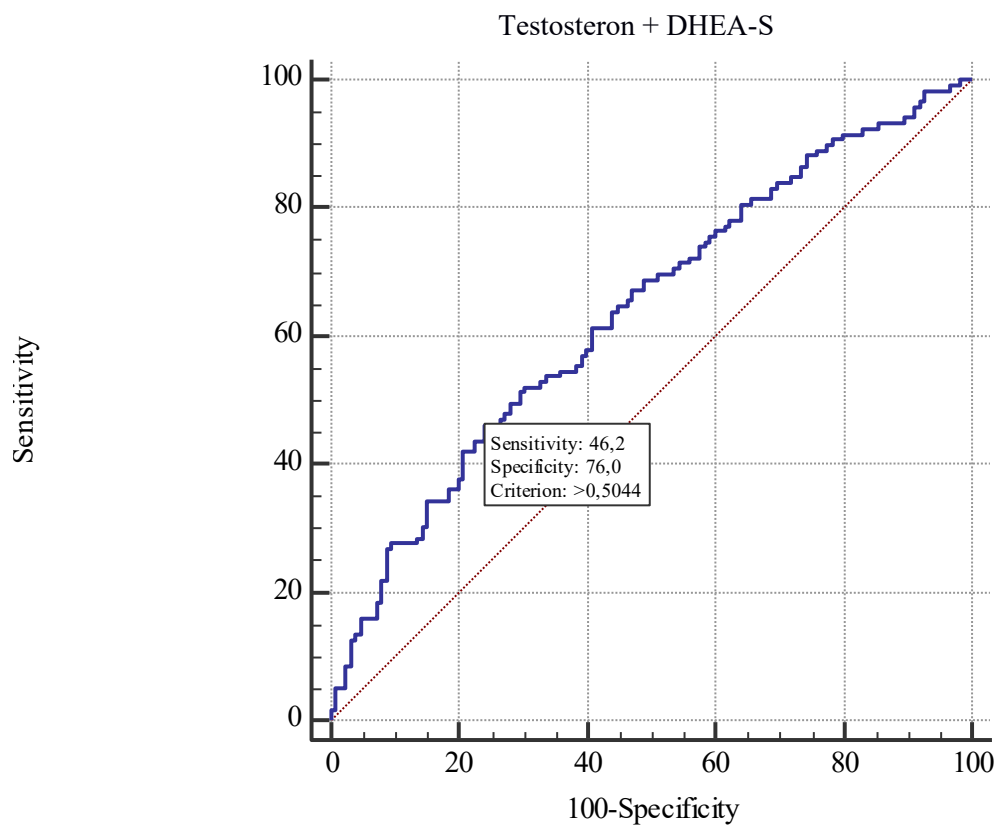
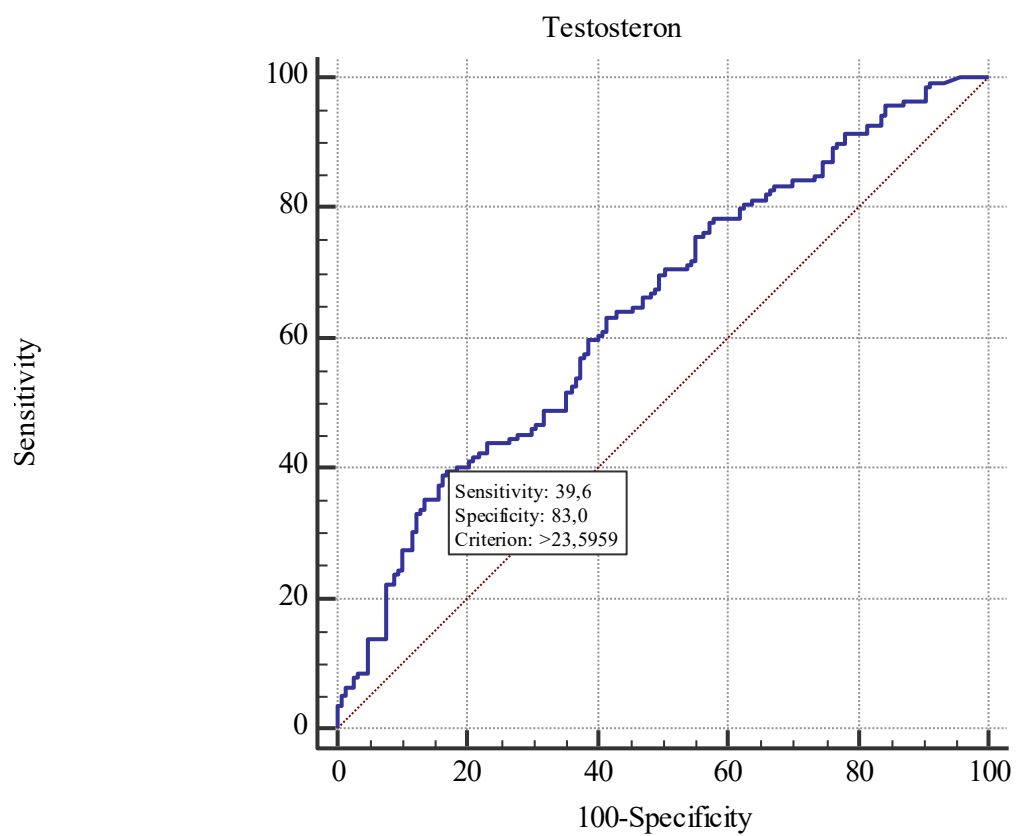
4.4. ROC analiza

Kako bi ispitali diskriminativnu sposobnost salivarnog testosterona u razlikovanja predpuberteta od puberteta u dječaka, napravljena je ROC analiza. Dobivena je ROC krivulja s pripadajućom površinom ispod krivulje (AUC), osjetljivosti, specifičnosti i optimalnom graničnom vrijednosti. Ista analiza napravljena je i za kombinaciju hormona testosteron + DHEA-S kako bi se utvrdilo doprinosi li DHEA-S u razlikovanju predpuberteta od početka puberteta. Kombinirani prediktor dobiven je binarnom logističkom regresijom, pri čemu su oba hormona uključena kao neovisne varijable, a pubertetski status kao zavisna varijabla. Iz regresijskog modela izračunate su prediktivne vjerojatnosti, koje su zatim korištene za izradu ROC krivulje kombiniranog markera testosteron + DHEA-S. U tablici 7. prikazani su AUC, osjetljivost i specifičnost za obje ROC krivulje.

Tablica 7. Prikaz AUC, osjetljivosti, specifičnosti, optimalne granične vrijednosti (cut-off) i pripadajućih p – vrijednosti.

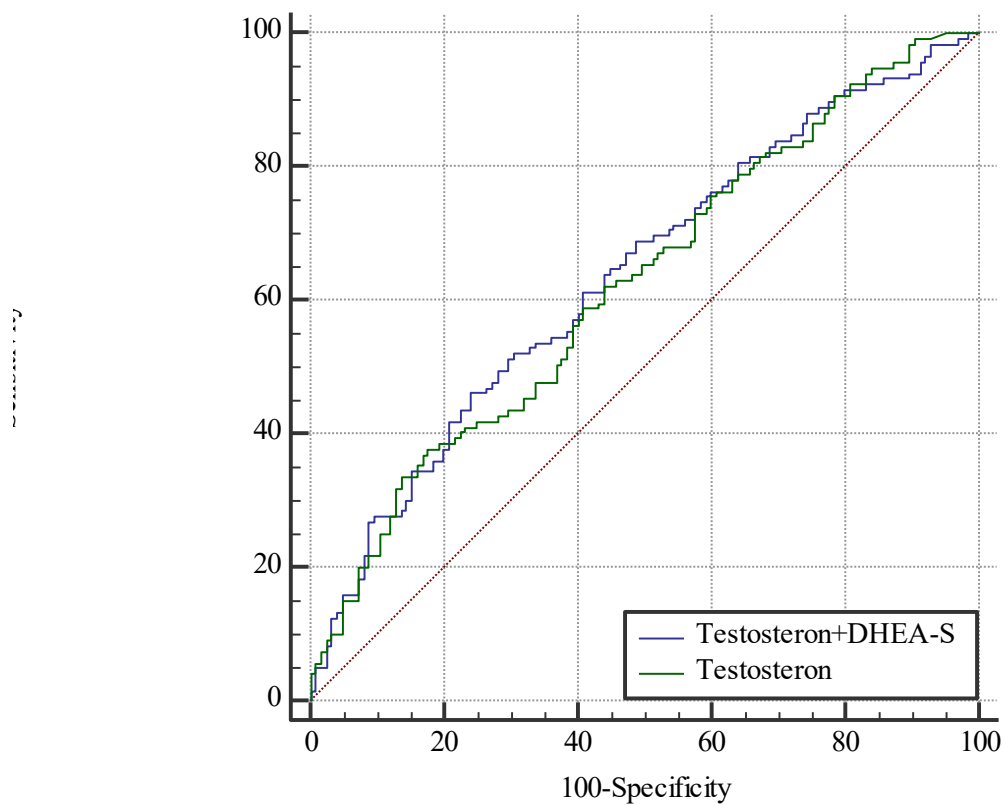
ROC krivulja	AUC	Osjetljivost	Specifičnost	Cut-off	p – vrijednost
Testosteron	0,644	39,6 %	83,0 %	> 23,69 pg/mL	< 0,001
Testosteron + DHEA-S	0,638	46,2 %	76,0 %	> 0,504*	< 0,001

*granična vrijednost regresijskog prediktora, ne predstavlja stvarnu koncentraciju.



Slika 8. Prikaz ROC krivulja za testosteron i kombinirani marker testosteron + DHEA-S.

Uz to, provedena je usporedba AUC vrijednosti između testosterona i kombiniranog modela DeLongovim testom. Utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u AUC vrijednostima između ROC krivulja ($p = 0,388$).



Slika 9. Usporedba ROC krivulja za testosteron i kombinirani marker testosteron + DHEA-S.

5. RASPRAVA

Ovim je istraživanjem ispitana mogućnost procjene gonadarhe i adrenarhe u dječaka, odnosno procjene spolnog razvoja, određivanjem salivarnog testosterona i DHEA-S. Testosteron predstavlja najvažniji hormonski marker gonadarhe i centralnog puberteta, dok je DHEA-S glavni marker adrenarhe (Bertholf i sur., 2023; Nerenz i Boha, 2023). Određivanje ovih hormona iz uzorka sline predstavlja vrlo prikladnu metodu za korištenje u pedijatrijskoj populaciji zbog neinvazivnosti i jednostavnosti prikupljanja uzoraka. U navedenim uzorcima ispitane su razlike u koncentracijama hormona dječaka u predpubertetu i u ranom pubertetu, razvrstanih u skupine prema Tannerovim stadijima te su ispitane povezanosti koncentracija hormona po skupinama. Svi ispitanici bili su dobi od 10 do 13 godina, kada bi se već trebala završiti adrenarha, a započeti gonadarha i centralni pubertet (Rosenfield, 2021). Uz to, napravljena je i ROC analiza ispitujući sposobnost razlikovanja predpuberteta od ranog puberteta određivanjem testosterona i kombiniranog markera testosteron + DHEA-S. Time se nastoji utvrditi mogu li se vrijednosti testosterona i DHEA-S u slini razmatrati kao neinvazivni pokazatelji u procjeni početka spolnog razvoja dječaka.

5.1. Rezultati istraživanja

U pubertetskoj skupini utvrđene su statistički značajno više koncentracije salivarnog testosterona u odnosu na predpubertetsku ($p < 0,001$). Takvi rezultati su očekivani, obzirom da je glavni kriterij za stadij 2 po Tanneru (početak puberteta) porast veličine testisa, odnosno početak gonadarhe te se tada testosteron počinje intenzivnije stvarati i lučiti (Guidi i Sapra, 2022). S druge strane, nije uočena statistički značajna razlika između koncentracija salivarnog DHEA-S kod dječaka u predpubertetu i pubertetu ($p = 0,423$). Takav rezultat je također očekivan jer adrenarha nastupa prije centralnog puberteta, pa je porast koncentracije DHEA-S u krvi vidljiv obično još prije 10. godine, što je bila minimalna dob naših ispitanika (Rosenfield, 2021). Iz ovih rezultata jasno je da su hormonske promjene vezane uz fiziološku gonadarhu i adrenarhu vidljive i u neinvazivnom uzorku sline.

Usporedbom s podacima iz drugih istraživanja, rezultati ovog rada u skladu su s promjenama testosterona tijekom spolnog razvoja. U istraživanju koje su proveli Shirtcliff i sur. (2009) određivane su koncentracije testosterona u slini metodom ELISA u dječaka različitih

stadija po Tanneru. Srednje vrijednosti koncentracija od 15,90 pg/mL u stadiju I (predpubertet, n = 36) i 20,25 pg/mL u stadiju II (n = 34) nešto su veće od onih dobivenih u ovom istraživanju (medijan u predpubertetu: 13,24 pg/mL; u pubertetu: 18,94 pg/mL), ali je jasno uočljiv trend porasta koncentracije testosterona početkom puberteta. U sličnom istraživanju Krebsa i sur. (2019) provedenom na 72 predpubertetska i 64 pubertetska dječaka, medijan koncentracije testosterona u slini također određenog ELISA metodom u predpubertetskoj skupini iznosio je 11,8 pg/mL, što je slično rezultatu ovog istraživanja. Međutim, u pubertetskoj skupini utvrđene su znatno više vrijednosti (medijan 67,9 pg/mL). To se može objasniti time što je pubertetska skupina kod Krebsa i sur. obuhvaćala veći raspon Tannerovih stadija (stadiji 2 – 4), za razliku od ovog istraživanja koje je uključivalo dječake u ranom pubertetu (pretežno stadij 2). U spomenutim istraživanjima je također uočeno preklapanje raspona koncentracija testosterona u različitim skupinama, kao i u našem istraživanju. Nadalje, Patjamontri i sur. (2023) određivali su testosteron u slini 903 dječaka dobi od 11 do 16 godina metodom LC/MS u usporedbi s pubertetskim stadijima samoprocijenjenim pomoću skale pubertetskog razvoja (PDS, engl. *Pubertal Development Scale*). Iako je testosteron određivan drugom metodom te je također korištena i druga metoda za praćenje pubertetskog razvoja, vidljiv je postepeni porast koncentracija s dobi i pubertetskim sazrijevanjem čime su zaključili da testosteron u slini predstavlja dobar neinvazivni marker pubertetskog razvoja.

Pretraživanjem literature uočeno je znatno manje radova u kojima se određuje DHEA-S u slini, posebice u svrhu praćenja adrenarhe i spolnog razvoja. Većina istraživanja ga ispituje kao marker stresa uz salivarni kortizol. U istraživanju Gavate i sur. (2023) određivane su koncentracije salivarnog DHEA-S kod 24 muška ispitanika u predpubertetu, pubertetu i odrasloj dobi, također ELISA metodom. Uočene su statistički značajne razlike između predpubertetske i pubertetske skupine, što je oprečno našim rezultatima. Ne može se sa sigurnošću tvrditi zašto je tako jer navedeno istraživanje ne spominje dob ili Tannerove stadije ispitanika, niti je poznat broj ispitanika po skupinama, no obzirom da ih je ukupno 24 može se zaključiti da nije značajan. Nadalje, u drugom istraživanju Netherton i sur. (2004) određivali su koncentracije DHEA-S u slini u svrhu praćenja cirkadijalnog ritma lučenja kod dječaka i djevojčica tijekom pubertetskog razvoja. Oni su također uočili značajno veće koncentracije salivarnog DHEA-S kod pubertetskih dječaka u odnosu na predpubertetske, ali njihova predpubertetska skupina je obuhvaćala stadije 1 i 2 po Tanneru, što bi se smatralo pogrešnim tumačenjem Tannerove skale (Marshall i Tanner, 1970). Iz tog razloga njihove je rezultate teško usporediti s našima. Iz spomenutih istraživanja je vidljivo da razine DHEA-S rastu s

pubertetskim razvojem, no moguće je da se značajni porast ne događa između 1. i 2. stadija, koji su većinom sudjelovali u ovom istraživanju.

Ispitujući povezanost koncentracija testosterona i DHEA-S u slini Spearmanovom korelacijom utvrđeno je da nema značajne korelacije niti u ukupnoj skupini niti u podskupinama predpuberteta i puberteta (ukupno: $\rho = 0,143$; $p = 0,025$; u predpubertetu: $\rho = 0,172$; $p = 0,055$; u pubertetu: $\rho = 0,138$; $p = 0,134$). Takav rezultat je u skladu s rezultatima ispitivanja značajne razlike u koncentracijama hormona jer DHEA-S ne prati trend porasta s ranim pubertetom kao testosteron. Ovakav rezultat se može objasniti i činjenicom da je sinteza tih hormona regulirana različitim hormonskim osima, odnosno da je DHEA-S gotovo u potpunosti adrenalnog podrijetla (Linos i van Heerden, 2005).

Analizirajući dobivenu ROC krivulju može se zaključiti da je sposobnost salivarnog testosterona za razlikovanja predpubertetskih od pubertetskih dječaka dovoljna ($AUC = 0,64$). Uočeno je da je specifičnost testosterona relativno visoka (83,0%) u odnosu na osjetljivost (39,6%), što bi značilo da salivarni testosteron dobro isključuje pubertet kod djece s niskim vrijednostima, ali nije dovoljno dobar marker za potvrdu puberteta jer mnogo dječaka u pubertetu neće imati povišen testosteron, pa ih ovaj model ne detektira (lažno negativni). Stoga se može reći se salivarni testosteron pokazao kao dobar negativni prediktor puberteta u dječaka. Dobivena granična koncentracija od 23,69 pg/mL mogla bi sugerirati da vrijednosti salivarnog testosterona $< 23,69$ pg/mL mogu imati kliničku vrijednost u isključivanju početka puberteta, ali i tada se trebaju uzeti samo kao orijentir i okvirna granica, a ne gledati na nju kao granicu definitivne odluke. Zbog toga bi se salivarni testosteron trebao koristiti samo kao okvirni ili dodatni, a ne samostalni marker u procjeni spolnog razvoja i gonadarhe.

Analizirajući drugu ROC krivulju kombiniranog markera testosteron + DHEA-S može se uočiti slična AUC, nešto bolja osjetljivost (46,2%) i lošija specifičnost (76,0%). DeLongov test pokazao je da nema statistički značajne razlike ($p = 0,388$) između prve i druge ROC krivulje, odnosno njihovih površina ispod krivulje. Zaključuje se da dodavanje DHEA-S kao glavnog adrenalnog androgena testosteronu ne utječe značajno na njegovu diskriminacijsku sposobnost razlikovanja predpuberteta od puberteta.

U već spomenutom istraživanju Patjamontri i sur. (2023) ispitivali su ROC analizom sposobnost salivarnog testosterona i drugih androgena u predikciji promjene glasa kao markera

puberteta iz PDS. AUC za jutarnje uzorke sline ($AUC = 0,927$) pokazao je da salivarni testosteron može biti izvrstan prediktor promjena glasa u pubertetu. Nadalje, u istraživanju Krebsa i sur. iz 2019. salivarni testosteron pokazao je jak stupanj korelacije s volumenom testisa ($r = 0,74$) i pubičnom dlakavosti ($r = 0,72$). Zatim je binarnom logističkom regresijom, koja je također korištena u ovom radu za dobivanje kombiniranog modela, utvrđena značajna korelacija s pubertetskim razvojem od predpuberteta do puberteta samo za salivarni testosteron. Uključivanje drugih androgena (DHEA, 17-hidroksiprogesterona i androstenediona) nije poboljšalo rezultate analize.

5.2. Ograničenja istraživanja

Glavno ograničenje ovog istraživanje je nedostatak jasno definiranih referentnih intervala za androgene u slini. Dodatan izazov predstavlja činjenica da se radi o pedijatrijskoj populaciji, gdje su fiziološke vrijednosti hormona podložne dobnim i razvojnim varijacijama. Iako CALIPER studija nudi referentne intervale za brojne hormone u djece i adolescenata, oni se odnose na koncentracije hormona u serumu koje je teško usporediti s vrijednostima izmjerenim u slini. Uz to, referentni intervali u toj studiji često nemaju jasno definirane granice za pojedine pubertetske stadije i dobne skupine, a u nekim slučajevima su dobiveni na relativno malim skupinama ispitanika, što umanjuje njihovu snagu.

Još jedan bitan nedostatak je uzak dobni raspon ispitanika uključenih u istraživanje koji većinski obuhvaćaju samo stadije 1 i 2 po Tanneru. Za bolje razumijevanje praćenja spolnog razvoja u neinvazivnim uzorcima trebalo bi obuhvatiti širi raspon Tannerovih stadija s podjednakim brojem ispitanika po stadiju. Dodatno ograničenje može biti prisustvo intraindividualnih varijacija u koncentracijama hormona u uzorcima sline, koje nisu u potpunosti poznate. Zato ako se želi odrediti točan hormonski status s većom sigurnošću, preporučljivo je određivati hormone iz više uzoraka istog ispitanika.

Uzrok lažno visokih koncentracija u slini može biti i kontaminacija, pogotovo kontaminacija krvlju iz mikrorana u ustima. Omjer koncentracija testosterona u slini i serumu je 1:90, pa već i male, na oko nevidljive kontaminacije mogu znatno utjecati na rezultate. Isto vrijedi i za DHEA-S čije salivarne koncentracije predstavljaju tek 1% slobodnih serumskih. Osim odbacivanja vidno kontaminiranih uzoraka (ružičasta do crvena boja) preporuča se i korištenje test traka za određivanje hemoglobina kako bi se uočile i najmanje kontaminacije

(Wood, 2009; Granger i sur., 2004). Još jedan potencijalan izvor grešaka je velika količina manualnog rada tijekom izvođenja ELISA metoda što povećava mogućnost grubih i slučajnih pogrešaka te varijabilnosti između analiza.

5.3. Perspektive i mogućnosti salivarnih androgena

Iz dobivenih rezultata i pregleda literature, vidljivo je da salivarni androgeni imaju velik potencijal kao neinvazivni markeri gonadarhe i adrenarhe, odnosno praćenja spolnog razvoja. To ih čini praktičnima i kad je potrebno uzimanje više uzoraka dnevno ili praćenje koncentracija tijekom određenog vremena. Uzorkovanje ne zahtijeva prisustvo educirane osobe kao što je slučaj kod venepunkcije, već je uzorke moguće sakupiti i u vlastitom domu. Određivanje hormona u slini ima potencijal kako u istraživačkom, tako i u kliničkom okruženju, ne samo u svrhu praćenja spolnog razvoja. Unatoč izazovima poput biološke varijacije i analitičkih limitacija, daljnjim istraživanjima, standardizacijom i poboljšanjem analitičkih metoda slina može postati vrijedan neinvazivan i lako dostupan uzorak korišten u svrhe probira, dijagnostike i praćenja terapije i stanja pacijenta, a u konačnici može pridonijeti i personalizaciji medicine (Ferrari i sur., 2025).

6. ZAKLJUČCI

Određivanjem testosterona i DHEA-S u slini u svrhu procjene gonadarhe i adrenarhe u dječaka zaključeno je sljedeće:

- Dobivene koncentracije testosterona u slini pokazale su se statistički značajno višima u pubertetskoj skupini u usporedbi s prepubertetskom ($p < 0,001$), dok u koncentracijama DHEA-S nije bilo razlike među skupinama ($p = 0,423$).
- Nema značajne korelacije između koncentracija testosterona i DHEA-S u slini niti u ukupnoj skupini, niti u podskupinama prepuberteta i puberteta (ukupno: $\rho = 0,143$; $p = 0,025$; u prepubertetu: $\rho = 0,172$; $p = 0,055$; u pubertetu: $\rho = 0,138$; $p = 0,134$).
- U ROC analizi, testosteron se pokazao kao dovoljno značajan marker ($AUC = 0,644$) u razlikovanju prepuberteta od ranog puberteta (gonadarhe) s visokom specifičnošću (83,0%) i nižom osjetljivošću (39,6%). Također, cut-off $< 23,69$ pg/mL može imati vrijednost u isključivanju početka puberteta.
- Uključivanjem DHEA-S nisu postignute značajne razlike u ROC analizi u odnosu na samostalan testosteron ($AUC = 0,638$; $p = 0,388$).
- Iz dobivenih rezultata može se u konačnici zaključiti da određivanjem testosterona i DHEA-S u slini možemo dobiti procjenu hormonskog statusa – gonadarhe i adrenarhe, te da neinvazivni uzorci sline mogu biti korisni u procjeni spolnog razvoja dječaka.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Saši Kralik Oguić na stručnom vodstvu, savjetima i prilici za izradu ovog rada.

Također, zahvaljujem se i dr.sc. Vedi Mariji Varnai, dr.med i Mariji Macan, mag.med.lab.diag. na svim ustupljenim podacima te pomoći u izradi eksperimentalnog dijela rada.

8. LITERATURA

Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(3), 254-264.

Anderson RC, Newton CL, Anderson RA, Millar RP. Gonadotropins and their analogs: current and potential clinical applications. *Endocr Rev*, 2018, 39(6), 911-937.

Angelousi A, Margioris AN, Tsatsanis C. ACTH action on the adrenals. U: Endotext. Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, et al, urednici. South Dartmouth, MDText.com, 2020.

Archus RJ. The physiology and biochemistry of adrenarche. *Endocr Dev*, 2010, 20–27.

Augsburger P, Liimatta J, Flück CE. Update on Adrenarche - Still a mystery. *J Clin Endocrinol Metab*, 2024, 109(6), 1403–1422.

Barceloux DG, Palmer RB. Anabolic—Androgenic steroids. *Disease-a-Month*, 2013, 59(6), 226-248.

Bertholf RL, Cooper M, Winter WE. Adrenal Cortex. U: Tietz Textbook of Laboratory Medicine. Rifai N, Chiu RWK, Young I, Burnham CAD, Wittwer CT, urednici, St. Louis, Elsevier, 2023, str. 805-805e30.

Bhattacharya I, Sharma SS, Majumdar SS. Pubertal orchestration of hormones and testis in primates. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(11), 1505-1530.

Bordini B, Rosenfield RL. Normal Pubertal Development: Part I: The endocrine Basis of puberty. *Pediatr Rev*, 2011, 32(6), 223-229.

Breehl L, Caban O. Physiology, Puberty. U: StatPearls. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2016.

Chad JA. The first ejaculation: a male pubertal milestone comparable to Menarche? *J Sex Res*, 2018, 57(2), 213-221.

Emmanuel M, Bokor BR. Tanner stages. U: StatPearls. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2022.

Ferrari CR, Moraes SM, Buzalaf MAR. (2025). Saliva-based Hormone Diagnostics: advances, applications, and future perspectives. *Expert Rev Mol Diagn*, 2025, 25(7), 341–355.

Gavate ND et al. Assessment of dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) and cortisol levels in saliva and their correlation to cervical vertebrae maturation method in males and females at different growth stages: a clinical study. *Dental Press J Orthod*, 2023, 28(4).

Goldman AL, Bhasin S, Wu FCW, Krishna M, Matsumoto AM, Jasuja R. A Reappraisal of testosterone's binding in circulation: Physiological and clinical implications. *Endocr Rev*, 2017, 38(4), 302-324.

Granger D, Shirtcliff EA, Booth A, KT Kivlighan, EB Schwartz. The “trouble“ with salivary testosterone. *Psychoneuroendocrinology*, 2004, 29(10), 1229-1240.

Guidi JCA, Sapra A. Physiology, sexual maturity rating. U: StatPearls. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2022.

Hall JE, Hall, ME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Elsevier, 2021, str. 915-1025.

Handelsman DJ. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse. U: Endotext. Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, et al, urednici. South Dartmouth, MDText.com, 2020.

Herati AS, Cengiz C, Lamb DJ. Assays of serum testosterone. *Urol Clin North Am*, 2016, 43(2), 177-184.

Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testicular growth and development in puberty. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24(3), 215-224.

Linós D, van Heerden JA. Adrenal Glands: Diagnostic Aspects and Surgical Therapy. Heidelberg, Springer, 2005, str.160.

Mäkelä JA, Koskenniemi JJ, Virtanen HE, Toppari J. Testis development. *Endocr Rev*, 2018, 40(4), 857-905.

Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*, 1970, 45(239), 13-23.

Nassar GN, Leslie SW. Physiology, Testosterone. U: StatPearls. Treasure Island, StatPearls Publishing, 2023.

Nerenz RD, Boha B. Reproductive Endocrinology and Related Disorders. U: Tietz Textbook of Laboratory Medicine. Rifai N, Chiu RWK, Young I, Burnham CAD, Wittwer CT, urednici, St. Louis, Elsevier, 2023, str. 846-884.

Netherton C, Goodyer I, Tamplin A, Herbert J. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, 29(2), 125–140.

Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. Testosterone: Action, Deficiency, Substitution. New York, Cambridge University Press, 2012, str. 15-26.

Novello L, Speiser PW. Premature adrenarche. *Pediatr Ann*, 2018, 47(1), e7–e11.

Oduwolé OO, Huhtaniemi IT, Misrahi M. The roles of luteinizing hormone, Follicle-Stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23), 12735.

Pletcher A, Shibata M. Prostate organogenesis. *Development*, 2022, 149(12).

Rey RA. The role of androgen signaling in male sexual development at puberty. *Endocrinology*, 2020, 162(2).

Rohayem J, Alexander EC, Heger S, Nordenström A, Howard SR. Mini-Puberty, Physiological and Disordered: Consequences, and potential for therapeutic replacement. *Endocr Rev*, 2024, 45(4), 460-492.

Rosenfield RL. Normal and premature adrenarche. *Endocr Rev*, 2021, 42(6), 783-814.

Traish AM et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) - A precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J Sex Med*, 2011, 8(11), 2960–2982.

Witchel SF et al. Update on adrenarche. *Curr Opin Pediatr*, 2020, 32(4), 574–581.

Wood CL, Lane LC, Cheetham T. Puberty: Normal physiology (brief overview). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2019, 33(3), 101265.

Wood P. Salivary steroid assays – research or routine? *Ann Clin Biochem*, 2009, 46(3), 183-196.

Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol Reprod*, 2018, 99(1), 101-111.

Zitzmann M. Testosterone, mood, behaviour and quality of life. *Andrology*, 2020, 8(6), 1598-1605.

9. SAŽETAK

Juraj Županić

Procjena gonadarhe i adrenarhe u dječaka određivanjem testosterona i dehidroepiandrosteron-sulfata u slini

Određivanje testosterona i dehidroepiandrosteron-sulfata (DHEA-S) u slini predstavlja neinvazivnu metodu procjene gonadarhe i adrenarhe, osobito korisnu u pedijatrijskoj populaciji kada invazivne metode nisu moguće ili etički opravdane. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati razlike i povezanosti između koncentracija navedenih hormona u predpubertetskoj i pubertetskoj skupini te procijeniti njihov potencijal u procjeni spolnog razvoja, odnosno gonadarhe i adrenarhe u dječaka. U istraživanju je sudjelovalo 302 dječaka u dobi od 10 do 13 godina, razvrstanih prema Tannerovim stadijima u predpubertetsku (stadij 1; $n = 155$) i pubertetsku skupinu (stadij 2 i više; $n = 147$). Salivarni testosteron i DHEA-S određeni su komercijalnim ELISA kompletom (DRG Instruments GmbH). Utvrđene su statistički značajno više koncentracije testosterona između dječaka u predpubertetu i pubertetu ($p < 0,001$), dok u koncentracijama DHEA-S nije bilo razlike među skupinama ($p = 0,423$). Nije utvrđena značajna korelacija između koncentracija testosterona i DHEA-S u slini niti u ukupnoj skupini, niti u podskupinama predpuberteta i puberteta (ukupno: $\rho = 0,143$; $p = 0,025$; u predpubertetu: $\rho = 0,172$; $p = 0,055$; u pubertetu: $\rho = 0,138$; $p = 0,134$). Provedena je ROC analiza za salivarni testosteron kao marker razlikovanja predpuberteta od ranog puberteta (gonadarhe), pri čemu se testosteron se pokazao kao dovoljno značajan marker ($AUC = 0,644$), posebice u isključivanju početka puberteta (osjetljivost = 39,6%; specifičnost = 83,0%). Uključivanjem DHEA-S nisu postignute značajne razlike u ROC analizi u odnosu na samostalan testosteron ($AUC = 0,638$; $p = 0,388$). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da određivanje testosterona i DHEA-S u slini može koristiti za procjenu gonadarhe i adrenarhe u dječaka te da ima značajan potencijal u procjeni spolnog razvoja, posebice kada invazivne metode nisu moguće.

Ključne riječi: gonadarha, adrenarha, testosteron, DHEA-S, slina

10. SUMMARY

Juraj Županić

Assessment of Gonadarche and Adrenarche in Boys by Determining Testosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate in Saliva

Determination of testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) in saliva represents a non-invasive method for assessing gonadarche and adrenarche, particularly useful in the pediatric population when invasive methods are not feasible or ethically justified. The aim of this study was to examine differences and associations between the concentrations of these hormones in prepubertal and pubertal groups, and to evaluate their potential in assessing sexual development, namely gonadarche and adrenarche in boys. The study included 302 boys aged 10 to 13 years, classified according to Tanner stages into a prepubertal group (stage 1; $n = 155$) and a pubertal group (stage 2 and higher; $n = 147$). Salivary testosterone and DHEA-S were determined using a commercial ELISA kit (DRG Instruments GmbH). Significantly higher testosterone concentrations were observed between prepubertal and pubertal boys ($p < 0.001$), while no difference was found in DHEA-S concentrations between the groups ($p = 0.423$). No significant correlation was observed between salivary testosterone and DHEA-S concentrations either in the total sample or in the prepubertal and pubertal subgroups (total: $\rho = 0.143$; $p = 0.025$; prepubertal: $\rho = 0.172$; $p = 0.055$; pubertal: $\rho = 0.138$; $p = 0.134$). ROC analysis was performed for salivary testosterone as a marker of distinguishing prepuberty from early puberty (gonadarche), where testosterone proved to be a sufficiently significant marker ($AUC = 0.644$), particularly in excluding the onset of puberty (sensitivity = 39.6%; specificity = 83.0%). Inclusion of DHEA-S did not yield significant differences in ROC analysis compared with testosterone alone ($AUC = 0.638$; $p = 0.388$). The results of this study suggest that determination of testosterone and DHEA-S in saliva may be useful for assessing gonadarche and adrenarche in boys, and that it holds considerable potential in evaluating sexual development, especially when invasive methods are not feasible.

Key words: gonadarche, adrenarche, testosterone, DHEA-S, saliva

11. ŽIVOTOPIS

Juraj Županić rođen je 6.4.2000. u Karlovcu gdje je završio osnovnu školu i opću gimnaziju. Godine 2019. upisuje studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Tijekom studija aktivan je u Udruzi studenata farmacije i medicinske biokemije (CPSA) gdje je obnašao dužnost povjerenika za medicinske biokemičare organizirajući kraće studentske razmjene, edukativne i humanitarne događaje, a trenutno je autor popularno znanstvenih – članaka za studentski portal *Recipe*. Također, sudjelovao je u organizaciji 1. simpozija studenata medicinske biokemije 2025. Tijekom ak.god. 2024./2025. odradio je šestomjesečno Stručno osposobljavanje na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. U rujnu 2023. bio je na ljetnoj stručnoj praksi na Medicinskom sveučilištu u Wrocławu, Poljska. Uz to, bio je sudionik 8. CEEPUS ljetne škole *Complex Genetic Disorders* u Sloveniji te voditelj radionice o farmakogenetici na 19. *Croatian Student Summit*-u. Na 11. Simpoziju studenata farmacije medicinske biokemije izložio je istraživanje provedeno u sklopu svog diplomskog rada za što je nagrađen za najbolje usmeno priopćenje. Također je dobitnik 1. nagrade na Natjecanju u kliničkim vještinama (CSE) 2025. godine.