

นิพนธ์ต้นฉบับ

วิธีวิเคราะห์ Sex Hormone Binding Globulin โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต Determination of Sex Hormone Binding Globulin by Ammonium Sulphate Precipitation

สมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์*, พิมพรรณ องกิตติกุล**, ฉัตรพร อุษณาจิตต์*

Abstract : Smai Leepipatpaiboon, Pimpun Ongkittikul, and Chatporn Usanajitt. 1989. Determination of sex hormone binding globulin by ammonium sulphate precipitation. Thai J Hlth Resch 3 (1) : 13-20

Determination of sex hormone binding globulin (SHBG) by ammonium sulphate precipitation is a simple and rapid method. Precision of assay was calculated by within ($n = 10$) and between ($n = 30$) assay coefficient of variation. Of these two coefficient of variations the former is 1.55% and the later is 13.05%. This study has also measured SHBG in serum of 10 males and 10 females in 3 phases of menstrual cycle. The mean $\pm$ SD concentration of SHBG in male serum is 34.9 ± 5.17 nmol/L and female in follicular, mid-cycle and luteal phase are 90.1 ± 13.73 , 89.6 ± 11.6 and 87.3 ± 14.5 nmol/L respectively. This report will be useful for the study of sex steroids metabolism.

บทคัดย่อ : สมัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, พิมพรรณ องกิตติกุล และ ฉัตรพร อุษณาจิตต์. 2532. วิธีวิเคราะห์ Sex Hormone Binding Globulin โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3 (1) : 13-20

การวิเคราะห์ sex hormone binding globulin (SHBG) โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นวิธีที่ง่ายและได้ผลเร็วภายในวันเดียว ความแม่นยำของวิธีคำนวณจากการวิเคราะห์แบบ within ($n = 10$) และ between ($n = 30$) assay coefficient of variation ซึ่งค่าที่ได้เท่ากับ 1.55% และ 13.05% ตามลำดับ การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลืองของชายไทยและสตรีไทยในระหว่างรอบประจำเดือนอย่างละ 10 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ SHBG ในชายมีค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 34.9 ± 5.17 nmol/L และ follicular, mid-cycle และ luteal phase ของสตรีไทยมีค่าเฉลี่ย 90.2 ± 13.73 , 89.6 ± 11.6 และ 87.3 ± 14.5 nmol/L ตามลำดับ รายงานนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษา sex steroids metabolism

* ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330.

Dept of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Bangkok 10330.

** วิทยาลัยพยาบาลชั้นนาท กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดชัยนาท 10700.

Chainat Nursing College, Ministry of Public Health. Chainat Province 17000.

บทนำ

Sex hormone binding globulin (SHBG) เป็น glycoprotein จำพวก β -globulin (Hansson *et al.*, 1973) มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาเฉพาะกับฮอร์โมนเพศกลุ่ม 17β -hydroxysteroids (Rosenbaum *et al.*, 1966; Pearlman and Crepy, 1971; Anderson, 1974) ได้แก่ 17β -estradiol (E_2), testosterone (T) และ 5α -dihydrotestosterone (DHT) ฮอร์โมนชนิดแรกเป็น estrogen มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของระบบสืบพันธุ์เพศหญิง ส่วนฮอร์โมนสองชนิดหลังเป็น androgen มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์เพศชาย ได้มีการศึกษาฮอร์โมนเหล่านี้ในระบบหมุนเวียนในร่างกายพบว่า ฮอร์โมนเหล่านี้จะจับกับ SHBG และโปรตีนอื่น ๆ ในน้ำเลือด เหลืออยู่ในรูปอิสระซึ่งเป็น biological active form ประมาณ 1–2% (Sodergard *et al.*, 1982) การที่ SHBG จับกับฮอร์โมนนี้ ทำให้เชื่อกันว่านอกจาก SHBG จะเป็นตัวพาฮอร์โมนเหล่านี้ไปยังอวัยวะเป้าหมายแล้ว ยังช่วยป้องกันไม่ให้ฮอร์โมนถูกทำลายด้วยเอนไซม์และกระบวนการเมตาบอลิซึมในระบบหมุนเวียนและในตับ นอกจากนี้ SHBG ยังช่วยป้องกันไม่ให้ฮอร์โมนถูกขับออกทางไตด้วย (Saez *et al.*, 1972) ดังนั้นการศึกษาระดับ SHBG ในน้ำเหลืองจะเป็น parameter หนึ่งที่จะช่วยในการอธิบาย regulatory function ของฮอร์โมนเพศ และอาจจะประยุกต์ใช้ในการดูแลรักษาสตรีที่เป็น polycystic ovarian disease ร่วมกับ hirsutism ด้วยการให้ estrogen ไปเพิ่มระดับ SHBG เพื่อลดการเจริญของขน (Cullberg *et al.*, 1985) จากเหตุข้างต้นทำให้มีการวิเคราะห์ SHBG ซึ่งวิธีการวิเคราะห์มีหลายวิธี เช่น Electrophoresis (Corvalet *et al.*, 1971), radioimmunoassay (Cheng *et al.*, 1983) และ electroimmunodiffusion (Lee *et al.*, 1984) แต่ทั้งนี้ ราคาถูกและได้ผลเร็วคือการวิเคราะห์ SHBG โดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Heyns and De Moor, 1971; Rosner, 1972; Anderson *et al.*, 1976 และ Cekan *et al.*, 1985) Cekan *et al.* (1985) ได้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ SHBG โดยใช้ความเข้มข้นของ DHT แบบ single dose ตามวิธีของ Rosner (1972) มีความคลาดเคลื่อนสูง เนื่องจากความเข้มข้นของ SHBG ในน้ำเหลืองของแต่ละคนไม่เท่ากัน ดังนั้น Cekan *et al.* (1985) จึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ SHBG แบบ multiple-dose ของ DHT และผลวิเคราะห์ SHBG ที่ได้สอดคล้องกับวิธีวิเคราะห์ SHBG ด้วย electrophoresis รายงานนี้มีวัตถุประสงค์จะเสนอวิธีการวิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลือง โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามวิธีของ Cekan *et al.* (1985) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว และได้ผลถูกต้องเชื่อถือได้ นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลืองบวชและสตรีที่มีรอบเดือนปกติด้วย เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

วัสดุที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ตัวอย่างน้ำเหลือง แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ
 - 1.1 กลุ่มสตรีเพศ จำนวน 10 คน อายุระหว่าง 25–40 ปี เจาะเลือดช่วง follicular phase, mid-cycle และ luteal phase
 - 1.2 กลุ่มบุรุษเพศ จำนวน 10 คน อายุระหว่าง 25–40 ปี น้ำเหลืองที่ได้เก็บไว้ที่ -20°C . จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์
2. สารกัมมันตภาพรังสี ($1,2\text{-}^3\text{H}$)- 5α -dihydrotestosterone (3H-DHT) 60 Ci/nmol จาก Amersham, UK.
3. สารมาตรฐาน 5α -dihydrotestosterone (DHT) Sigma Co, USA.
4. แอมโมเนียมซัลเฟต (AR) จาก E Merck
5. 0.1 M phosphate buffer in saline pH 7.4
6. dioxane-based scintillation fluid

วิธีการ ทำตามวิธีการของ Cekan *et al.* (1985) สรุปเป็นตารางได้ดังนี้

หลอด ทดลอง	ความเข้มข้น ของสารละลาย มาตรฐาน DHT (nmol/L)	ปริมาตรของสารที่ใช้ในการทดลอง					อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 30°ซ. นาน 30 นาที	อินคิวเบทที่อุณหภูมิ 4°ซ. นาน 10 นาที
		สารมาตรฐาน DHT (มล.)	สารติดสลาท DHT (มล.)	บัฟเฟอร์ (มล.)	ซีรัมเจือจาง 1 : 8 (มล.)	รวม (มล.)		
Tc	-	-	0.2	0.05	-	0.25		
1	413.22	0.2	0.2	-	0.1	0.5		
2	5.51	0.2	0.2	-	0.1	0.5		
3	2.755	0.2	0.2	-	0.1	0.5		
4	1.377	0.2	0.2	-	0.1	0.5		
5	0.689	0.2	0.2	-	0.1	0.5		

หลังจากอินคิวเบทที่ 4°ซ. แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่อุณหภูมิ 4°ซ. ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในขณะที่หลอดทดลองอยู่บนเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) แล้วนำหลอดทดลองไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 3,000 รอบ/นาที (2,000 X g) ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลานาน 10 นาที ปิ่เปิดเฉพาะส่วนใส ซึ่งเป็น free form ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน vial แล้วเติม scintillation fluid ปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปตรวจนับปริมาณกัมมันตภาพรังสี

วิธีการคำนวณผล

1. คำนวณหาค่าเฉลี่ยของ total count (Tc)
2. นำค่า cpm ของ free form (F) คูณด้วย 2 เพราะ supernatant เท่ากับ 1.0 มล.
3. คำนวณหา bound form (B) ได้ดังนี้

$$B = Tc - F$$

4. คำนวณค่า factor of nonspecific binding (fn.s) ที่จุดความเข้มข้นของ DHT สูงสุด ก็คือหลอด-ทดลองที่เติม Std. DHT 413.22 นาโนโมล/ลิตร ดังนั้น

$$fn.s = \frac{B}{F}$$

5. คำนวณค่า total bound (Bt) แต่ละระดับความเข้มข้นของ DHT ดังนี้

$$Bt = \frac{B}{Tc} \times \text{ความเข้มข้นของ DHT}$$

6. คำนวณค่า free form (F) แต่ละระดับความเข้มข้นของ DHT ดังนี้

$$F = \frac{F}{Tc} \times \text{ความเข้มข้นของ DHT}$$

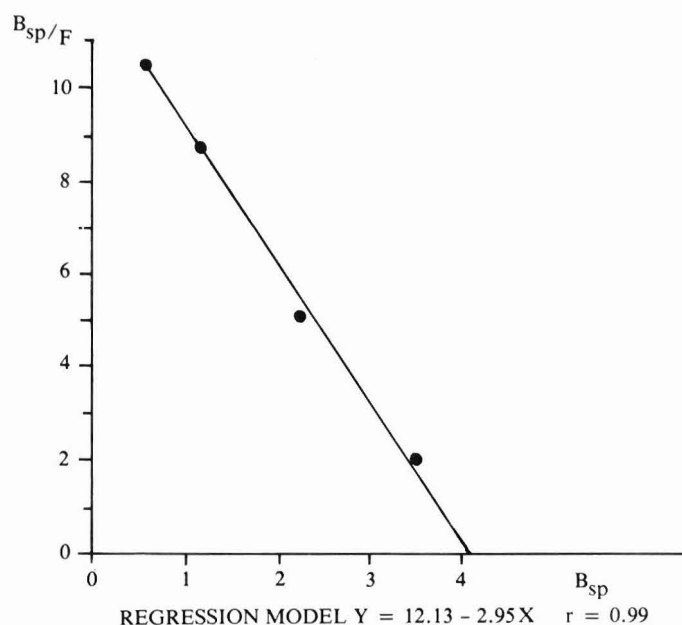
7. คำนวณค่า bound non specific (B_{n.s.}) ดังนี้

$$B_{n.s.} = fn.s \times F$$

8. คำนวณค่า bound specific (B_{sp})

$$B_{sp} = B_t - B_{n.s}$$

นำค่า B_{sp} และ B_{sp}/F ไปเขียนกราฟบน linear graph paper โดยให้ B_{sp} อยู่แกน X และ B_{sp}/F อยู่แกน Y (รูปที่ 1) ลากเส้นตรงผ่านจุดตัดแกน X อ่านค่าบนแกน X แล้วคูณด้วย dilution factor จะได้ความเข้มข้น SHBG เป็นหน่วย nmol/L



รูปที่ 1. แสดงกราฟ (Scatchard Plot) ใช้อ่านผล SHBG ในน้ำเหลือง

ผลการวิเคราะห์

1. ทดสอบอิทธิพลของ corticosteroid binding globulin (CBG) ต่อการวิเคราะห์ SHBG ทดลองโดยการเติม cortisol 400 nmol/L ลงในตัวอย่างน้ำเหลืองที่มีความเข้มข้นของ SHBG สูง (ประมาณ 400 nmol/L) และต่ำ (ประมาณ 160 nmol/L) เพื่อให้ cortisol ไปจับกับ CBG ก่อนทำการวิเคราะห์ SHBG เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับตัวอย่างเดียวกัน แต่ไม่ได้เติม cortisol ผลปรากฏว่า SHBG จากตัวอย่างที่เติม cortisol กับไม่เติม cortisol ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

Table I. Effect of CBG on the measurement of SHBG in serum.

Sample number	Concentration of SHBG (nmol/L)			
	high pool serum		low pool serum	
	+ cortisol	- cortisol	+ cortisol	- cortisol
1	412.7	356.4	160.5	157.0
2	373.8	332.2	163.9	160.7
3	387.7	380.4	163.7	153.9
4	399.1	338.8	161.1	151.3
5	451.8	387.7	158.3	157.0
$\bar{X} \pm SD$	405.0 ± 29.8	359.1 ± 24.6	161.5 ± 2.4	156.0 ± 3.6

2. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถหาสารบริสุทธิ์ของ SHBG ได้ Rosner (1972) ได้เสนอวิธีการทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ในทางอ้อม โดยทำ serial dilution curve รายงานนี้ได้ทำการทดลองพบว่าน้ำเหลืองของคนปกติจะเป็นกราฟเส้นตรงแบบ linear regression ($r = 0.99$) ที่ dilution ระหว่าง 1:20 ถึง 1:80 (รูปที่ 2) ดังนั้นในการวิเคราะห์ SHBG ตามวิธีของ Cekan *et al.* (1985) ต้องเจือจางน้ำเหลืองอยู่ในช่วงดังกล่าว ผลจึงจะถูกต้องเชื่อถือได้

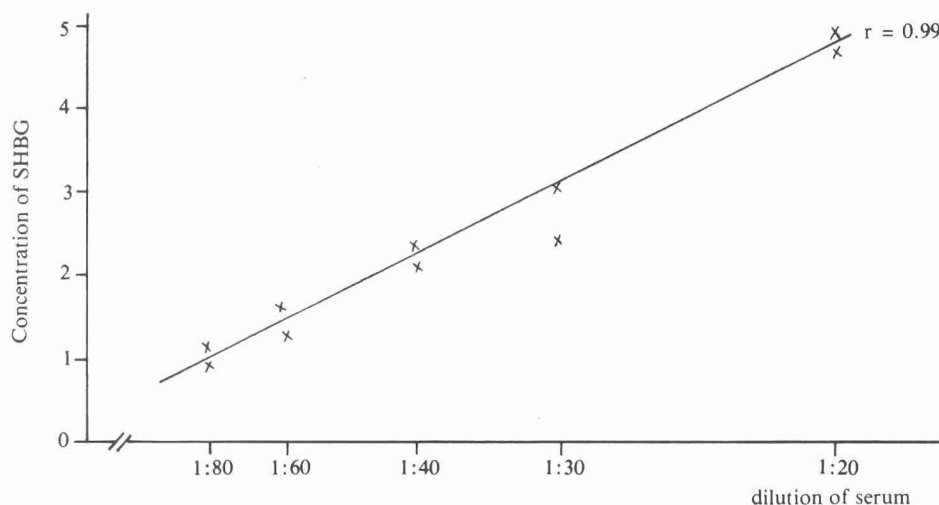


Fig. 2 Serial dilution curve for determination accuracy of assay

3. ความแม่นยำในการวิเคราะห์ ทดสอบความแม่นยำในการวิเคราะห์โดยใช้ pool serum ของสตรีที่มีปริมาณ SHBG เฉลี่ย 90 nmol/L มาวิเคราะห์ SHBG เพื่อคำนวณหาความแปรปรวนของการวิเคราะห์แบบ within assay ($n = 10$) กับ between assay ($n = 30$) ผลปรากฏว่าสัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบน (CV) แบบ within assay กับ between assay มีค่าเท่ากับ 1.55% และ 13.05% ตามลำดับ

4. ผลการวิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลืองสตรีและบุรุษ ในน้ำเหลืองของสตรีวัยเจริญพันธุ์ อายุ 25-40 ปี จำนวน 10 คน ในช่วง follicular phase, mid-cycle และ luteal phase มีค่าเฉลี่ย 90.1 ± 13.73 , 89.6 ± 11.6 และ 87.3 ± 14.5 nmol/L ตามลำดับ และในบุรุษเพศอายุระหว่าง 25-40 ปี จำนวน 10 คน มีค่าเฉลี่ย 34.9 ± 5.17 nmol/L

วิจารณ์ผล

การวิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลืองมีหลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายได้ผลรวดเร็วและราคาไม่แพง ได้แก่วิธีการตกตะกอน SHBG ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต Cekan *et al.* (1985) ได้รายงานไว้ว่า วิธีการวิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลืองแบบที่ใช้ความเข้มข้นของ DHT แบบ single dose ตามวิธีการของ Rosner (1972) จะมีข้อผิดพลาดสูง เพราะความเข้มข้นของ SHBG ในน้ำเหลืองของแต่ละคนไม่เท่ากัน ทำให้ degree of saturation ด้วย DHT แตกต่างกัน Cekan และคณะจึงได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ SHBG เพื่อให้ข้อผิดพลาดน้อยลงด้วยการเติม DHT หลายระดับความเข้มข้น แล้วนำผลมาเขียน scatchard plot รายงานนี้ได้แนะนำให้ดังกล่าวมาทดสอบ reliability of assay โดยการทดสอบความจำเพาะของการวิเคราะห์ด้วยการเติม cortisol 400 nmol/L ลงใน pool serum ที่มีระดับ SHBG สูงและต่ำ แล้ววิเคราะห์ SHBG เปรียบเทียบกับ pool serum เดียวกันที่ไม่ได้เติม cortisol ผลปรากฏว่า SHBG ที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Rudd *et al.* (1974) แสดงให้เห็นว่า CBG ในน้ำเหลืองไม่มีผลกระทบต่อวิธีการวิเคราะห์ SHBG นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบความแม่นยำ

ในการวิเคราะห์ โดยการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของการเบี่ยงเบน (CV) จาก within assay และ between assay ได้เท่ากับ 1.55% และ 13.05% ตามลำดับ ผลที่ได้นี้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ ส่วนความถูกต้องของการวิเคราะห์ (accuracy of assay) เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถหาสารบริสุทธิ์ของ SHBG ได้ตามท้องตลาด จึงทดสอบ accuracy ตามวิธีการของ Rosner (1972) โดยทำ serial dilution curve ซึ่งมีข้อมูลว่า น้ำเหลืองคนปกติจะมี linear relationship ที่ dilution 1:20 ถึง 1:80 ดังนั้นการวิเคราะห์ SHBG ตามวิธีของ Cekan และคณะต้องทำให้น้ำเหลืองเจือจางระหว่าง 1:20 ถึง 1:80 จึงจะทำให้ผลการวิเคราะห์เชื่อถือได้ การศึกษาครั้งนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ SHBG ในน้ำเหลืองของบุรุษและสตรีไทย (ผลการวิเคราะห์ข้อ 4) พบว่าระดับ SHBG ในน้ำเหลืองของบุรุษใกล้เคียงกับรายงานของ Heyns and De Moor (1971), Rosner (1972) และ Anderson *et al.* (1976) ซึ่งใช้วิธีการวิเคราะห์แบบตกตะกอน SHBG ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แต่ SHBG ในสตรีไทยมีค่าสูงกว่าสตรีในประเทศตะวันตก ซึ่งอาจเนื่องจากพันธุกรรมหรือขนาดและน้ำหนักของร่างกายต่างกัน (Ahrentsem *et al.*, 1982; Plymate *et al.*, 1985) ดังนั้นผลการวิเคราะห์นี้อาจใช้เป็นค่าอ้างอิง (reference value) ของคนไทย เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

จากการศึกษารายงานที่มีมาพบว่า SHBG มีบทบาทสำคัญในการอธิบายพยาธิสภาพของร่างกาย เช่น สตรีที่เป็น polycystic ovarian disease และ hirsutism จะมีระดับ SHBG ต่ำ แต่ฮอร์โมน androgen อยู่ในระดับปกติ (Anderson, 1974; Plymate *et al.*, 1981) ดังนั้นการวิเคราะห์ SHBG น่าจะเป็นประโยชน์ต่อนรีเวชแพทย์ ในการพยากรณ์และการรักษาโรคดังกล่าว (Cullberg *et al.*, 1985) นอกจากนี้ยังได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของยาคุมกำเนิดต่อระดับ SHBG (Kammen *et al.*, 1974; Victor *et al.*, 1977; Palatsi *et al.*, 1984) การที่ยาคุมกำเนิดทำให้ระดับ SHBG เปลี่ยนแปลงอาจเป็นผลทำให้ระดับ estrogen และ androgen ไม่สมดุล ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (Limpongsanurak *et al.*, 1981) ดังนั้นการวิเคราะห์ SHBG นอกจากจะช่วยในการอธิบาย regulatory function ของ androgen และ estrogen แล้ว ยังอาจช่วยแพทย์ในการวินิจฉัยและรักษาโรคทางนรีเวชวิทยาได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยกราบขอบพระคุณหัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์เพื่อการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ทุกท่าน และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนและให้กำลังใจ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จสมประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- Anderson DC. 1974. Sex hormone binding globulin. Clin Endocrinology 3:69-76.
- Anderson DC, Lasley BL, Fisher RA, Sherpherd JH, Newman L, and Hendrickx AG. 1976. Transplacental gradients of sex hormone binding globulin in human and simian pregnancy. Clin Endocrinology (oxf) 5:657-669.
- Ahrentsen OD, Jensen HK, and Johnsen SG. 1982. Sex hormone binding globulin deficiency. Lancet 14: 377.
- Cekan SZ, Segersteen U, and Jia Mc. 1985. A simple, but reliable assay of sex hormone binding globulin. Analyt Letters. 18:287-298.

- Cheng CY, Bardin CW, Mastro NA, Gunsalus GL, Cheng SL, and Ganguly M. 1983. Radioimmunoassay of testosterone-estradiol-binding globulin in humans : A reassessment of normal values. *J Clin Endocrinol Metab* **56**:68-75.
- Corval PL, Chrambach A, Rodbard D, and Bardin CW. 1971. Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol binding globulin in human plasma determined by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **246**:3435-3443.
- Cullberg G, Hamberger L, Mattsson L, Mobacken H, and Samsioe G. 1985. Low dose desogestrel-ethynyl-estradiol combination on hirsutism, androgens and sex hormone binding globulin in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand* **64**:195-202.
- Hansson V, Larsen J, and Rensch E. 1973. Physicochemical properties of the 5α -dihydrotestosterone binding protein in human male serum. *Steroids* **20**:555-574.
- Heyns W, and De Moor P. 1971. The binding of 17β -hydroxy- 5α -androstane-3-one to the steroid binding β -globulin in human plasma, as studied by means of ammonium sulphate precipitation. *Steroids* **18**:709-730.
- Kammen E V, Thijssen J H H, Rademaker B, and Schwartz F. 1974. The influence of hormonal contraceptives on sex hormone binding globulin (SHBG) capacity. *Contraception* **11**:53-59.
- Lee IR, Greed LC, and Hahnel R. 1984. Comparative measurements of plasma binding capacity and concentration of human sex hormone binding globulin. *Clinica Chimica Acta* **137**:131-139.
- Limpongsanurak S, Jenkins N, and Fotherby K. 1981. Effect of contraceptive steroids on serum levels of sex hormone binding globulin caeruloplasmin. *Curr Med Res Opin* **7**:185-191.
- Palatsi R, Hirvensalo E, Liukko P, Malmiharju T, Mitala L, Riihiluoma P, and Yostalo P. 1984. Serum total and unbound testosterone and sex hormone binding globulin (SHBG) in female acne patients with two different oral contraceptives. *Acta Derm Venereol (Stockh)* **64**:517-523.
- Pearlman W H, and Crepy O. 1971. Steroid protein interaction with particular reference to testosterone binding by human serum. *J Biol Chem* **242**:182-189.
- Plymate SR, Fariss BL, Bassett ML, and Matej L. 1981. Obesity and its role in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **52**:1246-1248.
- Plymate SR, Moore DE, Cheng CV, Bardin CW, Southworth MB, and Levinski MJ. 1985. Sex hormone binding globulin changes during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **61**:993-996.
- Rosenbaum W, Christy NP, and Kelly WC. 1966. Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding- β -globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **26**:1399-1403.
- Rosner W. 1972. A simplified method for the quantitative determination of testosterone-estradiol-binding globulin activity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **34**:983-988.
- Rudd BT, Duiganan NM, and London DR. 1974. A rapid method for the measurement of sex hormone binding globulin capacity of sera. *Clinica Chimica Acta*. **55**:165-178.

- Saez JM, Forest MG, Morera AM, and Bertrand J. 1972. Metabolic clearance rate and blood production rate of testosterone and dihydrotestosterone in normal subjects, during pregnancy and in hyperthyroidism. *J Clin Invest* **51**:1226-1234.
- Sodergard R, Backstrom T, Shanbhag V, and Carstensen H. 1982. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 β to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem* **16**:801-810.
- Victor A, Weiner E, and Johanson E D B. 1977. Relation between sex hormone binding globulin and D-norgestrel levels in plasma. *Acta Endocrinologica* **86**:430-436.