

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА

Н.П. Гончаров, Г.В. Кацяя

ФГУ «Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий», Москва
(дир. — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Физиологическая роль тестостерона у мужчин хорошо известна и заключается в формировании мужского фенотипа и обеспечении сперматогенеза. В организме женщин тестостерон поддерживает анаболические процессы (прежде всего в мышечной ткани), метаболизм и ремоделирование костной ткани.

Высококчувствительный и специфичный метод определения тестостерона абсолютно необходим для диагностики патологических состояний как у мужчин, так и у женщин. Главная проблема количественного определения тестостерона заключается в перекрестном реагировании с другими субстратами при работе в низком диапазоне значений (менее 10 нмоль/л), что существенно затрудняет его клиническое использование. Физиологическое низкое содержание тестостерона наблюдается у детей до периода полового созревания и женщин. Содержание тестостерона в крови у женщин не превышает 7% от его содержания в крови взрослых мужчин.

Количественная оценка содержания андрогенов необходима при наличии клинических признаков гиперандрогении (гирсутизм, акне, алопеция) с целью дифференциальной диагностики синдрома поликистозных яичников и андрогенсекретирующих опухолей у женщин [1–4]. Надежный метод количественного определения тестостерона необходим в педиатрической практике при уточнении причин преждевременного полового развития и задержки пубертатного периода, наблюдении пациентов с наиболее распространенной формой врожденной дисфункции коры надпочечников вследствие дефицита 21-гидроксилазы. Точное определение уровня тестостерона необходимо для диагностики распространенного возрастного дефицита андрогенов (PADAM или LOH-синдром): низкое содержание общего тестостерона (об. тестостерон менее 10 нмоль/л) у мужчин в возрасте 40–60 лет регистрируется в 7% случаев, а в возрасте 60–80 лет — в 21% случаев. Мониторинг тестостерона необходим при антиандрогенной терапии у больных раком простаты пролонгированными препаратами люлиберина (фармакологическая кастрация).

Даже в физиологических условиях уровень общего тестостерона (об.Т) довольно вариабелен, кроме того, возможны лабораторные погрешности на эта-

пе проведения измерения. Почти 50–60% об.Т образуют сильную связь с глобулином, связывающим половые стероиды (ГСПС), а 40–50% — с альбумином (легко диссоциирующая связь). Только 1–2% тестостерона циркулирует в свободной форме (св.Т) и вместе со связанным с альбумином тестостероном они формируют биодоступный тестостерон (биоТ). Для клинической практики оптимальным для определения тестостерона является определение его биодоступной фракции (свободного и связанного с альбумином).

Преаналитические факторы, влияющие на уровень тестостерона

Сезонная вариабельность. По данным J. Svartberg [5], сезонные колебания содержания об.Т достигают 19%, а св.Т — 31%. Наиболее низкие концентрации регистрируются летом, пиковые — осенью. Они также зависят от региона проживания. Приведенную разницу в уровнях, естественно, необходимо учитывать при выполнении продолжительных исследований.

Суточная вариабельность. Суточные колебания уровня био.Т достигают 57%, св.Т — 68%, тогда как колебания уровня об.Т — 45%. Данный процесс обусловлен увеличением синтеза тестостерона в ночное время с одновременным снижением содержания связывающих белков как следствие особенностей гемодинамики организма в горизонтальном положении тела. С увеличением возраста выраженный суточный ритм сглаживается, что также необходимо учитывать при разработке протокола клинических исследований [5].

Диета. Содержание тестостерона может определяться временем приема пищи и ее составом. Еще в 1973 г. была опубликована работа, в которой зарегистрировано снижение уровня тестостерона в крови у здоровых мужчин после перорального приема глюкозы [6]. Позднее при проведении глюкозо-толерантного теста наблюдалось снижение концентрации об.Т на 15% через 30 мин, которое сохранялось на протяжении последующих 3 ч [7]. Снижение уровня тестостерона было обусловлено не изменением секреции лютеинизирующего гормона (ЛГ), а выбросом в кровь глюкагоно-подобного пептида-1 (GLP-1), который подавляет импульсную продукцию тестостерона.

Наиболее важный эффект диеты — изменение содержания ГСПС, уровень которого снижается при



потреблении большого количества белка, жирной пищи, и наоборот, его концентрация повышается при вегетарианской пище и потреблении продуктов, богатых клетчаткой [7]. Высокое содержание свободных жирных кислот нарушает связывание половых стероидов с ГСПС, что влияет на уровень св.Т [8]. Взятие крови натощак или же после приема пищи может существенно влиять на результаты определения тестостерона. В большинстве проводимых или опубликованных работах данный фактор не учитывается.

Алкоголь. Небольшая доза алкоголя повышает уровень тестостерона в крови на 20% у мужчин [9] и у женщин [10]. Хроническое злоупотребление алкоголем приводит к необратимым деструктивным изменениям клеток Лейдига и клеток Сертоли, к развитию ожирения, повышению уровня эстрогенов и формированию необратимого дефицита андрогенов в сочетании с эректильной дисфункцией.

Физическая активность и стресс. Чрезмерные физические нагрузки, например, у молодых спортсменов, приводят к падению уровня как об.Т, так и св.Т [11].

Стресс, и физический, и психоэмоциональный, приводит к подавлению продукции тестостерона через центральные механизмы. Кроме того, высокая продукция кортизола ингибирует стероидогенез в клетках Лейдига [12–15]

Половая активность. Уровень как об.Т, так и св.Т повышается в процессе интимных отношений у обоих партнеров, мастурбация также сопровождается увеличением концентрации циркулирующего тестостерона.

Курение. Уровень андрогенов (об.Т и св.Т) у курильщиков возрастает на 5–15% [16].

Особенности забора проб крови и ее обработки

Сравнительно недавно в эксперименте была четко обоснована схема получения сыворотки для последующего определения тестостерона:

1. Отделение сыворотки от форменных элементов должно проходить в течение 6 ч при комнатной температуре. При температуре +4 °С пробы крови могут храниться до 48 ч. Пробы сыворотки можно хранить при температуре -20 °С в течение 3 мес, а при -70 °С — до 6 мес. Более продолжительное хранение проб сыворотки не гарантирует правильное определение концентрации тестостерона, так как за это время может измениться технология определения гормона.
2. Недопустимо повторное замораживание и размораживание проб сыворотки, что приводит к деструкции ГСПС и неправильному определению св.Т и биоТ.
3. В случае использования экстракционного радиоиммунного анализа (РИА, RIA) для определения

тестостерона субстрат (сыворотка или плазма) не имеет значения. Однако при применении неизотопных прямых методов, включая автоматические анализаторы, необходимо использовать сыворотку, так как при измерении тестостерона в плазме концентрация гормона занижается [17, 18].

4. Добавление ЭДТА или цитрата для получения плазмы недопустимо при использовании всех прямых методов определения тестостерона.
5. Забор крови в стеклянные или пластиковые пробирки для получения сыворотки не влияет на результаты определения тестостерона. Однако при использовании гелевого разделяющего компонента, что имеет место в вакутайнерах для взятия крови, происходит завышение результатов для об.Т до 28%, занижение уровня фолликулостимулирующего гормона на 43%, завышение общего Т3 на 58%, Т4 на 34%. В случае использования одних и тех же вакутайнерах разные анализаторы могут генерировать различные результаты при определении того или иного гормона. Более подробно влияние различных экзо- и эндогенных факторов на уровень об.Т освещено в цитируемой работе [19].

Проблемы иммуноанализа тестостерона автоматизированными системами

Начиная с конца 60-х годов прошлого века основным методом определения об.Т в сыворотке стал метод РИА с предварительной экстракцией этиловым эфиром. Этот метод принципиально увеличил диагностические возможности. Однако использование радиоактивной метки в методах РИА создавало целый ряд проблем для гормональных лабораторий.

Наиболее распространенной альтернативой методам РИА стало развитие иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA), при котором в качестве меченого компонента используется пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и др. Несколько позднее были созданы флюоресцентные методы (меченый компонент европий), метод усиленной люминесценции (меченый компонент люминол или акридин).

В настоящее время широко используются автоматизированные высокопроизводительные системы определения самых различных гормонов, включая тестостерон. Многие коммерческие диагностические компании используют технологии люминисцентного анализа с регистрацией усиленного люминисцентного сигнала. Все указанные неизотопные методы являются «прямыми», т.е. определение об.Т проводится непосредственно в сыворотке без предварительной экстракции его органическими растворителями, что увеличивает возможность одновременного определения и других стероидов, близких по химической структуре к молекуле тестостерона.

Проведенный в последнее время целенаправленный анализ результатов определения тестостерона

в сыворотке крови с помощью автоматизированных систем по сравнению с референсным методом масс-спектрометрии, позволил выявить систематическую ошибку анализаторов, как в сторону завышения (в большинстве случаев), так и в сторону занижения концентрации определяемого тестостерона. В частности, обстоятельную работу опубликовали французские авторы [20], в которой проведена характеристика 10 анализаторов по сравнению с референсным методом масс-спектрометрии. Вывод авторов следующий: использование указанной технологии прямых методов неприемлемо для определения низких концентраций тестостерона у женщин и детей. Аналогичные результаты также опубликованы авторитетной группой авторов из США [21] и группой австралийских ученых [22]. Они приходят к выводу о неприемлемости технологии прямых методов, включая ELISA, для определения низких концентраций тестостерона. В 2004 г. в журнале JCEM была опубликована редакционная статья с аналогичными заключениями [23]. И, наконец, в начале 2007 г. опубликовано официальное заявление Международной ассоциации эндокринологов о недопустимости использования прямых неэкстракционных методов для определения об.Т у женщин и детей, поскольку это ведет к ошибкам в диагностике с последующим назначением неправильного лечения [24].

Подобные результаты были получены нами при сравнении четырех автоматизированных систем со стандартизированным РИА-методом [25]. Неприемлемое завышение результатов у мужчин было получено при определении концентрации об.Т ниже 10 нмоль/л (рис. 1); в результате принципиально снижается процент (до 20%) выявления дефицита андрогенов, при котором потенциально требуется заместительная терапия препаратами тестостерона (рис. 2).

Возможности метода массспектрометрии

Любой из существующих методов иммунного анализа обуславливает необходимость специфичных для каждого гормона технологических разработок (в первую очередь высокоспецифичных моноклональных антител). Стероидные гормоны и их активные метаболиты представляют особую сложность при создании тест-систем: химическая структура соединений близка и многие из них циркулируют в крови в очень низких концентрациях. Каждая компания, создающая диагностические тест-системы, разрабатывает собственные способы, что затрудняет интерпретацию полученных результатов и является одной из причин расхождения результатов определения гормонов.

Появление и развитие современной технологии масс-спектрометрии в тандеме с высокоразрешающим жидкостным хроматографом обеспечивает высокую производительность и практически 100% специфичность, необходимую чувствительность и

воспроизводимость. Без преувеличения можно констатировать, что высокие рабочие характеристики метода масс-спектрометрии открывают новую эру в биохимии стероидов. В отличие от прежнего технологически трудоемкого комплекса газовый хроматограф—масс-спектрометр (GCMS), современная тандемная масс-спектрометрия (MS/MS) не требует трудоемкой процедуры подготовки исследуемого биологического материала. При наличии подготовленного специалиста метод MS/MS может быть использован (и уже используется в развитых странах) для стандартной диагностики в эндокринологических лабораториях.

Сравнительно недавно группа авторов из США [26] опубликовала блестящую работу, в которой продемонстрированы возможности технологии MS/MS с использованием масс-спектрометра API-3000 (applied biosystems), позволяющего в 0,2 мл сыворотки одновременно определять 12 основных стероидных гормонов — дегидроэпиандростерона сульфат (ДГЭА-С), альдостерон, кортизол, кортикостерон, 11-дезоксикортизол, андростендион, эстрадиол, тестостерон, 17-ОП, дегидроэпиандростерон (ДГЭА), прогестерон и 25-гидроксивитамин D. Четкое хроматографическое разделение близких по химической структуре стероидов с помощью HPLC достигается всего за 11 мин. Один подготовленный оператор может выполнять до 200 тестов в день. Метод MS/MS надежен, экономичен и обладает высокой производительностью по сравнению с современными автоматическими анализаторами. В методе MS/MS расходные материалы сведены к минимуму. Фактически технология MS/MS является ближайшим будущим в гормональном анализе.

В настоящее время тандемная MS/MS получает широкое распространение для основного спектра стероидов ряда C21, C19 и C18 и их многочисленных метаболитов. Метод MS/MS (API-3000) незаменим в скрининговых программах, например, аденогенитальный синдром (АГС) у новорожденных. Фактически метод тандемной MS/MS может в качестве эталонного и незаменимого «арбитра» при наличии неизбежных ложно-положительных результатах определения 17-ОП методом флуоресцентного иммунного анализа (Дельфия). При скрининге на каждый истинный случай АГС приходится до 200 ложноположительных результатов, которые легко дифференцируются при использовании MS/MS — ABI-3000.

В статье M. Kushnir [27] представлен опыт использования метода тандемной масс-спектрометрии для определения низких концентраций тестостерона у женщин и детей. Метод по основным параметрам (чувствительность и специфичность) является высоконадежным и адекватным для оценки андрогенного баланса и практически исключает эффект матрикса, присущий всем прямым методам иммунного анализа автоматизированных систем [28—29].

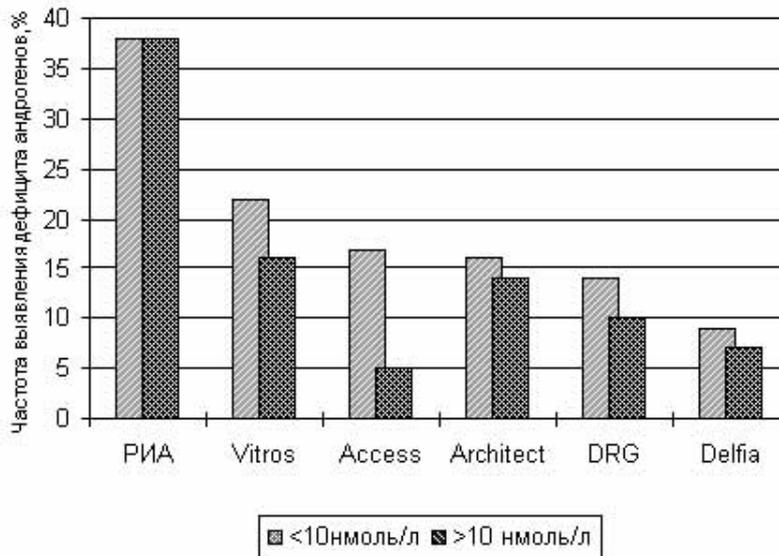


Рис. 1. Различия между показателями концентрации тестостерона (медиана), полученными с помощью РИА и неизотопными методами у мужчин

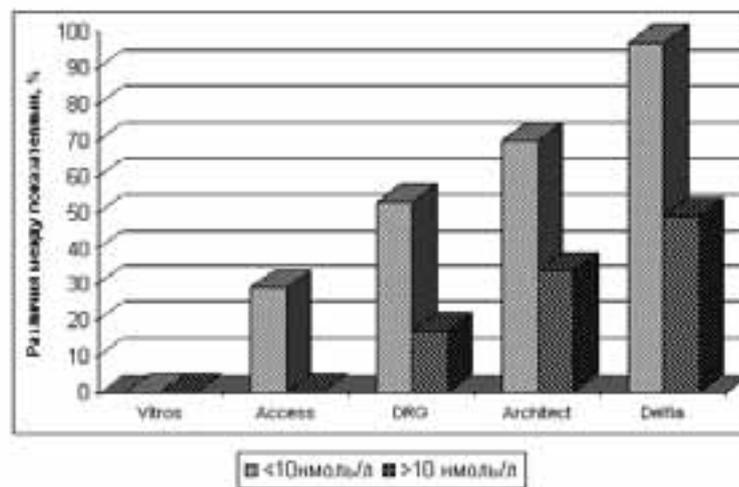


Рис. 2. Частота выявления дефицита андрогенов у 100 обследованных мужчин при сравнении с показателями тестостерона, определенными методом РИА (группа 1) и при использовании нормативов, указанных в инструкциях (группа 2). После адаптации метода и отработки нормальных значений для группы здоровых мужчин частота выявления дефицита тестостерона повысилась до 26%.

Свободный тестостерон

Как указывалось выше, тестостерон в крови циркулирует в комплексе со специфическим транспортным глобулином (ГСПС) и неспецифическим белком альбумином, который имеет низкое сродство к рецепторам, но большую емкость за счет его высокой концентрации в крови. И только 1—2% тестостерона циркулирует в крови в свободном виде. Константа ассоциации тестостерона, связанная с ГСПС, высокая (109 л/моль), тогда как с альбумином она намного ниже ($3,6 \cdot 10^4$ л/моль). Приведенные параметры определяют и скорость диссоциации тестостерона: с

ГСПС — около 20 с, а с альбумином — около 1 с, что обуславливает его биодоступность к тканям-мишеням при прохождении через стенку капилляра. Св.Т и связанный с альбумином тестостерон называется биологически активной формой гормона (био.Т).

Вопрос о биологической роли комплекса тестостерона с ГСПС остается открытым, большинство исследователей его рассматривают как буферную систему, препятствующую быстрой деградации тестостерона в печени, а некоторые авторы допускают его биологическое негеномное действие через мембранные рецепторы клетки [30].

Соотношение между свободным и связанным с белками тестостероном в физиологических условиях поддерживается на постоянном уровне. Однако при целом ряде патофизиологических ситуаций их соотношение нарушается, прежде всего, за счет изменения концентрации основного специфического транспортного белка ГСПС.

Стандартное обследование больного с подозрением на дефицит андрогенов начинается с определения общего тестостерона, поэтому неизбежны ошибки в интерпретации полученных результатов, так как остается открытым вопрос о содержании свободного и биологически доступного тестостерона, которые определяют андрогенный статус пациента.

Биологическая значимость ГСПС до настоящего времени до конца не раскрыта. Например, он продуцируется в печени только приматов (низших и человекообразных обезьян и человека). Его уровень не подчиняется суточному ритму, тогда как для уровня тестостерона такой ритм характерен.

Поскольку концентрация циркулирующего ГСПС влияет на содержание об.Т и св.Т и их соотношение, необходимо помнить о наиболее значимых факторах, изменяющих содержание ГСПС. Эндогенные и экзогенные эстрогены повышают его концентрацию, а андрогены, наоборот, снижают. Гормоны щитовидной железы увеличивают его продукцию, а при их недостатке концентрация циркулирующего ГСПС снижается. Его содержание в крови детей выше, чем у взрослых. У мужчин старше 50 лет концентрация ГСПС нарастает и тем самым снижается доля свободного биологически активного тестостерона, усугубляя тем самым формирование возрастного гипогонадизма.

Согласно теории о свободных формах циркулирующих в крови гормонов, уровень св.Т отражает андрогенный статус более адекватно, чем содержание в крови об.Т [31]. Именно поэтому определение адекватных аналитических методов св.Т обеспечило бы оптимальную диагностику андрогенного статуса пациента. Комплекс св.Т—об.Т — термодинамическая система, в которой свободная фракция гормона зависит от концентрации как об.Т, так и содержания связывающих белков, а также от уровня ассоциации и диссоциации комплекса, что определяется температурой и рН [32]. Традиционно отделение св.Т от тестостерона, связанного с белками, проводится методом равновесно диализа или методом ультрафильтрации (УФ), который появился позднее. При этом необходим ультрачувствительный и высокоспецифичный метод определения низкой концентрации св.Т в фильтрате.

Технология УФ, которая была предложена рядом авторов, действительно позволяет точно выделить св.Т и другие стероиды [33, 34]. Однако доступная в то время технология РИА не позволяла определять низкие концентрации св.Т с достаточной степенью

точности. В частности G. Hammond [3] приводит результаты определения свободных фракций гормонов (в % от общей), используя комбинацию УФ с диализом: у мужчин E2 — 2,4%, тестостерон — 1,97%, прогестерон — 2,76; у женщин (фолликулиновая фаза) E2 — 1,57%, тестостерон — 0,9%, прогестерон — 2,85%; (лютеиновая фаза) E2 — 1,52%, тестостерон — 0,85%, прогестерон — 2,54%.

Позже коммерческие диагностические компании разработали прямой безэкстракционный метод определения св.Т в сыворотке, который используется в ряде эндокринологических лабораторий, несмотря на обоснованную и аргументированную критику о недопустимости его применения для оценки содержания андрогенов [35].

Долгое время метод равновесного диализа определения св.Т и других стероидов рассматривался как «золотой стандарт». Однако в 2003 г. Европейский Комитет по Стандартизации диагностических систем и их компонентов принял решение о замене термина «золотой стандарт» другим — «референсная измерительная процедура». Для стероидных гормонов должен быть использован в качестве референсного метода метод tandemной масс-спектрометрии [36]. Принцип данного метода гарантирует точность, специфичность и снижение эффекта матрикса при количественном измерении тестостерона или любого другого стероида. Для разделения комплекса об.Т—св.Т предложено использовать технологию УФ или равновесного диализа. Группа авторов, выполнив большое сравнительное исследование, рекомендовала использовать в качестве метода, разделяющего св.Т—об.Т, прямую, более простую технологию УФ вместо диализа с последующим количественным измерением концентрации свободного тестостерона референсным методом масс-спектрометрии [37]. При такой комбинации методов авторы определяли в сыворотке мужчин содержание св.Т, составлявшего 1,8% от об.Т, а при использования диализа — 2,2%.

Определение свободного тестостерона в слюне

Неудовлетворительные и зачастую неприемлемые результаты определения об.Т с помощью автоматизированных систем послужили для нас основанием поиска альтернативных решений, и прежде всего — прямого и доступного метода определения свободной формы тестостерона (наиболее адекватного маркера андрогенного статуса как у мужчин, так и у женщин). Однако прямое определение свободной формы тестостерона в крови сопряжено с определенными технологическими трудностями. Поэтому был предложен альтернативный вариант биологической жидкости — слюна, в которую поступают только свободные формы стероидов, включая тестостерон.

Слюна как биологическая жидкость привлекла внимание исследователей почти 50 лет назад, так как слюнные железы обладают особым свойством:



в слюнной проток проникают соединения только с низкой молекулярной массой (< 400 Да), к которым относится и тестостерон, не связанный с альбумином или специфическим глобулином. Концентрация жирорастворимых свободных стероидов, таких как тестостерон, не зависит от скорости выделения слюны и соответствует уровню несвязанной формы стероида в сыворотке крови [38]. Если измерить адекватными методами концентрацию свободного тестостерона, который доступен тканям-мишеням и оказывает свое биологическое действие в этой форме, то его уровень в слюне мог бы стать оптимальным маркером для определения содержания и биологической активности андрогенов как у мужчин, так и у женщин и детей.

Сбор слюны прост, неинвазивен и имеет преимущества перед традиционными методами определения стероидов в венозной крови, так как уже забор крови является добавочным стрессорным фактором, способным исказить показатели гормональных маркеров. Необходимо отметить, что в процессе развития методов гормонального анализа неоднократно предпринимались попытки использования слюны в качестве биологической среды для диагностики гормональных нарушений. Однако, РИА-методы, а в последующем и традиционные иммуноферментные методы не обеспечивали достаточной чувствительности, необходимой для определения низких концентраций свободных стероидов в слюне. Поэтому для анализа были необходимы большие объемы слюны (до 3 мл), после сбора слюны следовала процедура экстракции диэтиловым эфиром, который является огнеопасным и взрывоопасным растворителем. В результате технологию было сложно адаптировать для повседневного использования в гормональных лабораториях.

Диагностические наборы для прямого измерения свободных стероидов, особенно для тестостерона в крови, еще не пригодны для массового диагностического использования и могут применяться лишь в научных целях [20, 39]. Как известно, группой A. Vermeulen [28] предложена формула для расчета концентрации св.Т на основе определения об.Т и ГСПС в крови. В этом случае корректное определение концентрации св.Т в крови основано на четком знании истинной концентрации об.Т, что представляет непростую задачу [20—23]. Кроме того, требуется также оптимальный метод для определения ГСПС, что значительно увеличивает стоимость расчета концентрации св.Т.

Лишь появление современной технологии иммунного анализа, основанной на усиленной хемилюминесценции [40], сочетающей высокую чувствительность и специфичность, сделало возможным определение свободных, не связанных с белками, стероидных гормонов в очень малых объемах слюны прямым методом (без экстракции). Высокая аналитическая ($6,2$ пмоль/л) и функциональная ($17,3$

пмоль/л) чувствительность позволяет количественно определять очень низкие ($2\text{—}3$ пг в пробе) концентрации тестостерона в слюне, что особенно важно для диагностики содержания андрогенов у женщин и детей. В наших исследованиях [41, 42] показано, что концентрация св.Т в слюне хорошо коррелирует и отражает концентрацию несвязанного тестостерона в крови и является дополнительным существенным диагностическим критерием для определения андрогенов у мужчин.

Наш опыт показал, что правильный сбор слюны — ключевой момент в достижении точных и воспроизводимых результатов измерения св.Т. Для этого мы разработали детальную процедуру сбора слюны.

Образцы слюны необходимо собирать в специальные контейнеры (SaliCaps, IBL) с трубочкой, изготовленные из материала, который не сорбирует стероиды. Слюна должна быть собрана не менее чем через 30 мин после еды, питья, чистки зубов или жевания жвачки. Требуется примерно 2 мин, чтобы собрать необходимое количество слюны ($0,6\text{—}0,8$ мл). Образцы с небольшим окрашиванием из-за контаминации кровью необходимо исключить. Собранная слюна может храниться до 5 дней при температуре 20°C , 10 дней при температуре $2\text{—}8^\circ\text{C}$ и 6 мес и более при температуре -20°C . Св.Т измеряется в 50 мкл слюны в дубликатах.

Ниже приведены некоторые приемы для быстрого и простого сбора слюны:

- При сборе слюны не рекомендуется делать перерыв и удалять трубочку изо рта и/или из пробирки.
- Сбор слюны становится легче, если пациент слегка сжимает зубами верхний конец трубочки
- Рекомендуется собирать слюну перед зеркалом, чтобы контролировать процесс наполнения пробирки

Мониторинг заместительной терапией андрогенами более адекватен при определении св.Т в слюне с помощью LIA-технологии. С этим методом достаточно просто изучать фармакокинетику в каждом отдельном случае, с тем чтобы подбирать оптимальную дозу препарата и пути его введения.

Таким образом, с введением в практику очень чувствительной и специфичной LIA-технологии, концентрация тестостерона в слюне может быть широко использована в качестве объективного гормонального маркера диагностики различных форм гипогонадизма у мужчин, а его определение LIA-методом может служить методом выбора для целого ряда научных исследований, мониторинга и лечения дисфункций половых желез, включая изучение фармакокинетики производных тестостерона при заместительной терапии.

Литература

1. Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Total testosterone and DHEAS levels as predictors of androgen-secreting neoplasms: a population study. *Gynecol Endocrinol.* 1999; 13(6):394-400.
2. Rittmaster R.S., Arab D.M., Lehman L. — Dose-response-effect of depot leuprolide acetate on serum androgens in hirsute women. - *Fertility Steril.* 1996; 65: 962-965.
3. Lughetti L., Prediezi B., Ferrari M. et al. — Diagnosis of central precocious puberty: endocrine assessment. - *J Pediatr Endocrinol Metabol.* 2000; 13: 709-715.
4. Choi H.H., Gray P.B., Storer T.W. et al. — Effects of testosterone replacement in human immunodeficiency virus-infected women with weight loss. - *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 1531-1541.
5. Svartberg J., Jorde R., Sundsfjord J. et al. — Seasonal variation of testosterone and waist to hip ratio in men: the Troms study - *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:3099-3104.
6. Wall J.R., Jarrett R.J., Zimmet P.Z et al. — Fall in plasma testosterone levels in normal male subjects in response to an oral glucose load. *Lancet.* 1973; 1: 967-968.
7. Jeibmann A., Zahedi S., Simoni M. et al. — Glucagon like peptide-1 reduces the pulsatile component of testosterone secretion in healthy males. - *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 565-572.
8. Vermeulen A, Kaufman J.M. — Diagnosis of hypogonadism in the aging male. - *Aging male* 2002; 5: 170-176.
9. Sarkova T., Eriksson C.J. — Testosterone increases in men after a low dose of alcohol. - *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 682-685.
10. Heikkonen E., Vlikahti R., Roine R. et al. — The combine effect of alcohol and physical exercise on serum testosterone, luteinizing hormone and cortisol in males. — *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 711-716.
11. Daly W., Seegers C.A., Rubin D.A. et al. — Relationship between stress hormones and testosterone with prolonged endurance exercise. - *Eur J Appl Physiol.* 2005; 93: 375-380.
12. Goncharov N.P. et al. — Effect of stress on the profile of plasma steroids in baboons (*papio hamodryas*). - *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1979; 90 (2), 372-384.
13. Кацяя Г.В. — Эндокринная функция тестикул у павианов гамадрилов при хроническом психоэмоциональном стрессе. — *Бюл Эксп Биол Мед.* 1984; 97(3): 285-287.
14. Goncharov N.P. et al. — Levels of adrenal and gonad hormones in rhesus monkeys during chronic hypokinesia. — *Endocrinology* 1984; 115(1): 129-135.
15. Гончаров Н.П. и др. — Характеристика стероидогенеза у обезьян при стрессе; зависимость от пола и возраста. — *Вестник Акад Мед Наук СССР* 1987; 10:88-94.
16. Vermeulen A, Kaufman J.M., Giagulli V.A. — Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgens levels in aging or obese males. - *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1821-1826.
17. Wheeler M.J. — Factors that affect the interpretation of testosterone results. - *CPD Clinifl Biochemistry* 2003; 5: 86-90.
18. DPC Technicfl Services department. - *Immulate/immulite, 1000 total testosterone — manufactures instruction. PILK7W-7, 24-4-2005, Los Angeles, USA.*
19. Carruthers M, Trinick TR, Wheeler MJ. The validity of androgen assays. *Aging Male* 2007 ;10(3):165-72.
20. Taieb J., Mathian B., Millot F. et al. — Testosterone measurement by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography- mass spectrometry in sera from 116 men, women and children. *Clin chem* 2003; 49: 1371-85.
21. Wang C., Catlin D.H., Demers L.M. et al. — Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography — tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 534-543.
22. Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, et al. .Reproductive hormone reference intervals for healthy fertile young men: evaluation of automated platform assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(11):5928-36.
23. Goncharov N, Katsya G, Dobracheva A. et al. Serum testosterone measurement in men: evaluation of modern immunoassay technologies. *Aging Male* 2005 ;8(3-4):194-202.
24. Matsumoto A. M., .Bremner W. J. Editorial: Serum Testosterone Assays—Accuracy Matters . *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 520-524,
25. Rosner W, Auchus R, Azziz R. et al. POSITION STATEMENT: Utility, Limitations, and Pitfalls in Measuring Testosterone: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 405-413.
26. Guo T, Taylor RL, Singh RJ, Soldin SJ. et al/ Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chemica Acta* 2006; 372: 76-82
27. Kushnir M., Rockwood AL, Roberts WL et al. Performance Characteristics of a Novel Tandem Mass Spectrometry Assay For Serum Testosterone. *Clin. Chem.* 2006; 52: 120 - 128.
28. Vermeulen A., Verdonc K.L., Kaufman J.M. — A critical evaluation of sample methods for the estimation of free testosterone in serum. - *J Clin Endocrinol Metab;* 1999; 84:3666-72
29. Zhan Sh. Critical review of development, validation and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/ MS methods. *Current pharmaceutical analysis,* 2005,1,3-14).
30. Schurmeyer T. Nieschlag E. Salivary and serum testosterone under physiological and pharmacological conditions. Ninth Tenovus Workshop—Immunoassays of Steroids in Saliva 1982;202-209 Alpha Omega Cardiff, Wal
31. Ekins R. The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clin Chem.* 1992 ;38(7):1289-93.
32. Obminski Z. Changes in the free (unbound) fraction of testosterone in serum in vitro as affected by pH and temperature. *Exp. Clin. Endocri. Diabetes* 1998; 106:85-88.
33. Kley H.K., Bartmann E., Kruske,per HL. A simple and rapid method to measure non-protein bound fractions of cortisol, testosterone and estradiol by equilibrium dialysis: comparison with centrifugal filtration. *Acta Endocrin.* 1977; 85:212-219.
34. Hammond G.L., Nikser J.A., Jones L.A. Sitteri R.K. Estimation of the percentage of free steroids in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration — dialysis. *J. Biol. Chem.* 1980;255:5023-26
35. Rosner W. Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J.Clin. Endocrinol.Metab* 1997; 82: 2014—5)
36. Stockl D., Franzini C, Kratochvila J, et al. Analytical specifications of reference methods compilation and critical discussion (from the members of the European EQA-Organizers Working Group B). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. biochem.* 1996;34: 319-37
37. Van Uytvanghe K, St ckl D, Kaufman JM et al. Evaluation of a Candidate Reference Measurement Procedure for Serum Free Testosterone Based on Ultrafiltration and Isotope Dilution—Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 2004; 50: 2101 - 2110.
38. Vermeulen A, Kaufman JM. Ageing of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. *Horm Res.* 1995;43(1-3):25-8. Review.
39. Rosner W. Measurement of free testosterone in Serum by DPC or DSL RIA — An Extraordinarily Inaccurate Assay for Free testosterone Is Still with Us. *J.Clin. Endocrinol.Metab* 2001;86(6): 2903-05.
40. Aldrecht S., Zimmermann T., Brandl H. et al // Chemiluminescence at the turn of the millenium — from annual fair curiosity to indispensable tool of laboratory diagnostics. *J Lab Med* 1997;21: 191 — 204.
41. Goncharov N., Katsya G., Dobracheva A. et al. — Diagnostic significance of free salivary testosterone measurement using a direct luminescence immunoassay in healthy men and in patients with disorders of androgen status. — *The Aging Male* 2006; 9: 111-122.
42. Гончаров Н.П., Кацяя Г.В., Добрачева А.Д. и др. — Диагностическая значимость определения общего тестостерона в сыворотке и свободного биологически активного тестостерона в слюне. *Пробл эндокринологии* 2007; 3: 30-35.

Поступила 30.01.2008