

Dyskusja na temat metod oceny stężenia testosteronu

Discussion on the methods of testosterone' concentration measurement

STRESZCZENIE

Testosteron to podstawowy męski hormon płciowy, oznaczanie jego stężenia ma istotne znaczenie dla oceny stopnia androgenizacji w wielu jednostkach chorobowych, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Stężenie tego hormonu, oznaczane wieloma powszechnie dostępnymi metodami nie zawsze koreluje z fenotypem klinicznym. W pracy przedstawiono dostępne metody, służące do oceny stężenia testosteronu całkowitego oraz jego frakcji (testosteronu biodostępnego i wolnego), opisując ich podstawowe cechy: wady i zalety.

Forum Medycyny Rodzinnej 2013, tom 7, nr 3, 149–154

Słowa kluczowe: wolny testosteron, testosteron biodostępny, testosteron całkowity

ABSTRACT

Testosterone is the main male sex hormone which determination is useful for assessment of androgen status in many diseases in men and women as well. It seems that serum levels of testosterone, when assayed by commonly used methods, do not correlate with clinical parameters. The aim of this review is to present available methods of measurement of total testosterone' level and its fraction (bioavailable and free) and its advantages and disadvantages.

Forum Medycyny Rodzinnej 2013, vol 7, no 3, 149–154

Key words: free testosterone, bioavailable testosterone, total testosterone

Wsurowicy testosteron występuje w formie wolnej i związanej z białkami. Głównymi proteinami, biorącymi udział w transporcie testosteronu we krwi, są albuminy oraz białka wiążące hormony płciowe (SHBG, *sex hormone binding globulin*). Testosteron wiąże się z al-

buminami za pomocą luźnych połączeń, ale z uwagi na stosunkowo duże stężenie albumin w surowicy połączenie to odgrywa istotną rolę. W tabeli 1 przedstawiono procentowy udział poszczególnych białek w transporcie testosteronu w surowicy u kobiet [1]. Tylko około 1,5–2% puli całkowitego testosteronu w suro-

Dorota Szydłarska¹,
Tadeusz Budlewski¹,
Ewa Bar-Andziak²

¹Pododdział Terapii Izotopowej Kliniki Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Diabetologii Centralny Szpital Kliniczny MSWiA, Warszawa
²Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa

Adres do korespondencji:

Ilek. Dorota Szydłarska
Pododdział Terapii Izotopowej Kliniki Chorób Wewnętrznych, Endokrynologii i Diabetologii CSK MSWiA
ul. Wołoska 137
02-507 Warszawa
tel.: (22) 508 17 39
e-mail: dszydłarska@op.pl

Copyright © 2013 Via Medica
ISSN 1897-3590

Tabela 1

Procentowy udział poszczególnych białek w transporcie testosteronu, z uwzględnieniem fazy cyklu miesięczkowego i informacji, czy kobieta biorąca udział w badaniu jest w ciąży

	Stężenie testosteronu całkowitego w surowicy (nM/l)	Testosteron niezwiązany [%]	Testosteron związany z białkami		
			SHBG [%]	CBG [%]	Albuminy [%]
Faza folikularna	1,3	1,36	66	2,24	30,4
Faza lutealna	1,3	1,37	65,7	2,2	30,73
Ciąża	4,7	0,23	95,4	0,82	3,55

SHBG (sex hormone binding globulin) — białka wiążące hormony płciowe; CBG (cortisol binding globulin)

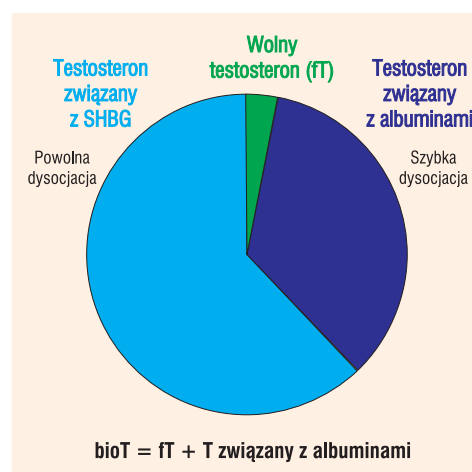
Tylko około 1,5–2% puli całkowitego testosteronu w surowicy nie jest związane z białkami i uznawane jest za frakcję wolną — czynną biologicznie

Frakcje hormonów wolnych i związanych z białkami pozostają w równowadze

wicy nie jest związane z białkami i uznawane jest za frakcję wolną — czynną biologicznie. Pojęcie testosteronu biodostępnego dotyczy testosteronu związanego z albuminami oraz wolnego (ryc. 1). Zgodnie z teorią wolnych hormonów, postać hormonu niezwiązana z białkami odpowiednimi receptorami może wnikać do wnętrza komórki, a następnie wpływać na ich czynność i metabolizm [2]. Frakcje hormonów wolnych i związanych z białkami pozostają w równowadze. Jeżeli hormon przedostaje się do wnętrza komórki, odpowiednia część frakcji hormonu związanej z białkami dysocjuje się, zachowując równowagę. W stanach klinicznych charakteryzujących się zwiększoną syntezą białek wiążących hormony płciowe (kobiety ciężarne, stosujące tabletki antykoncepcyjne lub leki przeciwpadaczkowe, z nadczynnością tarczycy) stężenie hormonów całkowitych zwiększa się, natomiast frakcja wolna pozostaje niezmienną.

Poważnym problemem klinicznym jest rozbieżność wyników oznaczeń stężenia testosteronu, uzyskiwanych różnymi metodami laboratoryjnymi, co szczególnie dotyczy kobiet, ponieważ mają niższe stężenie testosteronu niż mężczyźni [3].

Pomimo wielu szlaków przemian androgenów, stężenie mierzone jest tylko w niektórych spośród nich [4, 5]. Istotnym czynnikiem dla oceny znaczenia biologicznego jest powinowactwo hormonu do receptora: jeżeli za wartość referencyjną równą „1” przyjmiemy zdolność wiązania receptora przez testosteron, to dihydrotestosteron ma powinowactwo



Rycina 1. Frakcje testosteronu w surowicy

równe „5”, prekursorzy androgenów DHEA-S, DHEA i androstendion — odpowiednio — 0,001, 0,01 i 0,1. Działanie androgenne jest determinowane przez:

- stężenie androgenów w surowicy,
- siłę wiązania z białkami,
- stopień konwersji do innych steroidów,
- siłę biologicznego działania — zdolność wiązania receptora androgenowego [6].

Analiza stężenia testosteronu ma szczególnie istotne znaczenie dla oceny stopnia androgenizacji. W praktyce klinicznej stężenie tego hormonu nie zawsze koreluje z objawami klinicznymi. Metodą referencyjną oznaczania stężenia wolnego testosteronu jest dializa równowagowa, zaś testosteronu biodostępnego — precypitacja z wysyconym siarczanem amonu. Wymienione metody są jednak pracochłonne oraz wymagają skomplikowanej aparatury. Zakres wartości referencyjnych dla testostero-

nu nie był ustanowiony za pomocą dobrze zdefiniowanej zdrowej populacji, a wiek, wskaźnik masy ciała, faza cyklu miesięczkowego ani pora dnia nie były brane pod uwagę [7, 8].

Wobec szerokiej dyskusji na temat dokładności powszechnie stosowanych testów oceniających stężenie testosteronu w surowicy, w 2007 roku Towarzystwo Endokrynologiczne wydało oświadczenie, zgodnie z którym u osób z niskim stężeniem testosteronu w surowicy zalecono przeprowadzenie diagnostyki, a następnie monitorowanie leczenia przy zastosowaniu metody RIA (*radioimmuno assay*), poprzedzonej ekstrakcją, lub spektrometrii masowej [3].

METODY OZNACZANIA STĘŻENIA TESTOSTERONU CAŁKOWITEGO

Metoda spektrometrii masowej

Spektrometria masowa, poprzedzona ekstrakcją, chromatografią gazową lub cieczową, może służyć jako metoda ilościowa lub jakościowa do oceny stężenia testosteronu w surowicy [3, 9–13]. W wielu pracach badawczych traktowana jest jako metoda referencyjna dla oznaczeń stężenia testosteronu całkowitego w surowicy. Zaletą spektrometrii masowej jest wysoka swoistość i czułość. Do jej wad należą wysoki koszt oznaczenia, czasochłonność procedury i konieczność posiadania dużego doświadczenia przez personel laboratoryjny i specjalistycznego wyposażenia laboratoryjnego [14].

Metoda radioimmunologiczna

Dość powszechnie wykorzystywana metoda radioimmunologiczna, jeśli poprzedzona jest chromatografią kolumnową lub ekstrakcją, charakteryzuje się dużą czułością, dokładnością i specyficznością. Wadą tej metody są czasochłonność oznaczeń i wymóg dużego doświadczenia pracowników laboratorium. Wynik badania w znacznej mierze zależy od specyficzności wiązania hormonu przez przeciwciała [15].

Metody immunochemiczne bezpośrednie

Metody immunochemiczne [RIA, metoda radioimmunologiczna; ELISA (*enzyme-linked*

immunosorbent assay) immunoenzymatyczna) polegają na wykrywaniu reakcji antygen-ze swoistym dla niego przeciwciałem na podstawie pomiaru radioaktywności izotopu, którym wyznakowany jest jeden ze składników reakcji (antygen lub przeciwciało), bądź też reakcji enzymatycznej, w których stosuje się przeciwciała lub antygeny znakowane odpowiednimi enzymami. U kobiet, ze względu na stosunkowo niskie stężenie testosteronu w porównaniu do mężczyzn, wykazano mniejszą przydatność diagnostyczną metod bezpośrednich oznaczania stężenia testosteronu całkowitego. Mała czułość testów immunochemicznych, szczególnie w przypadku analizy stężenia testosteronu u kobiet, powoduje uzyskanie fałszywych wyników — zaniżonych lub zawyżonych. Błąd metody jest tym większy im niższe jest stężenie testosteronu w surowicy [10, 16, 17]. Analiza wyników oznaczenia stężenia testosteronu całkowitego w surowicy, przeprowadzonych różnymi testami z zastosowaniem metody RIA, dowiodła, że wyniki są mało porównywalne i niedostatecznie powtarzalne [10, 17, 18].

METODY OZNACZANIA STĘŻENIA TESTOSTERONU WOLNEGO

Metoda dializy równowagowej

Metoda dializy równowagowej, polegająca na dodaniu $^3\text{H-T}$ (testosteronu znakowanego trytem) do badanej próbki, uzyskaniu stanu równowagi w wystandaryzowanych warunkach, a następnie przeprowadzeniu pomiaru jej radioaktywności, umożliwia pośrednie oszacowanie stężenia wolnego testosteronu. Metoda ta, uznawana za złoty standard w oznaczaniu stężenia wolnego testosteronu w surowicy, cechuje się wieloma niedogodnościami znacznie ograniczającymi możliwość wykorzystywania jej w codziennej praktyce [19]. Do jej wad należą: pracochłonność i czasochłonność wykonywania pomiarów, obecność zanieczyszczeń radiologicznych, wysoki koszt badania oraz długi czas trwania wyliczeń. Stopień oczyszczenia izotopu



Metodą referencyjną oznaczania stężenia wolnego testosteronu jest dializa równowagowa, zaś testosteronu biodostępnego — precypitacja z wysyconym siarczanem amonu

i rozcieńczenia surowicy mogą wpływać na wyniki oznaczeń. Ostateczny wynik badania jest pochodną pomiaru stężenia testosteronu całkowitego w surowicy [20].

■ Ultrafiltracja z wirowaniem

Metoda ultrafiltracji z wirowaniem w celu oznaczenia stężenia testosteronu wolnego w surowicy polega na dodaniu do badanej próbki testosteronu znakowanego trytem ($^3\text{H-T}$). Po osiągnięciu stanu równowagi — za pomocą ultrafiltracji przyspieszonej wirowaniem — pomiędzy testosteronem całkowitym nieznakowanym a radioaktywnym, następuje oddzielenie frakcji wolnego testosteronu. Za pomocą pomiaru radioaktywności odseparowanej próbki, można wyliczyć wartość procentową testosteronu wolnego. Możliwość absorpcji testosteronu na błonie filtracyjnej, jest potencjalnym powodem uzyskiwania niższych stężeń hormonów [3].

■ Metoda immunologiczna

Stężenie wolnego testosteronu można również bezpośrednio oznaczać za pomocą metod RIA lub ELISA. Oznaczenia są wykonywane bezpośrednio w surowicy albo po wcześniejszym jej przygotowaniu za pomocą ekstrakcji i/lub chromatografii. Zastosowanie tej metody może powodować uzyskanie znacznie niższych wyników stężeń wolnego testosteronu w porównaniu do metody złotego standardu — dializą równowagową [21, 22]. Testy immunoenzymatyczne, oceniające stężenie wolnego testosteronu w surowicy, mierzą jedynie około 20–30% stężenia hormonu oznaczanego metodą dializy równowagowej [19, 23, 24]. Wobec powyższych danych przydatność tej metody w diagnostyce zespołów hiperandrogenizacji u kobiet jest ograniczona.

METODY KALKULACYJNE WYKORZYSTYWANE W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Stężenie testosteronu wolnego może być wyliczone za pomocą równania matematycznego,

wykorzystującego stałą wartość wiązania testosteronu z białkami (SHBG i albuminy) [19]:

$$TT = \frac{K_s \times \text{SHBG} \times \text{FT}}{1 + (K_s \times \text{FT})} + \frac{K_a \times \text{Alb} \times \text{FT}}{1 + (K_a \times \text{FT})} + \text{FT}$$

TT (*total testosterone*) — całkowity testosteron (mol/l); FT (*free testosterone*) — wolny testosteron (mol/l). K_a stała — siła wiązania testosteronu z SHBG (nmol/l); K_s stała — siła wiązania testosteronu z albuminami (mg/ml)

Wadą tej metody jest zależność wyniku od wyniku oznaczenia stężenia białek w surowicy. Pomocny w obliczeniach stężenia testosteronu wolnego przy zastosowaniu metody kalkulacyjnej jest wzór dostępny na stronie internetowej <http://www.issam.ch/freetesto.htm>.

■ Indeks wolnych androgenów

Indeks wolnych androgenów służy oszacowaniu ich liczby, może być wyliczony za pomocą równania:

$$\text{FAI} = T \text{ (nmol/l)} / \text{SHBG (nmol/l)} \times 100$$

Wielu naukowców kwestionuje zasadność wyliczania FAI (*free androgen index*). Wyznaczenie wartości wolnego testosteronu w surowicy za pomocą FAI powoduje uzyskiwanie wartości niższych, w porównaniu do wyników uzyskanych za pomocą dializy równowagowej [12, 13, 25, 26].

METODY OZNACZANIA STĘŻENIA TESTOSTERONU BIODOSTĘPNEGO

■ Metoda precipitacji z wysyconym siarczanem amonu

Testosteron biodostępny (wolny i związany z albuminami) jest uznawany za postać biologicznie aktywną [27]. Metodą referencyjną oznaczenia stężenia testosteronu biodostępnego jest precipitacja z zastosowaniem wysyconego siarczanu amonu, która polega na dodaniu do analizowanej próbki testosteronu znakowanego trytem ($^3\text{H-T}$), oznaczeniu radioaktywności, a następ-

nie dodaniu siarczanu amonu w celu wytrącenia białek (w tym także SHBG) [15, 19, 28]. Po odwirowaniu badanej próbki frakcje $^3\text{H-T}$ wolny i $^3\text{H-T}$ związany z albuminami pozostają w supernatancie. Kolejnym etapem diagnostycznym jest oznaczenie radioaktywności w supernatancie i wyliczenie odsetka testosteronu biodostępnego albo bezpośrednio oznaczenie stężenia testosteronu w supernatancie metodą RIA [27]. Ograniczeniem tej metody jest możliwość niepełnej precypitacji globulin, jak również jej czasochłonność i pracochłonność [19].

METODY KALKULACYJNE WYKORZYSTYWANE W PRAKTYCE KLINICZNEJ

Stężenie testosteronu biodostępnego, podobnie jak testosteronu wolnego, może być wyliczone za pomocą odpowiedniego równania matematycznego [19]:

$$TT = \frac{K_s \times \text{SHBG} \times \text{FT}}{1 + (K_s \times \text{FT})} + \frac{K_a \times \text{Alb} \times \text{FT}}{1 + (K_a \times \text{FT})} + \text{FT}$$

TT (*total testosterone*) — całkowity testosteron (mol/l); FT (*free testosterone*) — wolny testosteron (mol/l). K_a stała — siła wiązania testosteronu z SHBG (nmol/l); K_s stała — siła wiązania testosteronu z albuminami (mg/ml).

Pomocny jest także wzór dostępny na stronie internetowej <http://www.issam.ch/freetesto.htm>.

WYKORZYSTANIE ŚLINY W DIAGNOSTYCE HORMONALNEJ

W ślinie można oznaczać związki, które przechodzą na zasadzie dyfuzji. Spośród hormonów są nimi: testosteron, androstendion, DHEA, 17-OH-progesteron. Pobranie śliny do badania jest proste przy zachowaniu podstawowych zasad. Transport śliny, jako materiału wykorzystywanego do diagnostyki laboratoryjnej, nie wymaga specjalnej procedury, a związki oznaczane w ślinie charakteryzują się zwykle dużą trwałością. Dotychczasowe

dane na temat zastosowania oznaczeń hormonalnych w ślinie w diagnostyce zespołów hiperandrogenizacji u kobiet są ograniczone. Jest wiele doniesień na temat obecności podwyższonych stężeń androgenów u zdrowych kobiet w niestandardowych warunkach (wysiłek fizyczny, stosunek płciowy, stres) [29, 30].

PODSUMOWANIE

Dane z piśmiennictwa wskazują, że u kobiet z klinicznymi objawami hiperandrogenizacji stężenie androgenów w surowicy może mieścić się w zakresie referencyjnym. W praktyce klinicznej stężenie testosteronu nie zawsze koreluje z parametrami klinicznymi. Należy podkreślić, że analiza wyłącznie stężenia testosteronu całkowitego w surowicy nie jest wystarczająca do oceny androgenemii, szczególnie u kobiet. Czułość i specyficzność testów laboratoryjnych jest niedostateczna u kobiet oraz u mężczyzn z objawami hipogonadyzmu, z powodu niskich stężeń androgenów. Pomiar stężenia wolnego testosteronu w surowicy, jako uzupełnienie diagnostyki, obok stężenia całkowitego testosteronu, wydaje się być niezbędny. Testy służące do bezpośredniego oznaczania stężenia wolnego testosteronu w surowicy nie powinny być stosowane z uwagi na brak odpowiedniej czułości. Metody dializy równowagowej i precypitacji z wysyconym siarczanem amonu są pracochłonne oraz wymagają wykorzystania skomplikowanej aparatury [19, 22]. Z tego powodu do oceny stężenia zarówno wolnego, jak i biodostępnego testosteronu wprowadzono metodę kalkulacyjną, wymagającą znajomości stężenia albumin, SHBG i testosteronu całkowitego. Niższe stężenia androgenów w surowicy u kobiet, w porównaniu do mężczyzn, są powodem mniejszej czułości testów diagnostycznych. Błąd w którymś z oznaczeń wpływa na uzyskanie fałszywie dodatnich lub ujemnych wyników, co ma szczególne znaczenie u kobiet z objawami hiperandrogenizacji. Idealna metoda określenia stopnia androgenemii nadal pozostaje przedmiotem dyskusji.

PIŚMIENICTWO

1. Dunn J.F., Nisula B.C., Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1981; 53: 58–68.
2. Mendel C.M. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J. Androl.* 1992; 13: 107–116.
3. Rosner W., Auchus R.J., Azziz R. i wsp. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 405–413.
4. Rittmaster R.S. Androgen conjugates: physiology and clinical significance. *Endocr. Rev.* 1993; 14: 121–132.
5. Wilson J.D., Leihy M.W., Shaw G. i wsp. Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; 198: 1–5.
6. Jakiel G., Baran A. Androgen deficiency in women. *Endokrynol. Pol.* 2005; 6: 1016–1020.
7. Morán C., Knochenhauer E., Boots L.R. i wsp. Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass. *Fertil. Steril.* 1999; 71: 671–674.
8. Bili H., Laven J., Imani B. i wsp. Age-related differences in features associated with polycystic ovary syndrome in normogonadotrophic oligo-amenorrhoeic infertile women of reproductive years. *Eur. J. Endocrinol.* 2001; 145: 749–755.
9. Dorgan J.F., Fears T.R., McMahon R.P. i wsp. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids.* 2002; 67: 151–158.
10. Taieb J., Mathian B., Millot F. i wsp. 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: 1381–1395.
11. Kushnir M.M., Rockwood A.L., Roberts W.L. i wsp. Performance characteristics of a novel tandem mass spectrometry assay for serum testosterone. *Clin. Chem.* 2006; 52: 120–128.
12. Rauh M., Groschl M., Rascher W. i wsp. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxyprogesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids.* 2006; 71: 450–458.
13. Van Uytvanghe K., Stockl D., Kaufman J.M. i wsp. 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.
14. Singh R.J. Validation of a high throughput method for serum/plasma testosterone using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Steroids.* 2008; 73: 1339–1344.
15. Stanczyk F.Z. Diagnosis of hyperandrogenism: Biochemical criteria. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 20: 177–191.
16. Taieb J., Benattar C., Birr A.S. i wsp. Limitations of steroid determination by direct immunoassay. *Clin. Chem.* 2002; 48: 583–585.
17. Wang C., Catlin D.H., Demers L.M. i wsp. 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.
18. Boots L.R., Potter S., Potter D. i wsp. Measurement of total serum testosterone levels using commercially available kits: high degree of between-kit variability. *Fertil. Steril.* 1998; 69: 286–292.
19. Vermeulen A., Verdonck L., Kaufman J.M. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 10: 3666–3672.
20. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr. Rev.* 1990; 11: 5–46.
21. Winters S.J., Kelley D., Goodpaster B. The analog free testosterone assays: are the results in men clinically useful. *Clin. Chem.* 1998; 44: 2178–2182.
22. Rosner W. Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 2014–2015.
23. Gruschke A., Kuhl H. Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum. *Fertil. Steril.* 2001; 76: 576–582.
24. Morley J.E., Patrick P., Perry H.M. Evaluation of assays available to measure free testosterone. *Metabolism.* 2002; 51: 554–559.
25. Thienpont L.M., Van Nieuwenhove B., Stockl D. i wsp. Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years' experience of two European Reference Laboratories. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996; 34: 853–860.
26. Stanczyk F.Z., Cho M.M., Endres D.B. i wsp. Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids.* 2003; 68: 1173–1178.
27. Manni A., Pardridge W.M., Cefalu W. i wsp. Bioavailability of albumin-bound testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1985; 61: 705–710.
28. Emadi-Konjin P., Bain J., Bromberg I.L. Evaluation of an algorithm for calculation of serum „bioavailable” testosterone (BAT). *Clin. Biochem.* 2003; 36: 591–596.
29. Hooper A.E., Gangestad S.W., Thompson M.E. i wsp. Testosterone and romance: the association of testosterone with relationship commitment and satisfaction in heterosexual men and women. *Am. J. Hum. Biol.* 2011; 23: 553–555.
30. Nunes J.A., Crewther B.T., Ugrinowitsch C. i wsp. Salivary hormone and immune responses to three resistance exercise schemes in elite female athletes. *J. Strength. Cond. Res.* 2011; 25: 2322–2327.