



Niektóre problemy związane z oznaczaniem testosteronu

Some problems with testosterone determination

Barbara Mroczo¹, Marek Mędraś^{2,3}

¹Zakład Diagnostyki Biochemicznej Akademii Medycznej, Białystok

²Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Akademii Medycznej, Wrocław

³Katedra i Zakład Medycyny Sportowej Akademii Wychowania Fizycznego, Wrocław

Streszczenie

Testosteron jest głównym męskim hormonem płciowym, którego oznaczanie ma istotne znaczenie do oceny stopnia androgenizacji w różnych stanach chorobowych. W powszechnym odczuciu lekarzy praktyków stężenie tego hormonu, oznaczane dostępnymi metodami, nie zawsze koreluje z parametrami klinicznymi. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest fakt, że wyżej wymienione metody diagnostyczne pozwalają na oznaczanie głównie testosteronu całkowitego, nie dają zaś informacji o stężeniu aktywnej biologicznie frakcji tego hormonu. W niniejszej pracy przedstawiono celowość i metody oznaczania testosteronu oraz jego frakcji, jak również czynniki wpływające na wyniki tych oznaczeń.

(*Endokrynol Pol 2007; 58 (5): 440–445*)

Słowa kluczowe: wolny testosteron, testosteron biodostępny

Abstract

Testosterone is the main male sex hormone which determination is useful for assessment of androgen status. It seems that serum levels of testosterone, when assayed by commonly used methods, do not correlate with clinical parameters. One of the causes may be that these assays are suitable for determination of total testosterone, but not for measurement of biologically active forms of this hormone. The aim of this review is to present usefulness of testosterone measurement and its bioactive forms determination as well as factors influencing on their levels.

(*Pol J Endocrinol 2007; 58 (5): 440–445*)

Key words: free testosterone, bioavailable testosterone

Wstęp

Testosteron ($C_{19}H_{28}O_2$) jest głównym męskim hormonem płciowym [1]. Jego oznaczanie ma istotne znaczenie do oceny stopnia androgenizacji w różnych stanach chorobowych u dzieci, młodzieży, kobiet i — przede wszystkim — u mężczyzn.

W powszechnym odczuciu lekarzy praktyków stężenie tego hormonu, oznaczane powszechnie dostępnymi metodami, nie zawsze koreluje ze stanem klinicznym pacjenta, jak również ze stężeniami innych hor-

monów, np. hormonu luteinizującego (LH, *luteinizing hormone*), lub metabolitów testosteronu, takich jak dwuhydrotosteron (DHT). Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest fakt, że powszechnie dostępne metody diagnostyczne pozwalają na oznaczanie głównie testosteronu całkowitego, nie dają zaś informacji o stężeniu aktywnej biologicznie frakcji tego hormonu, jaką jest testosteron wolny (fT). W niniejszej pracy podjęto próbę przedstawienia najważniejszych problemów diagnostycznych związanych z oznaczaniem testosteronu, ograniczeń metodycznych i różnych czynników wpływających na wyniki jego oznaczeń.

Charakterystyka ogólna testosteronu

U mężczyzn testosteron produkowany jest głównie przez komórki Leydiga (około 5–7 mg/dobę). Z kory nadnerczy (razem z konwersją obwodową z androstendionu)



Prof. dr hab. med. Marek Mędraś
Katedra i Zakład Medycyny Sportowej
Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu
Al. I.J. Paderewskiego 35, 51-612 Wrocław
tel./faks: (071) 784 25 53

Tabela I
Frakcje testosteronu całkowitego

Table I
Total testosterone fractions

Różne formy wiązania testosteronu z białkiem	Rodzaj białka wiążącego testosteron	Procent testosteronu całkowitego
Testosteron wolny	–	1–2% u obu płci
Silnie związane	Globulina wiążąca hormony płciowe (SHBG)	44–65% u mężczyzn 66–78% u kobiet
Słabo związane	Albumina Globulina wiążąca kortykosteroidy (CBG)	33–54% u mężczyzn 20–32% u kobiet

SHBG (*sex hormone binding globulin*) — białko wiążące hormony płciowe; CBG (*corticosteroid-binding globulin*) — globulina wiążąca kortykosteroidy

pochodzi około 500 μg /dobę. Testosteron jest syntetyzowany z cholesterolu, wychwytywanego z krążenia przez endocytozę cząsteczek LDL, gromadzonych następnie w komórce pod postacią wakuoli lipidowych. Małe znaczenie ma endogenna synteza cholesterolu w komórkach Leydiga. Biosynteza testosteronu z pregnenolonu może odbywać się dwoma szlakami — progesteronowym (główny) i dehydroepiandrosteronowym [2].

Metabolizm testosteronu i związków pochodnych odbywa się głównie w wątrobie, w wyniku czego powstają: etiocholanolon, androsteron, androstendiol. Hormony te po sprzężeniu z grupami SH i kwasem glukuronowym wydalane są z moczem [3]. Ilość testosteronu wydalanego w ten sposób jest nieznaczna.

Testosteron ulega przemianom modyfikującym sygnał hormonalny w zależności od rodzaju tkanki, na którą oddziałuje. Aromataza, występująca głównie w tkance kostnej, tłuszczowej, jądrach, sutkach i gruczole krokowym, przekształca testosteron oraz jego prekursor — androstendion — w estradiol. Z kolei istniejąca w postaci dwóch izoenzymów 5α -reduktaza funkcjonuje jako wzmacniacz sygnału hormonalnego i powoduje w tkankach docelowych przekształcenie testosteronu do innego metabolitu testosteronu — DHT (dihydrotestosteron), wykazującego 2–6 razy większe powinowactwo z receptorem androgenowym niż związek wyjściowy. Dobowa produkcja DHT wynosi około 0,4 mg, przy czym większość obecnego w ustroju związku pochodzi z konwersji obwodowej — w jądrach powstaje jedynie 7 μg /dobę. 5α -reduktaza występuje przede wszystkim w prąciu, mosznie, gruczole krokowym, skórze i wątrobie. W mięśniach szkieletowych testosteron działa bezpośrednio na receptory androgenowe, których jest mniej niż w innych androgenozależnych tkankach (np. gruczoł krokowy). W mięśniach szkieletowych nie występuje 5α -reduktaza, w związku z czym nie działa na nie DHT.

Około 98% krążącego we krwi testosteronu występuje w formie związanej z białkami (tab. I). U mężczyzn około 44–65% tego hormonu wiąże się z globuliną wiążącą hormony płciowe (SHBG, *sex hormone binding globulin*), tworząc formę testosteronu o małej aktywności biologicznej, ale trwałym i specyficznym wiązaniu [4, 5]. Pozostałe 33–54% tego hormonu słabo wiąże się z albuminą i globuliną wiążącą kortykosteroidy (CBG, *corticosteroid-binding globulin*). U kobiet 66–78% testosteronu wiąże się z SHBG, a 20–32% z albuminą i CBG [4, 5]. Jedynie 1–2% to wolny, biologicznie aktywny testosteron [3, 6].

Pojęcia „testosteronu wolnego” nie należy mylić z „testosteronem biodostępnym” (BAT, *bioavailable testosterone*), określanym również jako testosteron niezwiązany z SHBG (*non-SHBG*) (ryc. 1). W endokrynologii zwyczajowo utożsamia się te dwa określenia, co prowadzi czasem do nieporozumień. W skład testosteronu biodostępnego (BAT), oprócz wolnego testosteronu (fT), wchodzi także testosteron związany z albuminami [3, 5–7] — a zatem fT jest częścią biodostępnego testosteronu. Testosteron biodostępny, podobnie jak fT, jest łatwo dostępny dla komórek docelowych [5, 7]. Uważa się, iż obie formy testosteronu (BAT i fT) odzwierciedlają bioaktywność tego hormonu oraz status androgenów i mogą być uważane za markery androgeniczności [3, 6, 7].

$$\text{Całkowity testosteron} = \text{wolny T} + \text{albumina-T} + \text{SHBG-T}$$

$$\underbrace{\hspace{10em}}_{\text{Biodostępny testosteron (BAT)}}$$

Rycina 1. *Frakcje testosteronu, różnica między testosteronem biodostępnym (BAT) i testosteronem wolnym*

Figure 1. *Testosterone fractions the difference between bioavailable testosterone and free testosterone*

Bezpośredni wpływ na stężenie testosteronu mają zmiany poziomu SHBG zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet [8]. Białko to, identyczne z występującym w jądrach białkiem wiążącym androgeny jądrowe (ABP, *androgen binding protein*), jest allosteryczną glikoproteiną o masie cząsteczkowej 90 kD. Gen kodujący SHBG znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 17 [9], zaś synteza tej globuliny odbywa się głównie w wątrobie. SHBG ma dwa miejsca wiążące: dla hormonu steroidowego i dla receptora błonowego. Białko to ma powinowactwo do endogennych hormonów płciowych, a jego stężenie u kobiet w wieku rozrodczym jest około 2-krotnie wyższe niż u mężczyzn [9]. Wykazano produkcję miejscową SHBG w takich tkankach, jak: endometrium, jajowody, gruczoł piersiowy i gruczoł sterczowy. Białko wiążące hormony płciowe wiąże się z DHT i estradiolem, natomiast słabo łączy androstendion i dehydroepiandrosteron (DHEA).

W hiperandrogenizmie, hirsutyzmie, wirylizacji, otyłości i w okresie pokwitania, a także w przebiegu zespołu policystycznych jajników, zmniejszają się stężenia SHBG [9]. Również pod wpływem insuliny, glikokortykoidów, androgenów (i substancji androgenno-anabolicznych) oraz hormonu wzrostu dochodzi do obniżenia stężenia tego białka [9].

Wzrost stężenia SHBG może występować u mężczyzn z hipogonadyzmem czy z niedoborem androgenów [9]. Ponadto podwyższony poziom SHBG wykazano w nadczynności tarczycy, chorobach wątroby, anoreksji, przewlekłym stresie oraz przy długotrwałym wysiłku fizycznym, przy stosowaniu diety ubogotłuszczowej, wysoko węglowodanowej, bogatej w fitoestrogeny i izoflawony [9] oraz pod wpływem estrogenów, w marskości wątroby czy w procesie starzenia się. Oznaczanie stężenia SHBG umożliwia ocenę statusu wolnych/biodostępnych androgenów i jest ważnym parametrem w diagnostyce niedoboru androgenów u mężczyzn lub hiperandrogenizmu u kobiet [9].

Metody oznaczania testosteronu całkowitego

Metoda radioimmunologiczna

Metodą do oznaczania całkowitego testosteronu o dużej czułości, dokładności i swoistości jest metoda radioimmunologiczna poprzedzona chromatografią kolumnową lub ekstrakcją rozpuszczalnikami organicznymi. Jest to metoda bardzo wiarygodna, ale czasochłonna [3].

Spektrometria masowa

Do oznaczania androgenów wykorzystuje się także metodę spektrometrii masowej połączoną z chromatografią gazową (GC-MS) i chromatografią cieczową

(LC-MS) [3]. Cechuje się ona wysoką swoistością i czułością, a jej dużą wiarygodność porównuje się z RIA związaną z chromatografią/ekstrakcją. Wadą tej metody jest wysoki koszt oznaczeń [3].

Metody bezpośrednie

Najwcześniej stosowaną metodą bezpośrednią jest metoda radioimmunologiczna RIA z zastosowaniem znakowanego izotopem jodu ^{125}I testosteronu, który konkuruje z testosteronem z badanej próby o miejsce wiązania na skierowanych przeciwko niemu przeciwciałach [3, 10]. Oprócz RIA, stosuje się także metody immunoenzymatyczne: MEIA — metoda immunoenzymatyczna z zastosowaniem mikrocząsteczek, ELISA — mikroimmunoenzymatyczna oraz metoda chemiluminescencyjna [3]. Wykazano wyższą przydatność diagnostyczną bezpośrednich metod oznaczania całkowitego testosteronu u mężczyzn [11] w porównaniu z kobietami [8, 12].

Metody oznaczania testosteronu wolnego

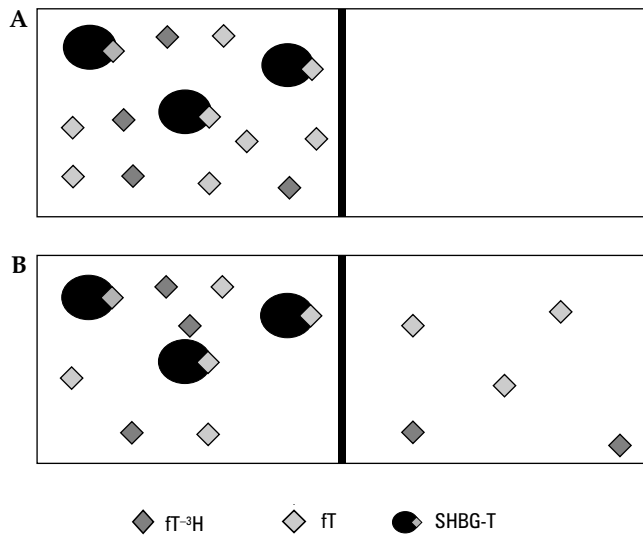
Najczęstszym wskazaniem do oznaczania fT jest potwierdzenie hipogonadyzmu u mężczyzn oraz hiperandrogenizmu u kobiet, gdy oznaczone stężenie całkowitego testosteronu jest na granicy wartości prawidłowych lub jeśli rozpoznanie kliniczne i stężenie całkowitego testosteronu dają rozbieżne informacje [12].

Metoda dializy równowagowej

Wielu autorów wskazuje, iż najdokładniejszą, a zarazem najbardziej pracochłonną metodą oznaczania wolnego testosteronu jest obecnie metoda dializy równowagowej (*equilibrium dialysis*), która w najnowszych modyfikacjach osiąga czułość 0,6 pg/ml [13]. Jest to metoda referencyjna i uznawana za „złoty standard” [6]. W próbce oznacza się stężenie testosteronu całkowitego przy użyciu metody RIA (metoda radioimmunologiczna). Następnie dodaje się znaną, niewielką ilość testosteronu znakowanego trytem (^3H -testosteron) (ryc. 2). Kolejny etap zachodzi w komorze dializacyjnej, gdzie dochodzi do rozdzielenia form testosteronu związanej z białkami i testosteronu wolnego. Jedynie fT przenika przez błonę dializacyjną. Po oznaczeniu ilości znakowanego testosteronu (^3H -testosteron) wylicza się, jaki procent dodanego znakowanego testosteronu stanowi oznaczona ilość. Ostatnim etapem jest wyliczenie stężenia fT przez pomnożenie otrzymanej wartości przez stężenie całkowitego testosteronu [3].

Metoda kalkulacyjna

Stężenie wolnego (fT) oraz biodostępnego testosteronu (BAT) może być wyliczone ze stężeń całkowitego testosteronu, SHBG i albuminy za pomocą odpowiedniego algorytmu matematycznego wykorzystującego



Rycina 2. Schemat metody dializy równowagowej: **A.** przed dializą — metodą RIA oznacza się stężenie testosteronu całkowitego w próbce, dodaje się niewielką ilość testosteronu znakowanego trytem ($ft\text{-}^3H$) i poddaje dializie; **B.** przez membranę przenika testosteron wolny (ft i $ft\text{-}^3H$), testosteron związany z białkami ($SHBG\text{-}T$) pozostaje w próbce; po ustaleniu stanu równowagi oznacza się stężenie $ft\text{-}^3H$ w płynie dializacyjnym i wylicza stężenie wolnego testosteronu ft

Figure 2. Equilibrium dialysis scheme: **A.** Before dialysis – total testosterone in a blood sample is determined by the RIA method and small amount of radiolabelled testosterone ($ft\text{-}^3H$) is added. **B.** Free testosterone (ft and $ft\text{-}^3H$) permeates through the membrane; protein-bound testosterone ($SHBG\text{-}T$) remains in the sample; once equilibrium is achieved, $ft\text{-}^3H$ level is determined in the dialysis solution and free testosterone (ft) is calculated.

stałe wiązania (*binding constants*) testosteronu z wymienionymi białkami [3, 6]. Kalkulatory służące do wyliczenia wolnego testosteronu są dostępne na stronach internetowych, na przykład www.issam.ch/freeteststo.htm. W odpowiednie pola należy wprowadzić wartość stężenia całkowitego testosteronu i SHBG, a otrzymamy stężenie ft lub BAT. Metody tej nie można stosować u pacjentów z niedoborami albumin lub w przypadku interferencji przez inne steroidy wiązane przez

SHBG, na przykład u kobiet ciężarnych lub mężczyzn poddawanych terapii testosteronem. Udowodniono, że opisana metoda pozwala na ocenę stężenia ft z dokładnością równą *equilibrium dialysis* i może być stosowana rutynowo zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet [6, 14].

Metoda radioimmunologiczna

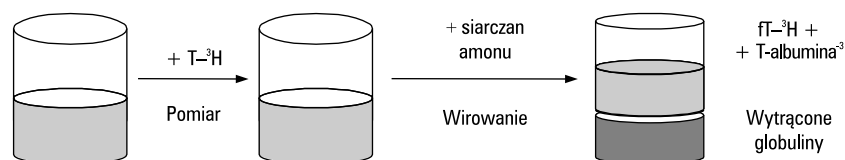
Wolny testosteron można również oznaczać metodą radioimmunologiczną (*analog-based free testosterone RIA*). Jest to metoda jednoetapowa, która polega na dodaniu znakowanego jodem radioaktywnym ^{125}I -testosteronu o niewielkiej swoistości wiązania z SHBG i albuminą do badanej próby. Znakowany testosteron konkuruje z ft o miejsce wiążące na cząsteczce skierowanego przeciw niemu przeciwciała, które jest osadzone na ścianie naczynka reakcyjnego. Radioaktywność powstałych kompleksów immunologicznych jest odwrotnie proporcjonalna do ilości wolnego testosteronu w badanej próbce. Wykazano, iż zastosowanie metody RIA do bezpośredniego oznaczania ft u mężczyzn wiąże się z uzyskaniem znacznie niższych stężeń ft , stanowiących od 0,5 do 0,65% całkowitego testosteronu, w porównaniu z innymi metodami — dializą równowagową i metodą kalkulacyjną [12].

Współczynnik wolnych androgenów FAI

Znając stężenia całkowitego testosteronu i SHBG, można wyliczać współczynnik wolnych androgenów (FAI, *free androgen index*), stosując wzór:

$$FAI = \left(\frac{\text{[stężenie testosteronu całkowitego]}}{\text{[stężenie SHBG]}} \right) \times 100$$

Zasadność wyliczania FAI jako rzetelnego markera odzwierciedlającego stężenie ft została zakwestionowana przez wielu autorów [6, 10, 14]. Wykazano, iż obliczanie stężeń wolnego testosteronu na podstawie FAI wiąże się z uzyskaniem o wiele niższych stężeń ft w porównaniu z dializą równowagową i metodą kalkulacyjną [6, 8, 14]. Metoda ta może być stosowana rutynowo jedynie do oceny statusu androgenów.



Rycina 3. Schemat metody precypitacyjnej z wysyconym siarczanem amonu do oznaczania testosteronu biodostępnego

Figure 3. Bioavailable testosterone measurement by ammonium sulphate precipitation

Metody oznaczania testosteronu biodostępnego (BAT)

Precypitacja z wysyconym siarczanem amonu

Metodą referencyjną oznaczania testosteronu biodostępnego jest precypitacja z wysyconym siarczanem amonu [3, 5–7]. Pierwszym etapem metody jest dodanie do próby znanej, niewielkiej ilości testosteronu znakowanego trytem (^3H -testosteron) i oznaczenie radioaktywności próbki (ryc. 3). Następnie dodaje się wysycony siarczan amonu, w wyniku czego dochodzi do wytrącania globulin, w tym także SHBG. Po odwirowaniu ^3H -testosteron wolny i ^3H -testosteron związany z albuminami pozostają w supernatancie, a wytrącone globuliny gromadzą się na dnie naczynia. Ostatnim etapem reakcji jest oznaczenie radioaktywności supernatantu i wyliczenie odsetka *non-SHBG* testosteronu. Ograniczeniem tej metody jest możliwość niepełnej precypitacji globulin i pracochłonność [6]. Wykazano brak zależności pomiędzy stężeniem BAT oznaczanego metodą precypitacyjną a stężeniem SHBG [12]. Oznaczanie biodostępnego testosteronu za pomocą precypitacji z wysyconym siarczanem amonu może być metodą z wyboru dla oceny hipogonadyzmu u osób starszych, u których może dochodzić do wzrostu stężenia SHBG i zmian stężenia albuminy [14].

Metoda kalkulacyjna

Metodę kalkulacyjną omówiono przy oznaczaniu wolnego testosteronu (fT). Wykazano, iż powyższa metoda obliczania BAT ma takie samo znaczenie diagnostyczne, jak metoda precypitacyjna [5, 6].

Czynniki wpływające na wyniki oznaczeń stężenia testosteronu

Stężenie całkowitego testosteronu krążącego we krwi zależy od stężenia SHBG. Jeżeli stężenie całkowitego testosteronu wynosi 4 ng/dl, przy średnim stężeniu albumin (4,3 g/dl), a stężenie SHBG jest w dolnej granicy normy (dla mężczyzn 13 nmol/l), to wyliczone metodą kalkulacyjną stężenie wolnego testosteronu wynosi 0,11 ng/dL (2,75%), zaś BAT — 2,58 ng/dl (64,4%). Natomiast przy tym samym stężeniu testosteronu całkowitego (4 ng/dl), a stężeniu SHBG znajdującym się w górnej granicy normy (71 nmol/l), otrzymujemy ponad 2-krotnie niższe stężenie fT — 0,0424 ng/dl (1,06%), a BAT — 0,994 ng/dl (24,9%). Zatem wzrost stężenia SHBG powoduje obniżenie frakcji wolnej testosteronu (fT). Podwyższenie stężenia SHBG wpływa także na wartość współczynnika wolnych androgenów, powodując jego obniżenie.

Tabela II

Metody oznaczania testosteronu wolnego i biodostępnego

Table II

Methods for the measurement of free and bioavailable testosterone

Metody oznaczania	Oznaczana frakcja testosteronu
Dializa równowagowa	fT
Precypitacja z wysyconym siarczanem amonu	BAT
Metoda radioimmunologiczna	fT
Metoda kalkulacyjna	fT BAT
FAI	fT

Ocena statusu androgenów

FAI (*free androgen index*) — indeks wolnych androgenów;
 BAT (*bioavailable testosterone*) — testosteron biodostępny;
 fT (*free testosterone*) — testosteron wolny

Na stężenie testosteronu całkowitego również istotny wpływ ma stężenie albumin. Wiąże się to z tworzeniem się słabych wiązań tego hormonu z albuminami. Jeżeli stężenie albumin jest w dolnej granicy normy (3,5 g/dl), przy stałym stężeniu SHBG i testosteronu całkowitego (4 ng/dl), to otrzymane stężenie wolnej frakcji testosteronu wynosi 0,124 ng/dl (3,1%) i jest wyższe w porównaniu z wartością fT równą 0,0938 ng/dl (2,34%), wyliczoną przy stężeniu albumin w górnej granicy normy (5,5 g/dl). Konsekwencją wzrostu stężeń albumin w osoczu jest spadek stężenia wolnej frakcji testosteronu (fT). Natomiast BAT wraz ze wzrostem stężenia albumin będzie ulegał podwyższeniu z 2,39 ng/dl (59,8%) przy stężeniu albumin równym 3,5 g/dl do 2,79 ng/dl (69,6%), przy stężeniu albumin wynoszącym 5,5 g/dl i stałym stężeniu SHBG.

Trudności w określeniu rzeczywistego stężenia wolnego testosteronu nie wiążą się jedynie z ograniczeniami technicznymi różnych metod diagnostycznych (tab. II). Nie bez znaczenia jest także sam moment pobrania materiału do badania. Czynniki wpływającymi na wynik oznaczenia stężenia testosteronu są dobowe wahania w wydzielaniu tego hormonu. Wykazano, iż stężenie testosteronu jest najwyższe w godzinach porannych, szczególnie w godzinach 6.00–9.00 rano, a najniższe po południu i wieczorem, stąd też zalecane jest pobieranie krwi o jednakowych porach.

Stężenie testosteronu u kobiet jest względnie stałe w przebiegu cyklu miesięcznego. W badaniach Sinha i wsp. nie wykazano istotnej różnicy stężeń fT w fazie folikularnej i lutealnej, natomiast wzrastało ono w okresie przedowulacyjnym (3 dni przed szczytem wydzie-

lania LH) [13]. Na wynik oznaczeń testosteronu mogą wpływać także obecność lipemii lub hemolizy w próbie badanej, powodując uzyskanie fałszywie podwyższonych stężeń testosteronu. Ważne jest też uwzględnienie wieku badanej osoby, rasy, masy ciała (ilość tkanki tłuszczowej), stanu ogólnego (choroby, podawane leki), a w przypadku sportowców — stopnia odwodnienia ustroju oraz jego zakwaszenia.

Chcąc oznaczyć stężenie testosteronu, należy zatem starannie przeanalizować uwarunkowania kliniczne i wybrać taką metodę oznaczania omawianego hormonu oraz jego frakcji, która będzie najlepiej odzwierciedlać istniejący stan patologiczny bądź fizjologiczny.

Podsumowanie

Oznaczanie testosteronu, głównego męskiego hormonu płciowego, ma istotne znaczenie do oceny stopnia androgenizacji. W praktyce klinicznej stężenie tego hormonu nie zawsze koreluje z parametrami 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. Dlatego też do oceny stężenia zarówno wolnego, jak i biodostępnego testosteronu wprowadzono metodę kalkulacyjną, wymagającą znajomości stężeń albumin, SHBG i testosteronu całkowitego, której dokładność jest porównywalna z metodami referencyjnymi oznaczania aktywnych biologicznie frakcji tego hormonu.

Piśmiennictwo

1. Jakiel G, Baran A. Hipoandrogenizm u kobiet. *Endokrynol Pol* 2005; 56: 1017–1020.
2. Stanczyk FZ, Bretsky P. Biosynthesis, transport and metabolism of steroid hormones. W: Henderson BE, Ponder B, Ross RK (red.). *Hormones, Genes and Cancer*. New York: Oxford University Press 2003; 12–23.
3. Stanczyk FZ. Diagnosis of hyperandrogenism: Biochemical criteria. *Best Practice and Res Clin Endocrinol and Metabolism* 2006; 20: 177–191.
4. Giffin JE, Wilson JD. Disorders of the testis and the male reproduction tract. W: Wilson JD, Williams RH (red.). *Williams Textbook of Endocrinology*. IX wyd. WB Saunders, Philadelphia 1998; 819–875.
5. Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum „Bioavailable” Testosterone (BAT). *Clin Biochem* 2003; 36: 591–596.
6. Vermeulen A, Verdonck L, Kauffman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol and Metabolism* 1999; 10: 3666–3672.
7. Giton F, Fiet J, Guehot J i wsp. Serum bioavailable testosterone: assayed or calculated? *Clin Chem* 2006; 3: 474–481.
8. Wilke TJ, Utley DJ. Total testosterone, free-androgen index, calculated free testosterone, and free testosterone by analog RIA compared in hirsute women and in otherwise-normal women with altered binding of sex-hormone-binding globulin. *Clin Chem* 1987; 8: 1372–1375.
9. Kondracka A, Bartoszewicz Z. SHBG — globulina wiążąca hormony płciowe — charakterystyka i znaczenie diagnostyczne. *LabForum* 2003; 17: 9–10.
10. Miller KK, Rosner W, Lee H i wsp. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. *J Clin Endocrinol and Metabolism* 2004; 2: 525–533.
11. Taieb J, Mathian B, Millot T i wsp. Testosterone measured 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.
12. Winters SJ, Kelley D, Goodpaster B. The analog free testosterone assays: are the results in men clinically useful. *Clin Chem* 1998; 44: 2178–2182.
13. Sinha-Hikim I, Arver S, Beall G i wsp. The use of a sensitive equilibrium dialysis method for the measurement of free testosterone levels in healthy, cycling women and in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Endocrinol and Metabolism* 1998; 4: 1312–1318.
14. Morley JE, Patrick P, Perry III HM. Evaluation of assays available to measure free testosterone. *Metabolism* 2002; 5: 554–559.