

Alicja Kotłowska, Wojciech Kamysz¹⁾

OZNACZANIE HORMONÓW STEROIDOWYCH W MOCZU

Katedra i Zakład Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. farm. *P. Szefer*

¹⁾ Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. *W. Kamysz*

Hasła kluczowe: hormony steroidowe, mocz, chromatografia, ELISA, RIA.
Key words: steroid hormones, urine, chromatography, ELISA, RIA.

Hormony steroidowe stanowią grupę związków naturalnych, których budowa oparta jest na czteropierścieniowym szkielecie węglowym będącym pochodną 1,2-cyklopentanoperhydrofenantrenu (1). Klasyfikacja hormonów steroidowych zależy od ich budowy oraz pełnionych w ludzkim organizmie funkcji. Człowiek produkuje pięć klas steroidów: glikokortykoidy, mineralokortykoidy, gestageny oraz hormony płciowe tj. estrogeny i androgeny. Związkiem prekursorowym dla wyżej wymienionych hormonów jest cholesterol, który w mitochondriach przy udziale desmolazy jest przekształcany do pregnenolonu. Pregnenolon jest związkiem wyjściowym do syntezy progesteronu i 17-hydroksypregnenolonu, z których syntezowane są odpowiednio mineralokortykoidy, glikokortykoidy i androgeny. Androgeny stanowią natomiast prekursor estrogenów. W cykl przemian biochemicznych prekursorów zaangażowane są enzymy zawarte w kompleksie cytochromu P450 (2).

Funkcją hormonów steroidowych jest regulacja działania określonych genów. Aktywność wyżej wymienionych związków jest związana z ich przyłączaniem się do wewnątrzkomórkowych receptorów cytoplazmatycznych oraz zapoczątkowania kaskady reakcji prowadzących do wywoływania określonych efektów biologicznych.

WYBÓR MATERIAŁU DO BADAŃ

Analizy hormonów steroidowych mogą być prowadzone wykorzystując zróżnicowany materiał biologiczny. Oznaczenia prowadzi się w kale, ekstraktach z tkanek, płynie owodniowym, włosach oraz płynach ustrojowych tj. we krwi, surowicy i osoczu, ślinie oraz moczu (tab. I). Pierwsza grupa próbek nie jest preferowana ze względu na konieczność skomplikowanej, pracochłonnej oraz czasochłonnej obróbki materiału (3).

Pobieranie próbek krwi może wiązać się ze wzrostem poziomu niektórych kortykosteroidów, wydzielanych we wzmożony sposób w trakcie odpowiedzi organizmu

na stres (10). Co więcej, analiza hormonów steroidowych we krwi może być zaburzona przez pulsacyjne wydzielanie niektórych związków w rytmie dobowym oraz miesięcznym. Ślina odznacza się mało inwazyjnym sposobem pobierania próbki, jednakże stężenie steroidów w tej matrycy jest ok. 1000–5000 niższe niż we krwi. Wykorzystanie moczu jako źródła próbki do analizy hormonów steroidowych jest zatem wysoce uzasadnione. Pobór próbek moczu jest nieinwazyjny oraz niestresogenny w odniesieniu do osocza i plazmy, a stężenie wyżej wspomnianych związków jest stosunkowo wysokie. Dodatkowo w moczu można badać pełne profile hormonalne jako, że wydzielane są w nim metabolity większości hormonów steroidowych produkowanych przez organizm.

Tab e l a 1. Przykłady oznaczania hormonów steroidowych w wybranym materiale biologicznym

Tab l e 1. Examples of techniques used to determine steroid hormones in selected biological material

Materiał badawczy	Oznaczane hormony steroidowe	Technika rozdzielania i detekcji	Odnosiłk literaturowy
Mocz	Androgeny, kortykosteroidy	GC-MS/MS	4
Surowica	Kortykosteroidy	HPLC-RIA	5
Plazma	Anaboliczne androgeny	GC-MS/MS	6
Włosa	Anaboliczne steroidy	GC-MS/MS	7
Tkanka tłuszczowa	Androgeny	GC-MS/MS	8
Mocz	Ketosteroidy	GC-FID	9

METODY STOSOWANE DO OZNACZANIA HORMONÓW STEROIDOWYCH W MOCZU

Metody immunoenzymatyczne są stosowane w diagnostyce klinicznej najczęściej do szybkich i rutynowych oznaczeń poziomów hormonów steroidowych. Techniki te bazują na selektywnym wiązaniu cząsteczek hormonów do przeciwciał. Dwie najbardziej popularne metody to ELISA (ang. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) oraz RIA (ang. *Radioimmunoassay*).

W metodzie RIA wykorzystuje się przeciwciała znakowane izotopowo (11). Po zajściu reakcji wiązania hormonu steroidowego z przeciwciałem przeprowadza się pomiary radioaktywności izotopu promieniotwórczego. Do znakowania używa się m.in. izotopu ^{125}I , ^{14}C , ^3H . Jeden ze składników reakcji jest związany z fazą stałą drugi zaś składnik obecny jest w fazie płynnej. Inna możliwość to obecność obu składników w roztworze. Wyznakowany antygen jest inkubowany z surowicą, w której znajdują się przeciwciała. Następnie mierzona jest radioaktywność danego kompleksu. Dostępne procedury oznaczeń klinicznych tj. RIA lub ELISA umożliwiają analizy pojedynczych hormonów lub grup metabolitów zawierających charakterystyczną grupę funkcyjną tj. np. 17-keto-steroidy.

ELISA wykorzystuje przeciwciała poliklonalne lub monoklonalne skoniugowane z odpowiednim enzymem (12). Antygen zostaje związany z podłożem, po dodaniu przeciwciał tworzone są kompleksy immunologiczne. Następnie, do roztworu do-

daje się substrat dla enzymu związanego z przeciwciałem. Zachodzącym reakcjom enzymatycznym często towarzyszą barwne reakcje, umożliwiające wykrycie hormonów steroidowych. Obecnie, w celu zminimalizowania kontaktu z radioaktywnymi izotopami, najczęściej z technik immunochemicznych stosowana jest metoda ELISA.

Techniki chromatograficzne są najczęściej wykorzystywane do profilowania hormonalnego, jako, że wymaga ono większej specyficzności. Rozdział związków opiera się o takie parametry, jak powinowactwo do fazy stałej, masę cząsteczkową, lotność lub polarność związków. Najbardziej popularnymi metodami badań steroidów są chromatografia gazowa (GC-FID), chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS), wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) oraz chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC-MS).

ZASTOSOWANIE METOD IMMUNOCHEMICZNYCH

W 2007 r. *Hsing* i współpr. (13) wykorzystali metodę RIA do oznaczania hormonów steroidowych obecnych w surowicy oraz moczu zdrowych mężczyzn. Badano w matrycy poziom 12 hormonów steroidowych z grupy androgenów tj. testosteron i jego metabolity oraz estrogenów. Autorzy zamieścili także prównanie wyników wspomnianych analiz otrzymanych przy wykorzystaniu RIA oraz technik chromatograficznych tj. GC-MS, LC-MS/MS.

Metodę RIA obok ELISA zastosowali *Salih* i współpr. w 2007 r. (14) podczas badania poziomu m. in. 2-hydroksyestrogenów, 2-metoksyestrogenów, metabolitów progesteronu, dehydroepiandrosteronu (DHEA) oraz testosteronu w osoczu i moczu kobiet z zespołem policystycznych jajników (PCOS). Wykazano, iż poziom 2-hydroksyestrogenów był niższy u pacjentek niż w grupie kontrolnej, co było uwarunkowane najprawdopodobniej obniżonym wydzielaniem transferazy katechol-O-metylowej. W trakcie analiz wykorzystano specyficzne przeciwciała wiążące się z 17 α -hydroksyprogesteronem, kity RIA dla testosteronu i DHEAS oraz metodę ELISA do oznaczania 2-hydroksyestrogenu i 16 α -hydroksyestrogenu. Zastosowano także LC-MS (ESI) do pomiarów 10 endogennie występujących estrogenów w moczu.

W 2005 r. *Al-Dujaili* i współpr. (15) wykorzystali metodę ELISA do opracowania czulej i specyficznej procedury do wykrywania nandrolonu, anabolicznego steroidu używanego w dopingu przez atletów, w moczu zdrowych ochotników. Potwierdzenie obecności nandrolonu w organizmie można stwierdzić przez oznaczanie metabolitów: 19-norandrosteronu oraz 19-noretiocholanonu wydalanych z moczem. Do badań wykorzystano koniugaty owczych przeciwciał IgG połączonych z peroksydazą chrzanową. W trakcie oznaczeń zaobserwowano niespecyficzne reakcje krzyżowe przeciwciał z testosteronem i dihydrotestosteronem, które mieściły się w granicy 3% oznaczeń. Poziom wydzielanego nandrolonu z moczem został określony u osobników poddanych i nie poddanych wysiłkowi fizycznemu. Stwierdzono obecność nandrolonu zarówno u osób poddanych oraz nie poddanych ćwiczeniom. Stwierdzono, iż obecność śladowych ilości tego hormonu w materiale biologicznym jest spowodowana najprawdopodobniej przyjmowaniem steroidów drogą pokarmową.

Wpływ ketokonazolu na wydzielanie hormonów steroidowych przez chorych z syndromem *Cushinga* badali w 2007 r. *Mortimer* i współpracownicy (16). W pracy oznaczano za pomocą ELISA poziom hormonów steroidowych w moczu i płazmie przez 2 tygodnie u 8 pacjentów cierpiących na syndrom *Cushinga* i przyjmujących dawki ketokonazolu w ilości 200 mg 4 razy dziennie. Stwierdzono, że leczenie powiązane było ze spadkiem wydzielania wolnego kortyzolu oraz metabolitów kortyzolu tj. tetrahydrokortyzol, 5 α -tetrahydrokortyzolu i tetrahydrokortyzonu wydalanych z moczem. Wydzielanie metabolitów androgenów tj. androsteronu, 11 β -hydroksyandrosteronu i etiocholanolonu również się zmniejszyło. Analiza stosunków prekursorów do produktów wykazała, że u pacjentów z syndromem *Cushinga* ketokonazol wyraźnie hamował działanie 11 β -hydroksylazy i 17,20-liazy, ale nie 17 α -hydroksylazy.

Metodę ELISA wykorzystał również *Onishi* i współpracownicy (17) do oznaczenia w próbkach moczu 17-glukuronidu 5 α -androstan-3 α ,17 β -diolu (androstanediol-17G). Wykorzystano przeciwciała królicze przeciw 17-glukuronidowi 5 α -androstan-3 α ,11 α ,17- β -triolu oraz znacznik połączony z peroksydazą chrzanową. Metodę zastosowano do próbek moczu 407 mężczyzn oraz 322 kobiet, należących do 11 grup wiekowych. Poziom androstanediolu-17G u obu płci był wysoki w niemowlęctwie, spadał w okresie dziecięcym i wzrastał w okresie dojrzewania. U dziewczynek w okresie dojrzewania osiągał *plateau*, natomiast u chłopców wzrastał. Wykazano, że androstanediol wydzielany z moczem może być dobrym wskaźnikiem androgeniczości oraz postępu procesu maskulinizacji w okresie dziecięcym oraz u starszych osobników obu płci.

Wykrywanie syndromu ekotopowego wydzielania ACTH, trudnego do zdiagnozowania oraz odróżnienia od zespołu *Cushinga*, opisali *Illios* i współpracownicy w 2005 r. (18). Wśród procedur potwierdzających występowanie schorzenia, autorzy zastosowali m.in. oznaczanie dobowego wydzielania wolnego kortyzolu w moczu (UFC) oraz 17-hydroksykortykosteroidów (17OH-KS) metodą RIA oraz immunochemiluminometryczną. Określono wzrost wydzielania UFC u wszystkich pacjentów przekraczający nawet 100-krotnie wartości wydzielania wyznaczone w grupie kontrolnej. W przypadku 17OH-KS, dobowe wydzielanie tych związków 20-krotnie przewyższało wartości charakterystyczne dla osób zdrowych. U chorych z syndromem *Cushinga*, wartości wydzielanego UFC były 200-krotnie większe w stosunku do grupy kontrolnej, a 17OH-KS zbliżone do wydzielania wspomnianych związków przez pacjentów z syndromem ekotopowego wydzielania ACTH.

W 1993 r. *Chiba* i współpracownicy (19) opracowali metodę oznaczania 18-hydroksykortyzolu w moczu za pomocą ELISA. W tym celu immunizowano króliki koniugatem 3-*O*-(karboksymetyl)oksymino-18-hydroksykortyzolu oraz albuminy bydlęcej. Następnie izolowano przeciwciała IgG i poddawano je biotynylacji. Do syntezy koniugatów związanych z peroksydazą chrzanową wykorzystywano *p*-nitrofenylowe estry oksymu. Po inkubacji próbkami moczu, kompleks steroid-enzym wraz biotynylowanym przeciwciałem był izolowany i przenoszony na płytki pokryte awidyną. Preoksydaza związana z fazą stałą była oznaczana kolorymetrycznie. Metoda wykazywała wysoką specyficzność za wyjątkiem reakcji krzyżowych przeciwciał z 18-hydroksykortyzonem. Wykazano przydatność opisanego procedury do przeprowadzania badań przesiewowych umożliwiających wykrycie pierwotnego aldosteronizmu.

ZASTOSOWANIE METOD CHROMATOGRAFICZNYCH

Chromatografię cieczową zastosowała w 1997 r. *Turpeinen* i współpr. (20). Celem badania było opracowanie metody umożliwiającej oznaczanie wolnego kortyzolu w moczu, będącego jednym z markerów choroby *Cushinga*, w obecności interferujących leków przepisywanych chorym cierpiącym na wspomniane zaburzenie. Za wzorzec wewnętrzny posłużył metyloprednizolon. Przed analizami, próbka była poddawana ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na złożu C_{18} . Następnie rozdział przeprowadzano przy wykorzystaniu kolumny LiChrospher 100 C_{18} , fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu, acetonitrylu oraz wody (43/3/54). Wyniki oznaczeń za pomocą HPLC porównano następnie z analizami RIA. Druga metoda dawała wyniki podwyższone o 60%.

W 2007 r. oznaczaniem hormonów steroidowych w moczu zajmowali się *Janzen* i współpr. (21), którzy badali za pomocą LC-MS/MS profile hormonalne u dzieci z wrodzonym przerostem kory nadnerczy (CAH). Zaobserwowano, że u chorych dzieci poziom 21-deoksykortyzolu był podwyższony ze względu na niedobór 21-hydroksylazy, co więcej poziom wydzielanego 17-hydroksyprogesteronu oraz stosunek (21-F + 17-OHP)/F był wyższy u chorych niż w grupie kontrolnej.

Technikę GC zastosowali *Luppa* i współpr. (22) do testowania funkcjonowania osi przysadka-jajniki u pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS). W tym celu badano wydzielanie hormonów steroidowych w osoczu i moczu po teście nafareliną. Wspomniane związki były ekstrahowane z moczu za pomocą SPE przy wykorzystaniu złoża C_{18} oraz NH_2 , a następnie przeprowadzane do pochodnych trimetylosililowych (TMS). Badania wykazały wzrost poziomu 17 α -hydroksyprogesteronu, androstendionu, testosteronu oraz estradiolu w osoczu, a także allo-tetrahydrokortyzolu oraz 17 α -hydroksypregnenolonu wydalanych z moczem w grupie pacjentek z PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej. Wzrost wydzielania wspomnianych steroidów sugeruje zaburzone działanie osi przysadka-jajnik u pacjentek z PCOS, badane związki mogą także posłużyć jako specyficzne markery charakterystyczne dla PCOS.

W 2007 r. *Andrada* i współpr. (23) wykorzystali metodę GC-MS do określenia wpływu 4-tygodniowego programu ćwiczeń siłowych na fluktuacje wydzielania hormonów steroidowych w moczu zdrowych mężczyzn. Badania wykazały, że po programie wykonywanych ćwiczeń, ze względu na działanie anaboliczne androgenów, nastąpił przyrost tkanki mięśniowej. Bezpośrednio po wykonywaniu serii ćwiczeń zaobserwowano spadek wydzielania androgenów z moczem, związany najprawdopodobniej z wykorzystaniem androgenów do wytworzenia anabolicznego środowiska. Natomiast po zakończeniu programu wykryto statystycznie istotny wzrost wydzielania androgenów w próbkach moczu grupy badanej. Nie zaobserwowano jednak wzrostu wydzielania odznaczających się katabolicznym działaniem kortykosteroidów tj. tetrahydrokortyzolu oraz tetrahydrokortyzonu. Co więcej, zaobserwowano zmniejszenie wydzielania estrogenów. Stosunek androgenów do kortykosteroidów tj. (androstendion + DHEA)/(THE + THF) oraz (A + E)/(THE + THF) po zakończeniu sesji ćwiczeń spadał, natomiast po zakończeniu całego programu wzrastał, wskazując, czy reakcje zachodzące w organizmie są anaboliczne czy kataboliczne. Na podstawie otrzymanych wyników wywnioskowano, że wysiłek fizycz-

ny ma wpływ na funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-jądra oraz podwzgórze-przysadka nadnercza.

GC-MS zastosował również *Shackleton* i współpracownicy (24) do poszukiwania w moczu ciężarnych kobiet nowych markerów syndromu Smith-Lemli-Opitza (SLOS), który odznacza się u zarodków niedoborem 7-reduktazy 7-dehydrocholesterolu (7DHC). Pomimo, że możliwe jest wykrycie schorzenia przez pomiar poziomu 7DHC w płynie owodniowym lub komórkach kosmówki/łożyska, potrzebna jest bardziej nieinwazyjna metoda. W badaniu oznaczano w moczu matek steroidy zawierające wiązania nienasycone w pozycji 7 i 8. Większość analizowanych związków została zidentyfikowana jako powszechnie występujące metabolity progesteronu, które nie wykazywały dodatkowych wiązań podwójnych. Nie wykryto także nienasyconych homologów metabolitów kortyzolu. W próbkach stwierdzono jednak obecność nienasyconych homologów pregnantrioli tj. pregnan-3,16,20-triol oraz pregnan-3,17,20-triol, które nie są zwyczajowo obecne w moczu matek zdrowych dzieci, mogą zatem pełnić funkcję markerów SLOS. Teorię tą potwierdza fakt, iż jeden ze wspomnianych związków jest obecny w moczu dzieci oraz dorosłych cierpiących na SLOS i jego wykrycie potwierdza występowanie schorzenia u dojrzałych osobników.

Metodę wykrywania w moczu anabolicznych steroidów zaprezentowali w 2004 r. *Leinonen* i współpracownicy (25). Celem badania było określenie optymalnych warunków oznaczania 9 różnych podstawionych w pozycji 17 alkilowych pochodnych anabolicznych steroidów tj. 4-chlorodehydrometylotestosteron, danazol, fluoksymesteron, formebolon, metandienon, oksandrolon oraz stanazolol, bądź też ich metabolitów w moczu. Związki ekstrahowane były z próbek za pomocą ekstrakcji cieczech-ciecz, a następnie oznaczane za pomocą LC/ESI-MS/MS. Kolumna wypełniona była fazą stacjonarną C_{18} , natomiast fazę ruchomą stanowiła mieszanina wody zawierającej 0,01% kwas octowy oraz metanol (w stosunku 1:9). Rozdział był prowadzony metodą gradientową. Zaprezentowana metoda charakteryzowała się niskimi granicami wykrywalności, wysoką selektywnością oraz precyzją. W 2001 r. *Kao* i współpracownicy (26) zastosowali LC-MS/MS w celu zbadania wydzielania w moczu 6 metabolitów szlaku kortykosteroidów u pacjentów, u których za pomocą metod immunoenzymatycznych, wykryto wrodzony przerost kory nadnerczy (CAH), niedobór 11 β -hydroksylazy, niedobór 21-hydroksylazy oraz chorobę Addisona. U pacjentów z defektem 11 β -hydroksylazy wartości 11 β -deoksykortyzolu oraz 11-deoksykortykosteronu w osoczu były wyższe niż wartości dla grupy kontrolnej, a obecność kortyzolu oraz kortyzonu w moczu chorych była znikoma. U pacjenta z niedoborem 21-hydroksylazy wykryto podwyższone stężenie 17-hydroksyprogesteronu oraz będącego markerem schorzenia 21-deoksykortyzolu, a także obniżone stężenie kortyzolu i kortyzonu w osoczu. Po stymulacji kortykotropiną (ACTH), kortyzol w osoczu dramatycznie wzrósł (jako jedyny związek), u pacjenta z defektem 21-hydroksylazy nastąpił wzrost 17-hydroksyprogesteronu, nie zauważono wzrostu kortyzolu w osoczu. U pacjenta z chorobą Addisona nie było wzrostu wydzielania kortyzolu lub innych związków w osoczu po stymulacji kortykotropiną. Autorzy sugerują, że LC-MS/MS jest techniką umożliwiającą wykrywanie schorzeń nadnerczy o charakterze endokrynologicznym.

WNIOSKI

Oznaczanie hormonów steroidowych w moczu umożliwia ich nieinwazyjną oraz wysoce miarodajną analizę w organizmie. W badaniach klinicznych, ze względu na możliwość prowadzenia szybkich i rutynowych analiz, najczęściej stosowanymi metodami badania powyższych związków są techniki immunoenzymatyczne (RIA, ELISA) (27). Wspomniane metody są jednak obciążone błędem wynikającym z reakcji krzyżowych, sięgającym 30% (28). Analiza hormonów steroidowych przy użyciu technik chromatograficznych, pomimo wymogu czasowego, sprzętowego oraz bardziej skomplikowanej obróbki materiału biologicznego niż w przypadku metod immunochemicznych jest bardziej informatywna i umożliwia wyznaczenie pełnego profilu hormonalnego badanych związków (29). Jest ona polecana szczególnie w przypadku diagnozowania defektów lub niedoborów enzymatycznych, zaburzeń metabolizmu oraz wrodzonych chorób o naturze endokrynologicznej.

A. Kotłowska, W. Kamysz

DETERMINATION OF STEROID HORMONES IN URINE SAMPLES

PIŚMIENICTWO

1. *Kołodziejczyk A.*: Naturalne związki organiczne. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004. – 2. *Kronenberg H.M., Melmed S., Polonsky K.S., Larsen P.R.*: Williams Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Company Philadelphia, 2002. – 3. *Andrew R.*: Clinical measurement of steroid metabolism. Clin. End. Metab., 2001; 1-16. – 4. *Remer T., Boye K.R., Hartmann M.F., Neu C., Schoenau E., Manz F., Wudy S.A.*: Adrenal Steroid Hormones and Metaphyseal Bone in Children, Horm. Res., 2004; 62: 221-226. – 5. *Schöneshöfer M., Jaster H.J., Fenner A.*: HPLC-RIA: A Convenient Alternative for the Specific Estimation of Multiple Steroid Hormones. Fresen. J. Anal. Chem., 1980; 130-131. – 6. *Peng S.H., Segura J., Farré M., González J.C., de la Torre X.*: Plasma and urinary markers of oral testosterone undecanoate misuse. Steroids, 2002; 67: 39-50. – 7. *Gambelungho C., Somavilla M., Ferranti C., Rossi R., Aroni K., Manes N., Bacci M.*: Analysis of anabolic steroids in hair by GC/MS/MS. Biomed. Chrom., 2007; 21: 369-375. – 8. *Lamounier-Zepter V., Ehrhart-Bornstein M.*: Fat tissue metabolism and adrenal steroid secretion. Curr. Hypertens. Rep., 2006; 8: 30-34. – 9. *Devaux P.G., Horning M.G., Hill R.M., Horning E.C.*: O-benzoyloximes: Derivatives for the study of ketosteroids by gas chromatography. Application to urinary steroids of the newborn human. Anal. Biochem., 1971; 41: 70-82. – 10. *Corbett B.A., Mendoza S., Abdullah M., Wegelin J.A., Levine S.*: Cortisol circadian rhythms and response to stress in children with autism. Psychoneuroendocrinology, 2006; 31: 59-68.
11. *Mansfield R.K., Bhattacharyya D., Hartman N.G., Jay M.*: Scintillation proximity radioimmunoassay with microporous membranes. Appl. Radiat. Isot., 1996; 47: 323-328. – 12. *Ebrahimi M.*: A Rapid ELISA Method for 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P) Hormone Using Acetylcholinesterase Enzyme as Tracer. J. Res. Med. Sci., 2004; 3: 103-110. – 13. *Hsing A.W., Stanczyk F.Z., Bélanger A., Schroeder P., Chang L., Falk R.T., Fears T.R.*: Reproducibility of Serum Sex Steroid Assays in Men by RIA and Mass Spectrometry. Canc. Epidemiol. Biomarkers Prev., 2007; 16: 1004-1008. – 14. *Salih S., Xu X., Veenstra T.D., Duleba A.J., Fouad H., Nagamani M., Al-Hendy A.*: Lower Levels of Urinary 2-Hydroxyestrogens in Polycystic Ovary Syndrome. J. Clin. End. & Metab., 2007; 8: 3285-3291. – 15. *Al-Dujaili E. A. S., Mason J.I., Swart P.*: Detection of endogenous nandrolone in the urine of healthy volunteers by utilising a sensitive ELISA. Endocr. Abstr., 2005; 10: 74. – 16. *Mortimer R.H., Cannell G.R., Thew C.M., Galligan J.P.*: Ketoconazole and plasma and urine steroid levels in Cushing's Disease. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 2007; 18: 563-569. – 17. *Onishi T., Takei H., Kambegawa A., Saisho S., Kashimada K., Koyama S., Mizutani S., Rao P.N.*: A highly specific heterologous enzyme immunoassay for

5 α -androstane-3 α , 17 β -diol 17-glucuronide (androstenediol-17G) and developmental patterns of urinary androstenediol-17G excretions. *Steroids*, 2002; 67: 175-183. – 18. *Ilias I., Torpy D.J., Pacak K., Mullen N., Wesley R.A. Nieman L.K.*: Cushing's Syndrome Due to Ectopic Corticotropin Secretion: Twenty Years' Experience at the National Institutes of Health. *J. Clin. End. & Metab.*, 2005; 90: 4955-4962. – 19. *Chiba H., Ikegawa S., Kurosawa T., Yoshimura T., Ito Y., Matsuno K., Kobayashi K., Tohma M.*: A direct enzyme immunoassay for 18-hydroxycortisol in urine: A new tool for screening primary aldosteronism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1993; 46: 85-89. – 20. *Turpeinen U., Markkanen H., Välimäki M., Stenman U.H.*: Determination of free urinary cortisol by HPLC. *Clin. Chem.*, 1997; 43: 1386-1391.

21. *Janzen N., Peter M., Sander S., Steuerwald U., Terhardt M., Holtkamp U., Sander J.*: Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Clin. End. & Metab.*, 2007; 92: 2581-2589. – 22. *Luppa P., Burkhardt M., Jacob K., Kimmig R., Strowitzki T., Höss C., Weber M., Engelhardt D., Lobo R.A.*: Variations of Steroid Hormone Metabolites in Serum and Urine in Polycystic Ovary Syndrome after Nafarelin Stimulation: Evidence for an Altered Corticoid Excretion. *J. Clin. End. & Metab.*, 1995; 80: 280-288. – 23. *Timon Andrada R., Maynar Marino M., Muñoz Marin, Olcina Camacho G.J., Caballero M.J., Maynar Mariño J.I.*: Variations in urine excretion of steroid hormones after an acute session and after a 4-week programme of strength training. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2007; 99: 65-71. – 24. *Shackleton C.H.L., Roitman E., Kratz L.E., Kelley R.I.*: Midgestational maternal urine steroid markers of fetal Smith–Lemli–Opitz (SLO) syndrome (7-dehydrocholesterol 7-reductase deficiency). *Steroids*, 1999; 64: 446-452. – 25. *Leinonen A., Kuورانne T., Kotiaho T., Kostianen R.*: Screening of free 17-alkyl-substituted anabolic steroids in human urine by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids*, 2004; 69: 101-109. – 26. *Kao P. C., Machacek D.A., Magera M.J., Lacey J.M., Rinaldo P.*: Diagnosis of Adrenal Cortical Dysfunction by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2001; 31: 199-204. – 27. *Middle J.*: Standardization of steroid hormone assays. *Ann. Clin. Biochem.*, 1998; 35: 354. – 28. *Jana C.K., Ali E.*: Antibody binding characteristics of geometrical isomers of testosterone 3-(O-carboxymethyl)oxime. *Steroids*, 1999; 64: 228-232. – 29. *Wudy S.A., Hartmann M. F.*: Gas chromatography-mass spectrometry profiling of steroids in times of molecular biology. *Horm. Metab. Res.*, 2004; 36: 415-422.

Adres: 80-416 Gdańsk, Al. Gen. J. Hallera 107.