

## СВОБОДНЫЙ ТЕСТОСТЕРОН В СЛЮНЕ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР АНДРОГЕННОГО СТАТУСА МУЖЧИН

**Н.П. Гончаров<sup>1</sup>, Г.В. Кацья<sup>1</sup>, А.Д. Добрачева<sup>1</sup>, А.Н. Нижник<sup>1</sup>,  
Г.С. Колесникова<sup>1</sup>, В. Хебст<sup>2</sup>, Ю. Вестерманн<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Эндокринологический научный центр РАМН, Россия, Москва (директор – академик РАН и РАМН Дедов И.И.)

<sup>2</sup>IBL GmbH., Германия, Гамбург

## FREE TESTOSTERONE CONCENTRATION IN SALIVA IS A GOOD REFLECTION OF UNBOUND TESTOSTERONE CONCENTRATION IN SERUM OF MEN

**N.P. Goncharov, G.V. Katsia, A.D. Dobracheva, A.N. Nizhnik,  
G.S. Kolesnikova, V. Hebst, U. Vestermann**

Aim of this study was to find out that free testosterone concentration in saliva is a good reflection of unbound testosterone concentration in serum of men. Recently published articles have stated that results, especially, when measured by fully automated systems, have been incorrect. A new luminescence enzyme immunoassay (LIA) has been developed and validated. The high analytical (8.7 pmol/L) and functional (17.3 pmol/L) sensitivity allows the quantification of very low concentration in saliva. Free salivary testosterone concentration in healthy men in morning hours was 369 pmol/L (Mediana), range 263–544 pmol/L, which statistically significantly higher than that in men with androgen deficiency, 215 pmol/L (Mediana), range 51–249 pmol/L. Repetitive determination of free testosterone concentrations in saliva (once a week for 5 weeks) showed high stability of results in time, with coefficient of variation 9% (range 5–23%). In this study we showed that free salivary testosterone levels in morning samples correlated well with calculated free testosterone in blood both in healthy men ( $R=0.754$ ,  $P=0.001$ ), and in patients with androgen deficiency ( $R=0.889$ ,  $P=0.0001$ ).

### Введение

Диагностика гипогонадизма у мужчин и особенно распространенного возрастного дефицита тестостерона связана с определенными трудностями, так как клинические его проявления недостаточно специфичны. Поэтому необходимо проведение биохимической диагностики по уровню циркулирующего общего тестостерона, физиологическая концентрация которого колеблется в пределах 12–35 нмоль/л (при этом нижний предел является определяющим). Однако, современные системы иммуноанализа имеют тенденцию к завыше-

нию концентрации тестостерона и тем самым снижают процент выявления пациентов с истинным дефицитом тестостерона [1,9,13]. Наиболее оптимальным маркером андрогенного статуса является свободная форма тестостерона, не связанная с белками, именно она обеспечивает биологическую активность. Определение этой формы в крови сопряжено с определенными технологическими трудностями. Поэтому мы обратились к альтернативной биологической жидкости – слюне, куда могут попадать только свободный тестостерон.

Слюна, как биологическая жидкость, привлекла внимание исследователей много лет назад, так как слюнные железы обладают особым свойством: в слюнной проток поступают соединения только с низким молекулярным весом, к которым относятся и тестостерон, не связанный с альбумином и специфическим глобулином – глобулин, связывающий половые стероиды (СССГ). Концентрация жирорастворимых свободных стероидов, таких как тестостерон, не зависит от скорости выделения слюны и практически равна уровню несвязанной формы стероида в сыворотке крови [8]. Если измерить адекватными методами концентрацию свободного тестостерона, который доступен тканям-мишеням и оказывает свое биологическое действие в этой форме, то этот уровень свободного тестостерона в слюне мог бы стать идеальным маркером для определения андрогенного статуса как у мужчин, так и у женщин.

Первые попытки измерять уровень стероидов в слюне, используя физико-химические методы, были предприняты около 50 лет назад, но низкая чувствительность этих методов препятствовала их использованию в клинической диагностике. Появление радиоиммунологических методов в 60-х годах дало новый импульс к повышению интереса для исследования содержания гормонов в слюне – биологической жидкости, в которой можно было бы определить широкий спектр стероидов: андрогенов – тестостерона, эстрогенов – эстриола у беременных, эстрадиола и эстрона, гестагенов – прогестерона и кортикостероидов – кортизола и 17-оксипрогестерона. Сбор слюны прост, не инвазивен и имеет большие преимущества перед традиционными методами определения стероидов в венозной крови, взятие которой требует квалифицированного персонала и сам по себе является добавочным стрессорным фактором, способным исказить показатели гормональных параметров.

Однако, РИА-методы все-таки не были способны достичь чувствительности, необходимой для определения свободных стероидов в слюне. Концентрация свободного тестостерона в слюне составляет только около 1–2% его содержания в крови. Следовательно, для анализа были необходимы большие объемы слюны (до 3 мл), после сбора слюны следовала неприятная процедура экстракции диэтиловым эфиром, который является огнеопасным и взрывоопасным растворителем. В результате такую технологию было сложно адаптировать для рутинного использования в биохимических лабораториях для клинической диагностики.

Диагностические наборы для прямого измерения свободных стероидов, в особенности для тестостерона в крови, пока не пригодны для диагностического исследования и могут использоваться лишь в научных целях [7,11]. Как известно, группой Vermeulen [11] выведена формула для расчета concentra-

ции свободного тестостерона на основе определения общего тестостерона и СССР в крови. Таким образом, корректное определение концентрации свободного тестостерона в крови основано на четком знании истинной концентрации общего тестостерона. Реально это не простая проблема, так как современные автоматизированные технологии для измерения общего тестостерона дают совершенно разные результаты [1,9,13]. Кроме того, требуется также оптимальный метод для определения СССР, что значительно удорожает стоимость вычисления концентрации свободного тестостерона.

Лишь появление новой современной технологии иммуноанализа, основанной на усиленной хемилюминесценции [2], сочетающей ультрачувствительность и высокую 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 концентрации тестостерона в слюне, что особенно важно для женщин и детей.

Цель настоящего исследования – доказать, что концентрация свободного тестостерона в слюне хорошо коррелирует и отражает концентрацию несвязанного тестостерона в крови и является дополнительным существенным диагностическим критерием для определения андрогенного статуса мужчин.

## Материал и методы

### *Пациенты*

Были обследованы следующие группы мужчин:

1. Добровольцы-мужчины (n=16) в возрасте от 21 до 50 лет (медиана 30 лет). В этой группе 12 человек собирали 9 образцов слюны (3 – утром, 3 – днем, и 3 – вечером), согласно протоколу сбора слюны, чтобы определить суточную динамику тестостерона в слюне. Остальные 4 человек собирали только 3 утренних порции слюны. Все исследуемые в этой группе добровольцы были клинически здоровыми.

2. Добровольцы-мужчины (n=15) в возрасте 38–55 лет (медиана 48 лет). Слюна была собрана один раз в неделю в течение 5 недель. Эта группа была стандартизирована: одна и та же профессия, физический и эмоциональный статус, режим дня (время вставания, характер диеты и т.д.).

3. Больные мужчины (n=14) с различными формами андрогенной недостаточности в возрасте от 22 до 68 лет (медиана 29,5 лет). 10 пациентов собирали слюну 9 раз в день, и 4 пациентов – только 3 утренние порции слюны.

4. Один пациент: транссексуал-женщина (F→M) – сбор слюны осуществлялся один раз в день утром до и после внутри мышечного введения сустанона.

*Процедура сбора слюны*

Чтобы исследовать колебания концентрации тестостерона, три порции слюны были собраны в течение одного часа трижды в день. Порции слюны были собраны по следующей схеме:

Образец 1 – в 8.30      Образец 4 – в 15.30      Образец 7 – в 22.00  
Образец 2 – в 9.00      Образец 5 – в 16.00      Образец 8 – в 22.30  
Образец 3 – в 9.30      Образец 6 – в 16.30      Образец 9 – в 23.00.

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

Образцы слюны были собраны в специальные контейнеры SalyCap со специальной трубкой, изготовленной из материала, который не сорбирует стероиды. Слюна была собрана не менее, чем через 30 минут после еды, питья, чистки зубов или жевания жвачки. Требовалось примерно 2 минуты, чтобы собрать необходимое количество слюны (0,6–0,8 мл). Образцы с небольшим окрашиванием из-за контаминации кровью были отбракованы. Все образцы были помечены специальным маркером (имя пациента, дата, время). Собранная слюна могла храниться до 5 дней при 20°C, 10 дней при 2–8°C и 6 месяцев и более при – 20°C. Свободный тестостерон измерялся 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 вы слегка сжимаете зубами верхний конец трубочки.
- Рекомендуется собирать слюну перед зеркалом, чтобы контролировать процесс наполнения пробирки.

*Процедура сбора крови*

Образцы крови были собраны между 8.00 и 10.00 утра в день сбора слюны. Образцы сыворотки хранились при –20°C в двух аликвотах до измерения в них содержания общего тестостерона и глобулина, связывающего половые гормоны (СССГ).

*Определение свободного тестостерона (сТ)* проводилось люминисцентным CIA-методом (фирма IBL-Гамбург, Германия), основанном на принципе конкурентного связывания. Регистрацию люминисцентного сигнала проводили на мультианализаторе Victor (фирма Wallac, Финляндия).

*Определение общего тестостерона (оТ)* в образцах крови определяли методом усиленной хемилюминисценции с помощью автоматического анализатора Vitros Eci (Ortho-Clinical Diagnostics, J&J, Великобритания), как наиболее адекватного метода [1].

*Определение содержания глобулина*, связывающего половые стероиды (СССГ), проводили методом флуоресценции, отсроченной по времени, с помощью автоматизированной системы Autodelphia (фирма Wallac, Финляндия).

*Вычисление концентрации свободного тестостерона* в крови определяли с помощью математической формулы, использующей показатели содержания в крови общего тестостерона и СССР и описанной в работе A.Vermeulen [11] (сайт в Интернете <http://www.issam.ch/freetesto.htm>):

*Статистическая обработка результатов*

Полученные данные были обработаны с помощью программы Statistica for Windows, StatSoft, Inc. (1999). Результаты представлены в виде медианы, 25/75 и 10/90-перцентилей. Для выявления достоверности различий между сравниваемыми параметрами был использован тест Манн-Уитни. Для оценки связи между различными показателями были использованы ранговый тест Спирмена и регрессионный анализ. Различия  $P < 0,05$  считались статистически достоверными.

**Результаты**

Концентрация общего тестостерона (оТ), уровень СССР, вычисленный свободный тестостерон (всТ) в крови и средний возраст здоровых мужчин представлены в табл. 1. Обнаружено, что сравнимые по возрасту здоровые мужчины и мужчины с андрогенным дефицитом имели сопоставимый уровень СССР (медиана была равна, соответственно, 36,1 и 33,0 нмоль/л). Однако, уровень общего тестостерона был значительно выше в группе здоровых мужчин (18,8 и 6,7 нмоль/л). Концентрация вычисленного сТ в крови у здоровых мужчин также была в три раза выше, чем у пациентов с андрогенным дефицитом (374 и 135 пмоль/л).

Средние уровни свободного тестостерона в утренних, дневных и вечерних образцах слюны приведены в табл. 2.

Средняя концентрация тестостерона в слюне у здоровых мужчин (по 3 утренних образца от каждого, 8-30-9-30, всего 36 образцов) была 380 пмоль/л

Таблица 1

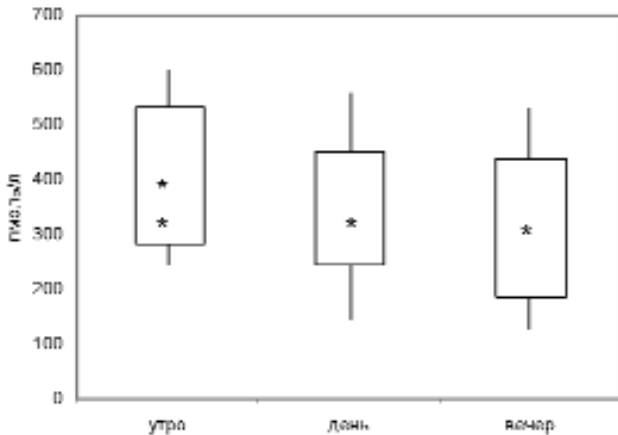
**Гормональная характеристика исследуемых групп (медиана и 10/90 перцентили)**

Группы	n	Возраст (годы)	Общий тестостерон (нмоль/л)	СССГ (нмоль/л)	Вычисленный свободный тестостерон (пмоль/л)
Здоровые Мужчины	31	38 (25-52)	18,8 (12,4-26,1)	36,1 (21-54)	374 (225-544)
Мужчины с андрогенным дефицитом	14	35 (21-54)	6,7 (1,2-10,8)	33,0 (14,7-104,1)	135 (9,3-215)
P=		0,2242	0,0000	0,3958	0,0000

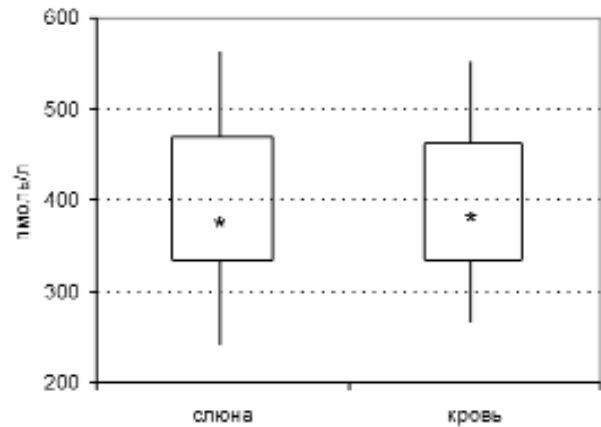
Таблица 2.

**Суточная динамика свободного тестостерона в слюне (пмоль/л) у здоровых мужчин и мужчин с андрогенным дефицитом (медиана и 10-90 перцентили)**

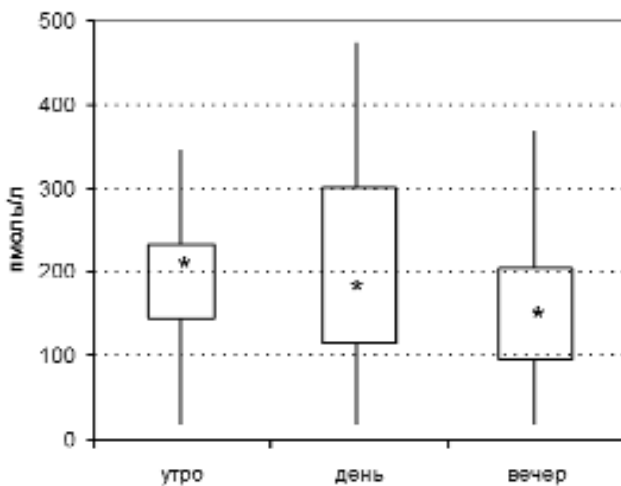
Группы	Время сбора слюны (часы)								
	8-30	9-00	9-30	15-30	15-00	16-00	22-00	22-30	23-00
здоровые мужчины	371 (260-562)	364 (277-531)	374 (263-541)	329 (208-440)	322 (225-502)	288 (225-440)	212 (146-423)	295 (222-430)	343 (164-475)
мужчины с андрогенным дефицитом	205 (76-250)	209 (36-267)	218 (52-302)	240 (35-416)	201 (21-319)	169 (51-347)	131 (45-364)	157 (66-305)	145 (42-316)
P=	0,0000	0,0000	0,0000	0,0926	0,0147	0,0037	0,0083	0,0019	0,0056



**Рис. 1. Суточная динамика свободного тестостерона в слюне у здоровых мужчин (\*медиана, достоверность разницы – между утром и вечером P=0,0012, между днем и вечером P=0,0006)**



**Рис. 3. Средний уровень тестостерона в слюне утром и вычисленный свободный тестостерон в крови у здоровых мужчин (\*медиана, достоверность разницы P=0,605)**



**Рис. 2. Суточная динамика свободного тестостерона в слюне больных мужчин с андрогенным дефицитом (\*медиана, достоверность разницы между утром и вечером P=0,583, между днем и вечером P=0,0006)**

(270–544). Средняя концентрация днем и вечером, соответственно,  $80 \pm 15\%$  и  $71 \pm 21\%$  от утренней концентрации (рис. 1).

В отличие от здоровых мужчин, суточная динамика свободного тестостерона в слюне у больных выражена менее заметно. Концентрация свободного тестостерона утром и днем практически не отличалась друг от друга, статистически достоверное

различие было обнаружено только вечером –  $68 \pm 29\%$  от утреннего уровня (рис. 2).

Концентрация сТ в слюне и вычисленная концентрация сТ в крови у здоровых мужчин практически не отличались друг от друга:  $380$  пмоль/л ( $270$ – $544$  пмоль/л) и  $374$  пмоль/л ( $225$ – $544$  пмоль/л,  $P=0,111$ ) (рис. 3), тогда как у пациентов с андрогенным дефицитом концентрация сТ часто отличалась от вычисленной концентрации сТ в крови. Медиана свободного тестостерона в трех утренних образцах слюны была выше ( $215$  пмоль/л, разброс  $55$ – $249$  пмоль/л), чем вычисленная концентрация свободного тестостерона в крови –  $135$  пмоль/л (разброс  $9,3$ – $215$  пмоль/л) (рис. 4)

У пациентов с андрогенным дефицитом, имеющих очень низкий уровень оТ в крови, выявлены значительные различия между содержанием сТ в слюне и вычисленным сТ в крови:

Пациент K4d с раком простаты, после двусторонней гонадэктомии. Концентрация оТ в крови –  $0,2$  нмоль/л, уровень СССГ –  $162$  нмоль/л. При таком высоком уровне СССГ уровень вычисленного сТ в крови составлял  $0,5\%$  от концентрации оТ в крови, тогда как содержание сТ в слюне составляло  $15\%$  от оТ в крови.

Пациент Ш6d с первичным гипогонадизмом. Концентрация оТ в крови –  $1,2$  нмоль/л, уровень СССГ –  $104$  нмоль/л. Уровень вычисленного сТ в крови составлял  $0,8\%$  от оТ в крови, тогда как сТ в слюне – более  $8\%$  от оТ в крови.

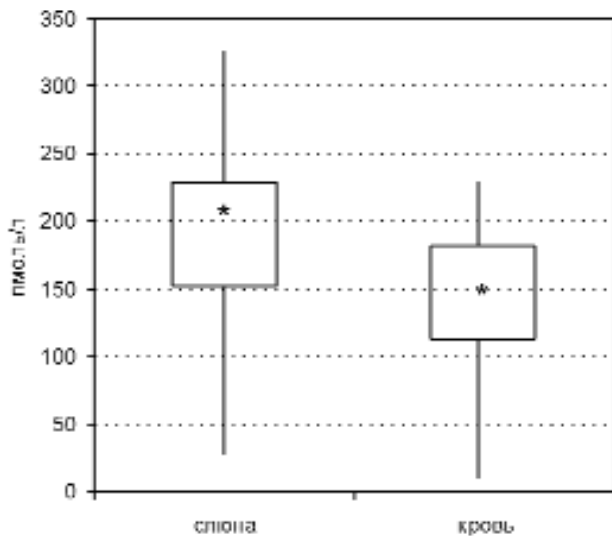


Рис. 4. Средний уровень утреннего свободного тестостерона в слюне и вычисленного свободного тестостерона в крови у пациентов с андрогенным дефицитом (\*медiana, достоверность разницы  $P=0,061$ )

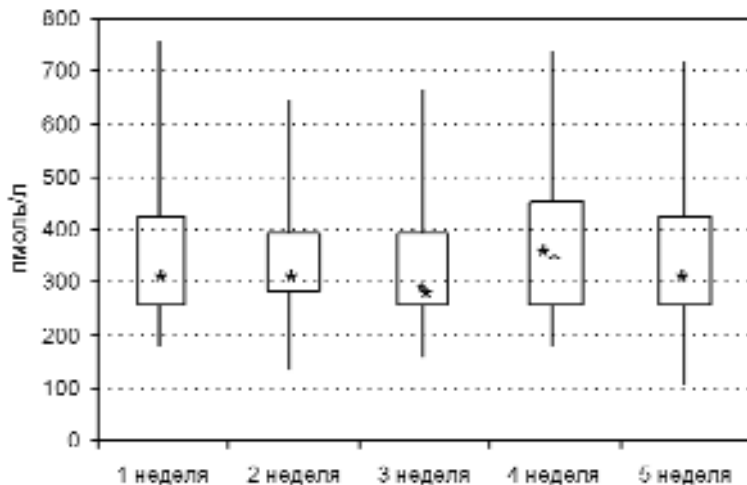


Рис. 5. Повторяемость измерения свободного тестостерона в слюне в течение 5 недель (один образец в неделю) у здоровых мужчин (\*медiana, коэффициент вариации 9,0%)

Пациент Ш2d с гипергонадотропным гипогонадизмом. Концентрация оТ в крови – 1,4 нмоль/л, уровень СССГ – 35 нмоль/л. Уровень вычисленного сТ в крови – 1,7% от оТ в крови, содержание сТ в слюне – 4% от оТ в крови.

Однако, несмотря на вышеперечисленные расхождения между абсолютными концентрациями сТ в слюне и вычисленной сТ в крови, значительная корреляция обнаружена между этими двумя показателями (коэффициент регрессии 0,889,  $P$  – средний = 0,0000), а диагностическая значимость определения сТ в слюне в группе пациентов с андрогенным дефицитом достигала 100%.

Чтобы изучить воспроизводимость концентрации свободного тестостерона в слюне во времени, мы собирали слюну в группе здоровых мужчин в течение 5 недель (один раз в неделю утром). В начале исследования (1я неделя) концентрация свобод-

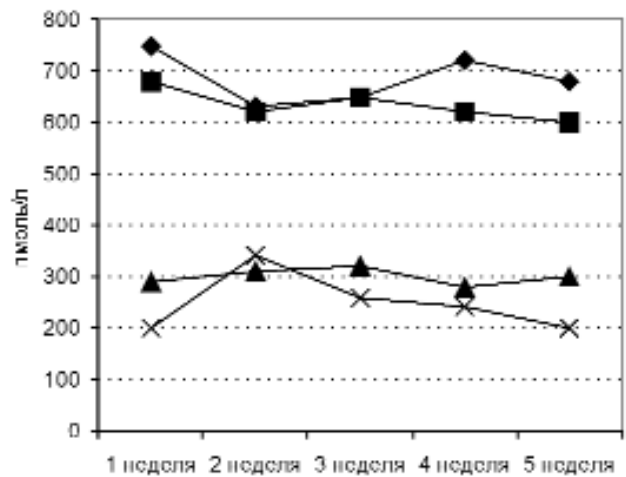


Рис. 6. Индивидуальные вариации уровня свободного тестостерона у 4 здоровых мужчин в течение 5 недель (один образец в неделю)

ного тестостерона у обследуемых была в пределах 180–745 пмоль/л. Последующие определения тестостерона (2я–5я недели) показали высокую повторяемость результатов (коэффициент вариации (9% – разброс от 5 до 23%) (рис. 5). На рис. 6 представлены примеры индивидуальной динамики у 4 мужчин данной группы: двое – с уровнем ниже медианы (медiana 374 пмоль/л) и двое – выше медианы (рис. 6).

Следующий важный аспект – мониторинг заместительной терапии андрогенами по уровню свободного тестостерона в слюне. Мы проводили мониторинг определения сТ в слюне у транссексуала (женщина > мужчина) после лечения сустаномом. До лечения уровень общего и вычисленного свободного тестостерона в крови был очень низок (соответственно 3,9 нмоль/л и 42,3 пмоль/л). Через 1 неделю после инъекции сустанона уровень оТ в крови вырос на 29%, концентрация вычисленного сТ в крови – на 140%, тогда как содержание сТ в слюне возросло утром на 275% и вечером на 527% (рис. 7).

Таким образом, можно заключить, что мониторинг заместительной терапией андрогенами более адекватен при определении сТ в слюне с помощью ЦА-технологии. С этим методом достаточно просто изучать фармакокинетику в каждом отдельном случае, с тем, чтобы подбирать оптимальную дозу препарата и пути его введения.

## Обсуждение

В настоящее время для обозначения биологической андрогенной активности часто используется термин – андрогенный статус пациента, основанный на определении общего тестостерона. С клинической и научной точки зрения этот термин неудачен. Измерение общего тестостерона в сыворотке

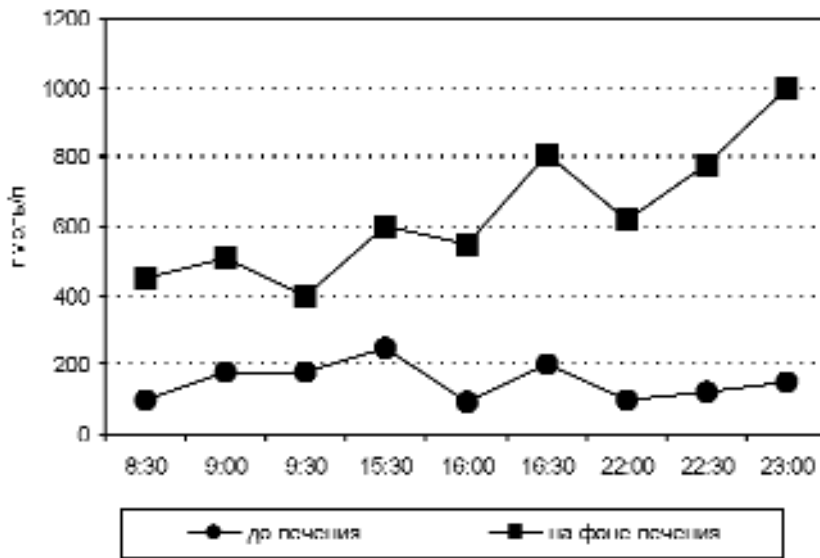


Рис. 7. Динамика тестостерона в слюне у транссексуала до и через 1 неделю введения сустанона

прямым безэкстракционным методом показало значительные количественные различия при использовании современных иммуноферментных технологий [4,9,13]. Все тестируемые методы по сравнению с «золотым стандартом» – газовой хроматографией в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ/МС) имеют значительный сдвиг в сторону завышения результатов, особенно при измерении низкого уровня тестостерона, т.е. ниже 12 нмоль/л. Ни один из методов (за исключением РИА с преаналитической экстракцией) не может обеспечить точное количественное определение уровня тестостерона в диапазоне низких концентрациях как у здоровых мужчин, так и пациентов с андрогенным дефицитом.

Определение тестостерона в слюне дает хорошую корреляцию с несвязанным тестостероном в крови. Так как именно свободная фракция тестостерона обладает биологической активностью, поэтому тестостерон в слюне является более адекватным индикатором биологической активности стероида, чем общий тестостерон в сыворотке, особенно в условиях изменения связывающей способности СССГ. Техника сбора проста и неинвазивна и позволяет сбор многих образцов без травмирования пациента, поэтому возможен частый сбор слюны и пересылка ее почтой [6]. С введением в практику очень чувствительной и специфичной ЛИА-технологии анализа, он превращается в метод выбора для научных исследований, клинической диагностики, мониторинга и лечения гонадальной дисфункции, включая изучение фармакокинетики производных тестостерона при заместительной терапии.

Разброс нормальных значений свободного тестостерона у здоровых мужчин утром, полученный в данной работе, согласуется с таковым, опубликованным ранее [5], полученным после экстракции и хроматографического разделения, с

использованием высоко-специфической антисыворотки. Авторы вышеназванной публикации обобщили результаты измерения тестостерона в слюне 8 научными группами и во всех исследованиях разброс нормальных значений свободного тестостерона в слюне составлял 233–314 пмоль/л. Согласно данным этой группы [3], свободный тестостерон у больных с эректильной дисфункцией был 198–240 пмоль/л, а у здоровых волонтеров – 200–1000 пмоль/л. Авторы также заключили, что свободный тестостерон в слюне может быть хорошим маркером для оценки андрогенного статуса у мужчин.

Другая группа [10] использовала измерение свободного тестостерона в слюне не только для диагноза гипогонадизма, но и для мониторинга фармакокинетики пролонгированного андрогена – тестостерон-буциклата. Наши данные определения свободного тестостерона в слюне у транссексуала при лечении его сустаномом подтвердили такую возможность.

В нашем исследовании мы также определили динамику слюнного тестостерона у здоровых мужчин во времени (в течение 5 недель). Было показано, что изменения концентрации свободного тестостерона в слюне незначительны (коэффициент вариации  $12 \pm 3\%$ ) но имеют индивидуальные количественные различия.

Таким образом, с введением в практику очень чувствительной и специфичной ЛИА-технологии, концентрация тестостерона в слюне может быть широко использована как объективный и адекватный гормональный критерий в диагностике различных форм гипогонадизма у мужчин, а его определение ЛИА-методом может служить методом выбора для целого ряда научных исследований, мониторинге и лечении гонадальных дисфункций, включая изучение фармакокинетики производных тестостерона при заместительной терапии.

## Выводы

Концентрация тестостерона в слюне у мужчин, определенная методом усиленной хемилюминесценции, полностью отражает уровень свободного, несвязанного с белками, тестостерона в крови.

Концентрация свободного тестостерона в слюне является адекватным маркером выявления андрогенного дефицита у пациентов.

Высокая чувствительность и специфичность ЛИА-метода в сочетании с неинвазивностью и простотой получения слюны позволяет рекомендовать его для широкого использования в диагностической практике.

**Литература**

1. Гончаров НП, Кацця ГВ, Колесникова ГС и др. Пробл.эндокрин. – 2005. – №6. – стр.31–37.
2. Aldrecht S, Zimmermann T, Brandl H. et al J Lab Med. – 1997. –V.21. – P. 191–204.
3. Corradi G, Szathmari M Orv Hetil. – 1998. – V.139(54). – P.2021–2024
4. Goncharov N, Katsya G, Dobracheva A. et al The Aging Male – 2005. – V.8(3/4). – P.194–202.
5. Lac G, Lac N, Robert A Arch Int Physiol Biochem Biophys. – 1993. – V.101(5), P.257–262.
6. Matsumoto AM, Bremner WJ. J Clin Endocr Metab – 2004. – V.89 – P.520–524.
7. Rosner W. J Clin Endocr Metab – 2001. – V.86 – P. 2903–2905.
8. Schurmeyer T, Nieschlag E. in Read GF. Et al “Immunoassay of steroids in saliva” Cardiff. Wales: Alpha Omega. – 1982. –P.202–209.
9. Taieb J, Matjian B, Millot F et al. Clin Chem. – 2003. – V.49(8). – P. 1381–1395.
10. Tschop M, Bebre HM, Nieschlag E et al. Clin Chem Lab Med. – 1998. –V.36(4). – P.223–230.
11. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufmann JM. J Clin Endocr Metab – 1999. – V.84 – P.3666–3672.
12. Vining RF, McGinley RA. In: Read GF, Riad-Fahmy D., Walker RF, Griffiths K “Immunoassays of steroids in saliva” Cardiff, Wales: Alpha Omega; 1982, P.56–63.
13. Wang C., Catlin DH., Demers LM. et al. J.Clin.Endocr.Metab. – 2004. – V.89(2). – P.534–543.