

毛髪コルチゾール濃度測定が オーバートレーニングを予防する生理指標となりうるか

筑波大学 越智元太
(共同研究者) 同 征矢英昭
同 弘山勉
同 岡本正洋
同 諏訪部和也

Assessing Hair Cortisol as Biomarker to Prevent Over-Training

by

Genta Ochi, Hideaki Soya,
Tsutomu Hiroshima, Masahiro Okamoto, Kazuya Suwabe
*Faculty of Health Sports Science,
University of Tsukuba*

ABSTRACT

Overtraining is primarily related to chronic stress caused by sustained high load training, and often coupled with other stressors. However, a diagnostic tool that monitors chronic stress has yet to be developed. Recently, hair cortisol concentrations (HCC) has been increasingly gaining attention as a novel biomarker of chronic stress, and we hypothesize that HCC could be a useful biomarker for preventing overtraining. To determine this hypothesis, we investigate the relationships between HCC and aerobic performance such as the peak oxygen uptake ($\dot{V}O_{2peak}$) and oxygen transport ability for 41 young male adults (Age: 19.7 ± 1.5 yr, Height: 171.7 ± 5.2 cm, Weight: 58.2 ± 5.3 kg). HCC, blood cortisol, red blood cells (RBC), hemoglobin concentrations (Hb), were measured once per month at June and July. 27 subjects

without big sports events in June and July measured $\dot{V}O_{2peak}$. HCC was measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the most proximal 1cm of hair. The results showed that HCC and $\dot{V}O_{2peak}$ increased in July. Although, there was no significant negative correlation between HCC and $\dot{V}O_{2peak}$, there were significant negative correlation between HCC and RBC (June: $r=-0.309$, $p<0.05$; July: $r=-0.384$, $p<0.05$). Moreover, there were significant negative correlation between HCC and The POMS category vigor in July ($r=-0.341$, $P<0.05$). These results suggest that HCC associated with declining oxygen transport ability and mood. Chronic stress of athletes may cause declining endurance performance and mood and as a result may be related to overtraining syndrome.

要 旨

アスリートに見られるオーバートレーニング症候群 (OTS) は過剰なトレーニングやコンディション不良といった慢性的なストレスが主な要因とされ、長期に渡りパフォーマンスや気分の低下を引き起こす。これまで、慢性ストレスの生理的な評価法は困難とされてきたが、近年、毛髪コルチゾール濃度 (hair cortisol concentrations; HCC) が慢性ストレスを評価する有用な指標として台頭してきた。そこで、本研究では、HCCがOTSを評価する生理指標として有用か検証するため、HCCが運動持久性や気分と関連するか明らかにすることを目的とした。2018年6月と7月にスポーツ競技経験を有する健康な男子大学生41名 (年齢 19.7 ± 1.5 歳, 身長 171.7 ± 5.2 cm, 体重 58.2 ± 5.3 kg) のHCCと最高酸素摂取量 (27名), 酸素運搬能の指標である血中赤血球数, ヘモグロビン濃度, ヘマトクリット, 気分の指標であるPOMS2を測定した。その結果, 6月7月のHCCは血中赤血球数と負の相関関係が示された。さらに, 7月のHCCはPOMS2の活気・活力と負の相関関係が示された。以上の結果から, HCCは血液酸素運搬能や気分と関係することが明らかとなり, 過剰な慢性ストレスは運動持久性低下に関連する可能性が示

唆された。今後, HCC測定を継続して行うことで, 慢性ストレスの増加が長期的に運動パフォーマンスや気分の低下と関連することが明らかとなれば, HCCはOTSの判断基準として有用であることを示されることが期待される。

緒 言

高いパフォーマンスを発揮するために, 日々厳しいトレーニングに取り組むアスリートは常にストレスフルな環境にさらされる。効率的にパフォーマンスを向上させるためにはトレーニング後の適切な休養が重要となるが, 不十分な休養や過剰なトレーニングは, パフォーマンス向上効果 (超回復) が得られないだけでなく, 長期のパフォーマンス不振や気分低下といったオーバートレーニング症候群 (Overtraining syndrome; OTS) を招く可能性がある (Lehmann et al., 1993¹); Meeusen et al., 2013)²。そのため, アスリートのOTSを予防し, トレーニングによるパフォーマンス向上効果を高めるには, 慢性ストレスを生理的評価する方法が求められる。

ストレスレベルの生理的指標は, 視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 軸の最終産物であるステロイドホルモン (コルチゾール) が用いられる。これまで, 血液・唾液・尿中のコルチゾール濃度

測定からストレスレベルが検討されてきた。しかし、これらのコルチゾールは飲食や運動といった急性のストレスの影響を受けやすく、日内変動もあることから、慢性ストレスを評価するためには、急性ストレスを制限するような実験プロトコルを用い、日内変動を考慮し、1日に複数回、毎日測定する必要がある。これは、アスリートに対する介入頻度が増加し、測定自体がストレスとなることから、現実的な測定法でない。そのため、アスリートの慢性ストレスを評価するためには、介入が少なく、急性ストレスの影響を受けない新たな評価法の開発が求められている。

近年、ヒトの毛髪中のコルチゾール濃度 (hair cortisol concentrations; HCC) が測定できることが報告され (Raul et al., 2004)³⁾、新たなストレスレベルの生理指標になりうるとして注目が集まっている。毛髪は1ヶ月に1cm伸び (Wennig, 2000)⁴⁾、毛髪形成時に毛細血管を介して血液由来のホルモンが蓄積することが考えられている (Gow et al., 2010)⁵⁾。1ヶ月間に渡る唾液中コルチゾール濃度の積分値 (area under the curve: AUC) と頭皮から1cmのHCCが高い正の相関関係を示すことが報告されている (Short et al., 2016)⁶⁾; Xie et al., 2011)⁷⁾。さらに、このHCC測定法を用いた先行研究において、ストレスフルなライフイベント (Dettenborn et al., 2010)⁸⁾; Staufenbiel et al., 2014)⁹⁾ や、妊婦の妊娠期間に関連して高値を示すことが報告されている (D'Anna-Hernandez et al., 2011)¹⁰⁾。さらに、高い身体活動量の人や運動量の多いアスリートにおいてHCCが高値になることも報告され (Gerber et al., 2012)¹¹⁾; Skoluda et al., 2012)¹²⁾、HCCは慢性的な心理ストレス、運動ストレスを反映する新しい生理指標となることが示唆されている。これらの先行研究から、HCCは介入頻度を最小限にしてアスリートの慢性ストレス評価が可能となることが示唆される。しかし、HCCが高まる要因についての検討は行われてい

る一方で、高まったHCCによる影響についての検討は少なく、HCCが運動持久性や気分に与える影響は明らかにされていない。HCCと運動持久性や気分の関係が明らかとなれば慢性ストレスがOTSの要因になっている可能性を示唆するものとなる。

そこで本研究では、スポーツ競技経験を有する健康な男子大学生を対象に、1ヶ月間の慢性ストレスを反映するHCCと運動持久性の指標となる最高酸素摂取量と血液酸素運搬能 (血中赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット)、気分の関係を明らかにすることを目的とした。

1. 方法

1.1 被験者

被験者は体育会部活動に所属する健康な男子大学生41名とした。解析に用いた41名の被験者の特性は年齢 19.7 ± 1.5 歳、身長 171.7 ± 5.2 cm、体重 58.2 ± 5.3 kgであった。すべての被験者は、本研究の目的及び内容、安全性に関するインフォームド・コンセントを行った上で、書面にて実験参加の同意を得た。本実験は、筑波大学倫理委員会の承認を得た後に実施した。

1.2 実験手順

2018年6月4週目と7月4週目に毛髪、血液、心理アンケートの採取、最高酸素摂取量測定を実施した (図1)。測定にかかる2ヶ月間、すべての被験者は所属する部での活動をおこなわせ、測定者から指示は与えなかった。慢性ストレスの指標として採取した毛髪からHCCと一過性ストレスの指標として血液から血中コルチゾールを測定した。血液酸素運搬能の指標として赤血球数とヘモグロビン濃度、ヘマトクリットを測定した。気分の評価として、OTSの心理指標として用いられる Profile of Mood States 2 (POMS2) を用いた。運動持久性の指標である最高酸素摂取量は6月7日と

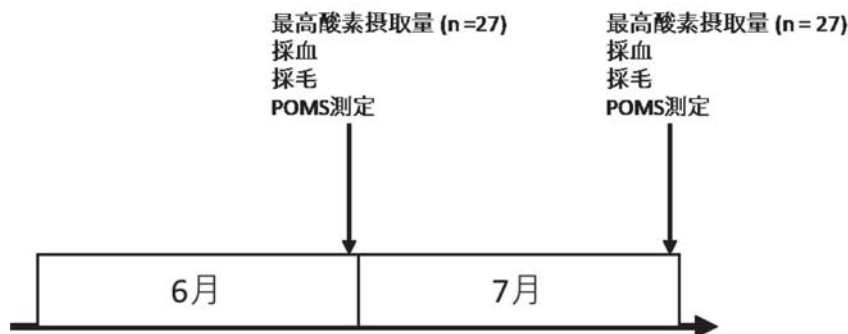


図1 実験プロトコル

もに測定日1週間以内に大きなスポーツイベントのなかった27名に対して行った。

1. 3 測定項目

1. 3. 1 毛髪コルチゾール

ヒトの毛髪は1ヶ月におよそ1cm伸びることから、毛髪1cmを解析することでおよそ1ヶ月間のストレス状態を調査することができる。本実験ではおよそ1ヶ月ごとのストレスを評価するため、根元から1cmをハサミで切り取り解析に用いた。採取した毛髪は根元の先端を揃え、そこから1cmを切断し、常温で保存した。

本研究では酵素免疫測定法(Enzyme Immunoassay : EIA)によりコルチゾール測定を行った。測定は毛髪の洗浄、毛髪の粉碎、コルチゾールの抽出、コルチゾール濃度測定という手順で行った。洗浄は4mlのイソプロパノールを用い、3分間浸すことを2回行った。毛髪の粉碎は乳鉢の中に液体窒素とともに毛髪サンプルを入れ、乳棒を用いてできるだけ細かく粉碎した。粉碎後、サンプルの重さを測定し、メタノール1mlを注入し、50℃の状態に16時間温置することでコルチゾールの抽出を行った。16時間後、上澄み液をとり、50℃に保ったまま、水分がなくなるまで窒素ガスをゆっくり吹き付け乾燥させた。水分が完全になくなったら250 μ lの緩衝液で戻し、その後はEIAキット(ARB社, Cortisol EIA Kit DetectX Strip Plate)の測定方法に従い測定を行った。キットによる手順が終

わったものは、プレートリーダー(PerkinElmer社, ARVO-X)で吸光度を測定し、コルチゾール濃度を算出した。

1. 3. 2 血液酸素運搬能指標

採血は、条件を揃えるため、午前7:30~8:30の間で行い、看護師が医師の指示の下、正中静脈から約15ml採取した。採血当日は食事、運動は控えた状態で採血を行った。採血された血液は血球測定のためにEDTA処理された真空採血管に2ml分注し、コルチゾール、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットの測定に用いた。分析は全てつくば臨床検査教育・研究センターつくばi-Laboratory LLPに委託した。

1. 3. 3 心理指標

被験者の心身のコンディションの評価の指標として、OTSの心理指標として用いられるPOMS 2短縮版を用いた。POMS2短縮版は35項目からなり、緊張・不安、抑うつ・落ち込み、怒り・敵意、活気・活力、疲労・無気力、混乱・当惑、友好の7つの観点から、対象者がおかれた条件により変化する一時的な気分・感情の状態を測定できるという特徴がある。アスリートにおけるOTSでは疲労・無気力の項目の増加と活気・活力の項目の低下が見られることが知られている。本研究では被験者に測定時の状態を思い浮かべて回答させた。

1. 3. 4 最高酸素摂取量

6月7月ともに測定日1週間以内に大きなスポー

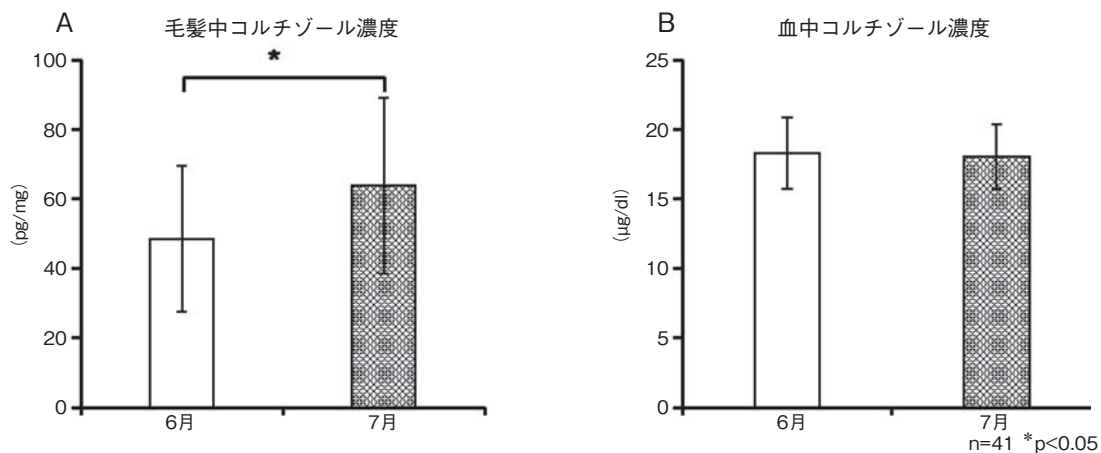


図2 ストレス指標
(A) 毛髪コルチゾール濃度 (B) 血中コルチゾール濃度

ツイベントのなかった被験者27名は自転車エルゴメータによる運動負荷ペダリング運動を行い、最高酸素摂取量を測定した。運動時のサドルの高さは、被験者が最も漕ぎやすいように被験者ごとに調整した。運動中は心拍数と主観的運動強度、呼気ガスを毎分測定した。

プロトコルは、ペダル回転数を60rpmに維持したまま、3分間のウォーミングアップの後、1分ごとに20W ずつ負荷を漸増させていくランプ負荷法を用いた。最高酸素摂取量は以下の指標2つを満たした場合とした：(1) 呼吸交換比が1.05以上、(2) 予測最大心拍数の90%、(3) 主観的運動強度が19か20に達している。

1. 4 統計処理

HCC、血中コルチゾール、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、POMS2、最高酸素摂取量は測定月ごとに平均値を算出し、月間の比較には対応のあるt検定を用いて分析した。HCCと血中コルチゾール濃度、HCCと赤血球数、ヘモグロビン濃度、HCCとヘマトクリット、HCCとPOMS2の相関にはピアソンの積率相関係数により示した。すべての解析はSPSS (Ver. 25, IBM社製)を用いて行い、いずれの場合にも統計学的有意水準は5%未満とした。

2. 結果

2. 1 ストレス指標

HCCは6月と7月で有意な差が認められたが ($t=-4.018, p<0.05$)、血中コルチゾール濃度には有意な差は見られなかった (図2)。

2. 2 最高酸素摂取量

6月と7月の最高酸素摂取量の結果を示す (表1)。6月に比べ、7月では最高酸素摂取量が有意に増加した ($t=4.462, p<0.05$)。

2. 3 血液酸素運搬能指標

6月と7月の赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットの結果を示す (表1)。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットは6月に比べ7月で有意な低値が示された (赤血球数: $t=3.559, p<0.05$; ヘモグロビン濃度: $t=3.264, p<0.05$; ヘマトクリット: $t=5.113, p<0.05$)。

2. 4 POMS2

POMS2で測定された怒り・敵意、混乱・当惑、抑うつ・落ち込み、疲労・無気力、緊張・不安、活気・活力、友好の結果を示す (表)。抑うつ・落ち込み項目においてのみ、6月に比べて7月に

表 1 本研究被験者の最高酸素摂取量と血液酸素運搬能, POMS2の測定値

| | | 6月 | 7月 |
|---------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|
| 最高酸素摂取量 (ml/kg・min) | | 60.8±4.1 (n=27) | 64.3±4.9* (n=27) |
| 血液酸素運搬能 | 赤血球数(×10 ⁶ /μL) | 4.9±0.3 | 4.8±0.3* |
| | ヘモグロビン濃度(g/dl) | 15.0±0.9 | 14.7±0.8* |
| | ヘマトクリット(%) | 45.5±2.4 | 44.2±2.2* |
| POMS2(T score) | 怒り-敵意 | 45.3±7.6 | 44.7±7.4 |
| | 混乱-当惑 | 47.6±7.4 | 46.1±6.3 |
| | 抑うつ-落ち込み | 47.6±7.5 | 45.6±5.9* |
| | 疲労-無気力 | 49.7±8.3 | 47.7±7.2 |
| | 緊張-不安 | 46.6±7.5 | 44.6±6.5 |
| | 活気-活力 | 54.2±7.2 | 55.4±7.7 |
| | 友好 | 55.1±7.3 | 55.3±9.4 |

有意な低値が認められた (t=2.087, p<0.05).

2.5 血中コルチゾール濃度と毛髪コルチゾール濃度の関係

急性ストレス指標の血中コルチゾールと慢性ストレス指標のHCCの関係を検討した。その結果、血中コルチゾール濃度とHCCの間に有意な相関関係は6月7月ともに見られなかった(図3)。

2.6 毛髪コルチゾール濃度と血液酸素運搬能

HCCと血液酸素運搬能に関連する赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットの関係を検討した。その結果、赤血球数においてのみ、6月7月ともにHCCと有意な負の相関関係が認められた(6月:r=-0.309, p<0.05;7月:r=-0.384, p<0.05, 図4)。血中コルチゾール濃度と赤血球数、ヘモグ

ロビン濃度、ヘマトクリットの間には有意な相関関係は認められなかった。

2.7 毛髪コルチゾール濃度と最高酸素摂取量

漸増負荷ペダリング運動を実施した27名の最高酸素摂取量とHCC、血中コルチゾール濃度の関係を検討した。その結果、最高酸素摂取量とHCCとの間に有意な相関関係は認められなかった。また、血中コルチゾール濃度との間にも有意な相関関係は認められなかった。

2.8 毛髪コルチゾール濃度と心理指標

HCCと気分の関係を検討した。6月のPOMS2は7項目すべてにおいてHCCと有意な相関関係は認められなかった。7月のPOMS2の活気・活力において、有意な負の相関関係が認められ

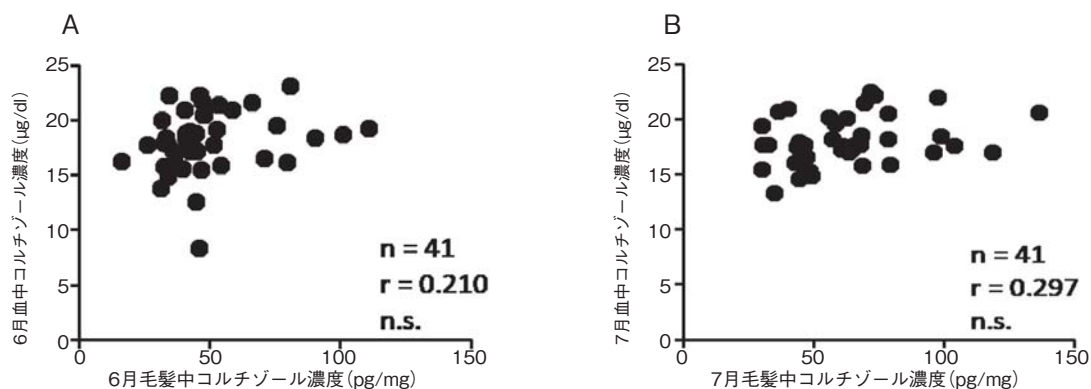


図3 毛髪コルチゾール濃度と血中コルチゾール濃度の関係 (A) 6月の毛髪中コルチゾール濃度と血中コルチゾール濃度の関係 (B) 7月の毛髪中コルチゾール濃度と血中コルチゾール濃度の関係

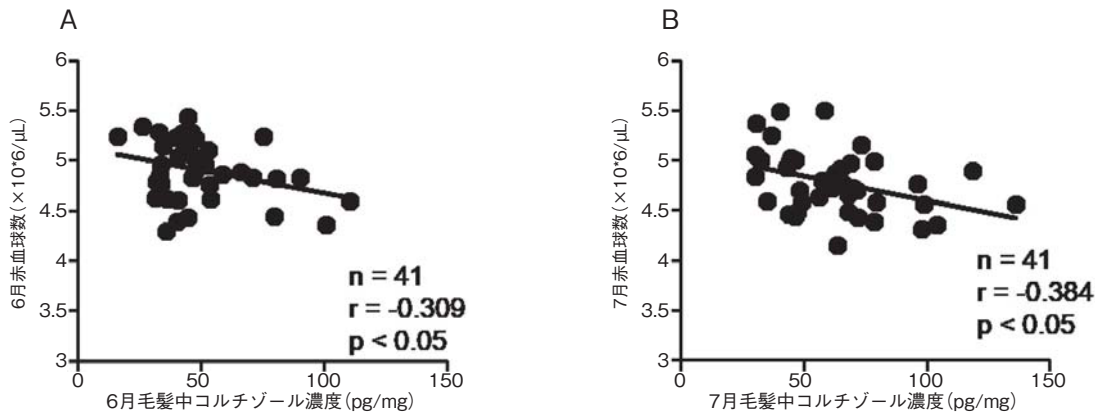


図4 毛髪コルチゾール濃度と血液酸素運搬能の関係
(A) 6月の毛髪中コルチゾール濃度と赤血球数の関係 (B) 7月の毛髪中コルチゾール濃度と赤血球数の関係

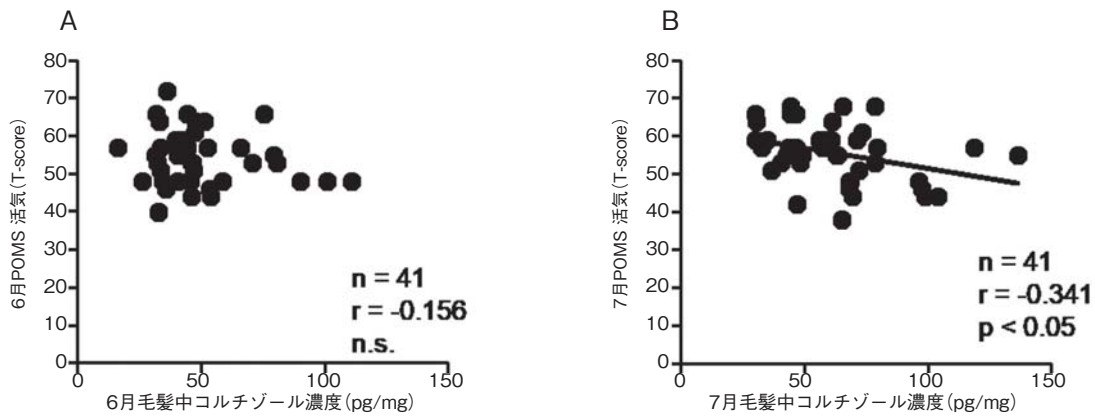


図5 毛髪コルチゾール濃度と気分の関係
(A) 6月の毛髪中コルチゾール濃度と POMS2活気・活力の関係 (B) 7月の毛髪中コルチゾール濃度と POMS2活気・活力の関係

た ($r=-0.341$, $p<0.05$, 図5). 血中コルチゾールと POMS2の間には6月7月ともに有意な相関関係は認められなかった.

3. 考察

本研究では、OTSの新しい生理指標として HCCが有用か検証するため、HCCが運動持久性や気分と関係するか明らかにすることを目的とし、スポーツ競技経験を有する健常な男子大学生を対象に、2018年6月、7月に2回、HCCと運動持久性に関わる最高酸素摂取量、血液酸素運搬能の指標である血中赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット、気分の指標である POMS2の測定をおこなった。その結果、HCCは赤血球数、

POMS2の活気・活力と負の相関関係であることが示された。

慢性ストレス指標である HCCは6月に比べて7月に増加が見られ、6月に比べ7月に慢性ストレスがかかっていたことが考えられた。先行研究において、高い身体活動量の人や運動量の多いアスリートにおいて HCCが高値になることが報告されており (Gerber et al., 2012¹¹) ; Skoluda et al., 2012¹²)、7月は6月に比べてトレーニング量が増加していることが示唆された。

急性ストレスの指標である血中コルチゾール濃度は6月7月で有意な変化は見られなかった。さらに、HCCと血中コルチゾール濃度の間に相関関係は見られなかった。これらの結果から、

HCCは急性ストレスの影響を受けず、血中コルチゾールでは検出できない蓄積されたストレスの評価に有用であることが示唆された。

最高酸素摂取量は6月に比べて7月に有意な増加が見られ、運動持久性が向上したことが示唆された。本研究で用いた被験者は体育会の部活動に所属しており、部活動でのトレーニングによって運動持久性が向上したことが示唆された。ヨーロッパ科学会議の打ち出したOTSの定義では、2週間から数ヶ月間にわたり運動パフォーマンスが低下した状態は非機能的オーバーリーチング、OTSになるとされている (Meeusen et al., 2006)¹³⁾。そのため、本研究で用いた被験者集団にはOTSの者はいなかったことが示唆された。

次に、採取した血液から測定された赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットの変化を検出した。赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットは6月に比べて7月に有意に低下した。さらに、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリットは最高酸素摂取量との間に相関関係が示されなかった。この背景に循環血漿量の変化が影響した可能性がある。持久性トレーニングは循環血漿量を増加させ、最高酸素摂取量増加に関連することが報告されている (Warburton et al., 2004)¹⁴⁾。赤血球数、ヘモグロビン濃度の増加に比べ循環血漿量の増加が大きい場合は見かけ上の赤血球数、ヘモグロビン濃度の低下見られることが知られている (希釈性貧血)。本研究においても1ヶ月間の部活動のトレーニングによって、循環血漿量の増加が起これば、赤血球数、ヘモグロビン濃度の低下が見られたにも関わらず最高酸素摂取量の増加が起これた可能性がある。

次に、運動持久性と血液酸素運搬能に慢性ストレスが関係するか検討した。最高酸素摂取量はHCCとの間に相関関係は認められなかった。本研究の被験者においては、OTSに至るような過剰なトレーニング負荷の増加ではなかったため、

運動持久性向上効果が得られた可能性がある。一方で、血液酸素運搬能の指標の赤血球数はHCCと負の相関関係にあることが認められた。慢性的にストレスを受けると、赤血球合成を促進するホルモンであるテストステロンの分泌が抑制されることが報告されている (Feek et al., 1989)¹⁵⁾; Sapolsky, 2000)¹⁶⁾。さらに、ストレス反応によって分泌されるコルチゾールは、赤血球、ヘモグロビン産生に関わるエリスロポイエチン受容体シグナルを阻害することで、赤血球産生を抑制することが報告されている (Stellacci et al., 2009)¹⁷⁾。このことから、1ヶ月間に蓄積された慢性ストレスが赤血球産生、合成に負の影響を及ぼし、血液酸素運搬能向上効果を減弱させることで、トレーニングによる運動持久性向上効果を制限している可能性がある。

OTSの心理的指標として用いられているPOMS2は、抑うつ・落ち込みの項目においてのみ7月に有意な低下が見られ、疲労・無気力、活気・活力には変化が見られなかった。OTSでは、疲労・無気力の増加や活気・活力の低下が見られることが報告されている (Slivka et al., 2010)¹⁸⁾。本研究の被験者では、心理指標でもOTSでないことが示された。気分と慢性ストレス指標のHCCの関係を検討したところ、7月のHCCにおいて活気・活力との間に負の相関関係が示された。以上の結果から、過剰な慢性ストレスが長期に継続することで気分の低下を引き起こす可能性が示唆された。

本研究の結果から、HCCは赤血球数やPOMS2の活気・活力と関係することが明らかとなった。2週間以上にわたる運動パフォーマンスの低下やPOMS2の活気・活力の低下、疲労・無気力の増加がOTSの診断症状とされていることから、長期にわたる高いHCCがOTSの要因となる可能性が示唆された。しかし、本研究では被験者としてスポーツ経験を有する男子大学生を対象としたが、パフォーマンス低下や気分の低下といった

OTSの診断症状のある被験者は見られず、HCCがOTSに直接的に関係するか検証できていない。さらに、本研究では、トレーニング負荷・活動量を測定できておらず、被験者の慢性ストレスの要因の特定ができなかった。今後、慢性ストレスの要因となるようなトレーニング負荷や活動量、貧血・炎症といったコンディション測定をHCC測定と合わせておこなうこと、持久性アスリートや瞬発性アスリートといった種目差、男女といった性差の影響を検討することで、アスリート特有の慢性ストレスの要因とOTSとの関係について明らかにでき、OTSの起こる新たな生理指標としてHCCを提案できる。

4. 結 論

本研究によって、HCCは血液酸素運搬能の指標である赤血球数とPOMS2の活気・活力と関係することが明らかとなった。今後、HCC増加と長期に渡る運動パフォーマンスや活気・活力低下の関係が明らかとなれば、HCCが将来OTSの新たな生理指標となることが期待される。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団及び筑波大学体育系ヒューマン・ハイ・パフォーマンス先端研究センターに深く感謝申し上げます。また、本研究を実施するにあたってご尽力くださった筑波大学体育系ヒューマン・ハイ・パフォーマンス先端研究センターの小倉かさね研究員、白井奈々絵技術補佐員、筑波大学運動生化学研究室大学院生の才記壮人氏、大村航希氏、中川凜氏、薬師寺真奈氏、筑波大学陸上競技研究室大学院生の木村亮太氏に深く感謝いたします。

最後に本研究は被験者の皆様のご協力無くして成り立ちませんでした。参加していただいた被験者の皆様には心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lehmann M., Foster C., Keul J., Overtraining in endurance athletes: a brief review, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **25**: 854-62(1993)
- 2) Meeusen R., Duclos M., Foster C., Fry A., Gleeson M., Nieman D., Raglin J., Rietjens G., Steinacker J., Urhausen A., European College of Sport Science, American College of Sports Medicine. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **45**: 186-205, doi:10.1249/MSS.0b013e318279a10a(2013)
- 3) Raul J.-S., Cirimele V., Ludes B., Kintz P., Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair, *Clin. Biochem.*, **37**: 1105-1111, doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.02.010(2004)
- 4) Wennig R., Potential problems with the interpretation of hair analysis results, *Forensic Sci. Int.*, **107**: 5-12, doi:10.1016/S0379-0738(99)00146-2(2000)
- 5) Gow R., Thomson S., Rieder M., Van Uum S., Koren G., An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications, *Forensic Sci. Int.*, **196**: 32-37, doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.040(2010)
- 6) Short S.J., Stalder T., Marceau K., Entringer S., Moog N.K., Shirtcliff E.A., Wadhwa P.D., Buss C., Correspondence between hair cortisol concentrations and 30-day integrated daily salivary and weekly urinary cortisol measures, *Psychoneuroendocrinology*, **71**: 12-18, doi:10.1016/j.psyneuen.2016.05.007(2016)
- 7) Xie Q., Gao W., Li J., Qiao T., Jin J., Deng H., Lu Z., Correlation of cortisol in 1-cm hair segment with salivary cortisol in human: hair cortisol as an endogenous biomarker, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **49**: 2013-9, doi:10.1515/CCLM.2011.706(2011)
- 8) Dettenborn L., Tietze A., Bruckner F., Kirschbaum C., Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls, *Psychoneuroendocrinology*, **35**: 1404-1409, doi:10.1016/j.psyneuen.2010.04.006(2010)
- 9) Staufenbiel S.M., Koenders M.A., Giltay E.J., Elzinga B.M., Manenschiijn L., Hoencamp E., van Rossum E.F.C., Spijker A.T., Recent negative

- life events increase hair cortisol concentrations in patients with bipolar disorder, *Stress*, **17**: 451–459, doi:10.3109/10253890.2014.968549 (2014)
- 10) D'Anna-Hernandez K.L., Ross R.G., Natvig C.L., Laudenslager M.L., Hair cortisol levels as a retrospective marker of hypothalamic–pituitary axis activity throughout pregnancy: Comparison to salivary cortisol, *Physiol. Behav.*, **104**: 348–353, doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.041 (2011)
 - 11) Gerber M., Brand S., Lindwall M., Elliot C., Kalak N., Herrmann C., Pühse U., Jonsdottir I.H., Concerns regarding hair cortisol as a biomarker of chronic stress in exercise and sport science, *J. Sports Sci. Med.*, **11**: 571–81 (2012)
 - 12) Skoluda N., Dettenborn L., Stalder T., Kirschbaum C., Elevated hair cortisol concentrations in endurance athletes, *Psychoneuroendocrinology*, **37**: 611–617, doi:10.1016/j.psyneuen.2011.09.001 (2012)
 - 13) Meeusen R., Watson P., Hasegawa H., Roelands B., Piacentini M.F., Central Fatigue, *Sport. Med.*, **36**: 881–909, doi:10.2165/00007256-200636100-00006 (2006)
 - 14) Warburton D.E.R., Haykowsky M.J., Quinney H.A., Blackmore D., Teo K.K., Taylor D.A., McGavock J., Humen D.P., Blood volume expansion and cardiorespiratory function: effects of training modality, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **36**: 991–1000 (2004)
 - 15) Feek C.M., Tuzi N.L., Edwards C.R., Adrenalectomy does not influence basal secretion of testosterone in rat in vivo, *J. Steroid Biochem.*, **32**: 725–8 (1989)
 - 16) Sapolsky R.M., How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions, *Endocr. Rev.*, **21**: 55–89, doi:10.1210/er.21.1.55 (2000)
 - 17) Stellacci E., Di Noia A., Di Baldassarre A., Migliaccio G., Battistini A., Migliaccio A.R., Interaction between the glucocorticoid and erythropoietin receptors in human erythroid cells, *Exp. Hematol.*, **37**: 559–572, doi:10.1016/j.exphem.2009.02.005 (2009)
 - 18) Slivka D.R., Hailes W.S., Cuddy J.S., Ruby B.C., Effects of 21 days of intensified training on markers of overtraining, *J. strength Cond. Res.*, **24**: 2604–12, doi:10.1519/JSC.0b013e3181e8a4eb (2010)