



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Συγκριτική μελέτη μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης αυτόλογης μετάγγισης
αίματος και διέγερσης ερυθροποίησης με εντοπισμό βιοδεικτών σε
βιολογικά δείγματα για τον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ

Βιολόγος, M.Sc.

ΑΘΗΝΑ 2020

« Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202) »

« Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής »

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συγκριτική μελέτη μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης αυτόλογης μετάγγισης αίματος και διέγερσης ερυθροποίησης με εντοπισμό βιοδεικτών σε βιολογικά δείγματα για τον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΟΥ

Βιολόγος, M.Sc.

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Μιχαήλ Κουμπάρης, Ομοτ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Μιχαήλ Κουμπάρης, Ομοτ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Διαμάντης Σίδερης, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Δημήτρης Στραβοπόδης, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Μπακέας, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

Δημήτρης Κλέτσας, Διευθυντής Ερευνών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

30/07/2020

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρά την απαγόρευση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόπινγκ (WADA), το ντόπινγκ αίματος, κυρίως με τη χρήση παραγόντων διέγερσης της ερυθροποίησης (ESAs) και τη μετάγγιση αίματος, χρησιμοποιείται από αθλητές που θέλουν να αποκτήσουν αθέμιτο πλεονέκτημα, αυξάνοντας την αερόβια ικανότητά τους, μέσω αύξησης της παραγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η ομολογη μετάγγιση αίματος και κάποιοι ESAs μπορούν να εντοπιστούν στα δείγματα των αθλητών με άμεσες μεθόδους ανίχνευσης. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμη μέθοδος άμεσης ανίχνευσης της αυτόλογης μετάγγισης αίματος. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δυσκολία εντοπισμού νέων συνεχώς αναδιδόμενων απαγορευμένων ουσιών, καθώς και τη χρήση πολλών διαφορετικών ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών σε μικροδόσεις, οδήγησε την επιστήμη του αντι-ντόπινγκ στην ανάπτυξη μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης. Το Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή (ABP), ως στρατηγική για την έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ αίματος μέσω της διαχρονικής παρακολούθησης των επιπέδων των αιματολογικών παραμέτρων και των ενδογενών στεροειδών σε ατομικό επίπεδο, αποτελεί σημαντική κατάκτηση. Νέες προσεγγίσεις, όμως, στο ντόπινγκ αίματος δημιουργούν νέες αναλυτικές προκλήσεις και ως εκ τούτου δημιουργείται η ανάγκη για περαιτέρω ενίσχυση αυτού του εργαλείου. Ο συνδυασμός του ABP με άλλους έμμεσους βιοδείκτες ανίχνευσης, όπως το προφίλ σιδήρου και οι μεταβολίτες, εκτιμάται ότι θα ενισχύσει την αποτελεσματικότητα των ελέγχων ντόπινγκ αίματος.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στην αναζήτηση βιοδεικτών έμμεσης ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών ή/και μεθόδων από τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA που μπορούν να συσχετιστούν με το ντόπινγκ αίματος. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη μελέτη της πιθανής επίδρασης της χρήσης των ουσιών ή/και των μεθόδων αυτών στη διαδικασία της ερυθροποίησης, καθώς και στη μελέτη των μεταβολών που μπορεί να προκαλέσει η χρήση τους στις παραμέτρους του ABP, κυρίως της αιματολογικής, αλλά και της στεροειδούς ενότητας, καθώς και στο προφίλ σιδήρου και στα επίπεδα έκφρασης της ερυθροποιητίνης.

In vivo μεταβολική μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από απλή χορήγηση 10 mg μεθυλονορτεστοστερόνης σε εθελοντή. Τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν με αεριοχρωματογραφία συνδεδεμένη με διπλή φασματομετρία μαζών (GC-MS/MS), οδηγώντας στην ταυτοποίηση επτά μεταβολιτών (M1-M4 και S1-S3). Οι μεταβολίτες φάσης II M2, M3, M4 και S2, S3 της μεθυλονορτεστοστερόνης ανιχνεύθηκαν μέχρι το τέλος της μελέτης απέκκρισης (192 h), ενώ οι M1, S1 ανιχνεύθηκαν για 72 h. Οι δύο συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ

μεταβολίτες M3 και M4 και οι τρεις συζευγμένοι με θειικό οξύ μεταβολίτες S1, S2 και S3 ανιχνεύονται για πρώτη φορά. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η απλή χορήγηση μεθυλονορτεστοστερόνης μεταβάλλει τις παραμέτρους του προφίλ των στεροειδών τουλάχιστον για 48 h μετά τη χορήγηση, ενώ δεν επηρεάζει τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης στα ούρα, μετά από ανάλυσή τους με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Η *in vivo* μεταβολική μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από απλή χορήγηση 10 mg LGD-4033 σε εθελοντή. Τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν με υγροχρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS). Εντοπίστηκαν έξι μεταβολίτες φάσης I M1-M6, με τον M5 να έχει το μεγαλύτερο παράθυρο ανίχνευσης (20,5 ημέρες) αποτελώντας το βασικό βιοδείκτη ελέγχου κατάχρησης LGD-4033 σε δείγματα ούρων που έχουν υποστεί υδρόλυση. Ο M6 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε ανθρώπινα ούρα. Ακόμη, μετά από απλή αραίωση των δειγμάτων ούρων η μητρική ουσία και οι M1, M2, M3 ανιχνεύτηκαν ως μεταβολίτες φάσης II συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ. Το γλυκουρονίδιο του LGD-4033 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανίχνευση της ουσίας έως και 2,5 ημέρες μετά τη χορήγηση σε δείγματα που αναλύονται μετά από απλή αραίωσή τους. Η απλή χορήγηση LGD-4033 δεν προκάλεσε μεταβολές στο προφίλ των στεροειδών, ούτε στα επίπεδα έκφρασης της ερυθροποιητίνης στα ούρα.

Η ανίχνευση ντόπινγκ αίματος, με έλεγχο δειγμάτων αίματος αθλητών για μεταβολές στις αιματολογικές παραμέτρους του ABP, μπορεί να πραγματοποιηθεί από το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας μετά από επικύρωση της λειτουργίας και έλεγχο της ορθότητας των μετρήσεων των αιματολογικών αναλυτών Sysmex XT-2000i και Sysmex XN-1000.

Η ανάλυση δειγμάτων ούρων με LC-MS μετά την πολλαπλή χορήγηση εισπνεόμενης σαλμετερόλης σε εθελοντή με 100 µg / 12 h απέδειξε τη βιοσυσσώρευση της μητρικής ουσίας και του μεταβολίτη της α-υδροξυσαλμετερόλη, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα ούρα που φτάνουν μέχρι τα 3,53 ng/mL για τη σαλμετερόλη και τα 11,11 ng/mL για τον μεταβολίτη της. Επιπλέον, η ανάλυση των δειγμάτων αίματος της μελέτης έδειξε ότι η βιοσυσσώρευση σαλμετερόλης μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στις αιματολογικές παραμέτρους του ABP και στο προφίλ σιδήρου, ενώ επηρεάζει και τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης στα ούρα, μετά από ανάλυσή τους με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι οι β2-αδρενεργικοί υποδοχείς συμμετέχουν στα πρώτα στάδια της ερυθροποίησης κατά τα οποία τα προγονικά κύτταρα δεν φέρουν υποδοχείς ερυθροποιητίνης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ντόπινγκ αίματος, μεθυλονορτεστοστερόνη, LGD-4033, σαλμετερόλη, ABP, μεταβολίτες, ερυθροποιητίνη

ABSTRACT

Despite being prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA), blood doping through Erythropoiesis Stimulating Agents (ESAs) misuse and blood transfusion, is used by athletes who want to gain an unfair advantage by increasing red blood cell production and hence, their aerobic capacity. Methods of direct detection can be used to detect ESAs and homologous blood transfusion in athletes' samples. The absence of a method for the direct detection of autologous blood transfusion, the inability to detect new banned substances, and the difficulty in detecting microdoses of recombinant erythropoietins have led anti-doping science to develop methods of indirect detection. The Athlete Biological Passport (ABP), is an important achievement, as ABP is a strategy for blood doping detection through the long-term monitoring of hematological parameter levels and endogenous androgen concentrations of an individual athlete. However, new approaches to blood doping create new analytical challenges for doping control and there is a need for the enforcement of this excellent detection tool. The combination of the Athlete Biological Passport with other indirect biomarkers, such as monitoring of iron metabolism protein levels and metabolites, is believed to enhance the effectiveness of blood doping tests.

The present study focused on the identification of indirect biomarkers for the detection of banned substances and/or methods included in WADA's Prohibited List and associated with blood doping. Special attention was given to the possible effect of their abuse in erythropoiesis, the changes that may cause in the parameter of the hematological and steroid module of ABP, as well as to the estimation of iron metabolism proteins and erythropoietin expression levels.

An in vivo metabolic study was performed following a single administration of 10 mg methyltestosterone to a volunteer. Urine samples were analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Seven metabolites were identified (M1-M4 and S1-S3). Phase II glucuronide metabolites M2, M3, M4 and sulfate metabolites S2 and S3, were detected until the end of the excretion study (192 h), while M1 and S1 were detected for 72 h. The two glucuronide metabolites M3 and M4 and the three sulfate metabolites S1, S2, S3 are detected for the first time. It has also been observed that single administration of methyltestosterone alters steroid profile parameters at least 48 h after administration, while not affecting urinary erythropoietin levels as shown following analysis by electrophoresis.

An in vivo metabolic study was performed following a single administration of 10 mg LGD-4033 to a volunteer. Urine samples were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Six phase I metabolites M1-M6 were identified, with M5 metabolite

having the largest detection window (20,5 days). The M5 metabolite is suggested as the most suitable biomarker for LGD-4033 detection in hydrolyzed urine samples. The M6 metabolite was detected for first time in human urine. Furthermore, after dilute-and-inject preparation of urine samples, the parent compound and the M1, M2, M3 metabolites were detected as gluco-conjugated phase II metabolites. Gluco-conjugated parent LGD-4033 can be used as a biomarker for LGD-4033 detection up to 2,5 days after administration to samples analyzed after dilution. The LGD-4033 administration did not alter steroid profile or urinary erythropoietin levels.

The blood doping detection, by analyzing athletes' blood samples for changes in the ABP hematological parameters, can be performed in the Doping Control Laboratory of Athens after the evaluation of the Sysmex XT-2000i and Sysmex XN-1000 hematological analyzers.

Analysis of urine samples by LC-MS, after multiple administration of inhaled salmeterol to a volunteer at 100 µg / 12 h, demonstrated bioaccumulation of the parent substance and the α-hydroxysalmeterol metabolite, with increasing urinary concentrations up to 3,5 ng/ml for salmeterol and up to 11,11 ng/mL for its metabolite. In addition, blood samples analysis showed that salmeterol bioaccumulation may cause changes in the ABP hematological parameters and iron metabolism proteins' level, while it also affects the urinary erythropoietin levels, as shown after analysis by electrophoresis. These results support the view that β2-adrenergic receptors are involved in the early stages of erythropoiesis in which progenitor cells do not express erythropoietin receptors.

KEYWORDS: blood doping, methylnoretestosterone, LGD-4033, salmeterol, ABP, metabolites, erythropoietin

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Διδακτορικών Διπλωμάτων του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), κατά το χρονικό διάστημα 2016-2020. Το ερευνητικό μέρος της διατριβής διεξήχθη στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας, το οποίο κατά την έναρξη της διατριβής ανήκε στο Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.) “Σπύρος Λούης”, ενώ από τον Αύγουστο του 2019 ανήκει στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) “Δημόκριτος”. Πρόκειται για το μοναδικό διαπιστευμένο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ στην Ελλάδα, και ένα από τα 30 που υπάρχουν σήμερα παγκοσμίως. Ο έλεγχος ντόπινγκ, τόσο σε αθλητές, όσο και σε άλογα, είναι ένα πολύ ενδιαφέρον και διαρκώς εξελισσόμενο πεδίο έρευνας, που απαιτεί υψηλή εξειδίκευση και συνεχή ενημέρωση. Η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στον έλεγχο ντόπινγκ αίματος σε ανθρώπινα δείγματα ούρων και αίματος με ανίχνευση έμμεσων βιοδεικτών.

Η ερευνητική εργασία υποστηρίχτηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδακτόρων» (Αρ. Σύμβασης 14544).



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το πρώτο και μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη, την επιβλέπουσα Καθηγήτρια της διδακτορικής μου διατριβής, η οποία μου έδειξε από την πρώτη στιγμή ότι πιστεύει σε εμένα και τις ιδέες μου και μου έδωσε απλόχερα την ευκαιρία να τις κάνω πραγματικότητα. Σε όλη τη διάρκεια της διατριβής, καθώς και στο δύσκολο και πιεστικό κομμάτι της ολοκλήρωσής της, ήταν δίπλα μου σε ό,τι και αν χρειάστηκα, γεμίζοντάς με ασφάλεια και αισιοδοξία.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Ανδρέα Σκορίλα και κ. Μιχαήλ Κουππάρη, για τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις τους, τη διάθεση συνεργασίας και το χρόνο που διέθεσαν για τη διατριβή μου.

Ακόμη, ευχαριστώ τα άλλα τέσσερα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Διαμάντη Σίδηρη, κ. Δημήτρη Στραβοπόδη, κ. Ευάγγελο Μπακέα και κ. Δημήτρη Κλέτσα, για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής και για τις επικοινωνητικές συζητήσεις.

Ένα θερμό και ιδιαίτερα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ κ. Ιωάννη Αγγελή, ο οποίος πέρα από τις πολύτιμες και αστείρευτες επιστημονικές του γνώσεις μου προσέφερε απλόχερα στήριξη, χρόνο και εμπιστοσύνη, αλλά κυρίως τον ευχαριστώ για τον βαθμό στον οποίο μου έδειξε να πιστεύει σε εμένα και για το ότι αποτέλεσε και αποτελεί πρότυπο, τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ στο σύνολο του για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και για την εκτίμηση που δείξαν στο πρόσωπό μου. Δεν μπορώ να μην ξεχωρίσω και να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Τσίβου, πρώην Διευθύντρια του εργαστηρίου, καθώς ήταν εκείνη που πρώτη πίστεψε σε εμένα και μου έδωσε τη δυνατότητα να ξεκινήσω τη διδακτορική μου διατριβή. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Πολυξένη Κιούση, διότι η συμβολή της στην ολοκλήρωση της διατριβής ήταν σημαντική και καθοριστική, φανερώνοντας μου ένα πιο ανθρώπινο πρόσωπο του τομέας της έρευνας. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς την κ. Όλγα Γούλα, για την ανιδιοτελή της βοήθεια και στήριξη κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Ένα ευχαριστώ από καρδιάς χρωστάω και στην κ. Βασιλική-Αναστασία Παπαβασιλείου, για τη συνεργασία κατά τη διαδικασία των λήψεων δειγμάτων αίματος, καθώς και για την ψυχολογική υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια υλοποίησης της διατριβής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που στηρίζει κάθε επιλογή μου και τους φίλους μου, τη δεύτερη μου οικογένεια, γιατί είναι το σημαντικότερο κομμάτι της ζωής μου.

*Στον εαυτό μου παιδί
που απ' το χέρι κρατάω...*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	19
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	27
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	27
1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	28
1.3 Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙ-ΝΤΟΠΙΝΓΚ	30
1.4 ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙ-ΝΤΟΠΙΝΓΚ	33
1.4.1 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	34
1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	37
1.6 ΜΟΡΦΕΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΑΙΜΑΤΟΣ	43
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΑΙΜΑΤΟΣ	43
2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ	44
2.2.1 ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	44
2.2.2 ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ	46
2.2.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	48
2.2.4 ΕΡΥΘΡΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ	51
2.2.5 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ	53
2.3 ΤΥΠΟΙ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΑΙΜΑΤΟΣ	59
2.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	62
2.5 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	63
2.6 ΑΜΕΣΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	65
2.6.1 ΗΒΟСs ΚΑΙ PFCs	65
2.6.2 ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΙΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	66
2.6.3 rHuEPOs ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ESAs	67
2.6.3.1 Τεχνικές ηλεκτροφόρησης	67
2.6.3.2 Τεχνικές ανοσοπροσδιορισμού	71
2.6.3.3 Τεχνικές χρωματογραφίας	72
2.7 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΜΕΣΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΙΑΒΑΤΗΡΙΟ ΑΘΛΗΤΗ	75
3.1 Η ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	75
3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΙΑΒΑΤΗΡΙΟ ΑΘΛΗΤΗ	76
3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ABP	81
3.4 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΕΜΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	83
3.5 ΠΡΟΦΙΛ ΣΙΔΗΡΟΥ	86
3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ	89
3.7 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ	93
4.1 ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ	93
4.2 LGD-4033	97
4.3 ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ	98
4.4 ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗ	104
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΚΟΠΟΣ	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	117
6.1 ΥΛΙΚΑ	117
6.1.1 ΓΥΑΛΙΝΑ ΥΛΙΚΑ	117
6.1.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	117
6.1.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	118
6.1.3.1 Υγρά αντιδραστήρια	118
6.1.3.2 Στερεά αντιδραστήρια	119
6.1.3.3 Διαλύτες	120
6.1.3.4 Διαλύματα	120
6.1.4 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	122
6.1.5 ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ	123
6.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	123
6.2.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	123
6.2.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ	124

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	127
7.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	127
7.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	128
7.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II ΜΕ GC-MS/MS	128
7.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS/MS ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II	129
7.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II	130
7.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	136
7.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΜΕ GC-MS/MS	136
7.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS/MS ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ	137
7.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ	138
7.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	140
7.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΜΕ IEF	140
7.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ	143
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ LGD-4033	145
8.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ LGD-4033	145
8.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΚΑΙ ΦΑΣΗΣ II ΤΟΥ LGD-4033	147
8.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΜΕ LC-MS(/MS)	147
8.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II ΜΕ LC-MS(/MS)	148
8.2.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ LC-MS ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΚΑΙ ΦΑΣΗΣ II	148
8.2.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ LGD-4033 ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΚΑΙ ΦΑΣΗΣ II	150
8.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ LGD-4033	158
8.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΜΕ GC-MS	158
8.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ	159
8.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ	160
8.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ LGD-4033	163
8.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΜΕ SDS-PAGE	163
8.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ	166
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	167
9.1 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ SYSMEX XT-2000i	167
9.1.1 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ SYSMEX XT-2000i	167
9.1.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ SYSMEX XT-2000i	176

9.2 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ SYSMECH XN-1000	180
9.2.1 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ SYSMECH XN-1000	180
9.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ SYSMECH XN-1000	181
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	183
10.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	183
10.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΑΒΡ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	185
10.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΣΙΔΗΡΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	188
10.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΣΣΥΣΩΡΕΥΣΗΣ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	189
10.4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS	189
10.4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ SPE ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ LC-MS	191
10.4.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ LC-MS	193
10.4.4 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS	195
10.4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΜΕ LC-MS	199
10.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	203
10.5.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ELISA	203
10.5.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ IMMULITE	204
10.5.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ IEF	204
10.5.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ SDS-PAGE	206
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	207
11.1 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	207
11.2 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ LGD-4033	208
11.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	210
11.4 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ	211
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	215
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	229
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	257
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ IN VIVO ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ	263
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ IN VIVO ΜΕΛΕΤΗΣ LGD-4033	289

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΣΥΝΤΜΗΣΗ	ΑΓΓΛΙΚΟΣ ΟΡΟΣ	ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ
5αAdiol	5α-androstane-3α,17β-diol	5α-ανδροστανό-3α,17β-διόλη
5βAdiol	5β-androstane-3α,17β-diol	5β-ανδροστανό-3α,17β-διόλη
A	androsterone	ανδροστερόνη
AAFs	adverse analytical findings	ανεπιθύμητα αναλυτικά ευρήματα
AAS	anabolic androgenic steroids	ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή
ABP	athlete biological passport	βιολογικό διαβατήριό αθλητή
AC	adenyl cyclase	αδενυλική κυκλάση
ActRII	activin type II receptor	υποδοχέας ακτιβίνης τύπου II
ANOVA	analysis of variation	ανάλυση διακύμανσης
AR	androgen receptor	υποδοχέας ανδρογόνων
ARE	androgen response element	στοιχείο απόκρισης σε ανδρογόνο
ATP	adenosine triphosphate	τριφωσφορική αδενοσίνη
BFU-E	burst forming unit-erythroid	μονάδα έκρηξης σχηματισμού ερυθράς σειράς
BHK	baby hamster kidney	νεφρικά κύτταρα μικρού χάμστερ
BSS	blood stability score	δείκτης σταθερότητας αίματος
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CEPO	carbamylated erythropoietin	καρβαμυλιωμένη ερυθροποιητίνη
CERA	continuous erythropoietin receptor activator	συνεχής ενεργοποιητής υποδοχέα ερυθροποιητίνης
CFU-E	colony forming unit-erythroid	μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθράς σειράς
CFU-GEMM	colony forming unit granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte	μονάδα σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-ερυθρών-μονοκυττάρων-μεγακαρυοκυττάρων

CHO	chinese hamster ovary	ωοθηκικά κύτταρα κινέζικου χάμστερ
CKD	chronic kidney disease	χρόνια νεφρική νόσος
CO	carbon monoxide	μονοξείδιο του άνθρακα
CRP	C-reactive protein	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CSCQ	Center Switzerland Quality Control	Κέντρο Ελέγχου Ποιότητας Ελβετίας
CyADA	Cyprus Anti-Doping Authority	Κυπριακή Αρχή Αντι-Ντόπινγκ
DBS	dried blood spots	αποξηραμένες κηλίδες αίματος
dEPO	darbepoetin a	δαρμπεποετίνη α
DNA	deoxyribonucleic acid	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DL	decision limit	όριο απόφασης
DUS	dried urine spots	αποξηραμένες κηλίδες ούρων
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EI	electron ionization	ιοντισμός με ηλεκτρόνια
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός
EMP	erythropoietin mimetic peptides	ερυθρομιμητικά πεπτίδια
Epi	epitestosterone	επιτεστοστερόνη
EPO	erythropoietin	ερυθροποιητίνη
EPO-Fc	erythropoietin-Fc	ερυθροποιητίνη-Fc
EPO-R	erythropoietin receptor	υποδοχέας ερυθροποιητίνης
EQAS	external quality assurance services	πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας
ER	estrogen receptor	υποδοχέας οιστρογόνων
ESAs	erythropoiesis-stimulating agents	παράγοντες διέγερσης ερυθροποίησης

ESI	electrospray ionization	ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
Etio	etiocholaolone	ετιοχολανολόνη
FDA	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
GC	gas chromatography	αεριοχρωματογραφία
GDP	guanosine diphosphate	διφωσφορική γουανοσίνη
GR	glucocorticoid receptor	υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
GTP	guanosine triphosphate	τριφωσφορική γουανοσίνη
Hbmass	total mass of hemoglobin	συνολική μάζα αιμοσφαιρίνης
HBOCs	hemoglobin-based oxygen carriers	φορείς οξυγόνου με βάση την αιμοσφαιρίνη
HCT	haematocrit	αιματοκρίτης
HGB	haemoglobin	αιμοσφαιρίνη
HIF	hypoxia inducible factor	επαγόμενος από υποξία παράγοντας
HPLC	high performance liquid chromatography	υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HR	high resolution	υψηλή διαχωριστική ικανότητα
HRP	horseradish peroxidase	υπεροξειδάση αγριοράπανου
HuEPO	human erythropoietin	ενδογενής ανθρώπινη ερυθροποιητίνη
IEF	isoelectric focusing	ισοηλεκτρική εστίαση
IR	isotope ratio	ισοτοπικός λόγος
IRE	iron response element	σιδηροαπαντητικό στοιχείο
IRF	immature reticulocyte fraction	κλάσμα ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων
IRPs	iron regulatory proteins	σιδηρορυθμιστικές πρωτεΐνες
ISTD	internal standard	εσωτερικό πρότυπο
LABA	long-acting beta agonists	β-αγωνιστές μακράς δράσης

LC	liquid chromatography	υγροχρωματογραφία
LLE	liquid liquid extraction	εκχύλιση υγρού υγρού
LOD	limit of detection	όριο ανίχνευσης
LOQ	limit of quantification	όριο ποσοτικοποίησης
MAIIA	membrane-assisted isoform immunoassay	ανοσοπροσδιορισμός ισομορφής υποβοηθούμενος από μεμβράνη
MCH	mean corpuscular haemoglobin	μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration	μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης
MCV	mean corpuscular volume	μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων
MRM	multiple-reaction monitoring	παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων
mRNA	messenger RNA	αγγελιοφόρο ριβοσωμικό οξύ
MRPL	minimum required performance level	ελάχιστο επίπεδο απόδοσης ανίχνευσης
MS	mass spectrometry	φασματομετρία μαζών
MS/MS	tandem mass spectrometry	δίδυμη φασματομετρία μαζών
NESP	novel erythropoiesis-stimulating protein	νέα πρωτεΐνη διέγερσης ερυθροποίησης
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου
PCR	polymerase chain reaction	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PEG	polyethylene glycol	πολυαιθυλενογλυκόλη
PFCs	perfluorocarbons	υπερφθοριοάνθρακες
PKA	protein kinase A	πρωτεϊνική κινάση A
PLT	platelets count	αριθμός αιμοπεταλίων
Q	quadrupole	τετράπολο
QQQ	triple quadrupole	τριπλό τετράπολο
RBC	red blood cells count	αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων

RDW-SD	red blood cell distribution width-standard deviation	εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων – τυπική απόκλιση
RET#	reticulocytes count	αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων
RET%	reticulocytes percentage	ποσοστό δικτυοερυθροκυττάρων
rHuEPO	human recombinant erythropoietin	ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη
RNA	ribonucleic acid	ριβονουκλεϊκό οξύ
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ
SABA	short-acting beta agonists	β-αγωνιστές βραχείας δράσης
SAR	N-Lauroylsarcosine/sarcosyl	σαρκοσύλιο
SARMs	selective androgen receptor modulators	εκλεκτικοί ρυθμιστές υποδοχέα ανδρογόνων
SIM	selected ion monitoring	παρακολούθηση πολλαπλών ιόντων
SDS	sodium dodecyl sulfate	δωδεκυλοθειικό νάτριο
SEC	size exclusion chromatography	χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους
SPE	solid phase extraction	εκχύλιση στερεάς φάσης
sTfR	soluble transferrin receptor	διαλυτός υποδοχέας τρανσφερίνης
T	testosterone	τεστοστερόνη
TD	technical document	τεχνικό έγγραφο
TGF-β	tumor growth factor-β	παράγοντας αύξησης των όγκων-β
TOF	time of flight	αναλυτής χρόνου πτήσης ιόντων
TUEs	therapeutic use exceptions	εξαιρέσεις χρήσης για θεραπευτικούς σκοπούς
ULABA	ultra-long-acting beta agonists	β-αγωνιστές πολύ μακράς δράσης
WADA	World Anti-Doping Agency	Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ
WBC	white blood cells count	αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων
WGA	wheat germ agglutinin	συγκολλητίνη σπόρου σίτου

ΔΕΣ	δικτυοενδοθηλιακό σύστημα
ΔΟΕ	Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.	Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών
Ε.Κ.Π.Α.	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ε.Σ.ΚΑ.Ν.	Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ
Ε.ΣΥ.Δ.	Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης
Ο.Α.Κ.Α.	Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Ο πρώτος ορισμός, που υιοθετήθηκε το 1963 από το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Εξωσχολική Εκπαίδευση, ανέφερε μεταξύ άλλων, ότι ως ντόπινγκ στον αθλητισμό ορίζεται η χορήγηση ή η χρήση από ένα υγιές άτομο οποιουδήποτε παράγοντα ή ουσίας, που φυσιολογικά δεν εντοπίζεται στο σώμα ή χορηγείται σε αντικανονικές επιπρόσθετες ποσότητες και/ή με αντικανονικό τρόπο, με σκοπό την τεχνητή και με αθέμιτο τρόπο αύξηση της απόδοσης του ατόμου. Μετά την ίδρυση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) το 1999, και σύμφωνα με τον καθιερωμένο πλέον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ του WADA, ως ντόπινγκ ορίζεται η παραβίαση ενός ή περισσότερων εκ των παρακάτω κανονισμών:

- Η παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών ή δεικτών της σε δείγμα αθλητή. Εξαιρούνται οι ουσίες για τις οποίες έχει οριστεί συγκεκριμένο ποσοτικό όριο απαγόρευσης. Ο αθλητής είναι υπεύθυνος για οποιαδήποτε απαγορευμένη ουσία ή μεταβολίτη ή βιοδείκτη βρεθεί στα προσωπικά του δείγματα.
- Η χρήση ή η απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή που στοιχειοθετείται από άλλα αξιόπιστα μέσα, όπως παραδοχή εκ μέρους του αθλητή, μαρτυρικές καταθέσεις, έγγραφα αποδεικτικά στοιχεία κ.α..
- Η αποφυγή, η άρνηση ή η μη υποβολή σε δειγματοληψία μετά από ειδοποίηση χωρίς επαρκή αιτιολόγηση.
- Η παραβίαση των ισχυόντων κανονισμών διαθεσιμότητας του αθλητή για έλεγχο εκτός αγώνων, συμπεριλαμβανόμενης της αποτυχίας υποβολής απαιτούμενων πληροφοριών διαμονής.
- Η παραποίηση ή η απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε μέρους του ελέγχου ντόπινγκ και η συμπεριφορά που υπονομεύει την όλη διαδικασία ελέγχου.
- Η κατοχή από έναν αθλητή ή ένα μέλος του προσωπικού υποστήριξής του οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Η διακίνηση ή η απόπειρα διακίνησης οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.

- Η χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Η συγκάλυψη ή οποιαδήποτε άλλη μορφή εσκεμμένης συνέργειας που περιλαμβάνει παράβαση κανονισμού αντι-ντόπινγκ.
- Η σύμπραξη από έναν αθλητή. Οι αθλητές και οι συνεργάτες τους δεν πρέπει να συνεργάζονται με προπονητές ή άλλο προσωπικό υποστήριξης αθλητών που τελούν υπό αποκλεισμό λόγω παράβασης κανονισμού αντι-ντόπινγκ ή έχουν καταδικαστεί ποινικά ή τους έχει επιβληθεί ποινή σε επαγγελματικό επίπεδο σχετικά με το ντόπινγκ.^[1]

Στα ελληνικά η καλύτερη ερμηνεία του όρου ντόπινγκ είναι ο όρος φαρμακοδιέγερση, όμως, για να μπορέσουν να καλυφθούν όλες οι μορφές ντόπινγκ πέρα από τη χρήση φαρμάκων, έχει καθιερωθεί ο αγγλικός όρος.

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το ντόπινγκ δεν είναι ένας σύγχρονος όρος. Αρχαίες πηγές αναφέρουν τη χρήση ουσιών από τους πολεμιστές στη Μυθολογία για την αύξηση της δύναμης, ενώ σε αναφορές σχετικές με αρχαίες φυλές της Αφρικής με τον όρο “ντοπ” χαρακτηρίζεται ένα αλκοολούχο ποτό με διεγερτικές ικανότητες. Στην Αρχαία Ελλάδα ειδικοί περιγράφεται να προσφέρουν στους αθλητές διαφόρων ειδών κρέατα ή ζωμό αίματος πριν από τους αγώνες, προκειμένου να βελτιώσουν τη φυσική τους απόδοση. Ο Φιλόστρατος αναφέρει ότι οι ιατροί ήταν σημαντικά χρήσιμοι στην προετοιμασία των αθλητών για τους αγώνες.^[2]

Τον 1^ο αιώνα μ.Χ. αναφέρεται ότι οι Έλληνες δρομείς έπιναν ένα αφέψημα βοτάνων, για να αυξήσουν τη δύναμή τους και να είναι ικανοί να αποδώσουν σε αθλήματα μεγάλης διάρκειας. Περισσότερες αναφορές σχετικές με αυτήν την περίοδο είναι δύσκολο να βρεθούν, καθώς η γνώση για το ντόπινγκ ήταν καλά κρυμμένη από τους ιερείς. Η χρήση ουσιών στη Ρωμαϊκή ιστορία έχει επίσης καταγραφεί, με τους μονομάχους και τους αρματοδρομείς να καταναλώνουν διάφορα μείγματα, για να είναι πιο δυνατοί και γρήγοροι, τόσο εκείνοι, όσο και τα άλογά τους.^[2]

Το ντόπινγκ στο σύγχρονο αθλητισμό αξιόπιστα καταγράφηκε από το δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα. Η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση εμφανίστηκε το 1865 στην κολύμβηση κατά τη διάρκεια ενός αγώνα στο κανάλι του Άμστερνταμ, όπου περιγράφηκε η πρόσληψη μιας ανώνυμης ουσίας που βελτιώνει την απόδοση. Δύο χρόνια αργότερα, το 1867 στους δημοφιλείς αγώνες ποδηλασίας έξι ημερών, οι Γάλλοι αθλητές προτιμούσαν μείγματα με βάση την

καφεΐνη, οι Βέλγοι χρησιμοποιούσαν ζάχαρη αναμειγμένη με αιθέρα, ενώ άλλοι χρησιμοποιούσαν αλκοολούχα αφεψήματα ή νιτρογλυκερίνη. Ο όρος “doping” εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε Αγγλικό λεξικό το 1889, ενώ το 1896 καταγράφεται ο πρώτος θάνατος που προκλήθηκε λόγω ντόπινγκ. Πρόκειται για τον Άγγλο ποδηλάτη Arthur Linton, ο οποίος πέθανε έπειτα από λήψη εφεδρίνης.^[2]

Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, η εμπορευματοποίηση χαρακτήρισε τον αθλητικό κόσμο και ο αθλητισμός βαθμιαία εξελίχθηκε από μια δραστηριότητα σε μια μεγάλη βιομηχανία. Η ανάγκη για επιτυχία οδήγησε σε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης περιστατικών κατάχρησης ουσιών και σε πολυάριθμες περιπτώσεις το ντόπινγκ σχετιζόταν με το θάνατο αθλητών. Ήδη το 1904 σε μαραθώνιο ο Thomas Hicks, που μόλις είχε κερδίσει, κατέρρευσε και οι ιατροί διαπίστωσαν πρόσληψη στρυχνίνης και κονιάκ πριν από τον αγώνα. Το 1910 ο James Jeffrie ισχυρίστηκε, αφού ηττήθηκε από τον Jack Johnson, ότι το τσάι του αντιπάλου του μολύνθηκε/ντοπαρίστηκε προκειμένου να τον νικήσει. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά περίπτωσης στην οποία κατηγορείται ντοπαρισμένος αθλητής. Το 1952 κατά τη διάρκεια των παγοδρομιών στο Όσλο, αίσθηση προκλήθηκε, όταν αμπούλες και σύριγγες βρέθηκαν στα αποδυτήρια των αθλητών. Η δραματική αύξηση της χρήσης ουσιών για λόγους ντόπινγκ ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960, με τη χρήση αμφεταμινών να επικρατεί, προκαλώντας το θάνατο αρκετών αθλητών. Στα τέλη του αιώνα πραγματοποιήθηκε ένα από τα πιο σοκαριστικά και οργανωμένα σκάνδαλα ντόπινγκ, αυτό της Ανατολικής Γερμανίας. Ένα χρηματοδοτούμενο κρατικό πρόγραμμα είχε σχεδιαστεί για τη μαζική δημιουργία υπεραθλητών με χρήση στεροειδών και αντισυλληπτικών από πολύ μικρή ηλικία, με αποτέλεσμα την καθιέρωση των Ανατολικογερμανών στον παγκόσμιο αθλητισμό, αλλά και μια πληθώρα σοβαρότατων επιπτώσεων στην υγεία των αθλητών. Ο Ανατολικογερμανός Andreas Krieger γεννήθηκε γυναίκα, αγωνίστηκε στη σφαιροβολία ως γυναίκα, αλλά τελικά μετά από χρόνια υπεβλήθη σε εγχείρηση αλλαγής φύλου, λόγω της ανάπτυξης μυϊκής μάζας, τριχοφυΐας και αρσενικών χαρακτηριστικών. Η πιο διαβόητη υπόθεση ντόπινγκ όλων των εποχών σε οποιαδήποτε αθλητική διοργάνωση ανήκει στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ το 1988. Πρόκειται για την περίφημη κούρσα των 100 μέτρων ανδρών, με τον Καναδό νικητή Ben Johnson να ανιχνεύεται θετικός σε χρήση στανοζολόλης. Στα επόμενα χρόνια έξι ακόμη από τους οκτώ συμμετέχοντες εκείνης της κούρσας βρέθηκαν ντοπαρισμένοι ή ενεπλάκησαν σε περίεργες ιστορίες ντόπινγκ, ανάμεσά τους και ο δεύτερος νικητής Carl Lewis, και έτσι η κούρσα αυτή χαρακτηρίστηκε ως η πιο “βρώμικη” στην ιστορία του αθλητισμού.^[2-5]

Δυστυχώς, το ντόπινγκ δεν είναι μόνο ιστορία αλλά προφανώς συνεχίζεται στις μέρες μας με νέες ουσίες και μεθόδους. Η χαρραγή του 21^{ου} αιώνα χαρακτηρίζεται από πολλά

παραδείγματα αθλητών που έχουν κατηγορηθεί για ντόπινγκ, αλλά και από περιστατικά που κλονίζουν ολόκληρα αθλήματα ή χώρες. Η απόσυρση είκοσι επτά μελών από την ομάδα της Κίνας πριν από τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 2000 στο Σύνδνεϋ, για την αποφυγή ελέγχου με νέες μεθόδους, η γνωστή υπόθεση Κεντέρη-Θάνου στην επόμενη Ολυμπιάδα της Αθήνας το 2004 και τα μαζικά θετικά δείγματα σε μεθυλοτριενολόνη πριν και μετά τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 2008 στο Πεκίνο είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα. Εν τω μεταξύ, το 2007 η Αμερικανίδα σπρίντερ Marion Jones παραδέχτηκε οικειοθελώς, έπειτα από πιέσεις, την μακροχρόνια χρήση νέων συνθετικών στεροειδών όπως η τετραϋδρογεστρινόνη, κάνοντας την αρχή για την αποκάλυψη του περίφημου σκανδάλου της BALCO. Τα επόμενα χρόνια ακολούθησε πληθώρα θετικών δειγμάτων που έπληξαν μαζικά αθλήματα όπως η ποδηλασία, η άρση βαρών και ο στίβος. Σε αυτή τη μαζική εμφάνιση θετικών δειγμάτων βοήθησε σε μεγάλο βαθμό η ανακάλυψη νέων τεχνολογιών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον επανέλεγχο παλαιών κατεψυγμένων δειγμάτων, κυρίως από τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 2008 στο Πεκίνο και του 2012 στο Λονδίνο. Η “έκθεση McLaren” το 2016 ήταν η αρχή για τη δημοσιοποίηση του συστηματικού ντόπινγκ στη Ρωσία με συγκάλυψη ή νοθεία θετικών δειγμάτων, οδηγώντας στον αποκλεισμό της Ρωσίας από τους Ολυμπιακούς Αγώνες του Ρίο ντε Τζανέιρο το 2016, ένας αποκλεισμός που ισχύει μέχρι σήμερα για πολλές διεθνείς διοργανώσεις, αποδεικνύοντας ότι το ντόπινγκ δεν οφείλεται μόνο στην πρόοδο της φαρμακευτικής, αλλά και σε πολιτικές επιλογές.^[2-5]

1.3 Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ANTI-ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Η επιστημονική αρχή των ελέγχων ντόπινγκ τοποθετείται κατά τους περισσότερους το 1910 στην Αυστρία, όπου μετά από διάφορα μη αναμενόμενα αποτελέσματα σε υποδρομίες, ο Ρώσος χημικός Bukowski απομόνωσε αλκαλοειδή από το σίελο των αλόγων. Η ανάλυση εμπειρείχε πολλά στάδια εκχύλισης και συμπύκνωσης του δείγματος, τα οποία οδηγούσαν σε οπτική παρατήρηση έπειτα από αντιδράσεις σχηματισμού έγχρωμων ενώσεων ή αντιδράσεις καθιζήσεως. Έτσι, άρχισαν να ανιχνεύονται οι ουσίες στρυχνίνη, μορφίνη και ηρωίνη. Το 1928 η Διεθνής Ομοσπονδία Κλασσικού Αθλητισμού έγινε η πρώτη Διεθνής Ομοσπονδία Αθλητισμού που απαγόρευσε το ντόπινγκ. Πολλές άλλες Διεθνείς Ομοσπονδίες ακολούθησαν, αλλά το αντι-ντόπινγκ ήταν ακόμα σε πρωτογενές στάδιο με ελάχιστη αποτελεσματικότητα. Με την εισαγωγή της αμφεταμίνης και των παραγώγων της στους αγώνες, χρειάστηκε να αναπτυχθούν νέες πιο ευαίσθητες μέθοδοι και το 1930 ξεκίνησε η ανίχνευση διεγερτικών, ναρκωτικών και νιτρογλυκερίνης σε ούρα, σάλιο, αίμα και ιδρώτα με χρήση κρυσταλλογραφίας,

χρωματομετρίας, μικροκαθίζησης και νεφελομετρίας (όριο ανίχνευσης < 20 µg/mL). Η ανάγκη για μεγαλύτερη ειδικότητα της μεθόδου οδήγησε στη χρήση της χρωματογραφίας χάρτη για την ανίχνευση διεγερτικών, αλκαλοειδών και διουρητικών, καθώς και της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, που απαιτούσε χρήση ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας (όριο ανίχνευσης 0,1-1,0 µg/mL). Το 1950 άρχισε να εφαρμόζεται η τεχνική της αεριοχρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC) σε συνδυασμό με ανιχνευτές φλόγας και ανιχνευτές αζώτου-φωσφόρου.^[2,4]

Το πρώτο μεγάλο βήμα στην προσπάθεια καταπολέμησης του ντόπινγκ έγινε το 1960, όταν το Συμβούλιο της Ευρώπης συζήτησε για πρώτη φορά τη νομοθετική αντιμετώπιση ενάντια στη χρήση απαγορευμένων ουσιών στον αθλητισμό, με την πρώτη αντίστοιχη νομοθεσία να εμφανίζεται στη Γαλλία το 1963, και να ακολουθεί το Βέλγιο το 1965. Το 1967 η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ), στα πλαίσια της οργάνωσης και επίβλεψης του αγώνα κατά του ντόπινγκ, θεσμοθέτησε τη σχετική Ιατρική Επιτροπή, η οποία και δημοσίευσε τον πρώτο Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών στον αθλητισμό, που περιελάμβανε μόνο διεγερτικά και ναρκωτικά.^[2,4]

Οι έλεγχοι ντόπινγκ πρωτοεμφανίστηκαν σε Ολυμπιακούς Αγώνες το 1968 στο Μεξικό. Το 1972 στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μονάχου έγινε για πρώτη φορά η εφαρμογή ανοσοχημικών και ραδιοανοσοχημικών προσδιορισμών με επιτυχή ανίχνευση ουσιών υψηλού μοριακού βάρους, όπως η αυξητική ορμόνη και η χοριακή γοναδοτροπίνη. Αξιόπιστες μέθοδοι για τον εντοπισμό αναβολικών παραγόντων εισήχθησαν το 1974 και το 1976 με την υγροχρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) να συμπληρώνει τη χρήση GC, ενώ με την υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας ανιχνεύθηκαν αναβολικά ανδρογόνα, διεγερτικά και κορτικοστεροειδή (όριο ανίχνευσης 10 ng/mL). Τα αναβολικά στεροειδή προστέθηκαν στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών της ΔΟΕ και μια δεκαετία αργότερα προστέθηκε και η τεστοστερόνη. Η χρήση GC συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) (GC-MS) εφαρμόστηκε τη δεκαετία του 1970, με τη βοήθεια ιοντισμού με ηλεκτρόνια (Electron Ionization, EI), και οδήγησε στην ανίχνευση αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών και άλλων ουσιών, όπως οι εφεδρίνες, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια. Παράλληλα, άρχισε να χρησιμοποιείται η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) στην παρασκευαστική πορεία επεξεργασίας των δειγμάτων. Εν τω μεταξύ, κατά τη διάρκεια των Παναμερικανικών Αγώνων στο Καράκας το 1983, πολλοί αθλητές ήταν θετικοί σε απαγορευμένες ουσίες και πολλοί άλλοι εγκατέλειψαν τους Αγώνες χωρίς να αγωνιστούν, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα των νέων διαδικασιών ελέγχου. Το 1988 ο Κατάλογος Απαγορευμένων

ουσιών συμπληρώθηκε με τα διουρητικά και τους β-αναστολείς, ενώ ένα χρόνο αργότερα προστέθηκαν οι πεπτιδικές ορμόνες και έπειτα από τέσσερα χρόνια οι β2-αγωνιστές.^[4,6-7]

Ωστόσο, δεσμευτικός δεν ήταν μόνο ο Απαγορευμένος Κατάλογος της Ιατρικής Επιτροπής της ΔΟΕ. Οι αθλητικές ομοσπονδίες δημιούργησαν τους δικούς τους Καταλόγους Απαγορευμένων Μεθόδων και Ουσιών. Προκειμένου να επέλθει ένα ενιαίο σύστημα, η ΔΟΕ, οι Διεθνείς Ομοσπονδίες και οι Εθνικές Ολυμπιακές Επιτροπές κατέληξαν το 1994 σε συμφωνία σχετικά με την ενοποίηση των διαφορετικών Απαγορευμένων Καταλόγων.^[2]

Το 1994 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η χρήση συστήματος υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (High Resolution, HR) σε συνδυασμό με δίδυμη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS/MS) που συνέβαλε στην ανίχνευση ουσιών, όπως οι μεταβολίτες της στανοζολόλης. Την ίδια χρονιά χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής ισοτοπικού λόγου (Isotope Ratio, IR) άνθρακα σε συνδυασμό με GC (GC/C/IRMS), που οδήγησε στην ανίχνευση εξωγενούς χορήγησης στεροειδών, όπως η τεστοστερόνη. Τα επόμενα χρόνια έως σήμερα τη μεγαλύτερη ανάπτυξη σημείωσε η εφαρμογή συνδυασμένων τεχνικών LC-MS. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας το 2004 εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε συνθήκες ρουτίνας η ανάλυση με LC-MS με ανιχνευτή παγίδας ιόντων (Ion Trap). Παρόλο που το απλό τετράπολο (quadrupole, Q) από τις αρχές του 1980 παραμένει ο βασικός αναλυτής μαζών, μεγαλύτερη ακρίβεια επιτυγχάνεται με τη χρήση τριπλού τετράπολου (triple quadrupole, QQQ), αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (Time-Of-Flight, TOF) σε συνδυασμό με τετράπολο (QTOF) και με αναλυτή παγίδας ιόντων (Orbitrap). Σε κάθε περίπτωση οι αναλυτικές τεχνικές συνεχώς εξελίσσονται οδηγώντας στην ανίχνευση περισσότερων και καινούργιων ουσιών, κυρίως μικρού μοριακού βάρους, με μεγαλύτερη ακρίβεια, εκλεκτικότητα, ευαισθησία, ειδικότητα και ταχύτητα.^[6,7]

Λόγω μαζικών περιπτώσεων ντόπινγκ η ΔΟΕ συγκάλεσε το 1999 στη Λωζάνη το Παγκόσμιο Συνέδριο για το Ντόπινγκ στον Αθλητισμό. Το κύριο αποτέλεσμα του συνεδρίου αυτού ήταν η σύσταση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ (WADA) τη 10^η Νοεμβρίου του 1999. Το 2003 η ΔΟΕ σε συνεργασία με Διεθνείς Επιτροπές Αθλητισμού συμφώνησαν να υιοθετήσουν τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ, ως τη βάση για τον αγώνα κατά του ντόπινγκ στον αθλητισμό. Ο Κώδικας τέθηκε σε ισχύ από την 1η Ιανουαρίου του 2004, πριν τους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας.^[1,2]

1.4 ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΑΝΤΙ-ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντι-Ντόπινγκ περιλαμβάνει όλα εκείνα τα στοιχεία που απαιτούνται για να διασφαλιστεί η βέλτιστη εναρμόνιση και εφαρμογή των παγκόσμιων και εθνικών προγραμμάτων αντι-ντόπινγκ και δομείται στα ακόλουθα τρία επίπεδα:

- Παγκόσμιος Κώδικας Αντι-Ντόπινγκ (World Anti-Doping Code)
- Διεθνή Πρότυπα (International Standards)
- Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής (Model of Best Practice and Guidelines)

Ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντι-Ντόπινγκ, που αποτελεί το θεμελιώδες κείμενο πάνω στο οποίο στηρίζεται το Παγκόσμιο Πρόγραμμα Αντι-Ντόπινγκ, και τα Διεθνή Πρότυπα, που καθορίζουν τις λεπτομέρειες εφαρμογής του Κώδικα, είναι δεσμευτικά και υποχρεωτικά κείμενα. Οι Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής είναι συνιστώμενες και η εφαρμογή τους προαιρετική. Ο Κώδικας παρέχει ουσιαστικά το πλαίσιο εναρμόνισης των πολιτικών, των κανονισμών και των ρυθμίσεων σχετικά με το αντι-ντόπινγκ εντός των αθλητικών οργανισμών και μεταξύ των δημοσίων φορέων. Όσον αφορά στα Διεθνή Πρότυπα, αυτά περιλαμβάνουν τα πέντε κείμενα που εκδίδει ο WADA:^[1,8]

- Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών (List of Prohibited Substances), που καθορίζει τις απαγορευμένες ουσίες και κατηγορίες απαγορευμένων ουσιών και τις απαγορευμένες μεθόδους εντός και εκτός αγώνων.^[9]
- Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους (International Standard for Testing), που περιγράφει τη διαδικασία προγραμματισμού των ελέγχων.^[10]
- Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL), που έχει σκοπό να διασφαλίσει την εξαγωγή αξιόπιστων και ομοιόμορφα εναρμονισμένων αποτελεσμάτων και αναφορών από όλα τα διαπιστευμένα από τον WADA εργαστήρια ανά τον κόσμο. Περιλαμβάνει τις απαιτήσεις για την απόκτηση και τη διατήρηση της διαπίστευσης των εργαστηρίων από τον WADA, τις προδιαγραφές λειτουργίας τους και την περιγραφή της διαδικασίας απόκτησης διαπίστευσης.^[11]
- Διεθνές Πρότυπο για τις Εξαιρέσεις Χρήσης για Θεραπευτικούς Σκοπούς (International Standard for Therapeutic Use Exceptions, TUEs), που έχει σκοπό να διασφαλίσει την εναρμονισμένη χορήγηση TUE μεταξύ διαφορετικών αθλημάτων και χωρών.^[12]

- Διεθνές Πρότυπο για την Προστασία των Προσωπικών Δεδομένων (International Standard for the Protection of Privacy and Personal Information), που έχει σκοπό να διασφαλίσει την τήρηση προφυλάξεων από μέρους των εμπλεκόμενων στο αντι-ντόπινγκ φορέων, κατά τη συλλογή και διαχείριση προσωπικών πληροφοριών που αφορούν τον αθλητή.^[13]

Ο Κώδικας, καθώς και όλα τα επίσημα έγγραφα του WADA ανανεώνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να περιλαμβάνουν όλες τις αλλαγές τόσο στις διαδικασίες ελέγχου, ανάλυσης δειγμάτων και εκτίμησης αποτελεσμάτων, όσο και στις διαδικασίες λειτουργίας και διαπίστευσης των εργαστηρίων.

Κατά καιρούς εκδίδονται από τον WADA τεχνικά έγγραφα (Technical Documents, TDs), τα οποία είναι μέρος των Διεθνών Προτύπων για εργαστήρια, οπότε λογίζονται υποχρεωτικά στην εφαρμογή τους, και σχετίζονται με τον τρόπο διαχείρισης συγκεκριμένων θεμάτων που αφορούν τα εργαστήρια, όπως π.χ. τα κριτήρια ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών για ποιοτικές μεθόδους και τα όρια απόφασης (Decision Limits, DLs) για επιβεβαιωτικές διαδικασίες ποσοτικού προσδιορισμού ουσιών ορίου.^[14,15]

Για την εναρμόνιση του τρόπου έκδοσης αποτελεσμάτων από τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ, ο WADA έχει καθορίσει Ελάχιστο Επίπεδο Απόδοσης Ανίχνευσης (Minimum Required Performance Level, MRPL) για κάθε κατηγορία απαγορευμένων ουσιών. Αυτά τα επίπεδα είναι υποχρεωτικά για όλα τα εργαστήρια, δεν αποτελούν όρια ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης, αλλά αναλυτικές προδιαγραφές τεχνικής απόδοσης των εργαστηρίων κατά την πραγματοποίηση ελέγχων ρουτίνας.^[16]

1.4.1 ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντι-Ντόπινγκ αναφέρει ότι μια ουσία ή μια μέθοδος θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών, εάν ο WADA καθορίσει ότι η ουσία ή η μέθοδος καλύπτει δύο από τα τρία κριτήρια που ακολουθούν:

1. Η ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η ουσία ή η μέθοδος, από μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες ή μεθόδους, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει ή βελτιώνει την αθλητική απόδοση.
2. Η ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου αποτελεί πραγματικό ή ενδεχόμενο κίνδυνο για την υγεία του αθλητή.

3. Η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού που περιγράφεται στην Εισαγωγή του Κώδικα.

Επιπλέον, μια ουσία ή μέθοδος θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών εάν ο WADA καθορίσει ότι υπάρχει ιατρική ή άλλη επιστημονική απόδειξη, φαρμακολογική επίδραση ή εμπειρία ότι η ουσία ή η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να καλύψει τη χρήση άλλων Απαγορευμένων Ουσιών ή Απαγορευμένων Μεθόδων.^[1]

Η ενσωμάτωση μιας φαρμακευτικής ουσίας σε μια από τις απαγορευμένες κατηγορίες του Καταλόγου κρίνεται από την Επιτροπή Εργασίας Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών του WADA, που αποτελείται από επιλεγμένους επιστήμονες, με βάση τη δράση ή τη χημική δομή της. Σύμφωνα με την έκδοση του Απαγορευμένου Καταλόγου του 2020, που παρουσιάζεται συνοπτικά στον Πίνακα 1.1, οι ουσίες (substances, S) και οι μέθοδοι (methods, M) ταξινομούνται σε κατηγορίες και χωρίζονται σε τρεις ομάδες. Αυτές που απαγορεύονται και εντός και εκτός αγώνων (A), μόνο εντός αγώνων (B) και μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα (particular-P) (Γ).

Πίνακας 1.1. Συνοπτική παρουσίαση του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών του WADA^[9]

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΑΠΑΓΟΡΕΥΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΩΝ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ
A. Ουσίες και μέθοδοι που απαγορεύονται εντός και εκτός αγώνων		
S0. Μη εγκεκριμένες ουσίες	Κάθε φαρμακολογική ουσία η οποία δεν καλύπτεται από καμία από τις επόμενες κατηγορίες του Καταλόγου και χωρίς ισχύουσα έγκριση από οποιαδήποτε κυβερνητική ρυθμιστική υγειονομική αρχή για ανθρώπινη θεραπευτική χρήση.	φάρμακα υπό κλινική μελέτη ή που έχουν εγκριθεί μόνο για κτηνιατρική χρήση
S1. Αναβολικοί παράγοντες		
S1.1. Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή	Φυσικά ή συνθετικά στεροειδή που μπορούν να ενισχύσουν την αναβολική διεργασία στον οργανισμό, να διεγείρουν την πρωτεϊνοσύνθεση, να αναστείλουν τη διάσπαση των πρωτεϊνών και να οδηγήσουν σε ανάπτυξη μυών και ανδρικών χαρακτηριστικών.	τεστοστερόνη, στανοζολόλη, τετραϋδρογεστρινόνη
S1.2. Άλλοι αναβολικοί παράγοντες	Χημικώς τροποποιημένα στεροειδή που έχουν συντεθεί από τη φυσική δομή, στην προσπάθεια για μεγιστοποίηση των αναβολικών επιδράσεων και ελαχιστοποίηση των ανδρογόνων επιδράσεων των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών.	κλενβουτερόλη, εκλεκτικοί ρυθμιστές υποδοχέων ανδρογόνων
S2. Πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες και μιμητές	Φυσικά ή συνθετικά πρωτεϊνικά μόρια που συνδέονται με τους υποδοχείς των κυττάρων στόχων επιδρώντας σε συγκεκριμένες λειτουργίες, οι οποίες κανονικά ελέγχονται από τις ενδογενείς ορμόνες/πρωτεΐνες.	ερυθροποιητίνες, χοριακή γοναδοτροπίνη, αυξητική ορμόνη, πεπτίδια
S3. β2-αγωνιστές	Φαρμακευτικά σκευάσματα που συνδέονται με τους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς, δρώντας ως ανακουφιστικά του άσθματος ή βρογχοδιασταλτικά, αφού χαλαρώνουν και ανοίγουν τους αεραγωγούς (βρόγχους) στους πνεύμονες.	σαλβουταμόλη, φορμοτερόλη, σαλμετερόλη
S4. Ορμονικοί και μεταβολικοί ρυθμιστές	Ανταγωνιστές και ρυθμιστές ορμονών που επηρεάζουν σωματικές λειτουργίες, όπως τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος ή τη μυϊκή ανάπτυξη, αναστέλλοντας ή διεγείροντας τους κυτταρικούς υποδοχείς και ρυθμίζοντας συγκεκριμένες αντιδράσεις.	αναστολείς της αρωματάσης, εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων
S5. Διουρητικά και παράγοντες κάλυψης	Οι παράγοντες κάλυψης (μάσκες) μπορούν να κρύψουν ή να μειώσουν τη συγκέντρωση μιας απαγορευμένης ουσία κατά την ανάλυση ούρων, επομένως, και τα διουρητικά θεωρούνται μάσκες, καθώς αυξάνουν το ρυθμός της ούρηση, προκαλώντας αραιώση των ούρων.	ακεταζολαμίδη, φουροσεμίδη, διάφορες θειαζίδες.
M1. Χειρισμός του αίματος και των συστατικών του	Τεχνικές εισαγωγής αίματος και παραγώνων του στον οργανισμό, αύξησης της παροχής ή μεταφοράς οξυγόνου και ενδοαγγειακού χειρισμού του αίματος ή των συστατικών του με φυσικό ή χημικό τρόπο.	μεταγγίσεις αίματος, συνθετικοί φορείς οξυγόνου
M2. Χημικός και φυσικός χειρισμός	Χρήση ουσιών και/ή μεθόδων που τροποποιούν τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των ελέγχων ντόπινγκ, έτσι ώστε να μεταβάλλουν την ακεραιότητα και την εγκυρότητά τους.	καθετηριασμός, αντικατάσταση ούρων με ούρα άλλου ατόμου
M3. Γονιδιακό ντόπινγκ	Μεταφορά πολυμερών νουκλεϊκών οξέων ή αναλόγων νουκλεϊκών οξέων και χρήση φυσιολογικών ή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων.	γονιδιακή θεραπεία
B. Ουσίες και μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων		
S6. Διεγερτικά	Ουσίες που ενεργοποιούν το κεντρικό νευρικό σύστημα με τη δράση της αδρεναλίνης και της νοραδρεναλίνης και βελτιώνουν τη διάθεση, μειώνουν το αίσθημα της κόπωσης και βελτιώνουν τη φυσική απόδοση.	αμφεταμίνες, εφεδρίνες, κοκαΐνη
S7. Ναρκωτικά	Ουσίες ικανές να μεταβάλλουν τη ψυχική και φυσική κατάσταση ενός οργανισμού σε ένα ευρύ πεδίο από τον ύπνο και την πλήρη ακινητοποίηση έως την ευφορία και τη διέγερση.	μορφίνη, οπιοειδή, ψυχομιμητικά
S8. Κανναβινοειδή	Φυσικές ουσίες με ψυχομιμητική ή παραισθησιογόνα δράση που ανευρίσκονται στο φυτό <i>Cannabis Sativa</i> , καθώς επίσης και συνθετικά ανάλογα ή οι μεταβολίτες τους.	Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη
S9. Γλυκοκορτικοστεροειδή	Φυσικά ή συνθετικά στεροειδή, που εμποδίζουν τη διαδικασία της φλεγμονής και συμμετέχουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων (καταβολική δράση).	κορτιζόνη, φλουτικαζόνη, πρεδνιζολόνη
Γ. Ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα		
P1. β-αναστολείς	Ουσίες που επιβραδύνουν τους ρυθμούς της καρδιάς και χρησιμοποιούνται σε αθλήματα που στηρίζονται στην ηρεμία του αγωνιζόμενου για την εκτέλεση λεπτών και ακριβών κινήσεων, όπως η τζοβολία, η σκοποβολή, το γκολφ, το σκι κ.α.	ατενολόλη, λαβηταλόλη, προπρανολόλη

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Οι διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ ρυθμίζονται από τα Διεθνή Πρότυπα Ελέγχου του Παγκόσμιου Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ και βάσει αυτών ο έλεγχος πραγματοποιείται με δύο τρόπους, είτε εντός αγώνων έλεγχος (σε μια αθλητική διοργάνωση), είτε εκτός αγώνων έλεγχος (στις συγκεντρώσεις ομάδων, στο σπίτι ή στο χώρο προπόνησης). Και οι δύο τρόποι ακολουθούν τις ίδιες βασικές διαδικασίες συλλογής δειγμάτων, χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό δειγματοληψίας και ακολουθούν τα ίδια πρότυπα για τον έλεγχο. Η διαδικασία ελέγχου περιλαμβάνει την επιλογή του αθλητή, την ανακοίνωση επιλογής στον αθλητή, τη δειγματοληψία και την εργαστηριακή ανάλυση.^[1]

Για την εξασφάλιση της ανωνυμίας του αθλητή, παγκοσμίως τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ και το προσωπικό των εργαστηρίων αυτών δεν εμπλέκονται σε άλλες διαδικασίες πέραν της εργαστηριακής ανάλυσης. Για τις άλλες τρεις διαδικασίες έχουν καταρτιστεί λεπτομερή πρωτόκολλα, τα οποία είναι ενσωματωμένα, τόσο στο Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους, όσο και στη νομοθεσία κάθε χώρας. Στην Ελλάδα ο θεσμοθετημένος Εθνικός Φορέας που φέρει την ευθύνη για τη διαδικασία της δειγματοληψίας και την εφαρμογή και διαχείριση αποτελεσματικής πολιτικής αντι-ντόπινγκ στη χώρα είναι το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.). Ένα αποτελεσματικό πλάνο συλλογής δειγμάτων περιλαμβάνει ελέγχους σωστά σχεδιασμένους ως προς την επιλογή αθλητή και το χρόνο τέλεσης, σε όλη τη διάρκεια του έτους και χωρίς προηγούμενη προειδοποίηση. Οι αθλητές, από τη στιγμή που ενημερώνονται για την επιλογή τους, συνοδεύονται συνεχώς από το δειγματολήπτη έως ότου ληφθεί και σφραγιστεί το δείγμα.^[1,8,11,17]

Οι συνήθεις επιλογές δειγμάτων είναι ούρα και αίμα και σπανιότερα σάλιο ή τρίχες. Για την ανίχνευση των περισσότερων απαγορευμένων φαρμακευτικών ουσιών επιλέγεται το δείγμα ούρων, λόγω της ευκολίας λήψης του, του σχετικά μεγάλου λαμβανόμενου όγκου και κυρίως επειδή η συγκέντρωση των φαρμάκων αναμένεται να είναι υψηλότερη από ότι στο αίμα. Τα τελευταία χρόνια έχουν κάνει την εμφάνιση τους και άλλα εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα, όπως οι αποξηραμένες κηλίδες αίματος και ούρων (Dried Blood Spots, DBS – Dried Urine Spots, DUS).^[18]

Η διαδικασία συλλογής δειγμάτων ούρων ελέγχεται προσεκτικά για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της διαδικασίας ελέγχου ντόπινγκ. Οι ελεγχόμενοι αθλητές επιλέγουν από τρεις τουλάχιστον συσκευασίες ένα σφραγισμένο αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη. Ακολούθως, επιλέγεται μία από τουλάχιστον τρεις συσκευασίες ελέγχου ούρων, οι οποίες περιέχουν δύο φιάλες (συνήθως διαφανείς και γυάλινες), μια με την ένδειξη “δείγμα Α” και

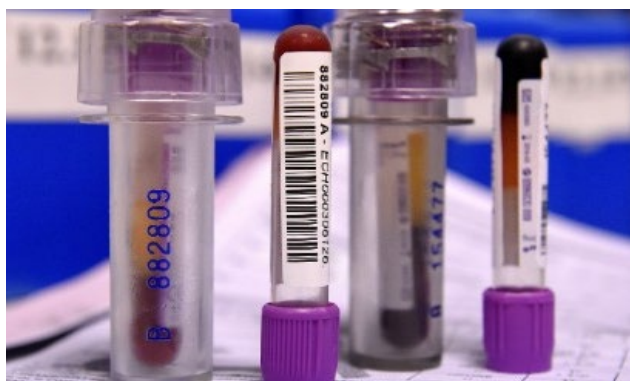
μα με την ένδειξη “δείγμα Β” και αντίστοιχα πώματα κατάλληλα σφραγισμένα, ενώ πάνω τους είναι ανεξίτηλα αποτυπωμένος ένας μοναδικός κωδικός αριθμός δείγματος (Εικόνα 1.1). Το δείγμα, έπειτα, μεταγγίζεται από τον αθλητή, σύμφωνα με τις οδηγίες του δειγματολήπτη και ο αθλητής κλείνει ερμητικά τις δύο φιάλες. Τα δείγματα μαζί με τα απαραίτητα έγγραφα που συμπληρώνονται και από τους δύο τοποθετούνται μέσα σε σάκους μεταφοράς, ασφαλιζονται και μεταφέρονται στο εκάστοτε εργαστήριο που θα πραγματοποιήσει την ανάλυση.^[11]



Εικόνα 1.1. Ουροσυλλέκτης και φιάλες (A & B) δειγματοληψίας.

Με παρόμοιο τρόπο γίνεται και η συλλογή δειγμάτων αίματος, η οποία πολλές φορές συνοδεύει τη συλλογή δείγματος ούρων ή γίνεται μόνη της σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως η ανίχνευση αυξητικής ορμόνης και η μέτρηση αιματολογικών παραμέτρων. Το πακέτο συλλογής δείγματος αίματος περιλαμβάνει συνήθως αποστειρωμένη βελόνα, σύριγγα, το κατάλληλο σωληνάριο αιμοληψίας *Vacutainer* και πλαστικές θήκες ασφαλείας που πάνω τους είναι ανεξίτηλα αποτυπωμένος ένας μοναδικός κωδικός αριθμός δείγματος, όλα συσκευασμένα μαζί σε σφραγισμένο σάκο (Εικόνα 1.2). Ο αθλητής επιλέγει τυχαία δύο τέτοια πακέτα ένα με την ένδειξη “δείγμα Α” και ένα με την ένδειξη “δείγμα Β”. Ο τύπος του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για τη συλλογή του αίματος και η διαδικασία μετά τη συλλογή διαφέρει ανάλογα με το είδος της απαιτούμενης ανάλυσης. Το ολικό αίμα και το πλάσμα συλλέγονται σε σωληνάρια που περιέχει αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ως αντιπηκτικό, ενώ ο ορός σε σωληνάριο που έχει αδρανή πολυμερή γέλη διαχωριστή ορού και παράγοντα ενεργοποίησης της πήξης. Μετά την αιμοληψία το περιεχόμενο του σωληναρίου ομογενοποιείται με ανακίνηση, τα δείγματα σφραγίζονται και μαζί με τα απαραίτητα έγγραφα που συμπληρώνονται και από τους δύο τοποθετούνται μέσα σε ψυγεία μεταφοράς. Μέσα στο ψυγείο τοποθετείται ένας καταγραφέας δεδομένων θερμοκρασίας για την παρακολούθηση των συνθηκών

μεταφοράς. Το ψυγείο ασφαρίζεται και μεταφέρεται στο εκάστοτε εργαστήριο που θα πραγματοποιήσει την ανάλυση.^[11,19]



Εικόνα 1.2. Θήκες ασφαλείας και σωληνάρια αιμοληψίας *Vacutainer* με EDTA.

Όλα τα δείγματα αποστέλλονται στα διαπιστευμένα από τον WADA εργαστήρια, ώστε τα αποτελέσματα να αναγνωρίζονται ως έγκυρα από τις αθλητικές αρχές. Η αναγνώριση των εργαστηρίων ενισχύεται από τη διεξαγωγή συνεχών εξωτερικών ελέγχων ποιότητας. Επιπλέον, τα εργαστήρια πρέπει να είναι διαπιστευμένα από τον Εθνικό Φορέα Διαπίστευσης, που στην Ελλάδα είναι το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.), σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17025.

Κατά την παραλαβή των δειγμάτων από εξουσιοδοτημένο μέλος του εργαστηρίου ελέγχεται η ακεραιότητα των δειγμάτων και των εγγράφων που τα συνοδεύουν. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρώνται, όταν αυτό απαιτείται. Το εργαστήριο δε γνωρίζει την ταυτότητα του αθλητή, αλλά εκθέτει το σύνολο των αποτελεσμάτων βασιζόμενο στο μοναδικό κωδικό αριθμό της φιάλης δειγματοληψίας. Ακολουθεί η εισαγωγή των δειγμάτων στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων του εργαστηρίου, συνήθως σε παρτίδες, (Εικόνα 1.3), όπου καθορίζονται οι αναλύσεις στις οποίες θα υποβληθεί κάθε δείγμα και αποδίδεται ένας εργαστηριακός κωδικός ανά δείγμα, ο οποίος εξαφανίζει κάθε σχέση του αθλητή με το δείγμα, αφού η ανάλυση πραγματοποιείται μόνο με τον εργαστηριακό κωδικό και όχι με τον κωδικό της συσκευασίας συλλογή. Τα Β δείγματα αποθηκεύονται σφραγισμένα και ακέραια, σύμφωνα με τις οδηγίες του Κώδικα.^[11,17]



Εικόνα 1.3. Παρτίδα A δειγμάτων προς προσανατολιστική διαδικασία ανάλυσης.

Τα Α δείγματα ανοίγονται και εκτελούνται προαναλυτικές διαδικασίες, όπως η καταγραφή συνολικού όγκου, η μέτρηση pH με πεχαμετρικό χάρτη και η μέτρηση του ειδικού βάρους με διαθλασίμετρο (Εικόνα 1.4). Στη συνέχεια γίνεται μετάγγιση του απαραίτητου όγκου για την πραγματοποίηση της παρασκευαστικής πορείας της προσανατολιστικής διαδικασίας (screening procedure) ανάλυσης. Η κατάλληλη επιβεβαιωτική διαδικασία (confirmation procedure) ανάλυσης πραγματοποιείται με νέα μετάγγιση δείγματος Α, σε περίπτωση που αυτό θεωρηθεί ύποπτο για την ύπαρξη απαγορευμένης ουσίας μετά την προσανατολιστική ανάλυση.^[11,17]



Εικόνα 1.4. Ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο για τη μέτρηση του ειδικού βάρους.

Τέλος, πραγματοποιείται έκδοση αποτελεσμάτων και συγγραφή αναλυτικής έκθεσης (report) στην περίπτωση θετικού δείγματος, στην οποία αναφέρεται η ονομασία της απαγορευμένης ουσίας που ανιχνεύτηκε, ο κωδικός του θετικού δείγματος και η ακριβής

συγκέντρωση της ουσίας στο βιολογικό υγρό (στην περίπτωση ουσιών που απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός). Τα αποτελέσματα της εξέτασης αποστέλλονται στην ενδιαφερόμενη ομοσπονδία, όπου ο κωδικός αριθμός του δείγματος αντιστοιχείται με τα προσωπικά δεδομένα που καταγράφηκαν κατά τη δειγματοληψία για τον έλεγχο ντόπινγκ. Η ανάλυση του Β δείγματος, γίνεται εφόσον το Α δείγμα βγει θετικό, αν αυτό ζητηθεί από τον αθλητή ή την ομοσπονδία του. Περιλαμβάνει την αποσφράγιση και την εφαρμογή της επιβεβαιωτικής διαδικασίας που εκτελέστηκε και στο Α δείγμα, παρουσία ή απουσία του αθλητή ή εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου του.^[1,11,17]

1.6 ΜΟΡΦΕΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Το ντόπινγκ ειδικά στη σημερινή εποχή δεν περιορίζεται στη χρήση των απαγορευμένων ουσιών που υπάρχουν σε διάφορα φαρμακευτικά και μη σκευάσματα. Το ντόπινγκ αίματος, για την αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα, έχει γίνει γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια, ενώ το γονιδιακό ντόπινγκ, μέσω γονιδιακής θεραπείας για τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, τα οποία μπορούν να βελτιώσουν την αθλητική απόδοση, φαίνεται να είναι η μορφή ντόπινγκ που είναι υπό άνοση σήμερα. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί κατά διαστήματα και άλλες μορφές ντόπινγκ, όπως η χρήση βλαστοκυττάρων, η αθέμιτη εκμετάλλευση των επιδράσεων των ορμονών που παράγονται στα πρώτα στάδια μιας εγκυμοσύνης, η οποία οδηγείται σκοπίμως σε άμβλωση, καθώς και το τεχνολογικό ντόπινγκ με χρήση εξελιγμένου αθλητικού ρουχισμού ή εξοπλισμού που μπορεί να δώσει αγωνιστικό πλεονέκτημα.^[20-22] Η παρούσα διδακτορική διατριβή θα επικεντρωθεί στο ντόπινγκ αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΑΙΜΑΤΟΣ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΑΙΜΑΤΟΣ

Η αερόβια ικανότητα ενός αθλητή εξαρτάται από την καρδιακή παροχή, την παροχή οξυγόνου και το ποσό της αιμοσφαιρίνης στο αίμα. Οι δύο πρώτες δύσκολα χειραγωγούνται και κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι σε μέγιστα επίπεδα. Έτσι, ο μόνος τρόπος για να ενισχυθεί η αερόβια ικανότητα είναι η αύξηση του ποσού της αιμοσφαιρίνης στο αίμα. Επειδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσω της αιμοσφαιρίνης μεταφέρουν το οξυγόνο από τους πνεύμονες στους μύες, η υψηλότερη συγκέντρωσή τους στο αίμα βελτιώνει την αερόβια ικανότητα ενός αθλητή.^[23]

Σύμφωνα με τον WADA, ως ντόπινγκ αίματος ορίζεται η κατάχρηση ορισμένων ουσιών ή/και μεθόδων για την αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα, η οποία επιτρέπει στο σώμα να μεταφέρει περισσότερο οξυγόνο στους μύες, προκειμένου να ενισχυθεί η αθλητική αντοχή και απόδοση.^[24]

Συμπληρωματικά, με βάση τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA, απαγορεύεται ο χειρισμός του αίματος και των συστατικών του με οποιονδήποτε από τους παρακάτω τρόπους:

1. Χορήγηση ή επανεισαγωγή οποιασδήποτε ποσότητας αυτόλογου, ομόλογου (αλλογενούς) ή ετερόλογου αίματος ή προϊόντων ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιουδήποτε είδους προέλευσης στο κυκλοφορικό σύστημα.
2. Τεχνητή ενίσχυση της πρόσληψης, μεταφοράς και παροχής οξυγόνου με χρήση οποιωνδήποτε φαρμακευτικών ουσιών ή προϊόντων, εξαιρουμένου του συμπληρωματικού οξυγόνου κατά την εισπνοή.
3. Οποιασδήποτε μορφής ενδοαγγειακός χειρισμός του αίματος ή συστατικών του αίματος με φυσικά ή χημικά μέσα.^[9]

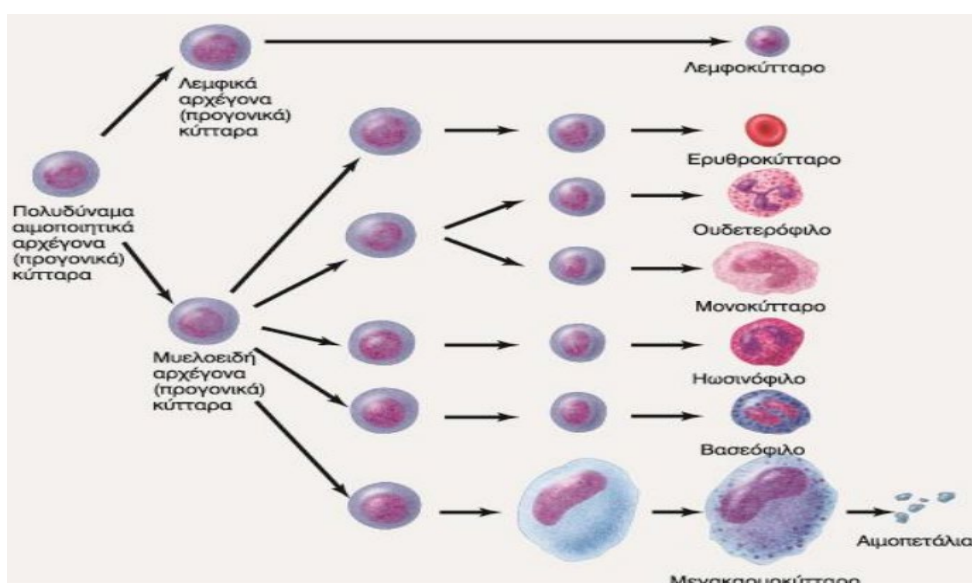
2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.2.1 ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Το αίμα είναι ο υγρός ιστός που κυκλοφορεί στο καρδιαγγειακό σύστημα του ανθρώπου εκτελώντας πλήθος λειτουργιών. Αποτελείται από κύτταρα τα οποία αιωρούνται μέσα σε ένα υγρό που ονομάζεται πλάσμα. Τα κύτταρα του αίματος συναποτελούνται από ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια. Περισσότερο από το 99 % των κυττάρων του αίματος είναι ερυθροκύτταρα, τα οποία μεταφέρουν το οξυγόνο στους ιστούς και το διοξείδιο του άνθρακα στους πνεύμονες. Τα λευκοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού, ενώ τα αιμοπετάλια, τα οποία δεν είναι πλήρη κύτταρα αλλά θραύσματα κυττάρων, συμβάλλουν στην πήξη του αίματος. Το αίμα αποτελεί το 7 % του βάρους του ανθρώπινου σώματος και, κατά συνέπεια, ο μέσος ενήλικος έχει συνολικό όγκο αίματος γύρω στα 5 L, από τα οποία τα 2,7-3,0 L είναι πλάσμα και το υπόλοιπο της σύστασής του είναι τα έμμορφα κυτταρικά στοιχεία που αιωρούνται σε αυτό. Τα κύτταρα του αίματος έχουν μικρή διάρκεια ζωής και είναι αναγκαία η συνεχής τους αναπλήρωση, ωστόσο ως τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν. Η αντικατάστασή τους γίνεται μέσω ενός συνόλου διεργασιών που επιτελούνται κατά την συνεχή αναπαραγωγή των κυττάρων του αίματος, μια διεργασία γνωστή ως αιμοποίηση η οποία πραγματοποιείται από τα αιμοποιητικά κύτταρα που είναι εγκατεστημένα στα αιμοποιητικά όργανα. Η αιμοποίηση είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο, που εξασφαλίζει την κανονική αναπλήρωση των κυττάρων του αίματος και ρυθμίζεται μέσω ενός πολύπλοκου αλλά αποτελεσματικού δικτύου επικοινωνίας ανάμεσα στα αιμοποιητικά κύτταρα και τα κύτταρα του υποστρώματος, είτε με άμεση επαφή μέσω επιφανειακών υποδοχέων, είτε έμμεσα μέσω κυτταροκινών. Κατά την εμβρυική ζωή τα αιμοποιητικά κύτταρα απαντώνται αρχικά στο λεκιθικό σάκο, ο οποίος συνιστά την αρχική θέση της αιμοποίησης, και από εκεί μεταναστεύουν στο ήπαρ και έπειτα στο μυελό των οστών, το κατ' εξοχήν αιμοποιητικό όργανο για τον ενήλικα, που εδρεύει στο εσωτερικό των οστών.^[25,26]

Όλα τα κύτταρα τόσο των αιμοποιητικών ιστών και οργάνων, όσο και του περιφερικού αίματος προέρχονται από έναν πληθυσμό πολυδύναμων προγονικών/αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (pluripotent stem cells). Ο πληθυσμός αυτός είναι εξαιρετικά μικρός και αποτελεί περίπου το 0,01 % των κυττάρων του μυελού των οστών. Τα περισσότερα αρχέγονα κύτταρα παραμένουν μέσα στο μικροπεριβάλλον του μυελού, σε κατάσταση ηρεμίας για μεγάλο χρονικό διάστημα. Μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτά,

μέσω διάφορων ερεθισμάτων, εισέρχεται σε κυτταρικό κύκλο, με τελικό σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης της αιμοποίησης. Κατά κανόνα, τα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα παραμένουν στον μυελό σε φάση ηρεμίας G0 και κατορθώνουν να εξασφαλίσουν την ισορροπία της αιμοποίησης με τον πολλαπλασιασμό τους που γίνεται πολύ σπάνια, μία φορά κάθε είκοσι μία εβδομάδες. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ιδιότητα να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται εξασφαλίζοντας και τη δική τους αυτοανανέωση. Σε μια δεύτερη φάση, τα αρχέγονα κύτταρα δεσμεύονται προς εξέλιξη για να οδηγηθούν σε μία από τις τέσσερις αιμοποιητικές σειρές (ερυθρά, κοκκιώδη-μονοκυτταρική, μεγακαρυοκυτταρική και λεμφική). Το μυελοειδές αρχέγονο αιμοποιητικό προγονικό κύτταρο (myeloid stem cell) είναι το πρόδρομο κύτταρο των μυελικών σειρών (ερυθρά, κοκκιώδη-μονοκυτταρική και μεγακαρυοκυτταρική) που μπορεί να αυτοανανεώνεται και να διαφοροποιείται (Εικόνα 2.1). Η μονάδα σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-ερυθρών-μονοκυττάρων-μεγακαρυοκυττάρων (Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Monocyte-Megakaryocyte, CFU-GEMM) είναι το πρώτο πολυδύναμο προγονικό κύτταρο δεσμευμένο για τα κύτταρα των μυελικών σειρών που δεν έχει την ικανότητα της αυτοανανέωσης. Έπειτα, τα δεσμευμένα προγονικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται για να καταλήξουν στα μονοδύναμα κύτταρα των παραπάνω σειρών, που εξέρχονται στην κυκλοφορία για να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Κατά την διαφοροποίηση, ο γενικός κανόνας για κάθε σειρά είναι η προοδευτική σμίκρυνση του κυττάρου και η πύκνωση του πυρήνα με παράλληλη αύξηση της οξυφιλίας του πρωτοπλάσματος.^[25,26]

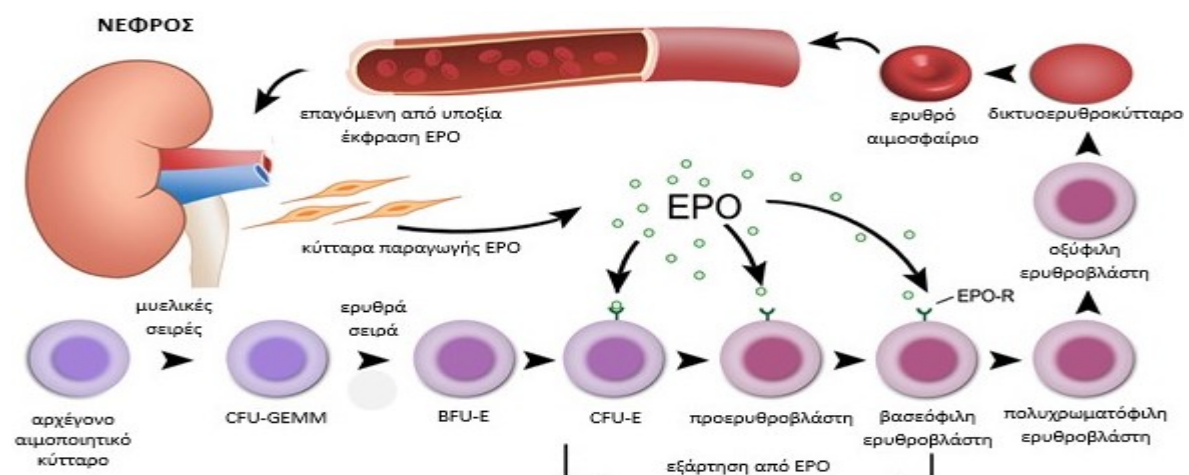


Εικόνα 2.1. Συνοπτική απεικόνιση παραγωγής κυττάρων αίματος στο μυελό των οστών.

2.2.2 ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η διαδικασία παραγωγής ώριμων ερυθροκυττάρων στον μυελό των οστών ονομάζεται ερυθροποίηση και επάγεται από την ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO), μια ορμόνη που παράγεται από τους νεφρούς και δρα στο μυελό των οστών διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροκυττάρων. Το σύνολο των κυττάρων που μετέχουν σε αυτή, από το πρώτο δεσμευμένο προς την ερυθροποίηση αρχέγονο κύτταρο μέχρι τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν την ερυθρά σειρά. Τα βασικά χαρακτηριστικά της ωρίμανσης της ερυθράς σειράς είναι η μείωση του μεγέθους του κυττάρου, η μείωση της σύνθεσης του RNA, η μείωση του ποσού του DNA, η αύξηση της ποσότητας της αιμοσφαιρίνης που περιέχουν τα κύτταρα και η έκφραση γλυκοφορίνης-A και υποδοχών τρανσφερίνης. Η ερυθροποίηση στο μυελό των οστών συμβαίνει σε άριστα οργανωμένες μονάδες, τις ερυθροβλαστικές νησίδες. Η ερυθροβλαστική νησίδα αποτελείται από ένα κεντρικό μακροφάγο, το οποίο περιβάλλεται από κύτταρα διαφόρων σταδίων ωρίμανσης που συγκρατούνται μέσω επιφανειακών υποδοχών και αλληλεπιδράσεων προσκόλλησης.^[25]

Το πρώτο μονοδύναμο κύτταρο δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά ονομάζεται μονάδα έκρηξης σχηματισμού ερυθράς σειράς (Burst Forming Unit-Erythroid, BFU-E), ενώ το αμέσως ωριμότερο μονοδύναμο κύτταρο δεσμευμένο για την ερυθρά σειρά ονομάζεται μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθράς σειράς (Colony Forming Unit-Erythroid, CFU-E), το οποίο έχει αυξημένους υποδοχείς ερυθροποιητίνης στην επιφάνειά του. Απουσία ερυθροποιητίνης τα CFU-Es οδηγούνται σε απόπτωση. Τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της ερυθράς σειράς είναι οι βλάστες (Εικόνα 2.2).^[25-27]



Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας ερυθροποίησης.

Η εξέλιξη της ερυθράς σειράς αρχίζει παρουσία ερυθροποιητίνης με τη διαφοροποίηση του CFU-E σε προερυθροβλάστη, ένα μεγάλο κύτταρο με διάμετρο 15-30 μm, βαθύκυανο έντονα βασεόφιλο πρωτόπλασμα, λόγω της παρουσίας άφθονου RNA και στρογγυλό μεγάλο πυρήνα που περιέχει σχετικά αδρό δίκτυο χρωματίνης. Η προερυθροβλάστη πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται προς βασεόφιλη ερυθροβλάστη, ένα μικρότερο στρογγυλό κύτταρο με λιγότερο βασεόφιλο πρωτόπλασμα και πυκνότερο πυρήνα, η χρωματίνη του οποίου λαμβάνει τροχοειδή διάταξη. Ακολουθεί η πολυχρωματόφιλη ερυθροβλάστη, η οποία είναι ακόμη μικρότερη με ερυθροκύανο πρωτόπλασμα αυξημένης οξυφιλίας, λόγω της παρουσίας αιμοσφαιρίνης, έχει πιο βαθύχρωματικό πυρήνα και στερείται υποδοχέων ερυθροποιητίνης. Από τις πολυχρωματόφιλες ερυθροβλάστες το 1/3 διαιρείται, το 1/3 καταστρέφεται και το 1/3 ωριμάζει. Στη σειρά της διαφοροποίησης έπεται η ακόμη μικρότερη σε μέγεθος οξύφιλη ερυθροβλάστη, όπου το κυτταρόπλασμα γίνεται προοδευτικά οξύφιλο και ροδίζει (πλήρωση με περισσότερη αιμοσφαιρίνη), ενώ ο πυρήνας πυκνώνει περισσότερο και γίνεται ένα βαθύχρωμο σφαιροειδές μόρφωμα. Οι ώριμες οξύφιλες ερυθροβλάστες δεν διαιρούνται αλλά ωριμάζουν, συνεχίζουν την αιμοσφαιρινοποίηση και σταδιακά εκπυρηνώνονται. Στο τέλος, ο πυρήνας εκβάλλεται και το άωρο ερυθροκύτταρο, που ονομάζεται δικτυοερυθροκύτταρο (επειδή τα υπολείμματα του πυρήνα δίνουν την εικόνα δικτύου), αφού παραμένει για 1-2 ημέρες στο μυελό, αποδίδεται στην κυκλοφορία. Το δικτυοερυθροκύτταρο είναι μεγαλύτερο από το ώριμο ερυθροκύτταρο και έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε αιμοσφαιρίνη, ενώ χαρακτηριστική είναι η παρουσία ριβοσωμικού RNA (rRNA). Αφού παραμένει στην κυκλοφορία για 1-2 ημέρες το δικτυοερυθροκύτταρο χάνει το rRNA και κυκλοφορεί πια ως ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο (Εικόνα 2.2).^[25-27]

Ο ερυθρός μυελός των οστών παράγει ερυθρά αιμοσφαίρια από τη γέννηση μέχρι περίπου το πέμπτο έτος της ηλικίας, ενώ μετά τα είκοσι έτη η ερυθροποίηση περιορίζεται στους σπονδύλους, το στέρνο, τις πλευρές και τα οστά της πυέλου. Έχει υπολογισθεί ότι από την ώρα που το CFU-E γίνεται προερυθροβλάστη μέχρι την στιγμή που το ώριμο δικτυοερυθροκύτταρο εγκαταλείπει τον μυελό για να εισέλθει στην κυκλοφορία μεσολαβούν 6 περίπου μιτώσεις, που αποδίδουν 8-16 ώριμα ερυθροκύτταρα μέσα σε 4-6 ημέρες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγονται περίπου $2,5 \times 10^9$ ερυθρά αιμοσφαίρια/kg βάρους την ημέρα και ο μέσος χρόνος επιβίωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι περίπου 120 ημέρες. Αυτό σημαίνει ότι κάθε μέρα καταστρέφεται περίπου το 1 % των ερυθρών αιμοσφαιρίων και αντικαθίστανται από ίσο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Φυσιολογικά, εκτός από τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση δεν κυκλοφορούν ερυθροβλάστες στο

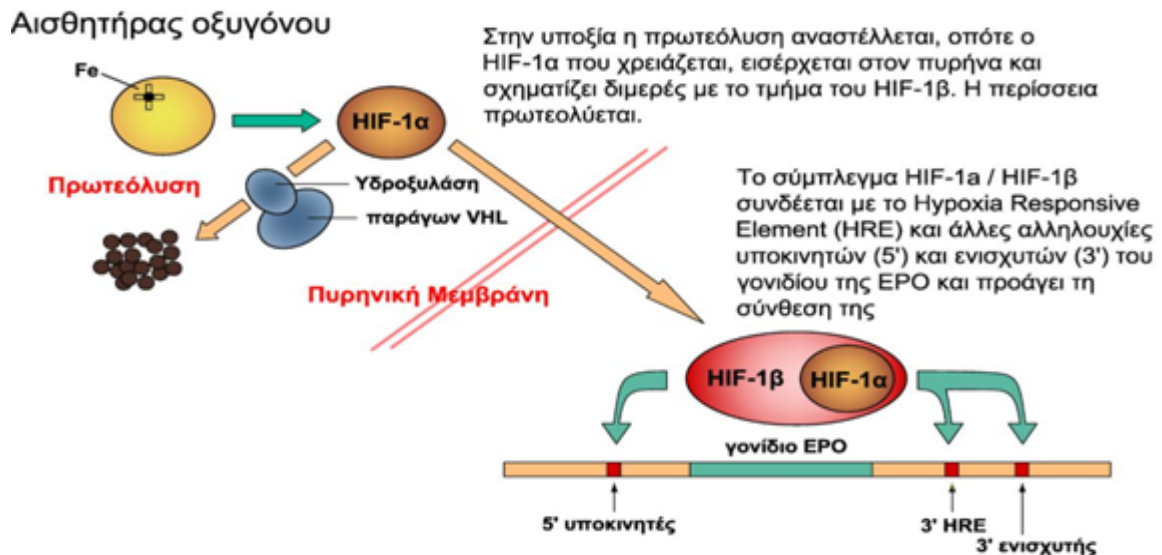
περιφερικό αίμα. Η παρουσία τους στο αίμα των ενηλίκων δείχνει αυξημένη ή παθολογική αιμοποίηση ή κατάληψη από ξένα κύτταρα (μεταστάσεις).^[27]

2.2.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων της ερυθράς σειράς στον μυελό ρυθμίζεται με ακρίβεια με ειδικά σήματα, εξωκυττάρια (ερυθροποιητίνη, αυξητικοί παράγοντες, θρομβοποιητίνη και άλλες κυτταροκίνες) και ενδοκυττάρια (κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες), ως απάντηση έναντι συγκεκριμένων αναγκών. Η βασική λειτουργία των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς μέσω της αιμοσφαιρίνης που αυτά περιέχουν. Ως εκ τούτου, ο ρυθμός και το μέγεθος της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων ρυθμίζεται με βάση τις ανάγκες του οργανισμού σε οξυγόνο. Όταν υπάρχει ιστική υποξία (π.χ. σε αθλητές που προπονούνται σε μεγάλο υψόμετρο), τότε η ερυθροποίηση γίνεται εντονότερη και ο αιματοκρίτης αυξάνεται χωρίς αυτό να είναι παθολογικό. Αντίθετα, όταν ο οργανισμός δεν χρειάζεται πολύ οξυγόνο (π.χ. στην νωθρότητα του υποθυρεοειδισμού), ο αιματοκρίτης είναι χαμηλότερος από το κανονικό. Σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. αιμοσφαιρινοπάθειες και αναιμίες) οι αυξομειώσεις αυτές εμφανίζονται σε εντονότερο βαθμό.^[27]

Ο κύριος αισθητήρας της τάσης του οξυγόνου βρίσκεται στα περισωληναριακά κύτταρα του νεφρού. Πρόκειται για μια μεταλλοπρωτεΐνη που περιέχει αίμη με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο της και κοβάλτιο, νικέλιο ή μαγγάνιο που δεσμεύουν οξυγόνο (οξυγονωμένη και μη οξυγονωμένη μορφή). Σε καταστάσεις υποξίας η μεταλλοπρωτεΐνη αυτή μένει χωρίς οξυγόνο και ρυθμίζει με πολύπλοκο μηχανισμό τον επαγόμενο από υποξία παράγοντα 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1). Ο HIF-1 είναι ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας, υπεύθυνος για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της ερυθροποιητίνης σε συνθήκες υποξίας. Ο HIF-1 αποτελείται από δύο υπομονάδες α και β που συντίθενται ανεξάρτητα. Ο HIF-1α συντίθεται σε περίσσεια. Έπειτα συνδέεται με τον HIF-1β, ο οποίος συντίθεται στην ποσότητα που χρειάζεται. Απουσία υποξίας η περίσσεια του HIF-1α συμπικουϊτινώνεται από το σύμπλεγμα von Hippel-Lindau/E3 λιγάση και αποικοδομείται γρήγορα με πρωτεόλυση στο πρωτεάσωμα των κυττάρων παραγωγής ερυθροποιητίνης με την συμβολή της προλυλ-υδροξυλάσης του HIF-1. Σε συνθήκες υποξίας αυτή η εξαρτώμενη από οξυγόνο προλυλ-υδροξυλάση του HIF-1 αναστέλλεται και η υποβάθμιση του HIF-1 παύει. Έπειτα, η προκαθορισμένη ποσότητα HIF-1α που έχει πια σταθεροποιηθεί εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται με τον HIF-1β σχηματίζοντας ένα

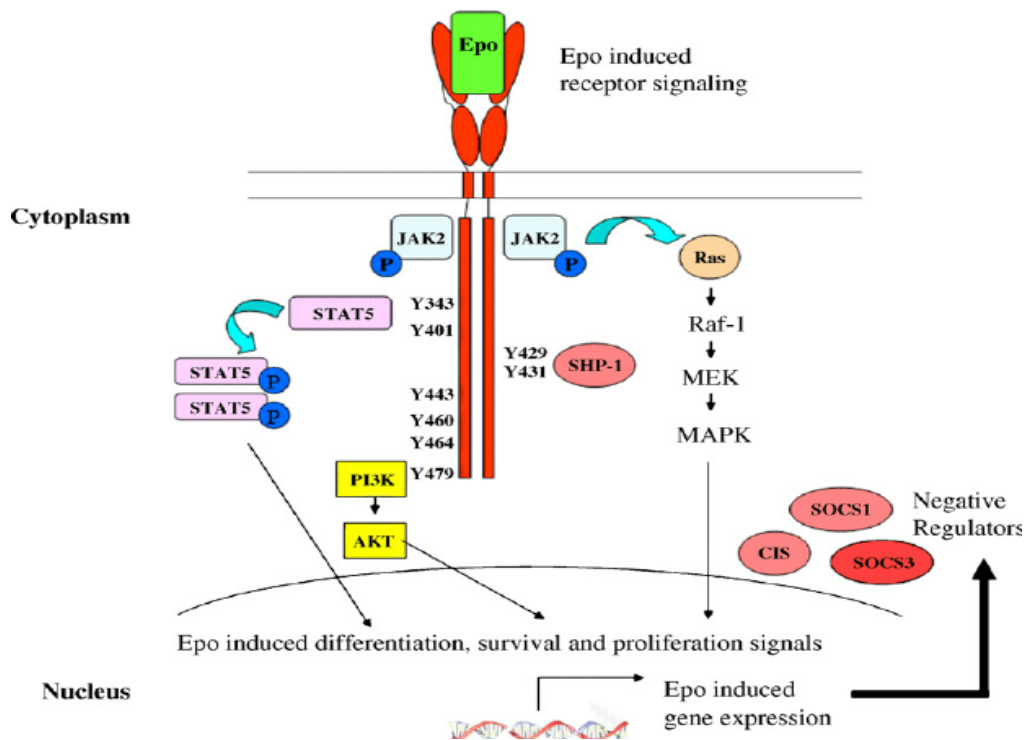
σταθερό διμερές, το οποίο προάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης μέσω της σύνδεσής του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στο γονίδιο της (Εικόνα 2.3). Επισημαίνεται, ότι ο HIF-1 επιδρά και εμμέσως στην οξυγόνωση των ιστών γιατί αποτελεί σημαντικό αγγειογενετικό παράγοντα.^[27-29]



Εικόνα 2.3. Ρύθμιση της σύνθεσης ερυθροποιητίνης μέσω αισθητήρων οξυγόνου.

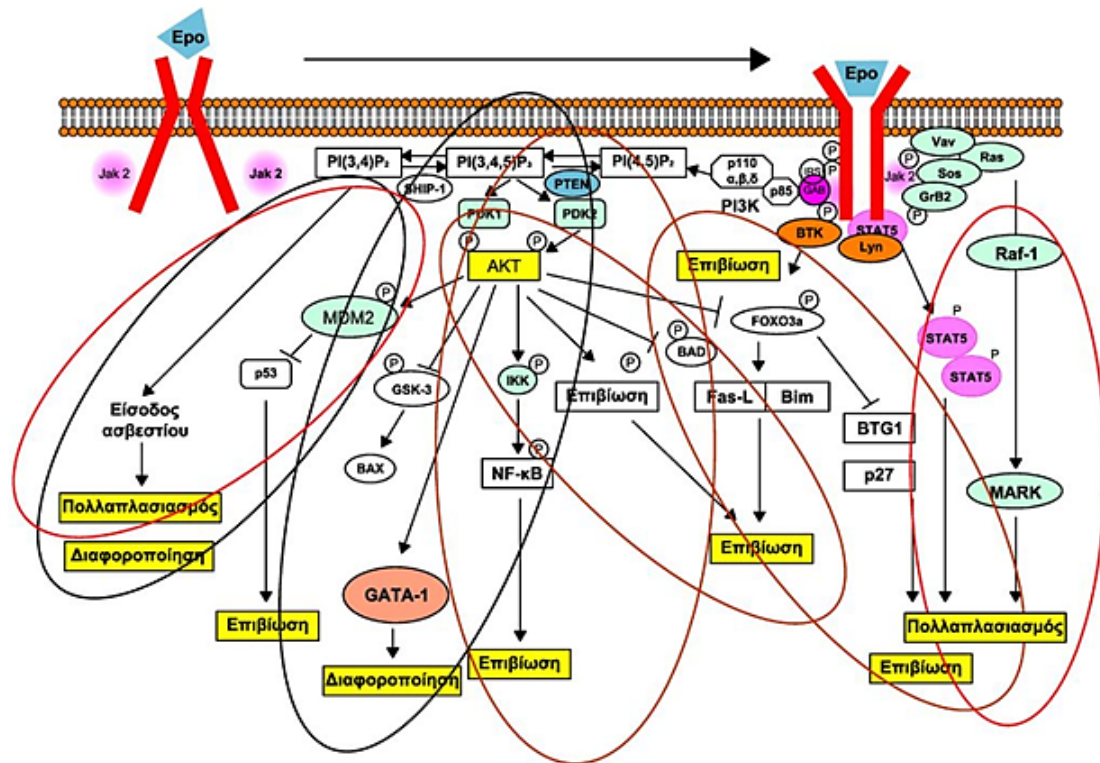
Η επίδραση της ερυθροποιητίνης στα κύτταρα της ερυθράς σειράς αρχίζει με τη σύνδεσή της με τον αντίστοιχο υποδοχέα που εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων, κυρίως των ώριμων προγονικών CFU-E και των προερυθροβλαστών. Ο υποδοχέας της ερυθροποιητίνης (erythropoietin receptor, EPO-R) ανήκει στην υπερικογένεια I υποδοχέων κυτταροκίνης. Είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 484 αμινοξέων με μοριακό βάρος 59 kDa που κινείται χαλαρά μέσα στη διπλοστοιβάδα και διμερίζεται για να λειτουργήσει. Η σύνδεση ενός μορίου ερυθροποιητίνης με το εξωμεμβρανικό άκρο του διμερούς υποδοχέα της, επιφέρει ενεργοποίηση του ενδοκυτταρικού άκρου του, μέσω φωσφορυλίωσης. Έπειτα, αρχίζει μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλίωσεων ενδοκυττάρων πρωτεϊνών με κυριότερες τις JAK2 (Janus family kinase 2) και STAT-5 (signal transducer and activator of transcription-5), και ακολουθεί η ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος όπως του PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B-Akt/mammalian target of rapamycin) και του MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase), που καταλήγουν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι εισέρχονται στον πυρήνα, συνδέονται με τους υποκινητές γονιδίων πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης, προάγοντας την έκφραση

τους. Παράλληλα, η σύνδεση της ερυθροποιητίνης με τον υποδοχέα της προάγει τη φωσφορυλίωση αρνητικών ρυθμιστών του EPO-R, όπως της τυροσινικής φωσφατάσης SHP1, που σε δεύτερο χρόνο θα οδηγήσουν στην αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα και το σύστημα θα επανέλθει σε ηρεμία (Εικόνα 2.4). Υποδοχείς της ερυθροποιητίνης εκτός από τα κύτταρα της ερυθράς σειράς βρίσκονται και σε κύτταρα του πλακούντα και σε νευρικά κύτταρα. Τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα ώριμα ερυθροκύτταρα δε φέρουν υποδοχείς ερυθροποιητίνης.^[27-30]



Εικόνα 2.4. Μονοπάτι σηματοδότησης έκφρασης της ερυθροποιητίνης.

Οπωσδήποτε, εκτός από την ερυθροποιητίνη, στη ρύθμιση της ερυθροποίησης μετέχουν πολλοί πρόσθετοι παράγοντες. Πρόκειται για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, οι οποίες εμφανίζονται σταδιακά, όπως άλλωστε και οι υποδοχείς τους, πάνω στα κύτταρα της ερυθράς σειράς. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν, είτε να ευνοούν την παραγωγή ερυθροκυττάρων, όπως η ιντερλευκίνη-6, είτε να έχουν αρνητική επίδραση στην διαδικασία της ερυθροποίησης, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-2 που καταστέλλει τον υποκινητή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζεται το σύνολο των παραγόντων αυτών, αλλά η ερμηνεία της λειτουργίας τους ξεφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας διατριβής.^[29]



Εικόνα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση των πολλαπλών και πολύπλοκων οδών με τις οποίες η ερυθροποιητίνη επιτελεί τη λειτουργία της παρεμβαίνοντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση.

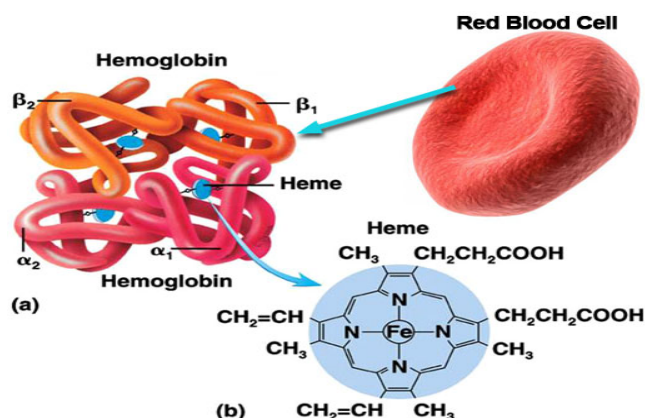
2.2.4 ΕΡΥΘΡΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ερυθροκύτταρα αποτελούν το τελικό παράγωγο των ερυθροβλαστών του μυελού και χαρακτηρίζονται από την έλλειψη πυρήνα και οργανιδίων. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει 30 pg αιμοσφαιρίνης με την οποία επιτελεί την μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς με απόλυτη ακρίβεια. Τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα έχουν σχήμα αμφίκυκλου δίσκου, καθώς η αιμοσφαιρίνη διατάσσεται περιμετρικά, με διάμετρο περί τα 7 μm, και είναι όλα ισομεγέθη και ισόχρωμα (Εικόνα 2.6). Το σχήμα τους ωστόσο παραμορφώνεται σημαντικά στη μικροκυκλοφορία, γιατί πρέπει να περάσουν μέσα από τριχοειδή, που έχουν διάμετρο πολύ μικρότερη από τη δική τους, περίπου 3 μm, όμως έπειτα μπορούν και επαναφέρουν το αρχικό τους σχήμα.^[25,27]

Η πλαστικότητα των ερυθροκυττάρων εξασφαλίζεται χάρη στην ειδική κατασκευή της μεμβράνης τους που αποτελείται από μια διπλή μεμβράνη λιποειδών στερεωμένη σε έναν πρωτεϊνικό σκελετό (υπομεμβρανικές πρωτεΐνες). Η μεμβράνη διαπερνάται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες κατά βάση είναι αντλίες ιόντων και νερού, και

χρησιμεύουν στη διατήρηση του καλίου μέσα στο ερυθροκύτταρο και την αποτροπή της εισόδου νερού, νατρίου και ασβεστίου. Τέλος, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες στερεωμένες στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, οι οποίες φέρουν στο ελεύθερο άκρο τους ενώσεις σακχάρου που αποτελούν τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα (σύστημα ομάδων αίματος ABO, Rhesus κ.α.). Το περιεχόμενο των ερυθροκυττάρων είναι ένα πυκνό διάλυμα (περίπου 30 %) αιμοσφαιρίνης σε νερό, με άλλες πρωτεΐνες, ένζυμα και ηλεκτρολύτες σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση. Ο λόγος για τον οποίο η αιμοσφαιρίνη κυκλοφορεί μέσα στα ιδιόμορφα αυτά κύτταρα και όχι ως διάλυμα είναι ότι ένα διάλυμα με την αντίστοιχη πυκνότητα θα είχε μεγάλο ιξώδες και δεν θα κυκλοφορούσε εύκολα μέσα στα τριχοειδή. Από την άλλη πλευρά, το μοριακό βάρος της αιμοσφαιρίνης είναι 64 kDa, και αν ήταν απλά διαλυμένη στο πλάσμα, εύκολα θα διέφευγε από τους νεφρούς. Κατά συνέπεια, τα εύπλαστα ερυθροκύτταρα εξυπηρετούν την μικροκυκλοφορία και αποτελούν ιδανική λύση για τη μεταφορά της αιμοσφαιρίνης σε υψηλή πυκνότητα.^[25-27]

Το μόριο της αιμοσφαιρίνης είναι τετραμερές και αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς, ελίσσονται και διαπλέκονται στον χώρο σχηματίζοντας ένα σχεδόν σφαιρικό μόριο με αυστηρά καθορισμένη δομή. Προσαρτημένη σε μια αναδίπλωση κάθε αλυσίδας είναι μία αίμη, ένας επίπεδος τετραπυρολικός δακτύλιος με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο του (Εικόνα 2.6). Το οξυγόνο δεσμεύεται ταχύτατα στην αιμοσφαιρίνη, κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στους πνεύμονες, και αποδεσμεύεται στους ιστούς, όπου η συγκέντρωση οξυγόνου είναι χαμηλή. Η αποδέσμευση του οξυγόνου προωθείται από μειωμένο pH, που επιτρέπει την αυξανόμενη παροχή οξυγόνου στους μεταβολικά ενεργούς ιστούς. Μεταβολές στη συγγένεια οξυγόνου-αιμοσφαιρίνης μπορεί να έχουν αρνητικά αποτελέσματα. Αν αυξηθεί η συγγένεια οξυγόνου-αιμοσφαιρίνης, τότε θα μειωθεί η απόδοση οξυγόνου στους ιστούς που το χρειάζονται, ενώ αν η συγγένεια μειωθεί, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα θα γίνει τοξική για τον εγκέφαλο και τους νεφρούς.^[25,27,28]



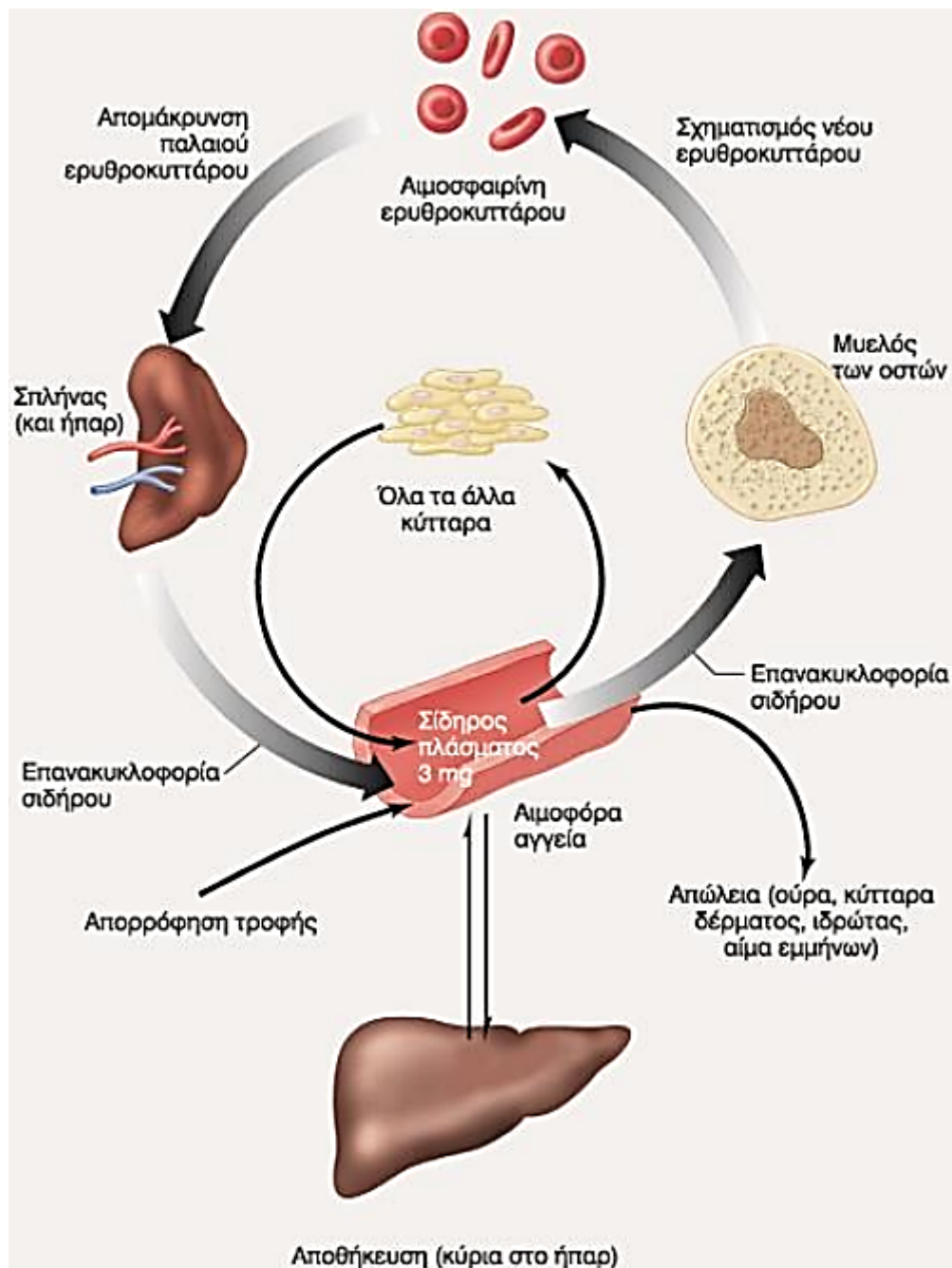
Εικόνα 2.6. Απεικόνιση ερυθρού αιμοσφαιρίου και του μορίου της αιμοσφαιρίνης που φέρει στο εσωτερικό του, σε κάθε αλυσίδα της οποίας είναι προσαρτημένη μια αίμη.

Οι συνεχείς παραμορφώσεις των ερυθροκυττάρων κατά την κίνησή τους στην κυκλοφορία, οι μηχανικές κακώσεις που επέρχονται κατά τη διέλευσή τους μέσω των καρδιακών βαλβίδων και οι αναπόφευκτες βλαπτικές επιδράσεις της οξειδωσης και άλλων τοξικών παραγόντων επιφέρουν σημαντική φθορά, η οποία δεν μπορεί να αντισταθμισθεί με τους προστατευτικούς μηχανισμούς που αυτά διαθέτουν, και απολήγει στο θάνατό τους μέσα στα μακροφάγα κύτταρα του σπληνός.^[27]

2.2.5 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΣΙΔΗΡΟΥ

Ο σίδηρος είναι ένα ιχνοστοιχείο ζωτικής σημασίας λόγω της συμμετοχής του σε μεγάλο αριθμό βιολογικών αντιδράσεων, όπως μεταξύ άλλων η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και η ερυθροποίηση. Το οξυγόνο δεσμεύεται και αποδεσμεύεται μεταξύ του σιδήρου της αίμης και της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που την περιβάλλει. Ο σίδηρος είναι το βασικό στοιχείο για τη διεργασία αυτή, και όταν αυτός απουσιάζει η αίμη δεν μπορεί να συντεθεί. Παρά το γεγονός ότι ο σίδηρος είναι άφθονο στοιχείο στη φύση, η ενσωμάτωσή του είναι δύσκολη, γιατί το μέταλλο βρίσκεται στην τρισθενή μορφή Fe^{3+} (μη αιμικός) που έχει ελάχιστη διαλυτότητα, ενώ ο οργανισμός του ανθρώπου τον χρειάζεται στη δισθενή του μορφή Fe^{2+} (αιμικός).^[25,26] Η ομοιόσταση του σιδήρου προϋποθέτει ισορροπία ανάμεσα στην απορρόφηση και αποβολή του από το εντερικό επιθήλιο, την είσοδο και κυκλοφορία του στο πλάσμα, τη μεταφορά του σε όργανα-στόχους και την αποθήκευση του. Ένας οργανισμός για να βρίσκεται σε ισορροπία όσον αφορά στο σίδηρο πρέπει να απορροφά τόσο σίδηρο όσο χάνει (Εικόνα 2.7). Αυτή η αυστηρή ρύθμιση του μεταβολισμού του

σιδήρου απαιτεί τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνών.^[31] Ο σίδηρος του οργανισμού διακρίνεται σε λειτουργικό, μεταφερόμενο και αποθηκευμένο.^[27]



Εικόνα 2.7. Σύνοψη του ισοζυγίου σιδήρου.

Ο λειτουργικός σίδηρος βρίσκεται στην αιμοσφαιρίνη, τη μυοσφαιρίνη και σε κάποια λειτουργικά ένζυμα που φέρουν σίδηρο στην αιμική και μη αιμική του μορφή. Η αιμοσφαιρίνη περιέχει περίπου το 65 % του σιδήρου του ανθρώπινου οργανισμού, με τη σύνθεση και τον καταβολισμό της να αποτελούν τη μεγαλύτερη ποσοτικά μεταβολική οδό

του σιδήρου. Ένα άτομο σιδήρου βρίσκεται σε ένα κλειστό κύκλωμα από τη στιγμή που θα εισαχθεί στον οργανισμό. Από την κυκλοφορία του αίματος μεταφέρεται στο μυελό των οστών για να ενσωματωθεί στην αιμοσφαιρίνη των νεοσχηματιζόμενων ερυθροβλαστών. Παραμένει μέσα στα ερυθροκύτταρα για περίπου 120 ημέρες και έπειτα καταλήγει στα μακροφάγα (μυελός, ήπαρ, σπλήνας) όπου απομακρύνεται από την αιμοσφαιρίνη και ελευθερώνεται πάλι στην κυκλοφορία του αίματος για να επαναχρησιμοποιηθεί. Από το υπόλοιπο ποσοστό του σιδήρου του οργανισμού περίπου το 10 % περιέχεται στην μιοσφαιρίνη. Πρόκειται για την ερυθρή χρωστική των μυών που αποθηκεύει οξυγόνο, το οποίο χρησιμοποιείται κατά τη μυϊκή συστολή. Η μιοσφαιρίνη αποτελείται από μια πεπτιδική αλυσίδα συνδεδεμένη με ένα μόριο αίμης, η οποία φέρει ένα άτομο σιδήρου. Την ίδια δομή (μια πεπτιδική αλυσίδα με ένα μόριο αίμης και ένα άτομο σιδήρου) έχει και το κυτόχρωμα C, που βρίσκεται κυρίως σε ιστούς με υψηλή κατανάλωση οξυγόνου, όπως ο καρδιακός μυς. Τα κυτοχρώματα είναι ένζυμα που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και σε διάφορες κυτταρικές μεμβράνες, αποτελώντας ένα σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, απαραίτητο για την οξειδωτική παραγωγή κυτταρικής ενέργειας υπό τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine Triphosphate, ATP). Κάθε κυτόχρωμα στην οξειδωμένη του μορφή φέρει Fe^{3+} ενώ στην ανηγμένη του μορφή Fe^{2+} . Η καταλάση και η υπεροξειδάση είναι επίσης ένζυμα που περιέχουν σίδηρο, υπό την αιμική του μορφή. Όλα τα ένζυμα του σιδήρου, αιμικά και μη αιμικά, περιέχουν περίπου το 3 % του συνολικού σιδήρου του οργανισμού.^[26]

Ο σίδηρος βρίσκεται πάντα συνδεδεμένος με πρωτεΐνες, καθώς ο ελεύθερος σίδηρος είναι ιδιαίτερα τοξικός συμμετέχοντας στην παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου. Έτσι, στην κυκλοφορία του αίματος ο μεταφερόμενος σίδηρος είναι πάντα συνδεδεμένος με την τρανσφερίνη, την πρωτεΐνη μεταφοράς του σιδήρου. Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη που μεταφέρει τον σίδηρο στους ιστούς και συντίθεται κατά κύριο λόγο στα ηπατοκύτταρα, αλλά και στα φαγοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα σε μικρότερες ποσότητες. Παρουσία ανιόντων η τρανσφερίνη δεσμεύει ισχυρά έως και δύο ιόντα Fe^{3+} . Με τη δέσμευση του τρισθενούς σιδήρου αυξάνεται η διαλυτότητά του, επιτυγχάνεται η μεταφορά του στους ιστούς και περιορίζεται η τοξικότητά του. Υπό κανονικές συνθήκες μόνο το ένα τρίτο των μορίων τρανσφερίνης του ορού μεταφέρουν σίδηρο (κορεσμός 30 %). Το υπόλοιπο παραμένει ελεύθερο και μπορεί να δεσμεύσει το σίδηρο που εισέρχεται με οποιονδήποτε τρόπο στην κυκλοφορία. Η τρανσφερίνη που δεν είναι συνδεδεμένη με σίδηρο ονομάζεται αποτρανσφερίνη. Ο υποδοχέας της τρανσφερίνης είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που καθιστά δυνατή την είσοδο του συμπλόκου της τρανσφερίνης με ένα ή δύο ιόντα

σιδήρου στα κύτταρα. Μετά τη δέσμευση ακολουθεί ενδοκύττωση του συμπλόκου και παρουσία μιας ATP-αντλίας πρωτονίων, το pH των ενδοσωμάτων μειώνεται και ο σίδηρος αποδεσμεύεται από την τρανσφερίνη. Το ενδόσωμα ενσωματώνεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και η τρανσφερίνη και ο υποδοχέας της μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξανά. Από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (ΔΕΣ), ο σίδηρος που αποδεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη επανέρχεται με την τρανσφερίνη στην κυκλοφορία του αίματος. Ο σίδηρος του πλάσματος είναι περίπου 3 mg στους ενήλικες. Από τον καταβολισμό της αιμοσφαιρίνης τα μακροφάγα συνήθως επαναφέρουν τα 2/3 του σιδήρου στην τρανσφερίνη που κυκλοφορεί στο πλάσμα και στο εξωκυττάριο υγρό, ενώ το υπόλοιπο 1/3 αποθηκεύεται στους ιστούς.^[26]

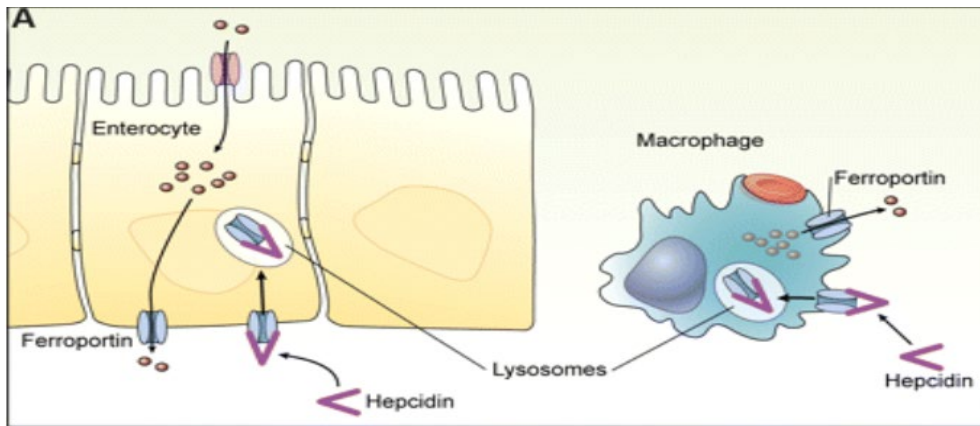
Ο αποθηκευμένος σίδηρος βρίσκεται στους ιστούς υπό τη μορφή φερριτίνης και αιμοσιδηρίνης. Η φερριτίνη είναι η κύρια αποθηκευτική πρωτεΐνη του σιδήρου, παράγεται από τα κύτταρα του ΔΕΣ στο ήπαρ, τον σπλήνα και το μυελό των οστών και αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό κέλυφος (αποφερριτίνη) 24 υποομάδων και έναν πυρήνα, που περιέχει άτομα σιδήρου υπό τη μορφή κρυστάλλου οξυ-υδροξειδίου του σιδήρου. Ένα μόριο φερριτίνης μπορεί να συνδέσει μέχρι και 80.000 μόρια σιδήρου. Η σύνθεση της τρανσφερίνης εξαρτάται από τα επίπεδα της φερριτίνης του ήπατος, καθώς μείωση της φερριτίνης στο ήπαρ συνοδεύεται από αύξηση της τρανσφερίνης. Από την άλλη, η συγκέντρωση της φερριτίνης στο πλάσμα έχει άμεση σχέση με τις αποθήκες σιδήρου στον οργανισμό. Είναι μειωμένη σε περιπτώσεις έλλειψης σιδήρου και αυξημένη σε περιπτώσεις υπερφόρτωσης σιδήρου. Σε περίσσεια σιδήρου η φερριτίνη μετατρέπεται στα λυσοσώματα σε αιμοσιδηρίνη, μια αποδομημένη μορφή φερριτίνης στην οποία ο πολυμερισμός και η ενδολυσοσωματική συγχώνευση του πρωτεϊνικού κελύφους έχουν επιτρέψει στους κρυστάλλους του σιδήρου να συναθροιστούν σχηματίζοντας μια ενδοκυττάρια μάζα. Η αιμοσιδηρίνη βρίσκεται κυρίως στα μακροφάγα του μυελού, του ήπατος και του σπλήνα. Ο σίδηρος της φερριτίνης και της αιμοσιδηρίνης αποτελεί το 22% του συνολικού σιδήρου του οργανισμού.^[26]

Το σώμα ενός ενήλικα περιέχει 45-55 mg σιδήρου/kg βάρους. Από αυτή την ποσότητα χάνει περίπου 1 mg σιδήρου την ημέρα με τη μορφή των ενζύμων της κυτταρικής αναπνοής που εμπεριέχονται στα κύτταρα του δέρματος και των βλεννογόνων τα οποία αποπύπτουν καθημερινά.^[26] Ο σίδηρος αυτός αναπληρώνεται, σε ίση με την αποβαλλόμενη ποσότητα, από το σίδηρο της τροφής, που απορροφάται στο έντερο με αυστηρά ελεγχόμενο μηχανισμό, ώστε να αποφευχθεί κάθε είδους υπέρβαση. Κατά μέσο όρο το ημερήσιο διαιτολόγιο ενός ενήλικα περιέχει 10-20 mg σιδήρου. Οι δύο μορφές του σιδήρου,

τρισθενής-μη αιμικός και δισθενής-αιμικός, βρίσκονται στις τροφές σε αναλογία 90:10 αντίστοιχα. Κατά γενικό κανόνα ο σίδηρος διέρχεται τις μεμβράνες ως δισθενής και αποτίθεται στο κύτταρα ως τρισθενής.^[27,32]

Στο όξινο περιβάλλον του στομάχου η αναγωγή του σιδήρου των τροφών γίνεται με τη βοήθεια του υδροχλωρικού οξέος του στομάχου, του ασκορβικού οξέος και άλλων αναγωγικών ουσιών της τροφής. Στο δωδεκαδάκτυλο ο δισθενής σίδηρος οξειδώνεται ξανά σε τρισθενή. Κατά τη διεργασία της πέψης, ο σίδηρος που φθάνει με την τροφή στις εντερικές λάχνες του ανώτερου τμήματος του εντέρου (νήσιδα) ανάγεται ξανά σε δισθενή από την αναγωγή του σιδήρου Dcytb (Duodenal cyt b). Ο δισθενής σίδηρος εισέρχεται στα εντερικά επιθήλια μέσω του διαμεμβρανικού υποδοχέα-μεταφορέα δισθενών μετάλλων DMT1 (divalent metal transporter 1). Ενδοκυτταρικά, μέρος του σιδήρου δεσμεύεται από την αποφερριτίνη στην τρισθενή του μορφή λόγω της παρουσίας της ενδοκυττάριας οξειδάσης του σιδήρου ή της σερουλοπλασμίνης που οξειδώνει τον σίδηρο.^[31,32]

Όταν ο οργανισμός χρειάζεται σίδηρο, τότε ο αποθηκευμένος σίδηρος γίνεται και πάλι δισθενής και περνά μέσω της βασικοκυτταρικής μεμβράνης του εντέρου στην πυλαία κυκλοφορία με τη βοήθεια της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης-σιδηρομεταφορέα που ονομάζεται φερροπορτίνη, για να συνδεθεί με την τρανσφερίνη.^[32] Η φερροπορτίνη ελέγχει την ποσότητα του σιδήρου που θα περάσει στην κυκλοφορία με έλεγχο της δικής της ποσότητας στην κυτταρική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, η φερροπορτίνη συντίθεται σε περίσσεια. Έπειτα, συνδέει και μεταφέρει προς το πλάσμα την ποσότητα σιδήρου που χρειάζεται, ενώ η περίσσειά της συνδέεται με μια πρωτεΐνη του πλάσματος, την εψιδίνη (ή ηπατιδίνη), και επαναφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου πρωτεολύεται (Εικόνα 2.8). Έτσι, ο σίδηρος που δεν πέρασε στην κυκλοφορία παραμένει στο εντερικό επιθήλιο και αποπίπτει με αυτό, ενώ, ο σίδηρος που πέρασε μέσα στο πλάσμα, γίνεται και πάλι τρισθενής με τη δράση της πλασματικής σερουλοπλασμίνης και συνδέεται με την τρανσφερίνη του πλάσματος για να μεταφερθεί στα κατάλληλα όργανα για χρήση ή αποθήκευση. Με τον τρόπο αυτό η τελική ποσότητα σιδήρου που εισέρχεται στον οργανισμό, τελικά ρυθμίζεται από την εψιδίνη.^[27,31] Η εψιδίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που συντίθεται στο ήπαρ όταν υπάρχει περίσσεια σιδήρου. Έχει αντιβακτηριακή δραστηριότητα, αλλά και τεράστια σημασία για το μεταβολισμό του σιδήρου. Η αύξηση του σιδήρου οδηγεί σε αύξηση της εψιδίνης, που συνοδεύεται από ελάττωση της απορρόφησης σιδήρου από το έντερο και αντίστροφα.^[26]



Εικόνα 2.8. Ρύθμιση επιπέδων φερροπορτίνης από την εψιδίνη.

Ο σίδηρος που απορροφάται από το έντερο αποτελεί μικρό μόνο μέρος του σιδήρου που διακινείται καθημερινά στον άνθρωπο. Η μεγάλη διακίνηση αφορά το σίδηρο που διακινείται από τα μακροφάγα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος προς τον ερυθροποιητικό ιστό. Πρόκειται για το σίδηρο της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων που αποθνήσκουν καθημερινά στο σπλήνα και διαλύονται στα συστατικά τους μέσα στα μακροφάγα κύτταρά του. Ο σίδηρος αυτός αποθηκεύεται πρόσκαιρα ως κοκκία φερριτίνης και έπειτα, αναλόγως των αναγκών της ερυθροποίησης, μεταφέρεται με την τρανσφερίνη στις ερυθροβλάστες του μυελού. Η έξοδος του σιδήρου από τα μακροφάγα γίνεται και εδώ με την φερροπορτίνη, ενώ η ρύθμιση της ποσότητας που αποδίδεται κάθε φορά ελέγχεται με την εψιδίνη. Όταν ο μυελός έχει ανάγκη σιδήρου, τότε η εψιδίνη παραμένει σε χαμηλά επίπεδα και η φερροπορτίνη εξάγει προς την τρανσφερίνη την ποσότητα σιδήρου που χρειάζεται. Αντίθετα, όταν ο ερυθροποιητικός μυελός δε χρειάζεται σίδηρο, τότε η εψιδίνη αυξάνεται και οδηγεί σε πρωτεόλυση όλη την περίσσεια της φερροπορτίνης, περιορίζοντας τη δράση της. Η διακίνηση σιδήρου από τα μακροφάγα προς τον ερυθροποιητικό μυελό υπολογίζεται σε 30 mg την ημέρα.^[27,31,32]

Η εψιδίνη αντιλαμβάνεται την επάρκεια ή την έλλειψη σιδήρου στον οργανισμό με μηνύματα που προέρχονται από τον ίδιο τον ερυθροποιητικό ιστό με την μορφή της ερυθροφερρόνης. Το τελευταίο αυτό μόριο περιγράφηκε πρόσφατα και θεωρείται σημαντικό γιατί εκκρίνεται από τους ερυθροβλάστες του μυελού σε απόκριση στη συγκέντρωση σιδήρου που αυτοί χρειάζονται και ρυθμίζει την ποσότητα του σιδήρου που διακινείται ελέγχοντας τη σύνθεση της εψιδίνης στο ήπαρ.^[32]

Είναι ενδιαφέρον, ότι η ποσότητα του σιδήρου που θα δεσμευθεί από τον υποδοχέα της τρανσφερίνης για να αξιοποιηθεί περαιτέρω, και η ποσότητα που θα αποθηκευθεί ως φερριτίνη ρυθμίζονται με ένα εξαιρετικά ευαίσθητο μηχανισμό. Στο ρυθμιστικό μηχανισμό

αυτό κύριο ρόλο παίζουν οι σιδηρορυθμιστικές πρωτεΐνες IRPs (Iron Regulatory Proteins). Πρόκειται για κυτταροπλασματικές συνδεδεμένες με RNA πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν το ειδικό σιδηροαπαντητικό στοιχείο IRE (Iron Response Element) σε δομή φουρκέτας. Όταν τα ενδοκυττάρια επίπεδα σιδήρου είναι χαμηλά οι IRPs συνδέονται με το IRE του 5' άκρου του αγγελιαφόρου RNA (messenger RNA, mRNA) της φερριτίνης αναστέλλοντας άμεσα την σύνθεση της, ενώ ταυτόχρονα η ίδια σύνδεση IRP-IRE στο 3' άκρο του mRNA του υποδοχέα της τρανσφερίνης αναστέλλει την αποδόμησή του κάνοντας το πιο σταθερό, με αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση υποδοχέων τρανσφερίνης και την αύξηση της πρόσληψης σιδήρου. Στην περίπτωση που τα ενδοκυττάρια επίπεδα σιδήρου είναι υψηλά, οι IRPs δεν συνδέονται ούτε με το IRE του 5' άκρου του mRNA της φερριτίνης, ούτε με το IRE του 3' άκρου του mRNA του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή φερριτίνης για την αποθήκευση του σιδήρου και τη μειωμένη παραγωγή του υποδοχέα της τρανσφερίνης για τη μείωση της πρόσληψης σιδήρου από τα κύτταρα.^[26]

2.3 ΤΥΠΟΙ ΝΤΟΠΙΝΓΚ ΑΙΜΑΤΟΣ

Παρά το γεγονός ότι απαγορεύεται από τον WADA, το ντόπινγκ αίματος χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Σύμφωνα με τον WADA η χρήση ερυθροποιητίνης, η χρήση συνθετικών φορέων οξυγόνου και οι μεταγγίσεις αίματος είναι οι τρεις βασικοί τύποι ντόπινγκ αίματος.^[24]

Η ενδογενής ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (human erythropoietin, HuEPO) είναι μεν η κύρια ορμόνη που επιδρά στη διαδικασία της ερυθροποίησης, αλλά στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA περιλαμβάνονται όλοι οι γνωστοί παράγοντες διέγερσης ερυθροποίησης (erythropoiesis stimulating agents, ESAs), που ενισχύουν με οποιονδήποτε τρόπο την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς και άγνωστες ουσίες που έχουν αποδεδειγμένα παρόμοια χημική δομή ή βιολογική λειτουργία.^[9] Πιο συγκεκριμένα στον Κατάλογο ανήκουν:

- Αγωνιστές του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης: ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (human recombinant erythropoietin, rHuEPO), ανάλογα ερυθροποιητίνης, προϊόντα ένωσης με ερυθροποιητίνης, μιμητές ερυθροποιητίνης και ενώσεις αυτών. Εκτενέστερη αναφορά σε αυτή την υποκατηγορία θα γίνει στο Κεφάλαιο 4.^[9,33]

- Παράγοντες ενεργοποίησης των επαγόμενων από υποξία παραγόντων (HIFs): στην κατηγορία αυτή ανήκουν φαρμακευτικά σκευάσματα, όπως το Daprodustat (GSK1278863), το Molidustat (BAY85-3934), το Roxadustat (FG-4592) και το Vadadustat (AKB-6548), τα οποία είναι σε κλινικές δοκιμές φάσης III για τη θεραπεία της αναιμίας και της χρόνιας νεφρικής νόσου (chronic kidney disease, CKD). Στην ουσία πρόκειται για αναστολείς της προλυλ-υδροξυλάσης του HIF-1, οπότε συμβάλουν στη σταθεροποίηση και ενεργοποίησή του, επάγοντας την έκφραση της ερυθροποιητίνης.^[9,29,30] Επίσης, απαγορεύεται η χρήση κοβαλτίου, καθώς ιόντα κοβαλτίου Co^{2+} συνδέονται με τον HIF-1α, εμποδίζοντας τη σύνδεσή του με το σύμπλεγμα von Hippel-Lindau/E3 λιγάση και τη μετέπειτα αποικοδόμηση του HIF-1α. Ο ρόλος του κοβαλτίου διαχωρίζεται εντελώς από το ρόλο της κοβαλαμίνης (βιταμίνη B12) που δεν έχει αποδεδειγμένη επίδραση στη βελτίωση της αθλητικής απόδοσης. Πρόσφατα, απαγορεύτηκε και το αέριο ξένο ως παράγων ενεργοποίησης του HIF-1.^[9,30,34]
- Αναστολείς GATA: ο GATA είναι μεταγραφικός παράγοντας για την αποσύνθεση ή παύση παραγωγής της ερυθροποιητίνης, καθώς καταστέλλει τον υποκινητή του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Οι αναστολείς GATA, όπως ο K-11706, είναι μη πεπτιδικές οργανικές ενώσεις που εμποδίζουν την λειτουργία του GATA και επάγουν την παραγωγή ερυθροποιητίνης.^[9,33]
- Αναστολείς σηματοδότησης μέσω του παράγοντα αύξησης των όγκων-β (tumor growth factor-β, TGF-β): Πρόκειται για ανασυνδυασμένες ερυθροποιητικές πρωτεΐνες που μπορούν να επάγουν την παραγωγή ερυθροποιητίνης χωρίς να συνδεθούν στον EPO-R. Τα φαρμακευτικά σκευάσματα Luspatercept (ACE-536) και Sotatercept (ACE-011) είναι πρωτεΐνες σύντηξης που αποτελούνται από το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα της ακτιβίνης τύπου II (activin type II receptor, ActRII) και τη σταθερή περιοχή Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1 και βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της αναιμίας. Η μεταγωγή σήματος μέσω TGF-β συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών όπως η ερυθροποίηση. Οι αναστολείς TGF-β, που είναι γνωστοί και ως παγίδες ακτιβίνης, μπορούν και συνδέονται με τους συνδέτες των ActRII, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των TGF-β υποδοχέων, αναστέλλοντας την ενδοκυττάρια μεταγωγή

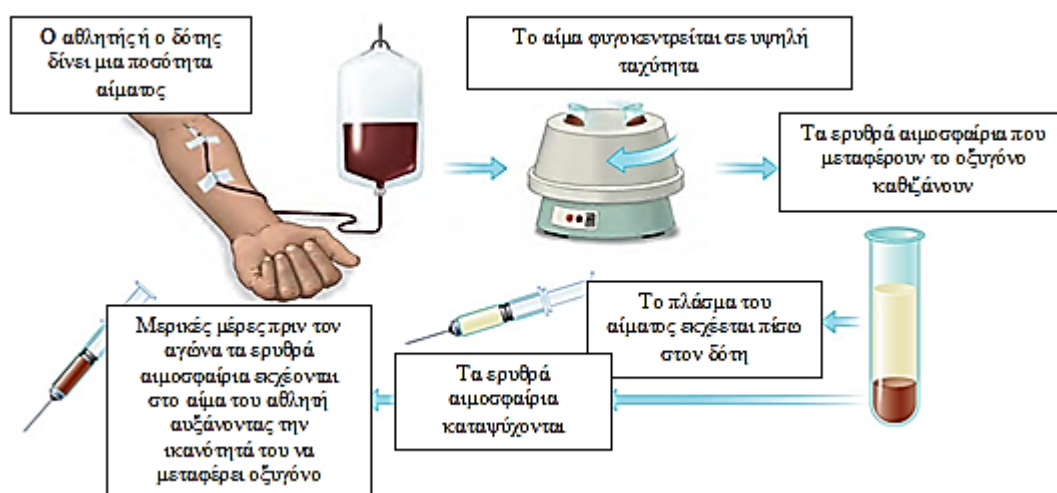
σήματος μέσω TGF-β και την αρνητική ρύθμιση της παραγωγή ερυθροποιητίνης, επάγοντας την έκφρασή της.^[9,30,33,35,36]

- Έμφυτοι αγωνιστές του υποδοχέα αποκατάστασης: Η ερυθροποιητίνη εκτός από ερυθροποιητικές ικανότητες έχει και νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε διάφορα νευροεκφυλιστικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, έχει αντιαποπτωτικές ιδιότητες, αναστέλλει τη φλεγμονή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και ενισχύει την νευρογένεση. Η ασιάλο-ερυθροποιητίνη (AsialoEPO) και η καρβαμυλιωμένη ερυθροποιητίνη (Carbamylated Erythropoietin, CEPO) είναι μη ερυθροποιητικά μόρια παράγωγα της ερυθροποιητίνης που έχουν σχεδιαστεί ώστε να διατηρούν τις νευροπροστατευτικές τους ιδιότητες.^[9,33,37]

Οι συνθετικοί φορείς οξυγόνου, όπως οι φορείς οξυγόνου με βάση την αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin-Based Oxygen Carriers, HBOCs) και οι υπερφθοριοάνθρακες (Perfluorocarbons, PFCs), είναι υποκατάστατα αίματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μηχανική μεταφορά οξυγόνου. Ένα υποκατάστατο αίματος, που ονομάζεται επίσης και τεχνητό αίμα, είναι μια ουσία που χρησιμοποιείται για να μιμείται και να εκπληρώνει ορισμένες λειτουργίες του βιολογικού αίματος. Στην ουσία πρόκειται για καθαρισμένες πρωτεΐνες ή χημικές ουσίες που έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν οξυγόνο και ουσιαστικά φαίνονται χρήσιμες για θεραπευτικούς λόγους έκτακτης ανάγκης, όταν δεν υπάρχει διαθέσιμο ανθρώπινο αίμα, ο κίνδυνος μόλυνσης του αίματος είναι υψηλός ή όταν δεν υπάρχει αρκετός χρόνος για σωστή αντιστοίχιση του δωρηθέντος αίματος με τον λήπτη.^[9,24,28]

Οι μεταγγίσεις αίματος είναι η τρίτη βασική κατηγορία ντόπινγκ αίματος. Η μετάγγιση μπορεί να είναι αυτόλογη ή ομόλογη. Στην αυτόλογη μετάγγιση το αίμα λαμβάνεται από το δότη και του μεταγγίζεται στο επιθυμητό χρονικό διάστημα, δηλαδή ο δότης και ο δέκτης είναι το ίδιο άτομο. Από την άλλη, στην ομόλογη μετάγγιση το αίμα λαμβάνεται από το δότη και μεταγγίζεται στο δέκτη με την ίδια ομάδα αίματος, στο επιθυμητό χρονικό διάστημα, δηλαδή ο δότης και ο δέκτης είναι διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους. Είναι αναμενόμενο ότι απαγορεύεται και η ετερόλογη μετάγγιση αίματος (ο δότης και ο δέκτης είναι διαφορετικά άτομα διαφορετικού είδους), και γενικώς η διαχείριση ή επανεισαγωγή οποιασδήποτε ποσότητας αίματος ή προϊόντων του ή ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιουδήποτε είδους προέλευσης στο κυκλοφορικό σύστημα του αθλητή. Κατά την τυπική διαδικασία της μετάγγισης ο δότης δίνει μια ποσότητα αίματος, το οποίο φυγοκεντρείται σε

υψηλή ταχύτητα. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθιζάνουν, διαχωρίζονται από το πλάσμα, που εκχέεται ξανά στο δότη ή απορρίπτεται, και αποθηκεύονται (ψύχονται ή καταψύχονται) μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Την επιθυμητή χρονική στιγμή, συνήθως σε μικρό χρονικό διάστημα πριν τον αγώνα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια εκχέονται στο δέκτη, αυξάνοντας άμεσα την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου (Εικόνα 2.9).^[9,23,24]



Εικόνα 2.9. Πρωτόκολλο διαδικασίας ντόπινγκ αίματος με μετάγγιση αίματος.

2.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Στην ιατρική, οι rHuEPOs και η μετάγγιση αίματος χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με καρκίνο για την αντιστάθμιση των επιδράσεων της χημειοθεραπείας και της ακτινοβολίας στην ερυθροποίηση, καθώς και για τη θεραπεία ασθενειών, όπως η αναιμία και η CKD. Επιπλέον, η rHuEPO συμβάλει στην επούλωση τραυμάτων και η μετάγγιση στην αντικατάσταση χαμένου από τραυματισμό ή χειρουργική επέμβαση αίματος. Παρά τη χρησιμότητά τους στην ιατρική, η χρήση τους από τους αθλητές για ντόπινγκ αίματος και η αλόγιστη αύξηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορεί να επιφέρουν αρκετά σοβαρές επιπτώσεις. Η ανθρώπινη φύση χαρακτηρίζεται από τη βούληση να κερδίσει, συχνά χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι κίνδυνοι για την υγεία.^[38,39]

Η υπερβολική αύξηση του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους του αίματος και του αιματοκρίτη. Αυτή η αύξηση του αιματοκρίτη μπορεί εύκολα να προκαλέσει αύξηση της αρτηριακής πίεσης και δημιουργία θρόμβων και τη μετέπειτα εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου, καρδιακής ανακοπής, εγκεφαλικού επεισοδίου ή πνευμονικής εμβολής. Επιπλέον, είναι πιθανό να εμφανιστούν υπερκαλιαιμία,

συσσώρευση σιδήρου, αθηροσκλήρωση, αλλεργίες, νεφρική δυσλειτουργία μέχρι και αυτοάνοσες ασθένειες ή μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές.^[28,38,39]

Η χρήση rHuEPO μπορεί να μειώσει την ενδογενή παραγωγή EPO μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Αυτή η αρνητική ανατροφοδότηση και η προκύπτουσα αναιμία μπορεί να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την αποβολή της rHuEPO από τον οργανισμό. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στον πιθανό σχηματισμό αντισωμάτων έναντι στην rHuEPO, που μπορούν να συνδεθούν και με την HuEPO.^[28]

Κατά τη διαδικασία της ομόλογης μετάγγισης αίματος, ακατάλληλα αποθηκευμένο ή μολυσμένο αίμα μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις και εξάπλωση μολυσματικών ασθενειών. Ακόμη και στην αυτόλογη μετάγγιση αίματος, όπου ουσιαστικά ο αθλητής χρησιμοποιεί το δικό του αίμα, μπορεί να βρεθεί σε σημαντικούς κινδύνους για την υγεία του, αν η διαδικασία δεν γίνει σωστά ή εάν το αίμα δεν χειρίζεται ή αποθηκεύεται με τον κατάλληλο τρόπο.^[38]

Μια άλλη σημαντική ανησυχία είναι η διαθεσιμότητα μη εγκεκριμένων ESAs στη μαύρη αγορά για σκοπούς ντόπινγκ αίματος, χωρίς να έχουν ολοκληρωθεί οι αντίστοιχες κλινικές μελέτες. Η χρήση αυτών των φαρμάκων σε υγιή άτομα μπορεί να δείξει απροσδόκητες άγνωστες παρενέργειες. Για παράδειγμα, οι σταθεροποιητές HIF μπορεί να έχουν ογκογόνο δράση, επειδή οι HIFs ενεργοποιούν εκατοντάδες γονίδια, εκτός του γονιδίου της ερυθροποιητίνης, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Ακόμη, μη εγκεκριμένοι ESAs μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες, καθώς μπορεί να μην είναι πλήρως γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους, όπως οι αναστολείς σηματοδότησης μέσω TGF-β. Τέλος, προϊόντα που πωλούνται στη μαύρη αγορά στερούνται επαρκούς ποιοτικού ελέγχου και ενδέχεται να περιέχουν προσμίξεις, όπως βακτηριακές ενδοτοξίνες.^[29]

2.5 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Παρά τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει στην υγεία και αντίθετα με την απαγόρευση του από τον WADA, το ντόπινγκ αίματος είναι εδώ και δεκαετίες μια τακτική μη θεμιτής ενίσχυσης της αθλητικής απόδοσης, που επιλέγεται συχνά από αθλητές και προπονητές. Οι διάφορες επιδράσεις του μεγάλου υψομέτρου στην ανθρώπινη φυσιολογία έχουν περιγραφεί από την αρχαιότητα. Ωστόσο, το 1590 αναφέρθηκε για πρώτη φορά ο όρος “ασθένεια του βουνού”, για να περιγράψει συμπτώματα δύσπνοιας, θωρακικού άλγους, βήχα και εμετού, λόγω της χαμηλής εισπνεόμενης μερικής πίεσης του οξυγόνου στις

περιοχές με μεγάλο υψόμετρο. Σχεδόν τριακόσια χρόνια αργότερα, ο Γάλλος ιατρός Denis Jourdanet, ο οποίος ταξίδεψε για σχεδόν δύο δεκαετίες στις ορεινές περιοχές του Μεξικού, υπέθεσε ότι η υποξία υψηλής ανύψωσης (σε αντίθεση με τη χαμηλή βαρομετρική πίεση) ήταν υπεύθυνη για το αυξημένο ιξώδες αίματος το οποίο συσχετίστηκε με τον αυξημένο αιματοκρίτη των ατόμων που ζούσαν σε υψόμετρο.^[28]

Το ντόπινγκ του αίματος έχει συσχετισθεί με αθλητές αγωνισμάτων αντοχής εδώ και τουλάχιστον μισό αιώνα. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες του 1968 στο Μεξικό, παρατηρήθηκε ότι οι αθλητές από περιοχές με μεγαλύτερο υψόμετρο κέρδισαν τους περισσότερους αγώνες αντοχής. Τον Αύγουστο του 1972, μια σειρά πειραμάτων, στα οποία υγιή άτομα υποβλήθηκαν σε φλεβοτομή και στη συνέχεια έγινε επανέγχυση του αίματός τους πριν από την ελεγχόμενη άσκηση, απέδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης βελτιστοποιεί τη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου και συνεπώς την αερόβια ικανότητα. Η αυτόλογη μετάγγιση αίματος ήταν η πρώτη μέθοδος ντόπινγκ αίματος που αναφέρθηκε. Συγκεκριμένα, το 1981 ο Φινλανδός αθλητής Mikko Juhani Ala-Lerppilampi ήταν ο πρώτος αθλητής που παραδέχτηκε ότι έλαβε μετάγγιση πριν ανταγωνιστεί στο αγώνισμα των 3.000 μέτρων με φυσικά εμπόδια στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μονάχου το 1972.^[28]

Το ντόπινγκ αίματος έφτασε στο επίκεντρο της προσοχής το 1984, όταν αποκαλύφθηκε ότι επτά μέλη της Αμερικάνικης ποδηλατικής ομάδας ανδρών, τέσσερις από τους οποίους είχαν κερδίσει μετάλλια, είχαν μεταγγιστεί πριν αγωνιστούν στους Ολυμπιακούς Αγώνες εκείνου του έτους στο Λος Άντζελες. Το 1985, απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της ερυθροποιητίνης, όποτε συντέθηκε και ο πρώτος ESA, αλλάζοντας τον κόσμο του ντόπινγκ αίματος. Επρόκειτο για την ερυθροποιητίνη-α, η οποία εγκρίθηκε το 1989 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία της αναιμίας που σχετίζεται με νεφρική νόσο. Το επόμενο έτος, το 1990, η χρήση της από τους αθλητές απαγορεύτηκε από τη ΔΟΕ, ενώ είχε ήδη απαγορευτεί η μετάγγιση αίματος από το 1986.^[28]

Παρά την απαγόρευση, χρειάστηκε μια δεκαετία για να αναπτυχθεί το 2000, λίγο πριν από τους Ολυμπιακούς Αγώνες του Σίδνεϋ, μια μέθοδος ανίχνευσης rHuEPO σε αθλητές, με διαχωρισμό της από την ενδογενή ερυθροποιητίνη. Εν τω μεταξύ, μετά από χρόνια έρευνας και συζήτησης από την ΔΟΕ, σχετικά με τη νομιμότητα της δειγματοληψίας αίματος, εγκρίθηκαν το 1994 οι έλεγχοι δειγμάτων αίματος.^[28,40]

Στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας το 2004, χρησιμοποιήθηκε μια νέα μέθοδος κυτταρομετρίας ροής, για την ανίχνευση ομόλογης μετάγγισης αίματος. Ο νικητής στην ποδηλασία ανδρών θεωρήθηκε ύποπτος για ομόλογη μετάγγιση κάτι το οποίο

επιβεβαιώθηκε είκοσι τέσσερις ημέρες μετά, όταν ο ίδιος αθλητής αγωνίστηκε στο Γύρο της Ισπανίας και βρέθηκε θετικός σε ομόλογη μετάγγιση αίματος. Στον ίδιο αγώνα βρέθηκε θετικός για ομόλογη μετάγγιση και ένας συναθλητής του, αποκαλύπτοντας το γνωστό σκάνδαλο με τον γιατρό Fuentes, ο οποίος επέβλεπε την απομάκρυνση, αποθήκευση και επανέγχυση αίματος από πολλούς αθλητές της ομάδας παράλληλα. Τελικά, μέσω της βιογραφίας του το 2012, ο Tyler Hamilton παραδέχτηκε την ενοχή του και επέστρεψε το χρυσό ολυμπιακό μετάλλιο που είχε κερδίσει στους Αγώνες της Αθήνας το 2004. Στους ίδιους Αγώνες χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά μια μέθοδος για την ανίχνευση των HBOCs.^[40,41]

Η εξέλιξη στον τομέα της φαρμακευτικής έφερε το 2001 την εμφάνιση των δεύτερης γενιάς συνθετικών ερυθροποιητινών, με τρεις αθλητές να ανιχνεύονται θετικοί το επόμενο έτος, ενώ η τρίτη γενιά συνθετικών ερυθροποιητινών εγκρίθηκαν για ιατρική χρήση ένα χρόνο πριν τους Ολυμπιακούς Αγώνες του 2008 στο Πεκίνο, όπου και εντοπίστηκαν τα πρώτα θετικά δείγματα. Ο WADA πρόσθεσε τους σταθεροποιητές HIF στον κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών το 2011, υποδεικνύοντας ότι είναι διαθέσιμοι στη μαύρη αγορά εδώ και αρκετό καιρό. Ο πρώτος αθλητής που βρέθηκε θετικός για σταθεροποιητή HIF αναφέρθηκε το 2016 για χρήση Roxadustat (FG-4592).^[40]

Αυτή που είναι αναμφισβήτητη η πιο περίφημη περίπτωση ντόπινγκ αίματος είναι αυτή του ποδηλάτη Lance Armstrong, ο οποίος έχασε και τους επτά τίτλους του Γύρου της Γαλλίας το 2012 μετά από εξαντλητική έρευνα, που έδειξε ότι είχε κάνει ντόπινγκ αίματος τουλάχιστον από το 1999. Οι μέθοδοι του ντόπινγκ ήταν εκτεταμένες και περιλάμβαναν όχι μόνο τη χρήση αναβολικών στεροειδών αλλά και τη χρήση rHuEPO και των παραγώγων της, σε συνδυασμό με την αυτόλογη μετάγγιση αίματος.^[28,40] Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο ο επανέλεγχος παλαιών κατεψυγμένων δειγμάτων, οδήγησε στη μαζική εμφάνιση θετικών δειγμάτων και την αποκάλυψη συστηματικού ντόπινγκ στη Ρωσία, μια υπόθεση που μένει ανοιχτή μέχρι και σήμερα.^[5]

2.6 ΑΜΕΣΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

2.6.1 HBOCs ΚΑΙ PFCs

Η ανίχνευση του ντόπινγκ αίματος μπορεί να γίνει με άμεσο τρόπο, δηλαδή με εντοπισμό της ίδιας της απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, τόσο σε δείγματα ούρων, όσο και σε δείγματα αίματος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι συνθετικοί φορείς οξυγόνου

μπορούν και ανιχνεύονται από το 2004. Η μέθοδος ανίχνευσης HBOCs είναι απλή και βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση ως διαδικασία διαχωρισμού και στην HPLC αποκλεισμού μεγέθους (Size Exclusion Chromatography, SEC-HPLC).^[41] Επίσης, έχουν προταθεί μέθοδοι για την ανίχνευση PFCs με χρήση GC-MS σε δείγματα αίματος, καθώς και σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα, μιας που οι ουσίες αυτές αποβάλλονται κυρίως μέσω της αναπνοής, επιτρέποντας ένα παράθυρο ανίχνευσης άνω των 10 ημερών. Ωστόσο, αμφιλεγόμενη είναι η διατήρηση της ακεραιότητας των ουσιών στα δείγματα αυτά μέχρι τη μεταφορά τους στα εργαστήρια ελέγχου.^[42,43]

2.6.2 ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΙΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

Το 2004 παρουσιάστηκε για πρώτη φορά και μια μέθοδος για την ανίχνευση ομόλογης μετάγγισης αίματος με κυτταρομετρία ροής, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει τις μικρές διαφορές που υπάρχουν στα αντιγόνα επιφανείας των ερυθροκυττάρων μεταξύ δύο διαφορετικών ατόμων, δηλαδή μεταξύ του δότη και του δέκτη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση αντιορών έναντι δώδεκα ερυθροκυτταρικών αντιγόνων του αίματος για τον εντοπισμό μικτών πληθυσμών ερυθροκυττάρων σε δείγματα αίματος, έπειτα από τη χορήγηση τουλάχιστον μίας μονάδας ομόλογου αίματος.^[23,44] Μια μελέτη σε 140 δείγματα αίματος έδειξε ότι η χρήση αυτής της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής δεν δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα μετά από ανάλυση των δειγμάτων αυτών, τα οποία περιείχαν διαφορετικά ποσοστά (0% - 5%) ενός δευτερεύοντος πληθυσμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, γεγονός που υποδηλώνει την 100% εξειδίκευση της μεθόδου. Τα περισσότερα δείγματα που περιείχαν ποσοστό 1,5% του δευτερεύοντος πληθυσμού ερυθρών αιμοσφαιρίων ανιχνεύθηκαν χωρίς αμφιβολία αποδίδοντας ευαισθησία 78%.^[23,45] Επιπροσθέτως, έχει προταθεί και μία μέθοδος για την ανίχνευση της ομόλογης μετάγγισης αίματος με ανάλυση δειγμάτων χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time-Polymerase Chain Reaction, real time-PCR). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενίσχυση και ανίχνευση του DNA του δότη μέσα στο δείγμα του δέκτη, έχει επικυρωθεί αλλά δεν εφαρμόζεται ακόμη σε επίπεδο ρουτίνας από όλα τα διαπιστευμένα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ.^[46-48] Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία μέθοδος για την ανίχνευση της αυτόλογης μετάγγισης αίματος με άμεσο τρόπο.^[23]

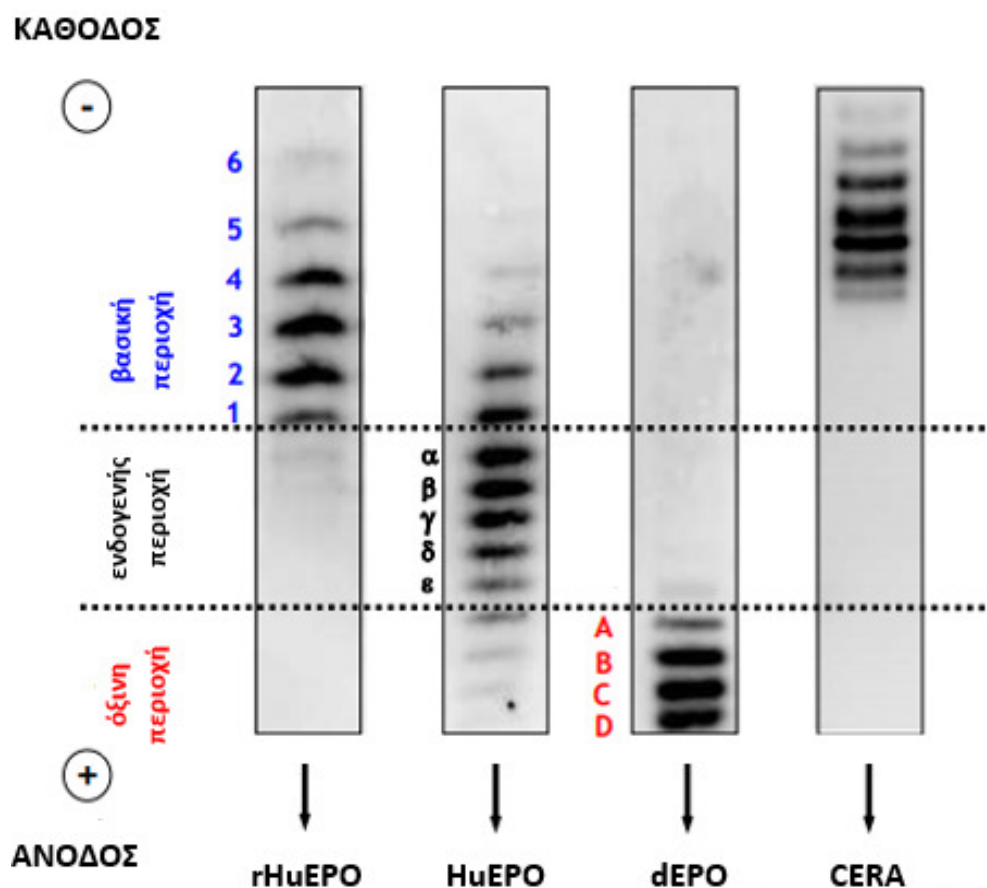
2.6.3 rHuEPOs ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ESAs

Όσον αφορά στην ανίχνευση συνθετικών ερυθροποιητινών και παραγώγων τους, εκτός από τις ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες πρώτης γενιάς (εποετίνη α, εποετίνη β, εποετίνη δ, εποετίνη ω), η εξέλιξη της φαρμακευτικής επιστήμης έχει δώσει την δυνατότητα σε ασθενείς με αναιμία και CKD να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικότερα την ασθένειά τους. Ωστόσο, οι δεύτερης (δαρμπεποετίνη α/darberpoetin α, dEPO) και τρίτης γενιάς (συνεχής ενεργοποιητής υποδοχέα ερυθροποιητίνης-continuous erythropoietin receptor activator, CERA) ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες, που διατέθηκαν στην αγορά για ιατρική χρήση, χρησιμοποιήθηκαν άμεσα από τους αθλητές για ντόπινγκ αίματος. Επιπλέον, τα προϊόντα ένωσης της ερυθροποιητίνης (EPO-Fc) και οι μιμητές της (peginesatide) σε συνδυασμό με τις νέες ερυθροποιητίνες δυσκόλεψαν ακόμη περισσότερο το πεδίο της άμεσης ανίχνευσης των ESAs.^[29,49]

2.6.3.1 Τεχνικές ηλεκτροφόρησης

Η ανάπτυξη μιας μεθόδου άμεσης ανίχνευσης συνθετικών ερυθροποιητινών άργησε σχεδόν μια δεκαετία από την έναρξη της κατάχρησής τους, καθώς η ομοιότητα της rHuEPO με την HuEPO είναι τέτοια που δεν ήταν εφικτός ο διαχωρισμός τους.^[29] Η ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing, IEF) είναι η τεχνική με τη χρήση της οποίας έγινε εφικτός ο διαχωρισμός αυτός. Η IEF εκμεταλλεύεται τις διαφορές στη σύνθεση υδατανθράκων, δηλαδή το διαφορετικό πρότυπο γλυκοζυλίωσης μεταξύ rHuEPO και HuEPO, κάνοντας δυνατή την ανίχνευση rHuEPO στα ούρα σε συγκεντρώσεις επιπέδων ng/mL.^[29,49,50] Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορές αυτές στη γλυκοζυλίωση καταλήγουν σε αλλαγή του τελικού καθαρού φορτίου του εκάστοτε πρωτεϊνικού μορίου σε ένα ορισμένο pH. Έτσι οι διαφορές αυτές παρατηρούνται με την IEF, καθώς οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) τους, το σημείο δηλαδή που είναι ηλεκτρικά ουδέτερες. Οι ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες είναι λιγότερο όξινες από την ενδογενή, συνεπώς το συνολικό τους φορτίο είναι λιγότερο αρνητικό και μετακινούνται διαφορετικά στο ηλεκτρικό πεδίο. Λόγω του μεγαλύτερου συνολικού αρνητικού φορτίου, η HuEPO μεταναστεύει σε πιο όξινη περιοχή του πηκτώματος της IEF, ενώ οι κύριες ισομορφές της πρώτης γενιάς rHuEPO (εποετίνη α, εποετίνη β) μεταναστεύουν σε μια πιο βασική περιοχή (Εικόνα 2.10).^[29,49]

Επειδή η συγκέντρωση ερυθροποιητίνης στα ούρα είναι χαμηλή, απαιτείται μεγάλος όγκος δείγματος (συνήθως 20 mL), ο οποίος συμπυκνώνεται με υπερφυγοκέντρωση σε ειδικά φίλτρα, που συγκρατούν μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 30 kDa, και το προκύπτον κατακράτημα διαχωρίζεται σε βαθμιδωτής κλίμακας pH πήκτωμα ακρυλαμίδιου με αμφολύτες. Αυτός ο τρόπος διαχωρισμού δημιουργεί μια κατανομή διάφορων ισομορφών οι οποίες αποτελούν το συγκεκριμένο προφίλ κάθε ερυθροποιητίνης.^[51] Η ηλεκτρομεταφορά (transfer) σε ειδική μεμβράνη των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί πάνω στο πήκτωμα και το ανοσοσύτρωμα πρωτεϊνών (western blotting) με τα κατάλληλα αντισώματα, επιτρέπουν την οπτική παρατήρηση των παραπάνω προφίλ κατανομής με χρήση χημειοφωταύγειας.^[29]

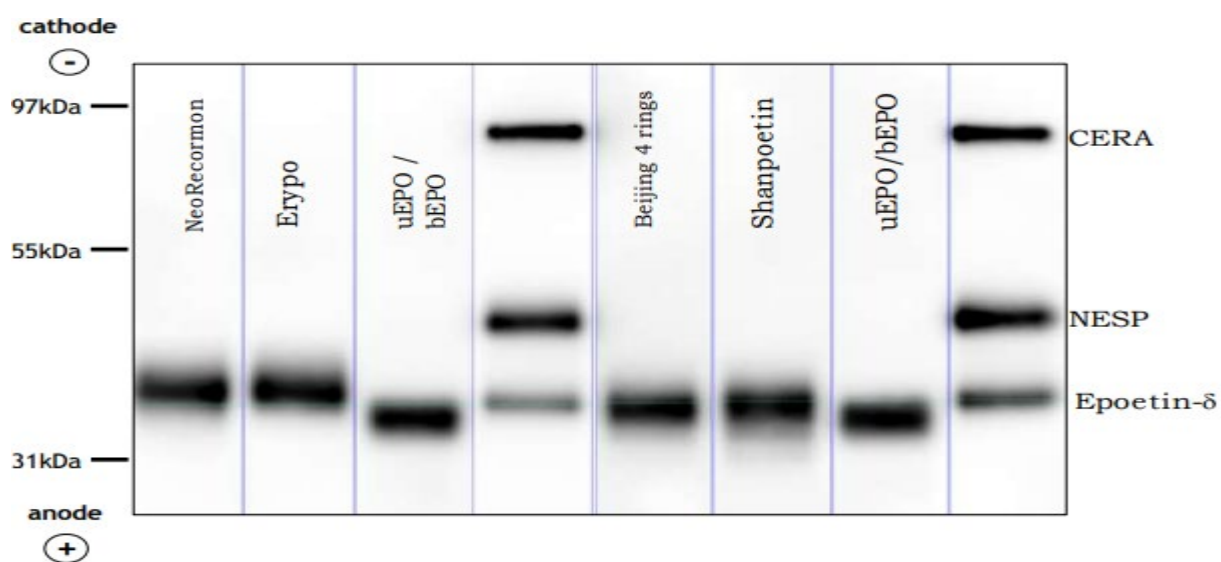


Εικόνα 2.10. Πρότυπα κατανομής ερυθροποιητινών με IEF.

Η δεύτερης γενιάς dEPO φέρει περισσότερες αλυσίδες άνθρακα, δηλαδή έχει μεγαλύτερη γλυκοζυλίωση, άρα και περισσότερο αρνητικό φορτίο από την HuEPO. Επομένως, η δαρμπεποετίνη α μετακινείται σε ακόμη πιο όξινη περιοχή του πηκτώματος από την ενδογενή (Εικόνα 2.10). Ωστόσο, η μέθοδος δεν είναι χρήσιμη για την ανίχνευση

της εποεΐνης δ, η οποία έχει παρόμοιο προφίλ κατανομής με την HuEPO στην IEF.^[29,51,52] Ακόμη, πολλοί αθλητές χρησιμοποιούν μείγματα με διαφορετικές rHuEPOs, για να επηρεάζουν τις χαρακτηριστικές εικόνες του προφίλ κατανομής που δίνει με IEF κάθε πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνουρία, είτε σχετίζεται με ασθένεια, είτε οφείλεται στην άσκηση, μπορεί επίσης να επηρεάσει την κατανομή των πρωτεΐνων στην IEF και να οδηγήσει σε ένα άτυπο προφίλ.^[49]

Έχει διαπιστωθεί ότι τα μοριακά βάρη των rHuEPOs είναι μεγαλύτερα από το μοριακό βάρος της HuEPO λόγω της διαφορετικής γλυκοζυλίωσης. Επομένως, η ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με δωδεκυλο-θειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους βάρος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων σε ούρα και αίμα.^[53] Η μέθοδος ανίχνευσης με την SDS-PAGE είναι αρκετά όμοια με αυτήν της IEF, μιας που ακολουθούνται τα στάδια της μεταφοράς και του ανοσοστυπώματος, ωστόσο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των ούρων και του αίματος σε πρωτεΐνες, τα δείγματα πρέπει πριν την υπερφυγοκέντρηση να υποστούν ανοσοκαθαρισμό με κάποια τεχνική ανοσοσυγγένειας. Τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί πολλά μοντέλα ανοσοκαθαρισμού με χρήση αντισωμάτων ή μαγνητικών νανοσφαιριδίων.^[54] Έπειτα από το στάδιο της εμφάνισης οι rHuEPOs, που κινούνται αργότερα λόγω του μεγαλύτερου τους μοριακού βάρους, εμφανίζονται σε μία ζώνη πάνω από την αντίστοιχη ζώνη της HuEPO (Εικόνα 2.11).^[29,53]



Εικόνα 2.11. Πρότυπα κατανομής ερυθροποιητινών με SDS-PAGE ή SAR-PAGE.

Η τρίτης γενιάς CERA είναι μία ερυθροποιητίνη στη δομή της οποίας έχει προστεθεί πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol, PEG), η οποία αυξάνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, δυσκολεύοντας τη διήθησή της από τους νεφρούς και την έκκρισή της στα ούρα.^[29] Επομένως, απαιτείται ένα στάδιο ανοσοκαθαρισμού σε δείγματα ορού για να γίνει η ανίχνευση της CERA με IEF, ενώ είναι πιο δύσκολη η ανίχνευσή της με SDS-PAGE, καθώς η πεγκυλιωμένη δομή της συνδέεται με το SDS, εμποδίζοντας τον διαχωρισμό. Για τον λόγο αυτό προτάθηκε η αντικατάσταση του SDS με σαρκosύλιο (N-Lauroylsarcosine/sarcosyl, SAR), οδηγώντας στην επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού της με SAR-PAGE ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 2.11).^[55]

Οι ηλεκτροφορητικές τεχνικές, εκτός του ότι είναι αρκετά χρονοβόρες για αναλύσεις ρουτίνας, καθώς απαιτούν 2-3 ημέρες για να βγει το αποτέλεσμα, είναι και αρκετά πολύπλοκες σε επίπεδο εκτίμησης αποτελέσματος. Έτσι, ο WADA εξέδωσε κριτήρια για την εναρμόνιση των εργαστηρίων σχετικά με τις αρχές αποδοχής, ταυτοποίησης και σταθερότητας των rHuEPOs σε περίπτωση ύποπτου δείγματος.^[49] Τα κριτήρια αυτά αφορούν στις διαδοχικές ζώνες και στην ένταση των ζωνών κάθε ισομορφής συγκριτικά με κάποια άλλη.^[56] Τα εργαστήρια σήμερα χρησιμοποιούν υπολογιστικά προγράμματα με αλγόριθμους ταξινόμησης βασισμένους στα κριτήρια αυτά, όπως το πρόγραμμα GASEro, για να διασφαλιστεί η αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων.^[49]

Η φαρμακευτική βιομηχανία, ταυτόχρονα με την ανάπτυξη νέων rHuEPOs, επικεντρώνεται και στην ανάπτυξη μικρών μορίων που άμεσα ή έμμεσα διεγείρουν την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, όπως σταθεροποιητές HIF και τα μιμητικά πεπτίδια ερυθροποιητίνης. Αυτά τα μόρια λόγω του μικρού μοριακού τους βάρους φιλτράρονται εύκολα από τον νεφρό και εκκρίνονται στα ούρα. Αν και τα περισσότερα από αυτά τα νέα μόρια βρίσκονται ακόμη υπό έρευνα, είναι διαθέσιμα στο μαύρη αγορά.^[29]

Οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τον έλεγχο άλλων ESAs πέρα από τις rHuEPOs. Η ανίχνευση της EPO-Fc μπορεί να γίνει σε δείγματα ορού με SDS-PAGE και SAR-PAGE, ενώ είναι εφικτός και ο εντοπισμός της σε δείγματα αίματος με IEF έπειτα από ενζυμική εξάλειψη του Fc τμήματος της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης.^[57,58] Η ανίχνευση του peginesatide είναι δυνατή σε δείγματα πλάσματος και ορού με SDS-PAGE.^[59] Πρόσφατα, προτάθηκε και η ανίχνευση των παγίδων ακτιβίνης σε ορό με SAR-PAGE.^[60]

Ερευνητικές δοκιμές έδειξαν ότι ο ανοσοκαθαρισμός δειγμάτων πλάσματος και ορού με ένα συνδυασμό ανοσομαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη και βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντι-EPO αντίσωμα πριν από τις παραπάνω ηλεκτροφορητικές τεχνικές καλύπτει τα κριτήρια του WADA και επιτρέπει την ανίχνευση

πρώτης γενιάς rHuEPOs, dEPO, CERA και EPO-Fc με απλό ανοσοσύτρωμα πρωτεϊνών (western blotting) αντί του διπλού που χρησιμοποιείται στην εγκεκριμένη από τον WADA μέθοδο, αποφεύγοντας τις μη ειδικές δεσμεύσεις των αντισωμάτων και μειώνοντας το συνολικό χρόνο της αναλυτικής διαδικασίας.^[61]

2.6.3.2 Τεχνικές ανοσοπροσδιορισμού

Ερευνητές στη Σουηδία, ανέπτυξαν ένα νέο γρήγορο τεστ για την ανίχνευση συνθετικών ερυθροποιητινών, γνωστό ως ανοσοπροσδιορισμός ισομορφής υποβοηθούμενης από μεμβράνη (Membrane-Assisted Isoform Immunoassay, MAIIA). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει το χρωματογραφικό διαχωρισμό των γλυκοζυλιωμένων ισομορφών της EPO με συγκολλητίνη (λεκτίνη) σπόρου σίτου (wheat germ agglutinin, WGA) και έναν ευαίσθητο πλευρικής ροής ανοσοπροσδιορισμό χρησιμοποιώντας αντι-EPO νανοσυστοιχίες ενεργού άνθρακα.^[62] Και σε αυτή την περίπτωση ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές της γλυκοζυλίωσης, οι οποίες ευθύνονται για το διαφορετικό βαθμό πρόσδεσης με τη λεκτίνη. Η λεκτίνη είναι πρωτεΐνη που διαθέτει τουλάχιστον μια περιοχή με την ιδιότητα δέσμευσης σε υδατάνθρακες. Οι rHuEPOs αλληλεπιδρούν περισσότερο με το WGA από την HuEPO, η dEPO έχει ακόμη μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με λεκτίνες, λόγω των περισσότερων υδατανθράκων που περιέχει, ενώ η CERA έχει χαμηλότερη συγγένεια και από την HuEPO.^[29,62]

Οι ισομορφές των ερυθροποιητινών συνδέονται αντιστρεπτά με τη λεκτίνη και μπορούν να εκλουστούν με χρήση διαλύματος Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε χαμηλή συγκέντρωση εκλούνται μόνο ισομορφές με χαμηλή συγγένεια για WGA, ενώ σε μια πιο υψηλή συγκέντρωση εκλούνται όλες οι ισομορφές. Οι εκλουσμένες ισομορφές αντιδρούν με ένα ακινητοποιημένο αντι-EPO αντίσωμα στη ζώνη σύλληψης και ανιχνεύονται με δεύτερο αντίσωμα. Τα αποτελέσματα του ανοσοπροσδιορισμού χρησιμοποιούνται για την οπτική ποσοτικοποίηση του σήματος που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της κάθε ερυθροποιητίνης.^[63]

Η μέθοδος αυτή αν και αρκετά πιο ακριβή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί, τόσο για δείγματα ούρων, όσο και για δείγματα αίματος, αλλά απαιτεί πρώτα τον ανοσοκαθαρισμό τους. Μετρήσεις που έγιναν σε εθελοντές 18 h μετά από χορήγηση rHuEPO, έδειξαν ότι η WGA MAIIA έχει 100% ευαισθησία σε δείγματα πλάσματος, ενώ στα δείγματα ούρων παρουσιάζει μικρότερη ευαισθησία με 87,5%. Αντίστροφα, και οι δύο κλασικές ηλεκτροφορητικές τεχνικές παρουσιάζουν 100% ευαισθησία στα ούρα, με την IEF να έχει

75% ευαισθησία στο πλάσμα και την SAR-PAGE 87,5%.^[63] Η WGA MAIIA σε χρονικό διάστημα περίπου μίας ώρας μπορεί να δώσει αποτελέσματα για 15 ανοσοκαθαρισμένα δείγματα αθλητών. Ωστόσο, η αντικειμενικότητα στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι ακόμη πιο δύσκολη σε σχέση με τις ηλεκτροφορητικές τεχνικές.^[29]

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων που βασίζονται στον ενζυμικό ανοσοπροσροφητικό προσδιορισμό (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), για την ανίχνευση dEPO, CERA, EPO-Fc, peginesatide και παγίδων ακτιβίνης σε ορό ή πλάσμα, που ωστόσο δεν έχουν εφαρμοστεί σε επίπεδο συστηματικού ελέγχου ντόπινγκ.^[23,30,46]

2.6.3.3 Τεχνικές χρωματογραφίας

Η χρήση LC-MS/MS, πέρα από την τεράστια συμβολή της στην ανίχνευση αναβολικών ουσιών, δείχνει να μπορεί να συμβάλει σημαντικά και στην ανίχνευση μορίων μικρού μοριακού βάρους που χρησιμοποιούνται για ντόπινγκ αίματος, τα οποία δεν ανιχνεύονται πάντα εύκολα με τις προαναφερθείσες μεθόδους. Σταθεροποιητές HIF μπορούν να ανιχνευθούν σε ούρα και πλάσμα με χρήση LC-MS/MS, απαιτώντας μεθόδους με χαμηλή αναλυτική ευαισθησία. Έτσι, έχει γίνει εφικτός ο εντοπισμός Roxadustat, Daprodustat και Molidustat.^[64-67] Εξίσου αποτελεσματική φαίνεται να είναι η χρήση LC-MS/MS για την ανίχνευση peginesatide σε ούρα, ορό ή DBS.^[59,68,69] Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί μέθοδοι LC-MS/MS για την ανίχνευση Luspaterecept και Sotatercept με παράθυρα ανίχνευσης στο αίμα τουλάχιστον 96 h.^[35,36]

Αν και οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης προτιμώνται για την ανίχνευση των μεγαλύτερων μορίων, έχουν προταθεί μέθοδοι LC-MS/MS για την ταυτοποίηση rHuEPOs σε δείγματα ούρων και αίματος μετά από πέψη με πεπτιδάσες. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην ανίχνευση συγκεκριμένων πεπτιδικών τμημάτων των ορμονών ή των υδατανθρακικών αλυσίδων που φέρουν, επιτρέποντας την ανίχνευση πρώτης γενιάς rHuEPOs, dEPO και CERA σε συγκεντρώσεις επιπέδων ng/mL, καθώς και την ανίχνευση EPO-Fc σε ορό.^[55,70-72] Τέλος, το αέριο ξένον μπορεί να ανιχνευθεί σε ούρα με χρήση GC-MS με παράθυρο ανίχνευσης 48 h.^[46]

2.7 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΜΕΣΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Η συμβολή των άμεσων μεθόδων ανίχνευσης ντόπινγκ αίματος που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι αναμφισβήτητα ιδιαίτερα σημαντική στην καταπολέμηση του ντόπινγκ αίματος. Ωστόσο, δεν επαρκούν για να καλύψουν όλες τις περιπτώσεις και να επιτύχουν τον πλήρη εντοπισμό του.

Εντονότερο προβληματισμό προκαλεί η απουσία μεθόδου για την ανίχνευση της αυτόλογης μετάγγισης αίματος. Την απουσία αυτή την γνωρίζουν καλά οι αθλητές και πιστεύεται ότι προτιμούν σε μεγάλο βαθμό τη χορήγηση του δικού τους αίματος ή των παραγώγων του.^[23]

Μια άλλη τακτική που επιλέγεται συχνά από τους αθλητές είναι η χρήση ESAs σε δόσεις μικρότερες των θεραπευτικών, δυσκολεύοντας την ανίχνευσή τους με δύο τρόπους. Η rHuEPO έχει μικρό χρόνο ημιζωής στο αίμα, ενώ και στα ούρα είναι ανιχνεύσιμη μόνο για λίγες ημέρες, όταν χρησιμοποιείται σε θεραπευτικές δόσεις. Η χορήγηση μικροδόσεων, που συνήθως είναι οι μισές από τις θεραπευτικές, μικραίνει ακόμη περισσότερο το παράθυρο ανίχνευση της rHuEPO στα ούρα από λίγες ημέρες σε μερικές ώρες. Επιπλέον, οι μικρότερες δόσεις χορήγησης συνεπάγονται και μικρότερη συγκέντρωση της απαγορευμένης ουσίας στα ούρα ή/και στο αίμα, απαιτώντας μεθόδους με χαμηλότερη ευαισθησία. Η αδυναμία ή το μικρό παράθυρο ανίχνευσης, όμως, δεν σημαίνει ότι ο αθλητής δεν έχει ακόμη την θετική επίδραση της ουσίας στην απόδοσή του, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις η απαγορευμένη ουσία αποβάλλεται άμεσα από τον οργανισμό, αλλά η επίδρασή της διαρκεί για αρκετές ημέρες, ακόμη και εβδομάδες.^[28,69]

Αν και η άμεση ταυτοποίηση ESAs με LC-MS αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική το κύριο μειονέκτημα είναι ότι η μέθοδος απαιτεί υλικό αναφοράς, το οποίο είναι συχνά διαθέσιμο μόνο από τις φαρμακευτικές εταιρείες που αναπτύσσουν αυτά τα προϊόντα, ενώ και οι μέθοδοι ELISA απαιτούν την ύπαρξη κατάλληλων αντισωμάτων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλο περισσότεροι νέοι ESAs εμφανίζονται και κυκλοφορούν στη μαύρη αγορά, η καθυστέρηση που υπάρχει μεταξύ της χρονικής στιγμής εμφάνισης μιας νέας ουσίας ντόπινγκ και της εμφάνισης μιας επίσημης αναλυτικής μεθόδου για την ανίχνευσή της, μεγαλώνει ακόμη περισσότερο.^[29,49]

Ουσιαστικά, το ντόπινγκ βρίσκεται συνεχώς ένα βήμα μπροστά. Όταν καθιερώνεται μια μέθοδος ανίχνευσης μιας απαγορευμένης ουσίας έχει ήδη ξεκινήσει η εμφάνιση μιας νέας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου. Όλα τα παραπάνω οδηγούν την επιστήμη του αντι-ντόπινγκ να στραφεί σε νέους διαχρονικούς τρόπους ανίχνευσης ντόπινγκ αίματος, οι

οποίοι δεν θα βασίζονται στην ανίχνευση της ίδιας της ουσίας, αλλά της επίδρασης που προκαλεί τόσο αυτή, όσο και παρόμοιες ουσίες που μπορεί να εμφανιστούν μελλοντικά και θα προκαλούν την ίδια επίδραση. Έτσι, άρχισαν να χρησιμοποιούνται οι βιοδείκτες για την έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ αίματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΙΑΒΑΤΗΡΙΟ ΑΘΛΗΤΗ

3.1 Η ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Το κύριο εργαλείο στον έλεγχο ντόπινγκ από τη δεκαετία του 1960 που ξεκίνησε η ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε βιολογικά υγρά αθλητών, κυρίως ούρα και αίμα, ήταν η ανίχνευση φαρμάκων και ουσιών που δεν παράγονται φυσικά στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως τα διεγερτικά, τα ναρκωτικά, οι β2-αγωνιστές και τα διουρητικά. Η χρήση χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών συνέβαλε με μεγάλη επιτυχία σε αυτό.^[7,73] Ως αποτέλεσμα των προόδων της βιοτεχνολογίας εμφανίστηκε, σε αξιοσημείωτο βαθμό, η εμπορική διάθεση νέων φαρμάκων και ουσιών, που ήταν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια, με εντυπωσιακά παρόμοια ή και σε ορισμένες περιπτώσεις απολύτως όμοια δομή με τα αντίστοιχα φυσικά προϊόντα παραγωγής του ανθρώπινου σώματος. Το γεγονός αυτό δυσκόλεψε σημαντικά την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών, οδηγώντας στην αναγκαία ανάπτυξη ευρηματικών τοξικολογικών τεχνικών που θα καθιστούσαν εφικτή τη διάκριση των εξωγενών απαγορευμένων ουσιών από τους ενδογενείς ομολόγους τους που δεν αποτελούν απαγορευμένες ουσίες, αφού παράγονται φυσικά από το σώμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εξωγενής χρήση ερυθροποιητίνης και τεστοστερόνης.^[73]

Από τη δεκαετία του 1970 διάφορες αθλητικές οργανώσεις έλεγχαν το λόγο της συγκέντρωσης τεστοστερόνης προς το λόγο της συγκέντρωσης επιτεστοστερόνης (T/E) στα ούρα των αθλητών με σκοπό να αντιμετωπίσουν την κατάχρηση αναβολικών στεροειδών. Αυτό βασίστηκε στο γεγονός ότι η επιτεστοστερόνη είναι ένα δευτερεύον προϊόν, που δεν συσχετίζεται άμεσα με το μεταβολισμό της τεστοστερόνης και δεν αυξάνεται έπειτα από χρήση εξωγενούς τεστοστερόνης, με συνέπεια η χορήγηση τεστοστερόνης να αυξάνει το λόγο T/E. Επιπλέον, στα μέσα της δεκαετίας του 1990 ορισμένες αθλητικές ομοσπονδίες εισήγαγαν ανώτατο όριο στα επιτρεπόμενα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη στο αίμα αθλητών, σε μια προσπάθεια να ελέγξουν την αύξηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω της παράνομης χρήσης εξωγενούς ερυθροποιητίνης. Επομένως, η επιστήμη του αντι-ντόπινγκ έχει αρχίσει εδώ και δεκαετίες να προσθέτει ως βασικό εργαλείο στη φαρέτρα της

για την καταπολέμηση του ντόπινγκ τη χρήση βιοδεικτών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική και όχι μόνο.^[73]

Ως βιοδείκτης (biomarker) ορίζεται η μετρήσιμη ουσία ενός βιολογικού συστήματος της οποίας οι διαφορές στη συγκέντρωση ή οι αλλαγές στην παρουσία σε ένα βιολογικό δείγμα αντανακλούν σε μεταβολές της φυσιολογικής λειτουργίας του συστήματος. Στον τομέα του αντι-ντόπινγκ ένας βιοδείκτης μπορεί να είναι το προϊόν μεταβολισμού μιας ουσίας, η συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης που μεταβάλλεται λόγω της χρήσης κάποιας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων έπειτα από παραβίαση των κανονισμών ντόπινγκ, οι κυτταρολογικές μεταβολές που μαρτυρούν την κατάχρηση απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, η ανίχνευση μη απαγορευμένων ουσιών που συσχετίζονται όμως με τη χρήση απαγορευμένων, κ.α.. Η επίδραση της χρήσης μιας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου και οι μεταβολές που μπορεί να επιφέρει σε μια φυσιολογική διαδικασία του οργανισμού και στα επίπεδα των βιοδεικτών παραμένουν ανιχνεύσιμα στο σώμα και τα βιολογικά υγρά, για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την ίδια την ουσία, που μπορεί να αποβάλλεται γρήγορα και συνεπώς να μην ανιχνεύεται με μεθόδους άμεσης ανίχνευσης.^[73,74]

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι βιοδείκτες σε μεγάλο βαθμό είναι ανεξάρτητοι από την πρόοδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας, η οποία με ταχύτατους ρυθμούς προμηθεύει συνεχώς την αγορά με νέα φάρμακα και σκευάσματα, που μπορούν παράνομα να χρησιμοποιηθούν από τους αθλητές για τη βελτίωση της απόδοσής τους. Η βιολογία του ανθρώπινου σώματος είναι, όμως, σχετικά σταθερή για τις βασικές φυσιολογικές λειτουργίες, καθώς η εξέλιξη του ανθρώπινου σώματος απαιτεί αρκετές γενιές. Έτσι, οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα σαν δείκτες μια συγκεκριμένης μεταβολής θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μελλοντικά για την ανίχνευση οποιουδήποτε νέου φαρμάκου ή τεχνικής που θα προκαλεί την ίδια συγκεκριμένη μεταβολή. Για παράδειγμα, οι σημερινοί βιοδείκτες του ντόπινγκ αίματος είναι ήδη ευαίσθητοι στο γονιδιακό ντόπινγκ με την κατάχρηση γονιδιακής θεραπείας για την έκφραση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης.^[73]

3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΙΑΒΑΤΗΡΙΟ ΑΘΛΗΤΗ

Η ανίχνευση μιας απαγορευμένης ουσίας σε βιολογικό δείγμα έχει σημαντικούς περιορισμούς ως προσέγγιση για τον έλεγχο ντόπινγκ αίματος. Η απουσία μεθόδου άμεσης ανίχνευσης αυτόλογης μετάγγισης αίματος, η συνεχής εμφάνιση νέων ESAs, το μικρό

παράθυρο ανίχνευσής τους και η χορήγηση τους σε μικροδόσεις καθιστούν ακόμη πιο επιτακτική την ανάγκη για νέες μεθόδους έμμεσης ανίχνευσης με χρήση βιοδεικτών και χαμηλή αναλυτική ευαισθησία. Ο έλεγχος της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη θέτοντας συγκεκριμένα όρια απαγόρευσης, που αρχικά κάποιες αθλητικές ομοσπονδίες χρησιμοποίησαν σαν στρατηγική, δεν ήταν η κατάλληλη λύση καθώς υπάρχουν και περιπτώσεις μη ντοπαρισμένων αθλητών που έχουν εκ φύσεως υψηλές τιμές αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη.^[23] Είναι γνωστό ότι εκτός από τη συγκέντρωση της ερυθροποιητίνης, η χορήγηση ESAs αυξάνει και τις τιμές μερικών παραμέτρων του αίματος, ενώ η μετάγγιση αίματος και η διακοπή χορήγησης ESAs οδηγεί στο αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή μείωση της συγκέντρωσης ερυθροποιητίνης και των παραμέτρων του αίματος.^[75] Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η απόσυρση και επανέγχυση αίματος προκαλούν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις σε αρκετούς δείκτες της ερυθροποίησης, αφήνοντας ένα χαρακτηριστικό βιολογικό αποτύπωμα στον αθλητή.^[76]

Ο όρος Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή (Athlete Biological Passport, ABP) προτάθηκε τη δεκαετία του 2000, ως αποτέλεσμα της εδώ και δεκαετίες συσσωρευμένης γνώσης γύρω από τη χρήση βιοδεικτών στον έλεγχο ντόπινγκ, και αφορά στην παρακολούθηση επιλεγμένων αιματολογικών μεταβλητών παραμέτρων για τον καθορισμό του αιματολογικού προφίλ ενός αθλητή.^[29,73] Η εφαρμογή του ABP από τη Διεθνή Ένωση Ποδηλασίας το 2008 θεωρείται ορόσημο στο χώρο του ντόπινγκ. Το 2009, ο WADA καθιέρωσε το ABP ως βασικό εργαλείο στο συστηματικό έλεγχο ντόπινγκ σε δείγματα αίματος.^[40] Το ABP αποδεικνύει ότι ένας αθλητής παραποιεί παρανόμως τις φυσιολογικές αιματολογικές παραμέτρους του, χωρίς η απόδειξη αυτή να βασίζεται στην ανίχνευση μιας συγκεκριμένης απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, όπως συμβαίνει με τις άμεσες μεθόδους ανάλυσης δειγμάτων ούρων και αίματος.^[49,77]

Το ABP αποτελείται από δύο ενότητες, τη στεροειδή και την αιματολογική. Η στεροειδής ενότητα (steroidal module) αποσκοπεί στον εντοπισμό ντόπινγκ με χρήση ενδογενών ή/και εξωγενών αναβολικών στεροειδών ή άλλων αναβολικών παραγόντων, καθώς και στην ανίχνευση χειραγώγησης δείγματος ούρων με χρήση ούρων άλλου ατόμου. Η αιματολογική ενότητα (haematological module) αποσκοπεί στην ανίχνευση οποιασδήποτε μορφής ντόπινγκ αίματος, στοχεύοντας στον προσδιορισμό της χρήσης απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων για την ενίσχυση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων, της μεταφοράς οξυγόνου και της αερόβιας απόδοσης. Συμπληρωματικά, υπάρχει και μια τρίτη ενότητα, η ενδοκρινολογική, που στοχεύει στον εντοπισμό ντόπινγκ με αυξητικούς παράγοντες, όπως η αυξητική ορμόνη και ο αυξητικός παράγοντας

ινσουλίνης-1. Ωστόσο, δεν έχει επικυρωθεί ακόμη η χρήση αυτής της ενότητας στα πλαίσια του ABR.^[23,77]

Πιο αναλυτικά, η στεροειδής ενότητα, η οποία είναι γνωστή και ως “steroid profile” λαμβάνει υπόψη τις συγκεντρώσεις τεστοστερόνης (testosterone, T), επιτεστοστερόνης (epitestosterone, E ή Epi), ανδροστερόνης (androsterone, A), ετιοχολανολόνης (etiocholanolone, Etio), 5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (5α-androstane-3α,17β-diol, 5αAdiol) και 5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (5β-androstane-3α,17β-diol, 5βAdiol) στα ούρα, καθώς και τους λόγους T/E, A/Tα, A/Etio, 5αAdiol/5βAdiol και 5αAdiol/E που προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις των ορμονών αυτών, μετά από ανάλυση με GC-MS.^[77]

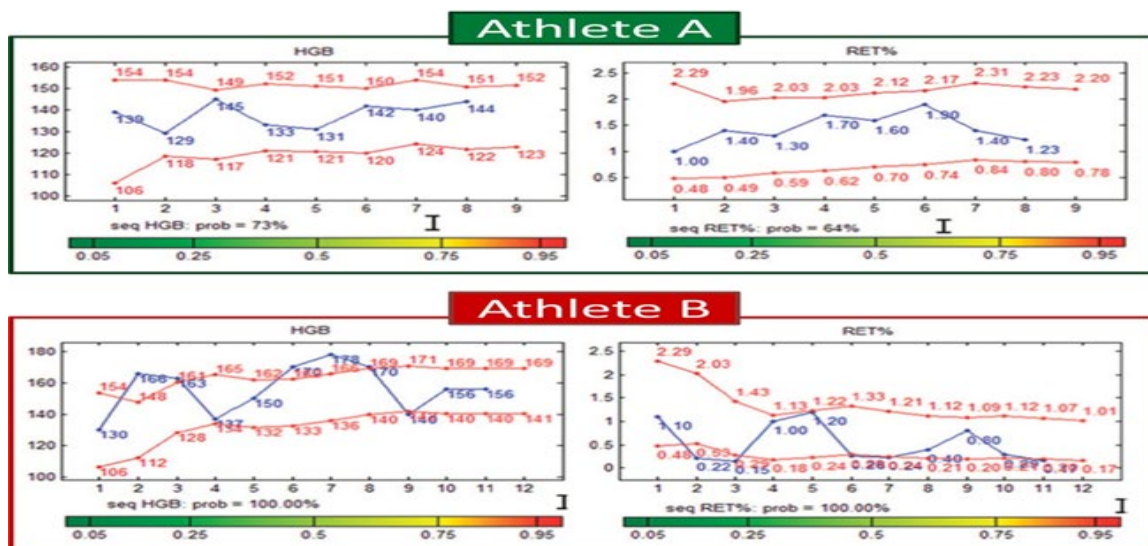
Όσον αφορά στην αιματολογική ενότητα, στην οποία επικεντρώνεται κατά κύριο λόγο η παρούσα διατριβή, συλλέγει διαχρονικά πληροφορίες για τις παρακάτω αιματολογικές παραμέτρους (σε παρένθεση η μονάδα μέτρησης), έπειτα από ανάλυση δειγμάτων ολικού αίματος σε αιματολογικό αναλυτή:^[25,77,78]

- Αιματοκρίτης (haematocrit, HCT): η εκατοστιαία κατά όγκο αναλογία ερυθρών αιμοσφαιρίων σε σχέση με το συνολικό όγκο αίματος (%).
- Αιμοσφαιρίνη (haemoglobin, HGB): η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου (g/dL).
- Αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (red blood cells count, RBC): η καταμέτρηση των ερυθροκυττάρων στο δείγμα ($10^6/\mu\text{L}$).
- Εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων – τυπική απόκλιση (red blood cell distribution width - standard deviation, RDW-SD): η μέτρηση του εύρους κατανομής καμπύλης όγκου ερυθροκυττάρων, ο οποίος μεταβάλλεται λόγω αλλαγής στο μέσο μέγεθος των ερυθροκυττάρων (fL).
- Μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (mean corpuscular volume, MCV): η μέτρηση του μέσου μεγέθους των ερυθροκυττάρων (fL).
- Μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (mean corpuscular haemoglobin, MCH): η μέση τιμή της κατά βάρος περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης σε κάθε ερυθροκύτταρο (pg).
- Μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (mean corpuscular haemoglobin concentration, MCHC): η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα των ερυθροκυττάρων σε αιμοσφαιρίνη ή η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (g/dL).
- Αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων (reticulocytes count, RET#): η καταμέτρηση των ανώριμων ερυθροκυττάρων στο δείγμα ($10^6/\mu\text{L}$).

- Ποσοστό δικτυοερυθροκυττάρων (reticulocytes percentage, RET%): η εκατοστιαία αναλογία ανώριμων ερυθροκυττάρων σε σχέση με το συνολικό όγκο αίματος (%).
- Κλάσμα ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων (immature reticulocyte fraction, IRF): η εκατοστιαία αναλογία των ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων (%).
- Αριθμός αιμοπεταλίων (platelets count, PLT): η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων στο δείγμα ($10^3/\mu\text{L}$).
- Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (white blood cells count, WBC): η καταμέτρηση των λευκών αιμοσφαιρίων στο δείγμα ($10^3/\mu\text{L}$).

Επιπλέον από τις παραπάνω παραμέτρους υπολογίζονται οι πολυπαραμετρικοί δείκτες OFF-score (δείκτης διέγερσης, που υπολογίζεται συναρτήσει της HGB και του RET%) και ABPS (abnormal blood profile score, που υπολογίζεται συναρτήσει των HCT, HGB, RBC, RET%, MCV, MCH και MCHC).

Οι αιματολογικές παράμετροι παρακολουθούνται με την πάροδο του χρόνου και αναλύονται χρησιμοποιώντας ένα στατιστικό μοντέλο εξαγωγής συμπερασμάτων το οποίο βασίζεται στη θεωρία του Bayes (Bayesian inference) για την επικαιροποίηση της πιθανότητας μιας υπόθεσης, καθώς διατίθενται περισσότερες πληροφορίες ή δεδομένα. Έτσι, λαμβάνονται υπόψη προηγούμενες τιμές για τη δυναμική ανάλυση μιας ακολουθίας δεδομένων και δημιουργείται ένα αιματολογικό προφίλ για κάθε αθλητή (Εικόνα 3.1).^[74]



Εικόνα 3.1. Ενδεικτικά παραδείγματα ABP για τις παραμέτρους HGB και RET# με φυσιολογικά επίπεδα μετρήσεων (αθλητής A) και με μη φυσιολογικές μετρήσεις που καταδεικνύουν ντόπινγκ αίματος (αθλητής B).

Ο WADA έχει εκδώσει τεχνικό έγγραφο που περιλαμβάνει υποχρεωτικές απαιτήσεις για τη συλλογή, τη μεταφορά και την ανάλυση των δειγμάτων αίματος, καθώς και για τη διαχείριση των αποτελεσμάτων για τον έλεγχο του ABP. Η διαδικασία δειγματοληψίας ακολουθεί τις βασικές οδηγίες που αναφέρθηκαν στον Κεφάλαιο 1 και πρέπει να πραγματοποιείται τουλάχιστον δύο ώρες μετά την τελευταία προπόνηση ή τον αγώνα του αθλητή, και αφότου αυτός παραμείνει σε καθιστή θέση για 10 min. Στον έλεγχο του ABP δεν μπορεί να υπάρξει “B δείγμα”, καθώς το δείγμα απαγορεύεται να καταψυχθεί, ενώ και σε συνθήκες ψύξης οι αιματολογικές παράμετροι δεν είναι αξιόπιστες μετά από 12 h. Οποιαδήποτε πληροφορία που αφορά σε έκθεση σε υψόμετρο, πιθανή αιμορραγία ή τραυματισμό ή μετάγγιση αίματος τους προηγούμενους τρεις μήνες, χρήση προσομοιωμένων υποξικών συνθηκών για την προπόνηση ή χρήση θερμικών τεχνικών αποθεραπείας που αυξάνουν την αιμάτωση είναι σημαντική και θα πρέπει να καταγράφεται.^[77]

Η μεταφορά και αποθήκευση των δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες ψύξης και ποτέ κατάψυξης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ειδικά ψυγεία μεταφοράς ή ψυχόμενοι σάκοι και σε κάθε περίπτωση τα δείγματα συνοδεύονται από έναν καταγραφέα θερμοκρασίας (data logger). Η αξιοπιστία των αιματολογικών βιοδεικτών που μετρούνται για το ABP είναι εγγυημένη όταν ο δείκτης σταθερότητας αίματος (blood stability score, BSS) είναι μικρότερος από 85. Ο δείκτης αυτός υπολογίζεται από τη σχέση $BSS = 3 * T + CAT$, όπου CAT (collection-to-analysis time) το χρονικό διάστημα σε ώρες από τη στιγμή της αιμοληψίας μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης και T (temperature) η μέση θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου από τη στιγμή της αιμοληψίας μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης, όπως αυτή υπολογίζεται από τον καταγραφέα θερμοκρασίας. Με βάση αυτή τη θερμοκρασία αποφασίζεται σύμφωνα με τις οδηγίες του τεχνικού εγγράφου και το χρονικό διάστημα σε ώρες που είναι αποδεκτό από τη στιγμή της αιμοληψίας μέχρι τη στιγμή της παραλαβής των δειγμάτων (collection-to-reception time, CRT) από το εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ.^[77]

Η ανάλυση των δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται εντός 12 h από την υποδοχή τους σε διαπιστευμένα από τον WADA Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ, που υπόκεινται σε αυστηρούς τακτικούς εσωτερικούς και εξωτερικούς ελέγχους ποιότητας, με τη χρήση αιματολογικού αναλυτή. Ο αιματολογικός αναλυτής θα πρέπει να διαθέτει τις κατάλληλες προδιαγραφές και να είναι ο ίδιος για όλα τα εργαστήρια παγκοσμίως, ώστε να υπάρχει εναρμόνιση και συγκρισιμότητα μεταξύ των διαχρονικών μετρήσεων.^[77]

Όσον αφορά στη διαχείριση των αποτελεσμάτων, η προσαρμογή του προφίλ με τα νέα κάθε φορά δεδομένα προβλέπει ένα αναμενόμενο εύρος τιμών για κάθε αθλητή, εντός του οποίου πρέπει να βρίσκονται οι τιμές των αιματολογικών δεικτών, υποθέτοντας τη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού του. Τα αιματολογικά προφίλ δεν ελέγχονται από τα εκάστοτε Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ, αλλά ο WADA διαθέτει μια ειδική επιτροπή εμπειρογνομόνων, οι οποίοι αξιολογούν τα ανώνυμα βιολογικά διαβατήρια. Μια μεταβολή σε κάποιο παράμετρο μπορεί να αναφερθεί αν υπάρχει μια συγκεκριμένη τιμή εκτός του καθορισμένου εύρους. Η μεταβολή αυτή μπορεί να θεωρηθεί φυσιολογική, ύποπτη (απαιτεί περαιτέρω δειγματοληψίες), απόδειξη ύπαρξης μιας παθολογικής κατάστασης ή απόδειξη χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου.^[49,77]

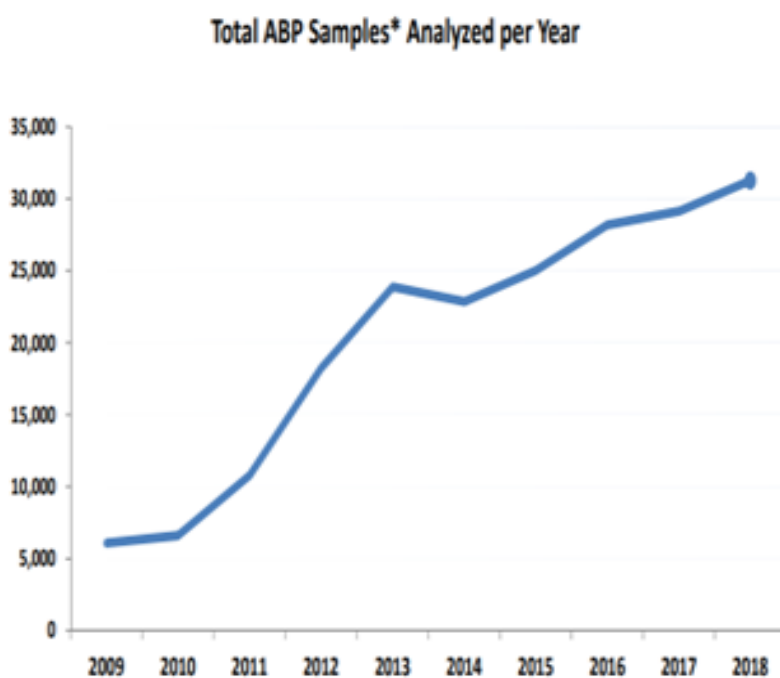
3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ABP

Σε πρωταρχική μελέτη με 10 υγιείς άνδρες, στους οποίους έγινε απόσυρση 20% του αίματός τους και αντικαταστάθηκε από 1,3 L υδροξυαιθυλικού αμύλου (πολύ περισσότερο από την κοινή πρακτική ντόπινγκ), παρατηρήθηκαν αλλαγές στην συγκέντρωση της ερυθροποιητίνης και στις αιματολογικές παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, η EPO αυξήθηκε 4 φορές μέσα σε μία ημέρα, ενώ ο RET# 2,4 φορές μετά από 7 ημέρες, παραμένοντας υψηλός για άλλες 7 ημέρες. Η HGB έμεινε μειωμένη κατά 15% για δύο εβδομάδες. Μετά την εκ νέου έκχυση 0,8 L αυτόλογων συσκευασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων αυξήθηκε έντονα η HGB κατά 8%, επιστρέφοντας στην αρχική τιμή αναφοράς μετά από 7 ημέρες. Η συγκέντρωση της EPO έμεινε αμετάβλητη, ενώ ο RET# μειώθηκε κατά 30% από την 7^η ημέρα μέχρι την 21^η ημέρα.^[79] Οι ίδιοι συγγραφείς έχουν αναφέρει ότι ο προσδιορισμός της αναλογίας μεταξύ της μάζας της HGB στον ώριμο πληθυσμό ερυθροκυττάρων και στα δικτυοερυθροκύτταρα (αναλογία RBC_{Hb} / RET_{Hb}) είναι ο καλύτερος βιοδείκτης ανίχνευσης του αυτόλογου ντόπινγκ αίματος. Η επιταχυνόμενη ερυθροποίηση που προκύπτει από τη χρήση rHuEPO μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή δικτυοερυθροκυττάρων χωρίς σίδηρο (μειωμένη MCH δικτυοερυθροκυττάρων, MCH_r) ακόμη και όταν τα αποθέματα σιδήρου είναι φυσιολογικά. Η χορήγηση σιδήρου μαζί με rHuEPO οδηγεί σε αύξηση της MCH_r και της RET_{Hb} σε σύγκριση με τη χορήγηση μόνο rHuEPO, ενώ ο RET# μένει ανεπηρέαστος. Άρα ο ενδοφλέβιος σίδηρος αυξάνει την αιμοποιητική απόκριση στην rHuEPO, χωρίς να δίνει ανιχνεύσιμες μεταβολές στο ABP. Η αύξηση των RET αρχίζει 36 h μετά την εφάπαξ δόση rHuEPO φθάνοντας σε μια μέγιστη τιμή μετά από 3-4 ημέρες και ομαλοποίηση εντός 7 ημερών.^[79] Οι νέοι αιματολογικοί αναλυτές που χρησιμοποιούνται από την αρχή του 2020

στα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ έχουν τις προδιαγραφές για να μετρήσουν και να διαχωρίσουν την αιμοσφαιρίνη των δικτυοερυθροκυττάρων από αυτή των ώριμων ερυθροκυττάρων, δίνοντας τιμές για νέες αιματολογικές παραμέτρους, όπως η RET_{Hb} και η MCH_r .

Επιπλέον, μια φαρμακοδυναμική μελέτη έδειξε ότι η rHuEPO αυξάνει παροδικά τη διάρκεια ζωής των κυκλοφορούντων δικτυοερυθροκυττάρων από 1,7 ημέρες σε 3,4 ημέρες. Επομένως, η rHuEPO αυξάνει και την απελευθέρωσή τους από το μυελό των οστών αλλά και το χρόνο ωρίμανσης τους.^[23,80] Το ABP έχει αποδειχτεί ένα ευαίσθητο εργαλείο και για την έμμεση ανίχνευση ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών νέας γενιάς. Μία μόνο ένεση με CERA έχει σημαντική επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους λόγω του μακρού χρόνου ημιζωής της στο αίμα.^[81]

Από το 2009, που εγκαθιδρύθηκε από τον WADA η χρήση του ABP για την ανίχνευση ντόπινγκ αίματος, φαίνεται όλο και περισσότεροι έλεγχοι να γίνονται και να συμπληρώνονται καλύτερα τα προφίλ των αθλητών για την εξαγωγή ακόμη πιο σίγουρων συμπερασμάτων. Η έκταση της χρήσης του ABP φαίνεται και από τα στατιστικά στοιχεία που δημοσιοποίησε ο WADA (Εικόνα 3.2).^[82]



Εικόνα 3.2. Στατιστικά στοιχεία ανάλυσης δειγμάτων για ABP ανά χρόνο την περίοδο 2009-2018, όπως δημοσιοποιήθηκαν από τον WADA.

Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί η καλύτερη ευαισθησία του ABP σε σχέση με τις άμεσες μεθόδους ανίχνευσης. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δειγμάτων ούρων και αίματος από 48 υγιείς επαγγελματίες ποδηλάτες, στους οποίους είχε χορηγηθεί rHuEPO (εποετίνη β) μία φορά την εβδομάδα για οκτώ εβδομάδες, έδειξαν ευαισθησία στην ανίχνευση ερυθροποιητίνης με IEF και SAR-PAGE, 63,8% και 58,6% αντίστοιχα, ενώ η αντίστοιχη ευαισθησία των αναλύσεων ABP υπολογίστηκε 91,3%. Καμία μέθοδος δεν ήταν πλήρως εύστοχη και αυτό δείχνει ότι η μία μέθοδος αλληλοσυμπληρώνει την άλλη και σε συνεργασία μπορούν να συμβάλουν στην καλύτερη αντιμετώπιση του ντόπινγκ.^[83]

Σήμερα, το ABP είναι κάτι περισσότερο από μια απλή σειρά μεμονωμένων τιμών βιοδεικτών. Ετερογενείς παράγοντες, όπως η ηλικία, το φύλο, γενετικά στοιχεία, αλλά και πληροφορίες για τις συνθήκες προπόνησης, τις συνθήκες συλλογής και μεταφοράς των δειγμάτων, καθιστούν το ABP μια πλατφόρμα για την αξιολόγηση πολλαπλών επιστημονικών στοιχείων.^[73]

Η εφαρμογή του ABP έκανε τους αθλητές και τους προπονητές να απομακρυνθούν από την κλασική χρήση ESAs και να οδηγηθούν στη χρήση μικροδόσεων, κυρίως μικροδόσεων rHuEPO, για να αποφύγουν τις μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα των αιματολογικών παραμέτρων και ταυτόχρονα να μειώσουν το παράθυρο ανίχνευσης με τις κλασικές τεχνικές ανάλυσης ντόπινγκ. Αυτές οι μικροδόσεις παρακολουθούνται βέβαια μέσω του ABP, αλλά μικρές αποκλίσεις στα προφίλ των αθλητών μπορούν να αποδοθούν σε έκθεση σε υψόμετρο, θερμική καταπόνηση ή ασθένεια. Για παράδειγμα, χαμηλές δόσεις rHuEPO δεν αυξάνουν τα δικτυοερυθροκύτταρα σε έντονο βαθμό. Και είναι άγνωστο αν αυτή η μικρή τους αύξηση μπορεί και να καλύψει τη μείωσή τους μετά από μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ πρόσφατα υπήρξε περίπτωση ανίχνευσης σταθεροποιητή HIF (FG-4592) σε δείγμα ούρων αθλητή με χρήση LC-MS, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στις αιματολογικές παραμέτρους του ABP του αθλητή. Έτσι, νέοι βιοδείκτες έμμεσης ανίχνευσης θα πρέπει να αναπτυχθούν και να συμπληρώσουν το ABP αυξάνοντας την ευαισθησία του σημαντικού αυτού εργαλείου.^[74]

3.4 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΕΜΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Το ABP αποτελεί ένα αναντικατάστατο αναλυτικό εργαλείο το οποίο πρέπει να βελτιώνεται συνεχώς και να συσχετίζεται με την εισαγωγή νέων έμμεσων βιοδεικτών αλλοιωμένης ερυθροποίησης. Ο μόνος τρόπος για να ενισχυθεί η αερόβια ικανότητα είναι η αύξηση της μάζας της αιμοσφαιρίνης, η οποία θα αυξήσει τη μέγιστη πρόσληψη

οξυγόνου.^[23] Κατά συνέπεια, σε ένα άτομο, μεταβολές στην HGB συνεπάγονται και μεταβολές στη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου, ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι η μέτρηση της HGB δεν είναι τόσο προβλεπτική και η συνολική μάζα της αιμοσφαιρίνης (total mass of hemoglobin, Hbmass) συσχετίζεται καλύτερα με τη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου.^[23,84] Η Hbmass εμφανίστηκε ως ευαίσθητος δείκτης μετάγγισης αίματος, αλλά το κύριο μειονέκτημα αυτής της ελπιδοφόρας παραμέτρου είναι ότι η μέτρηση της Hbmass βασίζεται στη μέθοδο αναπνοής μονοξειδίου του άνθρακα (carbon monoxide, CO). Το CO είναι τοξικό και μπορεί να μειώσει την ικανότητα άσκησης. Επιπλέον, η μέθοδος αναπνοής CO για να πραγματοποιηθεί σωστά απαιτεί από τους αθλητές την πλήρη συνεργασία τους, δίνοντάς τους την ευκαιρία, αν θέλουν, να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα του ελέγχου.^[74,85]

Τα miRNAs ή microRNAs είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNA που λειτουργούν στη μεταγραφική και μεταμεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα κυκλοφορούντα miRNAs που ανιχνεύονται στο πλάσμα και τον ορό του αίματος, ως ευαίσθητοι δείκτες διαφόρων παθοφυσιολογικών καταστάσεων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως βιοδείκτες ντόπινγκ, καθώς έχει παρατηρηθεί αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής τους μετά από αυτόλογη μετάγγιση ή χορήγηση CERA. Αυτά τα miRNAs προέρχονται από τα κύτταρα που πνεύμονα και του ήπατος. Το παράθυρο ανίχνευσης για αυτές τις παρατηρούμενες αλλαγές είναι μέχρι τρεις ημέρες μετά τη μετάγγιση αίματος, αλλά συγκεκριμένο miRNA, το miR-144, εμφάνισε σημαντική αύξηση στην έκφρασή του που διήρκεσε 27 ημέρες μετά τη χορήγηση της CERA. Η διαχρονική παρακολούθηση των κυκλοφορούντων miRNAs με χρήση τεχνικών μεταγραφωμικής (transcriptomics), όπως οι μικροσυστοιχίες (microarrays) και η ποσοτική real-time PCR, μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική για τη χρήση αυτών των νέων βιοδεικτών.^[74,86-88]

Ακόμη, η αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα, στα πλαίσια του ντόπινγκ αίματος με μετάγγιση αίματος ή παραγώγων του, πυροδοτεί αλλαγές στις μεμβρανικές τους πρωτεΐνες, το σχήμα και το μέγεθός τους, αυξάνοντας τις πιθανότητες για τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση αυτόλογης μετάγγισης.^[86,89] Μέθοδοι πρωτεωμικής (proteomics), όπως η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και το ανοσοσύτρωμα πρωτεϊνών, δίνουν τη δυνατότητα προσδιορισμού της παρουσίας αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων στο αίμα με εντοπισμό πιθανών βιοδεικτών, όπως η υπεροξυρεδοξίνη 2 (peroxiredoxin 2), μια αντιοξειδωτική πρωτεΐνη που βρίσκεται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα του ερυθροκυττάρου, αλλά κατά την αποθήκευση μεταναστεύει στην μεμβράνη του.^[86,89,90]

Οι σάκοι που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση του αίματος και των ερυθροκυττάρων είναι κατασκευασμένοι από πολυβινυλοχλωρίδιο, στο οποίο προστίθενται πλαστικοποιητές για να παρέχεται η κατάλληλη ευκαμψία. Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος πλαστικοποιητής και ο μόνος εξουσιοδοτημένος για το σκοπό αυτό σε ορισμένες χώρες, είναι ο φθαλικός δι-2-αιθυλεξυλεστέρας (di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP). Η μακροπρόθεσμη αποθήκευση του αίματος σε αυτούς τους σάκους οδηγεί στη διάχυση των φθαλικών ενώσεων στο αποθηκευμένο αίμα, οι οποίες στη συνέχεια μεταγγίζονται με το αίμα στον αθλητή. Διάφορες μελέτες έχουν καταδείξει την ανίχνευση των πλαστικοποιητών αυτών, ως βιοδείκτες ντόπινγκ με μετάγγιση αίματος, για μικρό χρονικό διάστημα μετά τη μετάγγιση χρησιμοποιώντας LC-MS.^[85,86] Στο ανθρώπινο σώμα, ο DEHP υδρολύεται σε μονο(2-αιθυλεξυλο) φθαλικό εστέρα [mono(2-ethylhexyl) phthalate, MEHP] και ακολούθως οξειδώνεται και γλυκουρονιώνεται σε μονο(2-αιθυλο-5-υδροξεξυλο) φθαλικό εστέρα [mono(2-ethyl-5hydroxyhexyl) phthalate, 5OH-MEHP], μονο(5-οξοεξυλο) φθαλικό εστέρα [mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate, 5oxo-MEHP], μονο(2-αιθυλο-(5-καρβοκυπεντυλο) φθαλικό εστέρα, [mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate, 5cx-MEPP] και μονο(2-καρβοξυμεθυλοεξυλο) φθαλικό εστέρα [mono(2-carboxymethylhexyl) phthalate, 2cx-MMHP], που αποτελούν όλοι δείκτες της έκθεσης σε DEHP. Οι μεταβολίτες 5cx-MEPP και 2cx-MMHP παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας του μεγάλου χρόνου ημιζωής τους. Αν και οι περισσότεροι μεταβολίτες είναι ανιχνεύσιμοι αρκετές ώρες μετά τη μετάγγιση (12 h), αυτά τα δύο μόρια επεκτείνουν το παράθυρο ανίχνευσης για έως και 1-2 ημέρες. Παρ'όλα αυτά, το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου ανίχνευσης είναι ότι οι φθαλικές ενώσεις είναι παρούσες σε πολλές πλαστικές συσκευασίες καθημερινής χρήσης και μπορεί να βρεθούν στα ούρα μετά από επαγγελματική ή διατροφική έκθεση.^[74,85,86]

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια μέθοδος για τη μέτρηση των ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε DBS, που είναι ένα είδος δείγματος ευκολότερης λήψης σε σχέση με την κλασική λήψη φλεβικού αίματος. Κυτταροειδικές πρωτεΐνες μετρούνται με LC-MS έπειτα από πέψη των DBS με θρυψίνη. Η ποσοτική ανίχνευση δύο πρωτεϊνών αντιστοιχεί στη μέτρηση ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων και ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η CD71 είναι η συνδεόμενη με μεμβράνη μορφή του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Εκφράζεται έντονα σε ανώριμα δικτυοερυθροκύτταρα, όπου είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά σιδήρου στα κύτταρα για σύνθεση αιμοσφαιρίνης και απουσιάζει στα ώριμα δικτυοερυθροκύτταρα και στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η Band3 είναι μια ολοκληρωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη γνωστή και ως

ανταλλάκτης ανιόντων 1, που στο αίμα εκφράζεται μόνο σε ερυθρά αιμοσφαίρια και δικτυοερυθροκύτταρα, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση της μεμβράνης τους, και έτσι αντιπροσωπεύει το συνολικό ερυθροειδή πληθυσμό. Η συγκέντρωση των CD71 και Band3 σε DBS έχει δειχθεί ότι συσχετίζεται καλά με τους αριθμούς των ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων, αντίστοιχα. Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε μια μελέτη αυτόλογης μετάγγισης αποτελούμενη από 15 άτομα που έλαβαν αίμα και 11 άτομα που έλαβαν φυσιολογικό ορό. Μετά τη μετάγγιση, η μέση αναλογία CD71/Band3 στην ομάδα με λήψη αίματος ήταν στατιστικά διαφορετική από την ομάδα ελέγχου. Με βάση τα πειραματικά καθορισμένα κριτήρια, η αναλογία CD71/Band3 θα μπορούσε να ανιχνεύσει 7/10 άτομα στα οποία έγινε μετάγγιση αίματος, ενώ το Ret% του ABP θα μπορούσε να ανιχνεύσει 3/10. Έτσι, η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να βελτιώσει την ανίχνευση της αυτόλογης μετάγγισης και να επιτρέψει πιο αυξημένη και εύκολη συλλογή δειγμάτων. Περαιτέρω δοκιμές είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό της διαχρονικής σταθερότητας του λόγου CD71/Band3 και για τη μελέτη της πιθανής μεταβολής του λόγω υψομέτρου, φλεγμονής, έντονης άσκησης ή/και χορήγησης μικροδόσεων ESAs.^[91]

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι υποθέσεις που υποστηρίζουν, πως κυτταρικά κατάλοιπα που προέρχονται από αποθηκευμένο αίμα επάγουν μια κυτταρική και μοριακή ανοσολογική απόκριση και μεταβάλλουν το προφίλ έκφρασης των T-λεμφοκυττάρων και πως η ερυθροποιητίνη αυξάνει την καταστολή των T-λεμφοκυττάρων με διαμεσολάβηση των μακροφάγων, μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό νέων ανοσολογικών βιοδεικτών. Η στρατηγική αυτή βέβαια δεν έχει προτιμηθεί εξαιτίας του ότι οι ανοσολογικοί δείκτες αναμένεται να επηρεάζονται σε περιπτώσεις αιμόλυσης και μόλυνσης.^[85,93,93]

3.5 ΠΡΟΦΙΛ ΣΙΔΗΡΟΥ

Είναι γνωστό ότι η ερυθροποίηση προκαλεί αλλαγές στο μεταβολισμό του σιδήρου, ο οποίος εμπλέκεται στην παραγωγή ερυθροκυττάρων και τη μεταφορά οξυγόνου. Η ενδογενής ερυθροποιητίνη εκτός από ρυθμιστής της παραγωγής ερυθροκυττάρων, είναι και ρυθμιστής του μεταβολισμού του σιδήρου, ως εκ τούτου η χορήγηση ESAs ή/και η μετάγγιση αίματος επηρεάζει τη φυσιολογία του μεταβολισμού του σιδήρου και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτόν. Στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση του σιδήρου εμπλέκονται πρωτεΐνες, όπως η είναι η φερριτίνη, η τρανσφερίνη, ο υποδοχέας τρανσφερίνης, η φερροπορτίνη, η εψιδίνη και η ερυθροφερρόνη, για τις οποίες έγινε

αναφορά και στο Κεφάλαιο 2. Επιπλέον, είναι γνωστή τακτική μαζί με τη χορήγηση κάποιου ESAs ή τη μετάγγιση αίματος να χορηγείται και συμπληρωματικός σιδήρος, διότι έχει αποδειχθεί ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του σιδήρου και των πρωτεϊνών αυτών με χρήση μεθόδων ELISA και LC-MS/MS θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε μια στρατηγική μελέτης των επιπέδων και της ρύθμισης σιδήρου (ironomics), αντίστοιχα με την παρακολούθηση των αιματολογικών παραμέτρων, για τον καθορισμό ενός προφίλ σιδήρου για κάθε αθλητή.^[29,74]

Το προφίλ του σιδήρου ενός αθλητή εμφανίζει συγκεκριμένες μεταβολές έπειτα από ντόπινγκ αίματος (Εικόνα 3.3). Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα σιδήρου στο αίμα μειώνεται μετά από τη χορήγηση rHuEPO, καθώς ενεργοποιείται η διαδικασία της ερυθροποίησης στο μυελό των οστών που απαιτεί τη συμμετοχή σιδήρου. Το ίδιο συμβαίνει και μετά από την απόσυρση αίματος για αυτόλογη μετάγγιση, ενώ κατά την επανέγχυση του αίματος στον οργανισμό τα επίπεδα σιδήρου στο αίμα αυξάνονται.^[32,94]

Η τρανσφερίνη, που είναι η κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου στη κυκλοφορία, αποτελεί έναν κοινό βιοδείκτη των σχετιζόμενων με το σίδηρο διαταραχών. Όταν το αίμα μεταγγίζεται, η συγκέντρωση του σιδήρου τείνει να αυξάνεται και συνδέεται με μια γρήγορη αύξηση του κορεσμού τρανσφερίνης. Ο σίδηρος που απαιτείται για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης λαμβάνεται από ερυθροβλάστες, συνδεδεμένος με την τρανσφερίνη, μέσω του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Η μέτρηση του διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (soluble transferrin receptor, sTfR) είναι ανάλογη με τη συνολική μάζα της κυτταρικής έκφρασής του. Αυτή η παράμετρος είναι ενδιαφέρουσα για το ντόπινγκ αίματος, επειδή αντανάκλα την ερυθροποιητική δραστηριότητα του σώματος. Η αυξημένη ερυθροποίηση που προκαλείται από ενέσεις rHuEPO ή απόσυρση αίματος οδηγεί σε αύξηση του sTfR, ενώ μια ελάττωση της ερυθροποιητικής δράσης, η οποία είναι χαρακτηριστική στη μετάγγιση αίματος, συνεπάγεται μείωση του sTfR.^[74,81]

Από την άλλη πλευρά, η φερριτίνη που είναι μια πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου, συσχετίζεται αντιστρόφως με την τρανσφερίνη. Σε περιπτώσεις αυξημένης ερυθροποίησης που προκαλείται από ενέσεις rHuEPO ή απόσυρση αίματος η φερριτίνη μειώνεται, ενώ μετά από μετάγγιση αίματος αυξάνεται η συγκέντρωσή της στον ορό.^[95]

Η εψιδίνη, το πεπτίδιο του ήπατος που ρυθμίζει τη διαθεσιμότητα του σιδήρου στην ερυθροποίηση με την προσαρμογή της απορρόφησης σιδήρου και της επανακυκλοφορίας του, έχει ερευνηθεί ως νέος δυναμικός βιοδείκτης μετάγγισης αίματος.^[32] Μελέτες έδειξαν ότι η μετάγγιση αίματος αυξάνει σημαντικά τις συγκεντρώσεις της εψιδίνης στις 12 h και 1 ημέρα μετά την επανέγχυση κατά 7 και 4 φορές, αντίστοιχα,

χωρίς αύξηση των φλεγμονωδών δεικτών, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) και τα WBC.^[95] Επιπλέον, η εψιδίνη συσχετίζεται με τη φερριτίνη και μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης της αντίδρασης σιδήρου που απαιτείται για την ερυθροποίηση. Έτσι, στη χορήγηση rHuEPO και την απόσυρση αίματος η εψιδίνη μειώνεται 24 h μετά τη χορήγηση, επιτρέποντας στο σίδηρο να βγει στην κυκλοφορία του αίματος και να συμβάλλει στην παραγωγή ερυθροκυττάρων.^[29,74,96] Η ίδια μείωση έχει παρατηρηθεί και μετά από χορήγηση άλλων ESAs, όπως σταθεροποιητών HIF και Sotatrcpt.^[97] Συνεπώς, η εψιδίνη μπορεί να είναι ένας νέος δυναμικός βιοδείκτης για την ανίχνευση ESAs. Το μέγεθος της πεπτιδικής ορμόνης (25 αμινοξέα) επιτρέπει την ποσοτικοποίησή της σε ανθρώπινο πλάσμα ή ορό χρησιμοποιώντας LC-MS/MS.^[29,98] Συγκεκριμένα, η εψιδίνη-25 φαίνεται να είναι η ισομορφή εψιδίνης με τον πιο βιολογικά ενεργό ρόλο στην ομοίωση σιδήρου και έχει την υψηλότερη συγκέντρωση από τις άλλες ισομορφές (εψιδίνη-20, εψιδίνη-22, εψιδίνη-24) στον ορό, αλλά απουσία κατάλληλων αντισωμάτων που θα δεσμεύουν μόνο αυτή την ισομορφή προτιμάται η ανίχνευσή της με LC αντί για ELISA.^[98]

Η πρόσφατα ανακαλυφθείσα ερυθροφερρόνη έχει αναδειχθεί ως ένας ενδιαφέρων υποψήφιος βιοδείκτης ντόπινγκ αίματος. Παράγεται από ερυθροβλάστες μετά από υποξία ή διέγερση με ερυθροποιητίνη και καταστέλλει την έκφραση της εψιδίνης.^[99] Σε περιπτώσεις αυξημένης ερυθροποίησης που προκαλείται από ενέσεις rHuEPO ή απόσυρση αίματος η ερυθροφερρόνη αυξάνεται, οδηγώντας στην ελάττωση της εψιδίνης, ενώ μετά από μετάγγιση αίματος μειώνεται η συγκέντρωσή της, για αυτό και σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα της εψιδίνης είναι υψηλά.^[29,74] Σε μελέτες χορήγησης συνδυασμένων ερυθροποιητινών νέας γενιάς, τα επίπεδα ερυθροφερρόνης αυξήθηκαν σημαντικά από την τρίτη ημέρα της χορήγησης dEPO ή CERA, ενώ μειώθηκαν στις 7 ή 14 ημέρες αντίστοιχα μετά τη χορήγηση.^[100]

	ΣΙΔΗΡΟΣ	ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ	εTIR	ΕΨΙΔΙΝΗ	ΦΕΡΡΟΠΟΡΙΤΙΝΗ	ΕΡΥΘΡΟΦΕΡΡΟΝΗ
ΧΟΡΗΓΗΣΗ rHuEPO	↓	↓	↑	↓	↑	↑
ΕΠΑΝΕΓΧΥΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	↑	↑	↓	↑	↓	↓
ΑΠΟΣΥΡΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	↓	↓	↑	↓	↑	↑

Εικόνα 3.3. Μεταβολές του προφίλ του σιδήρου έπειτα από μεθόδους ντόπινγκ αίματος.

Επειδή όλες αυτές οι εμπλεκόμενες στο μεταβολισμό του σιδήρου πρωτεΐνες επιδεικνύουν υψηλή διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων, η ατομική διαχρονική παρακολούθησή τους σε μια προσέγγιση με τη μορφή προφίλ σιδήρου, φαίνεται να είναι μια κατάλληλη στρατηγική για την ανίχνευση της χειραγώγησης του αίματος. Ωστόσο, όπως και το προφίλ αίματος, έτσι και το προφίλ σιδήρου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η άσκηση, η φλεγμονώδης απόκριση, η προπόνηση σε υψόμετρο, η χορήγηση νόμιμων συμπληρωμάτων σιδήρου κ.α., που περιορίζουν την πλήρη εφαρμογή του στις διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ.^[29,74] Για παράδειγμα, η φερριτίνη είναι μια πρωτεΐνη οξειάς φάσης, οπότε η συγκέντρωσή της αυξάνεται σε περιπτώσεις φλεγμονής. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη συγκέντρωση της εψιδίνης, ενώ σε συνθήκες φλεγμονής μειώνεται η έκφραση ερυθροποιητίνης λόγω της δράσης αναστολέων του υποκινητή του γονιδίου της, επηρεάζοντας και το μεταβολισμό του σιδήρου.^[28] Οι διαφορές στο μεταβολισμό του σιδήρου μεταξύ ανδρών και γυναικών πρέπει επίσης να καθοριστούν καλά πριν από κάθε ενδεχόμενη εφαρμογή ενός βιολογικού διαβατηρίου σιδήρου.^[74]

3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων μπορεί να οριστεί ως η χημική μετατροπή ενός φαρμάκου από ένα βιολογικό σύστημα με σκοπό την απέκκριση του από το σύστημα αυτό. Εάν μία φαρμακευτική ουσία δεν μπορεί να απορροφηθεί από τον οργανισμό, τότε αν είναι υδατοδιαλυτή αποβάλλεται φυσιολογικά, συνήθως μέσω των ούρων, αν είναι μη υδατοδιαλυτή μεταβολίζεται κυρίως με στόχο να γίνει υδατοδιαλυτή ώστε να αποβληθεί φυσιολογικά από τον οργανισμό.^[101,102] Είναι γνωστό ότι αρκετές ουσίες που ενδιαφέρουν τον έλεγχο ντόπινγκ δεν απεκκρίνονται στα ούρα ως μητρικές ουσίες και η παρακολούθηση των μεταβολιτών τους με μεθόδους φασματομετρίας μαζών είναι υψίστης σημασίας. Η παρουσία μεταβολιτών στα ούρα παρέχει μια πρόσθετη απόδειξη-πληροφορία που ενισχύει το συμπέρασμα ότι έχει χορηγηθεί απαγορευμένη ουσία στον αθλητή, ακόμη και αν δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της ίδιας της απαγορευμένης ουσίας. Εξάλλου, ο Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών του WADA περιέχει μεταβολίτες ουσιών, ενώ έχουν γίνει και πολλές *in vitro* και *in vivo* μεταβολικές μελέτες για τον εντοπισμό νέων μεταβολιτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως έμμεσοι βιοδείκτες ανίχνευσης ντόπινγκ.^[9] Οι καλύτεροι μεταβολίτες, από τη σκοπιά του ελέγχου ντόπινγκ, δεν είναι αναγκαστικά οι πιο άφθονοι σε συγκέντρωση, αλλά εκείνοι που απεκκρίνονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αυξάνοντας το χρονικό παράθυρο ανίχνευσης.

Η λαμβανόμενη ουσία υφίσταται, μέσω του μεταβολισμού, μια σειρά από αντιδράσεις με συνέπεια, το προϊόν που εκκρίνεται στα ούρα να είναι διαφορετικό από τη μητρική ουσία. Έτσι, ο αποτελεσματικός έλεγχος ντόπινγκ προϋποθέτει τη γνώση του μεταβολισμού των εξεταζόμενων ουσιών. Ένα φάρμακο μπορεί να μεταβολιστεί στο ήπαρ, το βλεννογόνο του εντέρου, τους νεφρούς, τα επινεφρίδια, τους πνεύμονες, το δέρμα και τον πλακούντα. Η βιομετατροπή των ουσιών λαμβάνει χώρα, κυρίως, στο ήπαρ και συνίσταται από δύο διαδοχικές φάσεις. Η φάση I περιλαμβάνει αντιδράσεις των δραστικών ομάδων, όπως οξείδωση, αναγωγή, υδροξυλίωση, επιμερείωση, υδρόλυση των εστέρων και N- ή O-αποαλκυλίωση. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από ένζυμα εντοπισμένα στις μεμβράνες μικροσωματίων των ηπατικών κυττάρων, όπως είναι οι ισομορφές του κυτοχρώματος P450 και οι οξυγενάσες. Η φάση II περιλαμβάνει αντιδράσεις σύζευξης, όπως γλυκουρονίωση, μεθυλίωση, ακετυλίωση και σουλφονίωση. Η γλυκουρονίωση και η σουλφονίωση είναι οι αντιδράσεις που αφορούν την παρούσα διατριβή. Η γλυκουρονίωση αποτελεί την αντίδραση σύζευξης του υποστρώματος (μητρική ουσία ή μεταβολίτης φάσης I), με ουριδινο-5'-διφωσφορογλυκουρονικό οξύ (uridine-5'-diphosphoglucuronic acid, UDPGA) προς το σχηματισμό γλυκουρονιδίων και καταλύεται από το ένζυμο ουριδινοδιφωσφορο-γλυκουρονοσουλτοτρανσφεράση (uridine diphosphoglucuronosyl transferase, UGT), η οποία επιτρέπει την προσθήκη γλυκουρονικού οξέος σε διάφορες δραστικές ομάδες του υποστρώματος, όπως -OH, -COOH, -NH₂ και -SH, μέσω γλυκοσιδικού δεσμού. Η σουλφονίωση αποτελεί την αντίδραση σύζευξης του υποστρώματος (μητρική ουσία ή μεταβολίτης φάσης I), με 5'-φωσφοθειική-3'-φωσφοαδενοσίνη (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS), η οποία καταλύεται από το ένζυμο σουλφοτρανσφεράση (sulfotransferase, SULT), που επιτρέπει τη μεταφορά σουλφοομάδας (-SO₃) από το PAPS στο υπόστρωμα.^[101, 103, 104]

Οι χορηγούμενες ουσίες είναι δυνατόν να υποστούν μόνο τη μία από τις δύο φάσεις μεταβολισμού ή και τις δύο. Υπάρχουν, όμως, και ουσίες οι οποίες δεν μεταβολίζονται και συνεπώς εκκρίνονται στα ούρα αμετάβλητες (free compounds). Σημειώνεται ότι η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο, λόγω πολυμορφισμών, καθώς δεν έχουν όλα τα άτομα το σύνολο των γνωστών ισοενζύμων. Κάποια άτομα μεταβολίζουν το ίδιο φάρμακο με φυσιολογικούς ρυθμούς, άλλα άτομα με βραδύτερους ρυθμούς, ενώ υπάρχουν και άτομα που δεν μπορούν να το μεταβολίσουν. Η δοσολογία, η οδός και η συχνότητα χορήγησης ενός φαρμάκου μπορεί να επηρεάζουν τις μεταβολικές οδούς. Ιδιαίτερα με την από του στόματος χορήγηση, επιταχύνεται η μεταβολική αδρανοποίηση ενός φαρμάκου λόγω της υποχρεωτικής διέλευσης από τον

εντερικό βλεννογόνο και το ήπαρ (φαινόμενο αρχικής διάβασης). Επιπλέον, λόγω του φαινομένου της ενζυμικής επαγωγής η χρόνια χορήγηση φαρμάκων μπορεί να ελαττώσει τη φαρμακολογική δράση της δραστικής ουσίας διεγείροντας στο ήπαρ τη σύνθεση μικροσωματιακών ενζύμων που μεταβολίζουν τα φάρμακα. Ακόμη, πολλοί διαφορετικοί ατομικοί παράγοντες, όπως γενετικοί παράγοντες (π.χ. η συγγενής έλλειψη ενός ενζύμου), ασθένειες (π.χ. ηπατοπάθεια, νεφροπάθεια, ορμονικές διαταραχές), εγκυμοσύνη (υπερπαραγωγή ενδογενών ορμονών που ακολουθούν τις ίδιες μεταβολικές οδούς), η ηλικία (σε πολύ νεαρά ή πολύ ηλικιωμένα άτομα, τα ενζυμικά συστήματα μπορεί να εμφανίζουν λειτουργική ανεπάρκεια) και το φύλο είναι δυνατόν να επηρεάσουν κατά τρόπο εξατομικευμένο το τελικό φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Είναι γνωστό ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η διατροφή και οι συνθήκες διαβίωσης, καθώς και η συγχορήγηση άλλων φαρμάκων μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά πολλές λειτουργίες του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των μηχανισμών ηπατικής κάθαρσης.^[102] Δεδομένων όλων των παραπάνω κάθε φάρμακο μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση στο ABP μεταξύ διαφορετικών αθλητών.

3.7 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Οι μεταβολές στο προφίλ σιδήρου μπορούν να αποτελέσουν συμπληρωματικούς βιοδείκτες του ABP για την ανίχνευση ντόπινγκ αίματος, υπό την προϋπόθεση να μετρούνται βιοδείκτες που καταδεικνύουν την παρουσία ή απουσία φλεγμονής. Έτσι, το προφίλ σιδήρου μπορεί να δράσει συμπληρωματικά για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών και να ενισχύσει περαιτέρω την εγκαθίδρυση του ABP στην προσπάθεια καταπολέμησης του ντόπινγκ.^[29] Με βάση αυτή τη λογική, η μελλοντική έρευνα χρησιμοποιώντας μαθηματικά μοντέλα θα πρέπει να στραφεί σε πιθανούς συνδυασμούς των αναδυόμενων βιοδεικτών έμμεσης ανίχνευσης ντόπινγκ αίματος που αναφέρθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, ειδικά από τη στιγμή που η τακτική της χορήγησης μικροδόσεων ESAs δυσκολεύει ακόμη περισσότερο την εφαρμογή των έμμεσων βιοδεικτών.^[29,105] Οι βιοδείκτες αυτοί συχνά παρουσιάζουν καλή ευαισθησία και κακή εξειδίκευση. Διαφορετικά βιολογικά υποστρώματα, όπως τα ούρα, το ολικό αίμα, το πλάσμα ή οι DBS θα μπορούν να παράσχουν συμπληρωματικά δεδομένα και θα αυξήσουν την εξειδίκευση και τις επιδόσεις της χρήσης των βιοδεικτών. Οι διάφοροι αναδυόμενοι βιοδείκτες ντόπινγκ αίματος αντιδρούν διαφορετικά και έχουν διαφορετικό εύρος παραθύρων ανίχνευσης.

Ο συνδυασμός βιοδεικτών βελτιώνει τη διαγνωστική ακρίβεια σε σύγκριση με τη χρήση ενός μόνο δείκτη και παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο εξατομικευμένης ανάλυσης, βελτιώνοντας το γενικό παράθυρο ανίχνευσης και τη σχέση ειδικότητας-ευαισθησίας. Επομένως, ο συνδυασμός των τεχνολογιών και των μεθόδων θα επιτρέψει την αναγνώριση του βιολογικού δακτυλικού αποτυπώματος του ντόπινγκ αίματος.^[29] Απαγορευμένες ουσίες που ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών μπορεί να αφήνουν εντελώς διαφορετικό βιολογικό δακτυλικό αποτύπωμα, για αυτό το λόγο δεν υπάρχει ένας γενικός κανόνας, αλλά κάθε ουσία θα πρέπει να μελετάται χωριστά πριν την εξαγωγή σίγουρων συμπερασμάτων.^[29]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

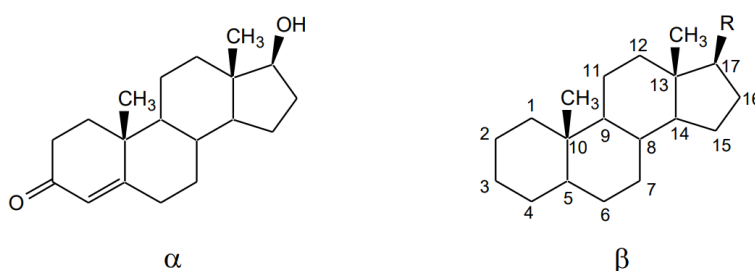
ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

4.1 ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

Οι αναβολικοί παράγοντες είναι ικανοί να ενισχύσουν την αναβολική διεργασία στον οργανισμό. Επηρεάζουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών διεγείροντας την πρωτεϊνοσύνθεση (αναβολική επίδραση) και αναστέλλοντας τη διάσπαση των πρωτεϊνών (καταβολική δράση). Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή (anabolic androgenic steroids, AAS) διακρίνονται σε ενδογενή, τα οποία παράγονται από τον οργανισμό και σε συνθετικά, τα οποία λαμβάνονται εξωγενώς και είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης (Εικόνα 4.1.α). Η τεστοστερόνη είναι η κύρια αρσενική ορμόνη του φύλου και αποτελεί ταυτόχρονα και αναβολικό και ανδρογόνο στεροειδές. Συντίθεται από χοληστερόλη στα κύτταρα Leydig των όρχεων, υπό την επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης, ενώ μικρές ποσότητες τεστοστερόνης εκκρίνονται επίσης από τις ωθήκες και τα επινεφρίδια. Η ανδρογόνος της δράση συμβάλει στην ανάπτυξη των ανδρικών χαρακτηριστικών, όπως ωρίμανση γεννητικών οργάνων, βάθυνση της φωνής και αυξημένη τριχοφυΐα, ενώ η αναβολική της δράση προάγει τη σύνθεση πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς και όργανα οδηγώντας μεταξύ άλλων στην ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος, στην αύξηση της οστικής πυκνότητας και την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Επιπρόσθετα, ο θεραπευτικός δείκτης της τεστοστερόνης ισούται με 1 που σημαίνει ότι υπάρχει ομοιότητα στην αναλογία μεταξύ αναβολικών και ανδρογόνων επιδράσεων.^[106-108]

Τα συνθετικά AAS είναι ανάλογα της τεστοστερόνης, έχουν σχεδιαστεί για να προάγουν την αύξηση της άπαχης μυϊκής μάζας και χρησιμοποιούνται θεραπευτικά για τη θεραπεία παθήσεων που οφείλονται σε ανεπάρκεια στεροειδών ορμονών και ασθένειες που οδηγούν σε απώλεια μυϊκής μάζας.^[108] Τα στεροειδή είναι μόρια, των οποίων η δομή βασίζεται στο τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων που παρατίθεται στην Εικόνα 4.1.β. Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή αποτελούνται από δεκαεννιά άτομα άνθρακα με οξυγονούχες ομάδες, δηλαδή, υδροξυλομάδες, κετονομάδες στις θέσεις C3 και C17 και χωρίς πλευρική ανθρακική αλυσίδα στη θέση C17. Η βασική δομή των περισσότερων AAS είναι ο πυρήνας της τεστοστερόνης, ένα α,β-ακόρεστο, 3-κετο στεροειδές. Μια τεράστια ποικιλία χημικώς τροποποιημένων στεροειδών έχουν συντεθεί από αυτήν τη φυσική δομή,

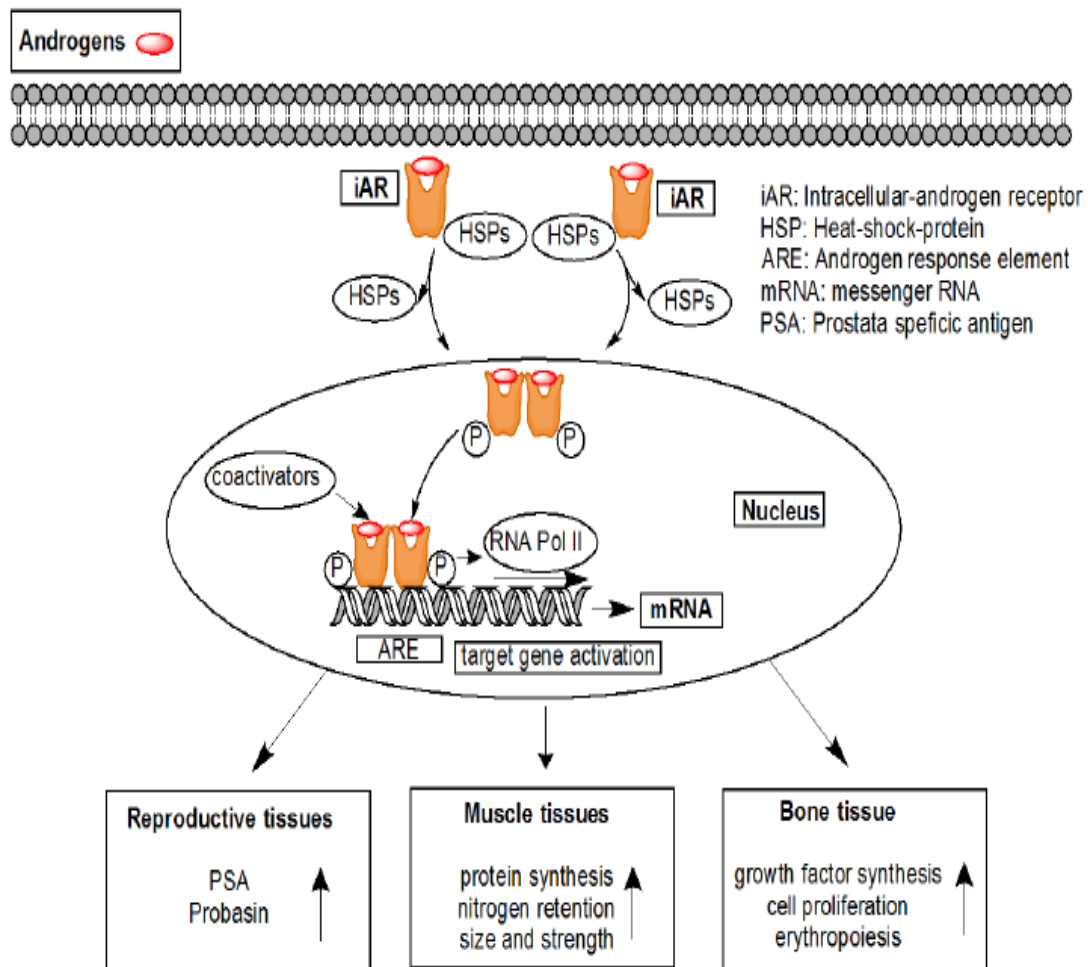
στην προσπάθεια για μεγιστοποίηση των αναβολικών επιδράσεων και ελαχιστοποίηση των ανδρογόνων επιδράσεων. Τροποποίηση του πυρήνα της τεστοστερόνης με αντικατάσταση του υδρογόνου με μεθύλιο ή αιθύλιο στη θέση C17 μπορεί να εμποδίσει τον μεταβολισμό πρώτης διέλευσης, επιτρέποντας την από του στόματος χορήγηση της τεστοστερόνης. Για παρεντερική χορήγηση, το υδροξύλιο στη θέση C17 γενικά εστεροποιείται, επιτρέποντας μια πιο αργή απορρόφηση. Άλλες τυπικές τροποποιήσεις είναι η απομάκρυνση του μεθυλίου της θέσης C19, όπως στην νανδρολόνη, η προσκόλληση διαφόρων ομάδων στη θέση C2, η σύνδεση μεθυλίου στην ομάδα C1 ή C7, η σύνδεση υδροξυλίου ή χλωρίου στη θέση C4, και η εισαγωγή διπλών δεσμών στις θέσεις C1, C4, C6 ή C9.^[109]



Εικόνα 4.1. α) δομή τεστοστερόνης, β) στεροειδής σκελετός.

Η τεστοστερόνη και τα συνθετικά της ανάλογα ασκούν τη φαρμακολογική τους δράση σε κυτταρικό επίπεδο, συνδεόμενα με τους υποδοχείς ανδρογόνων (androgen receptor, AR). Η συγγένεια ενός AAS προς τον AR, μπορεί να είναι υψηλή, χαμηλή ή μηδενική και πρέπει πρώτα να γίνει μετατροπή του ανδρογόνου σε πιο ενεργή μορφή. Ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης του AR είναι η άμεση ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Η δέσμευση ενός ανδρογόνου στον ενδοκυττάριο AR έχει ως αποτέλεσμα μία αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία με τη σειρά της προκαλεί διάσπαση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 90 (heat shock proteins 90, HSP90). Πρόκειται για πρωτεΐνες-συνοδούς που διατηρούν τον υποδοχέα σε κατάσταση που επιτρέπει τη σύνδεση με το συνδέτη του. Ο υποδοχέας διμερίζεται και μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου, όπου και φωσφορυλιώνεται σε αρκετά κατάλοιπα σερίνης επιτρέποντας τη σύνδεση με άλλους συνενεργοποιητές γονιδίων. Το διμερές του υποδοχέα ανδρογόνου μαζί με τους συνενεργοποιητές προσδέονται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA γνωστή ως στοιχείο απόκρισης σε ανδρογόνο (androgen response element, ARE), οδηγώντας σε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Η RNA-πολυμεράση II μεταγράφει τις περιοχές-στόχους του DNA σε mRNA, το οποίο μετά τη μετάφραση

καταλήγει στην παραγωγή διαφορετικών πρωτεϊνικών προϊόντων (Εικόνα 4.2). Το αποτέλεσμα αυτής της απόκρισης μπορεί να είναι η αύξηση της έκφρασης μιας πρωτεΐνης που επάγει την ενεργοποίηση της μυϊκής αύξησης, τη σύνθεση αυξητικών παραγόντων, την αύξηση των επιπέδων του ειδικού προστατικού αντιγόνου ή την αύξηση της ερυθροποίησης.^[110-112]



Εικόνα 4.2. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα ανδρογόνων.

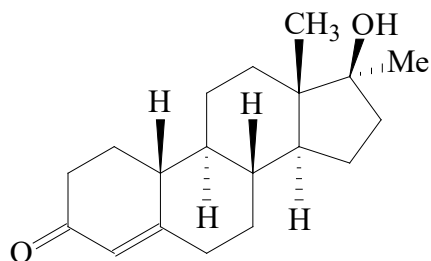
Ο μηχανισμός δράσης των AAS μπορεί να ακολουθεί και μη γονιδιακή οδό σε κύτταρα σκελετικών μυών και σε καρκινικά κύτταρα, μέσω σύνδεσης με διάφορους μεμβρανικούς υποδοχείς (μεμβρανικούς AR, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων κ.α.) και κανάλια μεταφοράς ιόντων, για την ενεργοποίηση δεύτερων μηνυμάτων μεταγωγής σήματος. Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί δράσης των AAS εκτός από τον γενικό μηχανισμό δράσης μέσω άμεσης σύνδεσης με τον AR (γονιδιακή και μη γονιδιακή οδός). Ένα μη ενεργό AAS μπορεί μέσω του ενζύμου 5α-αναγωγάση να μετατραπεί σε πιο ενεργή ουσία,

όπως η διϋδροξυτεστοστερόνη, και έπειτα να συνδεθεί με τον AR. Επιπρόσθετα, ενδοκυτταρικά μπορεί να γίνει μετατροπή AAS σε κάποια ορμόνη γυναικείου φύλου, όπως η οιστραδιόλη και η οιστρόνη και να συνδεθούν με τον υποδοχέα οιστρογόνων (estrogen receptor, ER). Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται όταν υπάρχει κορεσμός των AR από τα κυκλοφορούντα AAS, υποδεικνύοντας μια ανταγωνιστική δράση με τα οιστρογόνα σε περιπτώσεις που τα AAS υπάρχουν σε υπερφυσιολογικά επίπεδα στον ορό. Ανταγωνιστική σχέση υπάρχει και με τα γλυκοκορτικοειδή ως προς τον υποδοχέα τους (glucocorticoid receptor, GR). Τα γλυκοκορτικοειδή εκκρίνονται μετά από έντονη σωματική ή ψυχολογική καταπόνηση και έχουν καταβολικές ιδιότητες. Έτσι, τα AAS συνδέονται στον GR και εμποδίζουν τον καταβολισμό, για αυτό και χρησιμοποιούνται σαν θεραπεία σε διάφορες ασθένειες, όπως η οστεοπόρωση.^[111]

Λόγω της ικανότητάς τους να αυξάνουν τη δύναμη και την αθλητική απόδοση, η χρήση των AASs απαγορεύτηκε από την ΔΟΕ το 1976, ενώ μετέπειτα συμπεριελήφθησαν και στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA, στην κατηγορία S1.1 και η χρήση τους απαγορεύεται εντός και εκτός αγώνα.^[9] Οι κίνδυνοι για την υγεία που μπορεί να προκληθούν από μακροχρόνια χρήση ή υπερβολικές δόσεις AAS περιλαμβάνουν επιβλαβείς αλλαγές στα επίπεδα χοληστερόλης (αυξημένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας και μειωμένη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας), ακμή, υψηλή αρτηριακή πίεση, ηπατική βλάβη και επικίνδυνες αλλαγές στη δομή της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Η επίδραση των αναβολικών στεροειδών στην καρδιά μπορεί να προκαλέσει έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικά επεισόδια. Καταστάσεις που σχετίζονται με ορμονικές ανισορροπίες όπως η υπογονιμότητα, η γυναικομαστία και η μείωση του μεγέθους των όρχεων μπορούν επίσης να προκληθούν από τα AAS. Σε γυναίκες και παιδιά, τα AAS μπορεί να προκαλέσουν μη αναστρέψιμο ανδρισμό. Παρά την απαγόρευσή τους και τις σοβαρές επιπτώσεις που μπορούν να φέρουν στην υγεία, τα AASs εξακολουθούν να είναι η πιο συχνά απαγορευμένη ομάδα ουσιών που αναφέρονται ως Ανεπιθύμητα Αναλυτικά Ευρήματα (Adverse Analytical Findings, AAFs) στον αθλητισμό από τα διαπιστευμένα εργαστήρια του WADA.^[112, 113]

Η μεθυλονορτεστοστερόνη (methyltestosterone, 17-hydroxy-17-methyl-5-estr-4-ene-3-one, 17 α -MeNT) (Εικόνα 4.3), γνωστή και ως μεθυλοεστερενολόνη ή νορμεθανδρολόνη, είναι μια προγεστίνη και χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς σε συνδυασμό με ένα οιστρογόνο στη θεραπεία της αμηνόρροιας και των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης στις γυναίκες. Η μεθυλονορτεστοστερόνη εκτός από προγεστερογόνο και οιστρογόνο δράση είναι επίσης ένα αναβολικό ανδρογόνο στεροειδές που περιλαμβάνεται

στον Κατάλογο του WADA στην κατηγορία S1.1. Εμπορικά είναι διαθέσιμη με τη μορφή ποικίλων σκευασμάτων, όπως Batynid, Ginecosid, Ginecoside, Gynomin, Lutenin, Matronal, Mediol, Metalutin, Methalutin, Orgasteron, Orosteron, and Renodiol.^[114,115]



Εικόνα 4.3. Χημική δομή μεθυλονορτεστοστερόνης.

Η ευκολία στην πρόσβαση έδωσε τη δυνατότητα σε πολλούς αθλητές να προβούν σε κατάχρηση μεθυλονορτεστοστερόνης, καθώς και σε εργαστήρια να μελετήσουν τον μεταβολισμό της. Η μεθυλονορτεστοστερόνη έχει ανιχνευθεί στα ούρα και στο πλάσμα αλόγων έπειτα από ανάλυση με LC-MS/MS.^[116] Η in vivo μελέτη του μεταβολισμού της ουσίας οδήγησε στην ανίχνευση δύο κύριων μεταβολιτών, πέραν την μητρικής ουσίας, σε ανθρώπινα ούρα με χρήση GC-MS/MS.^[117-118] Σε μεταγενέστερη ανεξάρτητη in vivo μελέτη του ανθρώπινου μεταβολισμού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των μεταβολιτών αυτών, ενώ ανιχνεύθηκαν και ακόμη δύο μεταβολίτες.^[119] Βάσει αυτών των μελετών, η παρακολούθηση της κατάχρησης της μεθυλονορτεστοστερόνης στον αθλητισμό βασίζεται στην ανίχνευση της μητρικής ένωσης και των κύριων μεταβολιτών της (ελεύθερων ή συζευγμένων με γλυκουρονικό οξύ) με χρήση GC-MS/MS. Ωστόσο, δεν έχει γίνει ακόμη αναφορά για μεταβολίτες συζευγμένους με θειικό οξύ.

4.2 LGD-4033

Η νέα αναβολική ουσία με το όνομα LGD-4033 [(4-(2-(2,2,2-τριφθορο-1-υδροξυαιθυλο) πυρρολιδιν-1-υλο)-2-(τριφθορομεθυλο) βενζονιτρίλιο] ανήκει στην ομάδα των Εκλεκτικών Ρυθμιστών Υποδοχέα Ανδρογόνων (Selective Androgen Receptor Modulators, SARMs), οι οποίοι από το 2008 συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία S1.2 του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών του WADA και η χρήση τους απαγορεύεται εντός και εκτός αγώνα.^[9] Το πρώτο θετικό δείγμα αθλητή σε SARM ανιχνεύθηκε το 2010. Πρόκειται

για μια νέα κατηγορία φαρμάκων η χρήση των οποίων έχει τα ίδια αποτελέσματα με τη χρήση αναβολικών αλλά με μειωμένη ή καθόλου ανδρογόνο δράση.

Οι SARMs είναι κυρίως μη στεροειδείς ενώσεις που αλληλεπιδρούν επιλεκτικά με τον AR επάγοντας αναβολικά αποτελέσματα με λιγότερες ανδρογονικές παρενέργειες σε σύγκριση με τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή. Δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός ο μηχανισμός δράσης τους, αλλά θεωρείται ότι δεν ακολουθούν το μονοπάτι μετατροπής σε διϋδροξυτεστοστερόνη. Κυρίως συμβάλουν στη μυϊκή υπερτροφία και στην επούλωση των οστών, χωρίς να επηρεάζουν δυσμενώς τον προστάτη και το καρδιαγγειακό σύστημα, ενώ έχει παρατηρηθεί και σημαντική μεταβολή του αιματοκρίτη, της αρτηριακής πίεσης και διάφορων λιπιδίων και ορμονών στο αίμα μετά από τη χορήγηση SARM.^[111,120,121] Επιπλέον οι SARMs παρουσιάζουν καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα, πιο σταθερά προϊόντα μεταβολισμού και μειωμένη ηπατική τοξικότητα σε σχέση με τα ενέσιμα αναβολικά στεροειδή. Αποτελούν στόχους της ιατρικής έρευνας, για χρήση ως θεραπεία κυρίως σε διαταραχές των μυών, καχεξία, σαρκοπενία, οστεοπόρωση και στον υπογοναδισμό, με τα υποψήφια φάρμακα να βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες και να μην έχουν πάρει άδεια κυκλοφορίας.^[120]

Για όλους τους παραπάνω λόγους οι αθλητές κάνουν κατάχρηση των SARMs για λόγους ντόπινγκ. Μπορούν να τους προμηθευτούν εύκολα μέσω διαδικτύου, καθώς εμπεριέχονται σε διάφορα συμπληρώματα διατροφής, ή ακόμη και στη μαύρη αγορά, από τη στιγμή που δεν έχουν άδεια κυκλοφορίας και βρίσκονται σε στάδια κλινικών μελετών. Ενώ οι SARMs χρησιμοποιούνται σήμερα από αθλητές, τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην ανίχνευσή τους, λόγω απουσίας αντίστοιχων υλικών αναφοράς, αλλά κυρίως λόγω ανεπαρκών επιστημονικών γνώσεων αναφορικά με τον μεταβολισμό τους. Έχουν δημοσιευθεί *in vitro* μεταβολικές μελέτες και τα διαπιστευμένα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ βασίζονται στην παρακολούθηση των μητρικών ενώσεων.

Το LGD-4033 είναι ένας SARM που, αν και χρησιμοποιείται από τους αθλητές, δεν έχει εγκριθεί ακόμη από τον FDA για τη θεραπευτική του χρήση, καθώς βρίσκεται σε στάδιο κλινικής μελέτης III. Στο διαδίκτυο είναι διαθέσιμο τουλάχιστον από το 2015 ως σκεύασμα αύξησης της άλιπης μυϊκής μάζας, συνήθως με την εμπορική επωνυμία Ligandrol, αλλά και με άλλες όπως Anabolicum ή VK5211.^[123] Η εμπορική διαθεσιμότητά του έδωσε κίνητρο για μεταβολικές μελέτες. Οι πρώτες προσεγγίσεις αφορούσαν *in vitro* μελέτες σε μικροσωμάτια ανθρώπινου ήπατος, καθώς η δραστηριότητα ενός ηπατικού ενζύμου παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του LGD-4033. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη ενός πλούσιου μεταβολικού προφίλ με μεταβολίτες φάσης I και φάσης II.^[124,125] Τα αποτελέσματα αυτά

επιβεβαιώθηκαν και συμπληρώθηκαν από in vivo μελέτες που έγιναν με χορήγηση του φαρμάκου σε εθελοντή, αλλά και από μελέτες σε πραγματικά δείγματα αθλητών οι οποίοι βρέθηκαν θετικοί σε LGD-4033.^[126,127] Πρόσφατα, μεταβολίτες του LGD-4033 ανιχνεύθηκαν στα ούρα και το πλάσμα αλόγων.^[128] Ωστόσο, δεν είναι ακόμη γνωστά τα παράθυρα ανίχνευσης και τα προφίλ έκκρισης των παραπάνω μεταβολιτών.

4.3 ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗ

Η ερυθροποιητίνη ανήκει στην κατηγορία S2 του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών και η χρήση της απαγορεύεται εντός και εκτός αγώνα.^[9] Είναι η βασική πρωτεΐνη ρύθμισης της ερυθροποίησης και αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 165 αμινοξέων με μοριακό βάρος 30,4 kDa, που συντίθεται κατά βάση στα περισωληναριακά νεφρικά κύτταρα. Το 90% της κυτταροκίνης αυτής στον άνθρωπο συντίθεται στο νεφρό, το υπόλοιπο 10% συντίθεται στο ήπαρ, ενώ ελάχιστα ποσοστά σύνθεσης ανιχνεύονται και στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου, όπου η αποστολή της είναι η νευροπροστασία. Από τον νεφρό μεταφέρεται μέσω του πλάσματος στο μυελό, όπου αρχίζει η δράση της με τη σύνδεσή της στον αντίστοιχο υποδοχέα EPO-R, που εκφράζεται στα ερυθροειδικά κύτταρα. Η σύνδεση αυτή προκαλεί τη μετάδοση μιας σειράς ενδοκυττάρων μηνυμάτων στον πυρήνα, από όπου κατευθύνεται η προαγωγή της δέσμευσης των προγονικών κυττάρων προς την ερυθρά σειρά, η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων που συμβάλουν στη σύνθεση διαφόρων δομικών πρωτεϊνών, η προαγωγή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης CFU-E, προερυθροβλαστών και βασεόφιλων ερυθροβλαστών, η διάσωση των ωριμαζόντων κυττάρων της ερυθράς σειράς από τον πρόωρο θάνατο με την ενίσχυση της έκφρασης αντι-αποπτωτικών γονιδίων, και η προαγωγή της σύνθεσης αιμοσφαιρίνης.^[25-27]

Η ερυθροποιητίνη δεν αποθηκεύεται και η έκκρισή της ρυθμίζεται ταχύτατα μέσω ειδικών μοριακών μηχανισμών με βάση τα επίπεδα του οξυγόνου στον νεφρικό ιστό. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης στο αίμα, τα οποία είναι υψηλά στην αναιμία και χαμηλά έως μηδενικά στην πολυκυτταραιμία.^[27] Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή σε φυσιολογικές συνθήκες έχει συγκέντρωση στο πλάσμα περίπου 10^{-11} mol/L (ή 15-30 mU/mL) και παρά αυτή τη μικρή ποσότητα μπορεί να αυξηθεί πάνω από τρεις φορές κάτω από συνθήκες υποξίας. Σε περιπτώσεις βαριάς υποξίας το ήπαρ συμμετέχει στην παραγωγή μέχρι και του 30% περίπου της ολικής ερυθροποιητίνης.^[30]

Λεπτομερής αναφορά σχετικά με τον τρόπο δράσης της ερυθροποιητίνης και τη ρύθμιση της λειτουργίας της έγινε στο Κεφάλαιο 2.

Τη δεκαετία του 1970 η ερυθροποιητίνη απομονώθηκε από τα ούρα αρρώστων με απλαστική αναιμία, ενώ τη δεκαετία του 1980 καθορίστηκε η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του γονιδίου της ερυθροποιητίνης στον άνθρωπο, έγινε η παραγωγή ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης με μεθόδους βιοτεχνολογίας και οι πρώτες κλινικές εφαρμογές της σε νεφροπαθείς.^[27,40] Τα επόμενα χρόνια μέχρι σήμερα η ερυθροποιητίνη χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της αναιμίας σε ασθενείς με νεοπλάσματα, σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), ρευματοειδή αρθρίτιδα, μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, αιμοσφαιρινοπάθειες, κατά τη διάρκεια και μετά την εγκυμοσύνη, όπως και στην αναιμία των πρόωρων νεογνών, ενώ εφαρμόστηκε ευρέως ως ενισχυτική θεραπεία σε αυτόλογες μεταγγίσεις.^[27] Η ανάπτυξη των ESAs για τη θεραπεία ασθενειών όπως η αναιμία είναι έντονη τις τελευταίες δεκαετίες με αποτέλεσμα να έχουν πάρει άδεια προς θεραπευτική χρήση ασθενών έξι διαφορετικές ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες παγκοσμίως και πάνω από 90 ανάλογα ερυθροποιητίνης.^[28,129] Εκτός από τις αιμοποιητικές επιδράσεις, η σύνθεση της EPO στον EPO-R σηματοδοτεί και άλλες λειτουργίες σε διάφορους ιστούς και συστήματα, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα, την καρδιά, το νεφρό, το γαστρεντερικό σύστημα και την αναπαραγωγική οδό.^[29,130] Επιπλέον, οι πλειοτροπικές επιδράσεις της ερυθροποιητίνης δεν προκαλούνται μόνο από ενδοκρινείς, αλλά και από αυτοκρινείς και παρακρινείς μηχανισμούς.^[131]

Σύντομα, μετά την κυκλοφορία της, έγινε γνωστό ότι η ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη αυξάνει την απόδοση σε αερόβια αθλήματα. Μελέτες έδειξαν ότι η υποδόρια χορήγηση ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης σε δόσεις 60-350 U/kg σωματικού βάρους την εβδομάδα για 4 έως 6 εβδομάδες αυξάνει ουσιαστικά τη μέγιστη αερόβια ικανότητα O_{2max} και το χρόνο εξάντλησης του αθλητή.^[132] Μεταγενέστερες μελέτες, στις οποίες rHuEPO χορηγήθηκε σε υγιείς εθελοντές σε χαμηλότερες δοσολογίες, έδειξαν αύξηση της O_{2max} κατά 6% - 12% και αύξηση του HCT κατά περίπου 0,50, αλλά απέδειξαν επίσης ότι ο χρόνος μέχρι την εξάντληση (στο εργαστήριο) αυξάνεται κατά 50% σε ένα δεδομένο επίπεδο O_{2max} .^[133] Το ενδιαφέρον για τον έλεγχο ντόπινγκ είναι ότι όταν η χορήγηση rHuEPO διακόπτεται σε υγιείς εθελοντές, το O_{2max} παραμένει αυξημένο για τουλάχιστον 3 εβδομάδες. Τα παραπάνω ποσοστά βέβαια αμφισβητούνται συχνά, καθώς η επίδραση στην αθλητική απόδοση μπορεί να είναι πολυπαραγοντική και να εξαρτάται και από την προπόνηση.^[23]

Η γνώση της θετικής επίδρασης που μπορεί να έχει στην αερόβια ικανότητα η ερυθροποιητίνη, σε συνδυασμό με την απομόνωση και κλωνοποίηση του γονιδίου της το 1985, οδήγησαν στην παραγωγή και κατάχρηση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για σκοπούς ντόπινγκ αίματος. Οι ανθρώπινες ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες έχουν τον ίδιο αριθμό αμινοξέων με την ενδογενή και παράγονται με χρήση καλλιεργειών κυτταρικών σειρών όπως ωθηκικών κυττάρων κινέζικου χάμστερ (Chinese Hamster Ovary, CHO) ή νεφρικών κυττάρων μικρού χάμστερ (Baby Hamster Kidney, BHK).^[29] Το μόριο της ενδογενούς ερυθροποιητίνης περιέχει τρεις N-συνδεδεμένες και μια O-συνδεδεμένη ολιγοσακχαριτικές πλευρικές αλυσίδες (N-γλυκάνες και O-γλυκάνη). Οι γλυκάνες αντιπροσωπεύουν το 35-40% της μοριακής μάζας της ερυθροποιητίνης και η N-γλυκοζυλίωση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη βιολογική δραστηριότητα της ερυθροποιητίνης, επειδή ρυθμίζει τη συγγένειά της με τον υποδοχέα της και το χρόνο ημιζωής της στον ορό.^[29,129] Επειδή οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις εξαρτώνται από τα ένζυμα των κυττάρων στα οποία πραγματοποιείται η σύνθεση της ερυθροποιητίνης, η χρήση διαφόρων κυτταρικών σειρών έχει ως αποτέλεσμα διαφορές στην γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης. Έτσι, οι βιοχημικές και βιολογικές ιδιότητες μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των εποετινών που παράγονται σε διαφορετικά κύτταρα. Ανάλογα με τη σύνθεση και η φύση του προτύπου γλυκοζυλίωσης, οι εμπορικά παραγόμενες εποετίνες ακολουθούνται από ένα ελληνικό γράμμα (α, β, δ, ω, ζ). Διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία υποδεικνύονται με τη χρήση ενός τυχαίου προθέματος (π.χ. δαρμποεποετίνη-α).^[29,30,134]

Η εποετίνη-α, που παράγεται στην CHO κυτταρική σειρά, ήταν η πρώτη που έγινε εμπορικά διαθέσιμη το 1989 και εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία αναιμικών ασθενών με CKD. Έπειτα εγκρίθηκε και για τη θεραπεία της αναιμίας που σχετίζεται με χημειοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο ή με αντική θεραπεία σε ασθενείς με AIDS, καθώς και για την προετοιμασία της αυτόλογης μετάγγισης πριν από χειρουργική επέμβαση. Ο χρόνος ημιζωής της στον ορό είναι περίπου 8 ή 24 h όταν χορηγείται ενδοφλέβια ή υποδόρια, αντιστοίχως. Η βιοδιαθεσιμότητά της είναι χαμηλή και απαιτούνται έως τρεις ενέσεις την εβδομάδα για την επίτευξη θεραπευτικών αποτελεσμάτων.^[29,135] Η εποετίνη-β, που παράγεται στην CHO κυτταρική σειρά, έγινε εμπορικά διαθέσιμη το 1990. Παρότι έχει εκφραστεί και αυτή στην CHO κυτταρική σειρά, η γλυκοζυλίωσή της και η βιολογική της δράση είναι λίγο διαφορετικές σε σχέση με την εποετίνη-α. Τη δεκαετία του 1990 και ιδιαίτερα από το 2004, όταν οι ευρεσιτεχνίες για την εποετίνη-α και -β έληξαν, αρκετές εταιρείες άρχισαν να παράγουν rHuEPO με διαφορετικές μεταμεταφράσεις τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, η εποετίνη-ω παρήχθη σε κύτταρα BHK, ενώ η εποετίνη-δ είναι η μόνη που

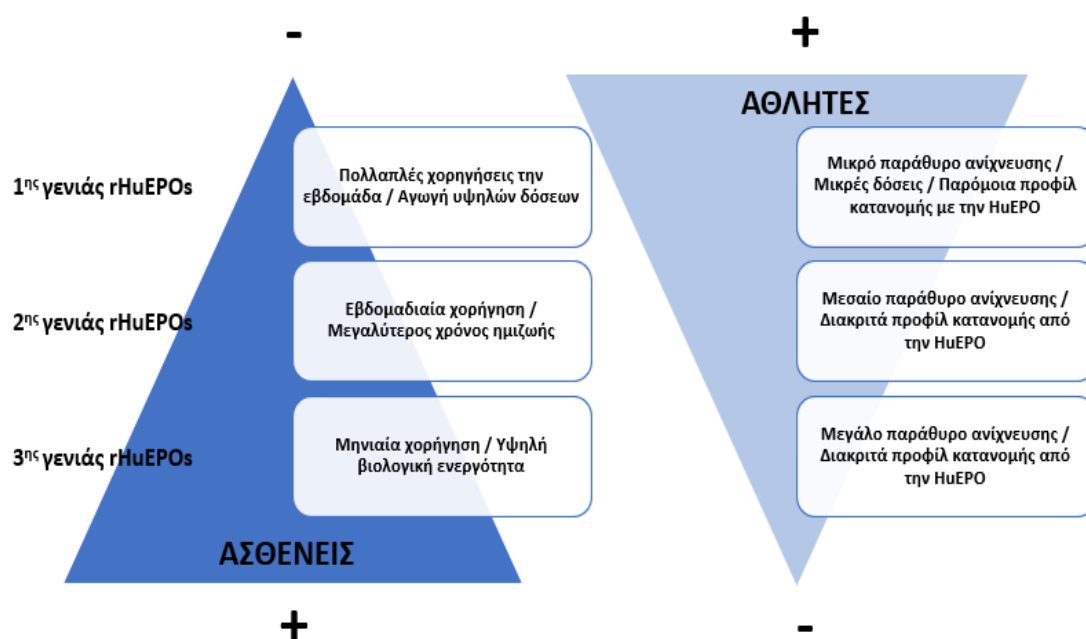
εκφράστηκε στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HT-1080 και η χρήση της απαγορεύτηκε το 2009 από τον WADA. Ωστόσο, κανένα από αυτά τα προϊόντα δεν πέτυχε να βελτιώσει τη βιολογική δραστηριότητα ή το χρόνο ημιζωής της rHuEPO. Βέβαια, για τις χρήσεις στο ντόπινγκ, ο σύντομος χρόνος απομάκρυνσης είναι συμφέρων, επειδή το παράθυρο ανίχνευσης περιορίζεται, ενώ η επίδραση διατηρείται.^[29] Αξίζει να σημειωθεί ότι, μόλις η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο αίμα αυξηθεί μετά από μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων ή χορήγηση ESA, ακόμη και πολύ χαμηλές δόσεις ESA ή με λιγότερο συχνές ενέσεις είναι αρκετές για να διατηρήσουν την αύξηση αυτή. Σε αυτή την περίπτωση, το παράθυρο ανίχνευσης της εποεΐνης στα ούρα είναι μόνο 12-18 h, σε σύγκριση με περίπου 3 ημέρες σε κανονική δοσολογία (50 U/kg σωματικού βάρους 3 φορές την εβδομάδα).^[23,30]

Η δεύτερης γενιάς ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη, dEPO είναι γνωστή και ως νέα πρωτεΐνη διέγερσης ερυθροποίησης (novel erythropoiesis-stimulating protein, NESP) και εγκρίθηκε το 2011 από τον FDA. Έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, έπειτα από μετάλλαξη πέντε αμινοξέων της ενδογενούς ερυθροποιητίνης, που επέτρεψε την προσθήκη δύο ακόμη N-συνδεδεμένων αλυσίδων υδατανθράκων.^[29,56] Αυτές οι αλλαγές αύξησαν τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, μείωσαν τη συγγένεια προς τον υποδοχέα και αύξησαν τον χρόνο ημιζωής στο τριπλάσιο, περίπου 24-26 h. Λόγω του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής, μειώθηκε η απαραίτητη δοσολογία σε μία εβδομαδιαία ή και μηνιαία βάση από τις 3 φορές την εβδομάδα που ήταν η δοσολογία για τις εποεΐνες πρώτης γενιάς.^[136] Ωστόσο, αυτό δεν ήταν επιθυμητό για την παράνομη χρήση του ντόπινγκ, επειδή αύξησε το παράθυρο ανίχνευσης σε 7 ημέρες και παράλληλα τον κίνδυνο θετικού αποτελέσματος σε πιθανό έλεγχο.^[23,29]

Η τρίτης γενιάς CERA εμφανίστηκε στην αγορά το 2007 και εκφράστηκε στην CHO κυτταρική σειρά που παρήγαγε εποεΐνη-β συνδεδεμένη με PEG.^[29] Η πεγκυλίωση οδήγησε σε αύξηση του μοριακού βάρους σε περίπου 60 kDa, προκαλώντας χαμηλότερη συγγένεια για τον EPO-R. Επιπλέον, λόγω μεγέθους εμποδίζεται η πειραματική διήθηση από τους νεφρούς, αυξάνοντας τον χρόνο ημιζωής. Η εξαιρετική σταθερότητα της CERA στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα ένα χρόνο ημιζωής στον ορό 70-122 h, που μειώνει τη χορήγησή της σε μία φορά το μήνα ή λιγότερο.^[30,137] Λόγω του ευρύτερου παραθύρου ανίχνευσης, η CERA είναι λιγότερο πιθανό να χρησιμοποιηθεί για σκοπούς ντόπινγκ.

Είναι προφανές ότι ο στόχος της βελτίωσης των φαρμακευτικών σκευασμάτων, που προορίζονταν για τη θεραπεία ασθενών, ήταν οι αλλαγές στη δομή των ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών που θα οδηγούσαν σε μείωση του απαιτούμενου χρόνου χορήγησης θεραπευτικής δοσολογίας με ταυτόχρονη αύξηση του χρόνου ημιζωής και της επίδρασης

του φαρμάκου, αλλά και μη επιθυμητή μείωση της συγγένειας με τον EPO-R. Τα πλεονεκτήματα των ερυθροποιητινών νέας γενιάς αποτέλεσαν μειονεκτήματα για τους αθλητές, καθώς ο αυξημένος χρόνος ημιζωής αύξανε το παράθυρο ανίχνευσης της ουσίας, ενώ οι αλλαγές στη δομή των μορίων σε σχέση με την ενδογενή πρωτεΐνη, οδηγούσαν σε όλο και πιο διαφορετικά προφίλ κατανομής στις ηλεκτροφορήσεις, που έκαναν πιο εύκολη την ανίχνευσή τους (Εικόνα 4.4). Σε συνεργασία με τον WADA οι φαρμακευτικές εταιρείες που παρήγαγαν την NESP και την CERA, δηλαδή η Amgen (εμπορική ονομασία Aranesp[®]) και η Roche (εμπορική ονομασία Mircegra[®]) αντίστοιχα, παρείχαν φαρμακοκινητικές μελέτες και μεθόδους ανίχνευσης για να προλάβουν την κατάχρησή τους για σκοπούς ντόπινγκ αίματος.^[29,56]



Εικόνα 4.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των τριών διαφορετικών γενιών ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών για τους ασθενείς και τους αθλητές.

Η αποτελεσματικότητα της χορήγησης rHuEPO αυξάνεται όταν γίνει μαζί με ενδοφλέβια χορήγηση σιδήρου. Έχει αποδειχθεί ότι οι αιματολογικές παράμετροι HGB, RBC, HCT και RET% αυξάνονται σημαντικά σε αθλητές που έλαβαν rHuEPO σε κανονικές δόσεις 30 U/kg σωματικού βάρους κάθε δεύτερη ημέρα για 30-45 ημέρες, μαζί με 65 mg σιδήρου δύο φορές την εβδομάδα.^[30]

Δράση ESA με ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν και ανάλογα μόρια της ερυθροποιητίνης, όπως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σύντηξης της Epo με την περιοχή Fc της βαριάς αλυσίδας των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών IgG, καθώς αποδείχθηκε ότι διεγείρουν την ερυθροποίηση μετά από χορήγηση σε κλινική μελέτη φάσης I.^[23,56] Επιπρόσθετα, άλλη μια

κατηγορία ESAs είναι οι μιμητές ερυθροποιητίνης, όπως τα ερυθρομιμητικά πεπτίδια (erythropoietin mimetic peptides, EMP), τα οποία είναι συνθετικά κυκλικά πεπτίδια περίπου 20 αμινοξέων που δεν εμφανίζουν ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία τους με την ερυθροποιητίνη.^[23,56] Ένα ισχυρό πεγκυλιωμένο διμερές EMP με την ονομασία reginesatide (ή εμπορική ονομασία Hematide) αποδείχθηκε ότι διεγείρει την ερυθροποίηση σε πειραματόζωα και σε υγιείς άνδρες εθελοντές και εγκρίθηκε το 2012 από τον FDA για τη θεραπεία ασθενών με CKD.^[23,138] Παρότι η δομή του reginesatide διαφέρει από αυτή της ερυθροποιητίνης, μπορεί να διεγείρει το διμερισμό του EPO-R και να ενεργοποιεί παρόμοιες ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης που προκαλούν ερυθροποίηση.^[29] Μία μελέτη σχετικά με την ασφάλεια και τη φαρμακοδυναμική του reginesatide ανέφερε παρατεταμένο χρόνο ημιζωής και καθυστέρηση της κάθαρσης, ενώ απέδειξε και συσχέτιση του πεπτιδίου με αύξηση της HGB σε αναιμικούς ασθενείς, μετά από απλή χορήγηση. Η αύξηση αυτή διατηρήθηκε για περισσότερο από ένα μήνα. Η μηνιαία χορήγηση του φαρμάκου ήταν σε θέση να διατηρήσει την αυξημένη HGB σε αναιμικούς ασθενείς με CKD.^[138] Παρά την απόσυρση του φαρμάκου ένα χρόνο μετά την κυκλοφορία του λόγω σοβαρών παρενεργειών επικίνδυνων για τη ζωή, υπάρχει η υποψία ότι χρησιμοποιείται ακόμη για λόγους ντόπινγκ, ενώ και ο WADA το απαγόρευσε το 2009.^[29]

Μέθοδοι για την άμεση και έμμεση ανίχνευση των παραπάνω ουσιών περιγράφηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια. Πρόσφατα, παρουσιάστηκε ένα πρόβλημα ανίχνευσης με την προσθήκη πρωτεασών από τους αθλητές στα δείγματα ούρων τους, που καταστρέφει τις ερυθροποιητικές πρωτεΐνες. Η νοθεία των ούρων με τις πρωτεάσες είναι μια απαγορευμένη μέθοδος και έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ανίχνευση της κατάχρησής τους.^[139,140]

4.4 ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗ

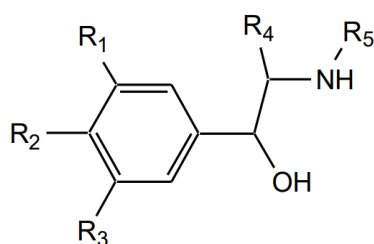
Η σαλμετερόλη ανήκει στην ομάδα των β2-αγωνιστών που περιλαμβάνονται στην κατηγορία S3 του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών και η χρήση τους απαγορεύεται εντός και εκτός αγώνα.^[9] Πρόκειται για ουσίες που συνδέονται με τους β2-αδρενεργικούς υποδοχείς προκαλώντας βρογχοδιαστολή. Οι αδρενεργικοί υποδοχείς είναι μια κατηγορία διαμεμβρανικών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας μετασυναπτικών αδρενεργικών νευρώνων και είναι συζευγμένοι ενδοκυτταρικά με G πρωτεΐνες για την αναγνώριση και μετάδοση σημάτων, αποτελώντας στόχους νευροδιαβιβαστών όπως οι κατεχολαμίνες και

ειδικά η αδρεναλίνη και η νοραδρεναλίνη. Αδρενεργικοί νευρώνες νευρώνουν τον εγκέφαλο και τα αισθητήρια όργανα, καθώς και όλα σχεδόν τα όργανα του σώματος, λείους μύες, σπλαχνικούς αδένες και φυσικά την καρδιά. Υπάρχουν δύο κύριες οικογένειες αδρενεργικών υποδοχέων που ονομάζονται α και β και διαχωρίστηκαν με βάση τις διαφορετικές απαντήσεις των υποδοχέων. Με την εξέλιξη των μοριακών τεχνικών εντοπίστηκαν έπειτα αρκετές υποκατηγορίες-υπότυποι, με τους β υποδοχείς να εμφανίζουν τρεις υποτύπους τους β1, β2 και β3. Ο β2 συνδέεται με τις Gs και Gi πρωτεΐνες, ενώ οι άλλοι δύο μόνο με την Gs.^[141]

Οι αδρενεργικοί αγωνιστές είναι φάρμακα που δρουν αντιγράφοντας συγκεκριμένες δράσεις φυσικών χημικών ενώσεων που παράγονται στον οργανισμό (αδρεναλίνη και νοραδρεναλίνη) και διεγείρουν την ενεργοποίηση και απόκριση των αδρενεργικών υποδοχέων. Ποικίλουν στην εξειδίκευσή τους ως προς τους υποδοχείς, αλλά μπορούν να ταξινομηθούν αντίστοιχα σε α1, α2, β1, β2 και β3. Οι αδρενεργικοί αγωνιστές επίσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το χρόνο δράσης τους σε βραχείας δράσης (Short-Acting Beta Agonists, SABA) (πρώτης γενιάς φάρμακα) και μακράς δράσης (Long-Acting Beta Agonists, LABA) (δεύτερης γενιάς φάρμακα), ενώ υπάρχουν και οι πολύ μακράς δράσης (Ultra-Long-Acting Beta Agonists, ULABA) (τρίτης γενιάς φάρμακα). Συνήθως, οι βραχείας δράσης χρησιμοποιούνται προληπτικά, ενώ οι μακράς θεραπευτικά.^[141,142]

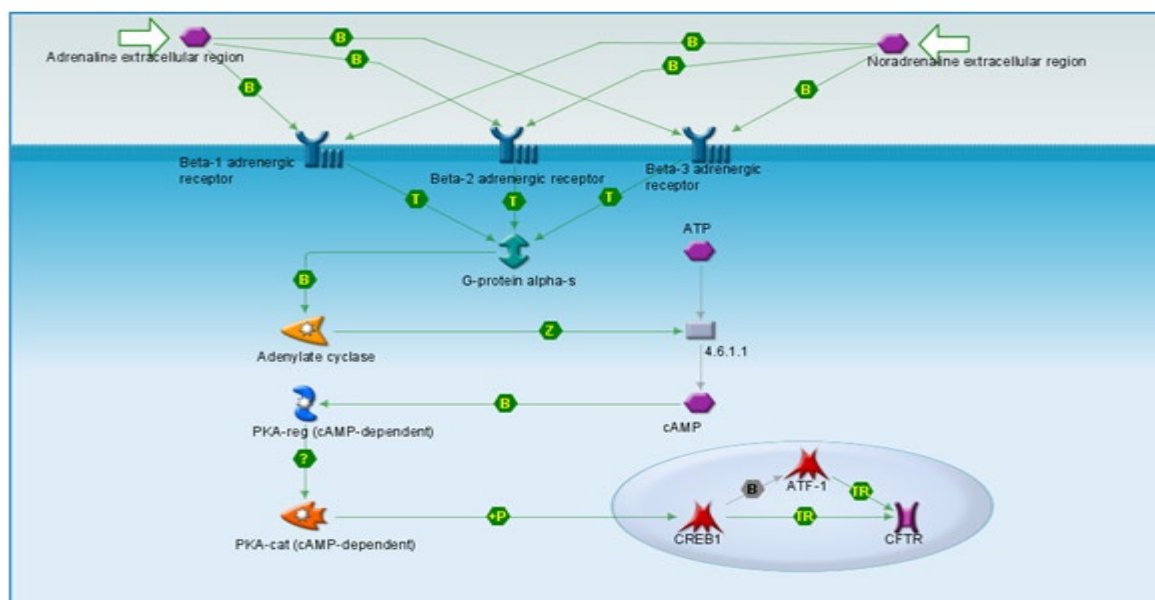
Οι β2-αδρενεργικοί αγωνιστές κυριαρχούν και παρουσιάζουν ευρεία κατανομή στον πνεύμονα και συγκεκριμένα στα κύτταρα των λείων μυών των αεραγωγών, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα λεμφοκύτταρα, τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, τα πνευμονοκύτταρα τύπου II και τα σιτευτικά κύτταρα.^[141,142]

Ως προς τη δομή τους, οι συγκεκριμένες ουσίες αποτελούνται από έναν υποκατεστημένο φαινολικό δακτύλιο που φέρει ως πλευρική αλυσίδα μια αιθανολαμίνη, η οποία καταλήγει σε τετρ-βουτυλο ή ισοπρόπυλο ή άλλου είδους άλκυλο ομάδα (R5) (Εικόνα 4.5). Οι υποκαταστάτες R1, R2 και R3 ποικίλλουν και μπορεί να είναι -Br, -Cl, -OH, -H, -CH₂OH, -CN, -NH₂, -CF₃.



Εικόνα 4.5. Γενική δομή των β2-αγωνιστών.

Ο β2-αγωνιστής συνδέεται στην υδρόφιλη κατάλληλη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα και τον ενεργοποιεί. Υπάρχουν πλέον ισχυρές ενδείξεις ότι οι β2-αδρενεργικοί υποδοχείς ταλαντεύονται ανάμεσα σε δύο μορφές, την ενεργό και την ανενεργό. Σε συνθήκες ηρεμίας αυτές οι δύο μορφές βρίσκονται σε ισορροπία. Ο υποδοχέας βρίσκεται στην ενεργό μορφή όταν είναι συνδεδεμένος με την α υπομονάδα της Gs πρωτεΐνης μαζί με ένα μόριο τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP). Η αντικατάσταση του GTP από διφωσφορική γουανοσίνη (GDP) μειώνει δραματικά την συγγένεια της α υπομονάδας με τον υποδοχέα, ο οποίος επιστέφει στη χαμηλής ενέργειας ανενεργό μορφή. Η σύνδεση αγωνιστή-υποδοχέα ενεργοποιεί την Gs πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από τρεις υπομονάδες τις α, β και γ. Η α διεγείρει το ένζυμο αδενυλική κυκλάση (AC), ενώ οι βγ μετάγουν άλλα σήματα. Η AC συνδέεται με τον υποδοχέα και καταλύει την μετατροπή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σε κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP), οδηγώντας σε αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσής της. Το cAMP είναι αγγελιοφόρο μόριο του δεύτερου ενδοκυτταρικού μηνύματος και τελεστής για την ενεργοποίηση καταρρακτών οδών μεταγωγής σήματος. Τα επίπεδά του ρυθμίζονται από τη δράση φωσφοδιεστεράσης που το αποικοδομεί σε 5'-AMP. Το cAMP με τη σειρά του ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA μέσω κατανάλωσης ATP φωσφορυλιώνει ρυθμιστικές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες γονιδίων που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην τέλεση του κυτταρικού αποτελέσματος (Εικόνα 4.6).^[141, 143]



Εικόνα 4.6. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ενεργοποίησης β-αδρενεργικού υποδοχέα και της μετέπειτα ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος.

Έτσι, στα κύτταρα του πνεύμονα η PKA φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον έλεγχο του μυϊκού τόνου και το cAMP μειώνει τα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου με την παρεμπόδιση της απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από τα ενδοκυτταρικά αποθέματα, την παγίδευση των ενδοκυτταρικών Ca^{2+} και τη μείωση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης σε Ca^{2+} . Όλες αυτές οι αλλαγές αδρανοποιούν την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και ενεργοποιούν τη φωσφατάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Επιπλέον, η σύνδεση των β2-αγωνιστών οδηγεί στην διάνοιξη των μεγάλης αγωγιμότητας καναλιών καλίου που ενεργοποιούνται από ασβέστιο και ως εκ τούτου υπάρχει η τάση να υπερπολώνονται τα λεία μυϊκά κύτταρα των αεραγωγών. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω οδηγεί σε χαλάρωση των λείων μυών και βρογχοδιαστολή.^[141,143]

Οι β2-αγωνιστές συγκαταλέγονται στα πιο συνταγογραφούμενα φάρμακα για τον άνθρωπο στη θεραπεία ασθενειών των αεραγωγών (ιδιαίτερα του άσθματος, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και της βρογχοσυστολής που προκαλείται από την άσκηση) λόγω της έντονης και πολύ αποτελεσματικής βρογχοδιασταλτικής δράσης τους. Εκτός από την επιθυμητή φαρμακολογική δράση, οι β2-αγωνιστές μπορούν να προκαλέσουν παρενέργειες στην πρωτεϊνική σύνθεση και τη λιπόλυση, με αποτέλεσμα την αναβολική δράση και την αύξηση της μέγιστης απόδοσης άσκησης και της μυϊκής δύναμης, όταν χρησιμοποιούνται σε υψηλότερες δόσεις από τη θεραπευτική ή σε υπερβολική μακροχρόνια χρήση.^[144,145] Ως εκ τούτου, οι β2-αγωνιστές μπορεί να χρησιμοποιηθούν παρανόμως από υγιείς αθλητές για τις διεγερτικές επιδράσεις στην αναπνοή, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στην προαγωγή της μυϊκής ανάπτυξης όταν χορηγούνται σε υψηλές δόσεις^[145]

Οι β2-αγωνιστές, λόγω της αναβολικής τους δράσης, απαγορεύονται στον αθλητισμό σε μη ασθματικούς αθλητές, καθώς οι αθλητές με άσθμα μπορούν να τους χρησιμοποιήσουν για θεραπευτικούς σκοπούς, μετά από χορήγηση TUE. Το άσθμα, ο ασκησιογενής βρογχόσπασμος και η υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών συναντώνται συχνά σε υψηλού επιπέδου αθλητές, πιθανόν ως συνέπεια του αθλήματός τους. Παρότι ο επιπολασμός του άσθματος στους ενήλικες είναι περίπου 5%, μεταξύ των αθλητών Ολυμπιακού επιπέδου εκτιμάται να είναι 10-20%. Για τον λόγο αυτό ο WADA έχει ορίσει ως MRPL για τους β2-αγωνιστές τα 20 ng/mL (μέχρι το 2013 ήταν 100 ng/mL). Με εξαίρεση την εισπνεόμενη σαλβουταμόλη (μέγιστη επιτρεπτή παρεχόμενη δόση 1600 μg σε 24 h), την εισπνεόμενη φορμοτερόλη (μέγιστη επιτρεπτή παρεχόμενη δόση 54 μg σε 24 h) και τη σαλμετερόλη (μέγιστη επιτρεπτή παρεχόμενη δόση 200 μg σε 24 h). Η παρουσία στα ούρα σαλβουταμόλης άνω των 1000 ng/mL ή φορμοτερόλης άνω των 40 ng/mL θεωρείται ότι δεν

είναι μια επιδιωκόμενη θεραπευτική χρήση της ουσίας και θα πρέπει να θεωρείται ως AAF, εκτός εάν ο αθλητής αποδείξει, μέσω ελεγχόμενης φαρμακοκινητικής μελέτης, ότι το ανώμαλο αποτέλεσμα ήταν η συνέπεια της χρήσης της θεραπευτικής εισπνεόμενης δόσης μέχρι το ανώτατο όριο που αναφέρεται παραπάνω.^[9,12,16] Οι β2-αγωνιστές θεωρούνται από μερικούς αθλητές ως μια ασφαλής εναλλακτική επιλογή αντί για αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή, εξαιτίας των σχετικά περιορισμένων ιατρικών επιπτώσεων που εμφανίζει η χρήση τους.^[142]

Η σαλμετερόλη είναι ένας παρατεταμένης δράσης αγωνιστής των β2-αδρενεργικών υποδοχέων των λείων μυών των βρόγχων. Αν και χειρόμορφη ένωση, η σαλμετερόλη διατίθεται στο εμπόριο και χορηγείται ως άλας ξιναφοϊκού άλατος ενός ρακεμικού εισπνεόμενου μείγματος (rac) 50:50 των (R) - και (S) – εναντιομερών . Διάφορες συσκευές διανομής είναι διαθέσιμες για τη χορήγηση σαλμετερόλης, όπως εισπνευστήρες μετρημένης δόσης υπό πίεση και συσκευές ξηρής σκόνης. Η συνήθης δόση είναι 50 μg δύο φορές ημερησίως, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως και 100 μg δύο φορές ημερησίως.^[146] Οι φαρμακολογικές ιδιότητες της σαλμετερόλης προσφέρουν αποτελεσματικότερη προστασία κατά του βρογχόσπασμου που προκαλείται από ισταμίνη και επιτυγχάνουν μεγαλύτερης διάρκειας βρογχοδιαστολή, η οποία διαρκεί τουλάχιστον 12 h συγκρινόμενη με τις συνιστώμενες δόσεις συμβατικών SABA.^[116,118] Για τη σαλμετερόλη δεν έχει οριστεί μέχρι σήμερα όριο απαγόρευσης στα ούρα, όπως έχει γίνει για τη σαλβουταμόλη και τη φορμοτερόλη.^[9]

Η εισπνεόμενη δόση της σαλμετερόλης οδηγεί σε απέκκριση του μητρικού φαρμάκου σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης στα ούρα, χαμηλότερα από ng/mL, με την πλειοψηφία του φαρμάκου να αποβάλλεται ως α-υδροξυσαλμετερόλη, που αποτελεί και τον κύριο μεταβολίτη της.^[147] Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες οι οποίες έχουν αναφέρει επίπεδα σαλμετερόλης σε ούρα, εν μέρει λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων που καθιστούν τον προσδιορισμό τεχνικά απαιτητικό σε κανονικές δοσολογίες χορήγησης σε άνθρωπο. Για τους σκοπούς του ελέγχου ντόπινγκ, η α-υδροξυσαλμετερόλη μπορεί να είναι ένας πιο κατάλληλος βιοδείκτης για την υπερβολική χρήση της εισπνεόμενης σαλμετερόλης, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσής της στα ούρα που επιτρέπει την ανίχνευσή της.^[147,148]

Η σαλμετερόλη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα συνδυασμού που περιέχουν προπιονική φλουטיκαζόνη, ένα ισχυρό εισπνεόμενο κορτικοστεροειδές με σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση.^[149] Η προπιονική φλουטיκαζόνη έχει χαμηλή δια του στόματος βιοδιαθεσιμότητα και υψηλό ηπατικό μεταβολισμό πρώτης διέλευσης που έχει

ως αποτέλεσμα χαμηλές συγκεντρώσεις στα ούρα.^[150,151] Καθώς η συστηματική απορρόφηση της προπιονικής φλουטיκαζόνης είναι χαμηλή, μια αναλυτική μέθοδος πρέπει να είναι πολύ ευαίσθητη προκειμένου να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα του φαρμάκου στο πλάσμα.

Η ανίχνευση της σαλμετερόλης, της α-υδροξυσαλμετερόλης και της προπιονικής φλουטיκαζόνης σε βιολογικά υγρά αποτέλεσε το αντικείμενο πολλών μελετών. Έχουν περιγραφεί παρασκευαστικές διαδικασίες επεξεργασίας δειγμάτων με εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid Liquid Extraction, LLE) σε συνδυασμό με ευαίσθητες μεθόδους LC-MS/MS, για την ποσοτικοποίηση σαλμετερόλης σε ανθρώπινα ούρα και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε ανθρώπινο πλάσμα.^[144,152] Επιπλέον, έχουν δημοσιευτεί ευαίσθητες μέθοδοι LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό της σαλμετερόλης και της προπιονικής φλουטיκαζόνης σε ανθρώπινο πλάσμα βασιζόμενες σε παρασκευαστικές διαδικασίες με χρήση SPE.^[153,154] Μία μόνο μέθοδος έχει περιγραφεί για την ποσοτικοποίηση α-υδροξυσαλμετερόλης και σαλμετερόλης σε ανθρώπινα ούρα και ορό βασιζόμενη σε χρήση SPE και ανάλυση με LC-MS/MS.^[147] Ωστόσο, είναι κοινώς αποδεκτό επιστημονικά ότι απαιτούνται μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση των ουσιών αυτών με ακόμη χαμηλότερη αναλυτική ευαισθησία.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ

Τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ και όσοι ασχολούνται με το αντι-ντόπινγκ σε ερευνητικό επίπεδο έχουν ως πρωτεύοντα στόχο να προλαβαίνουν ή να ακολουθούν όσο το δυνατόν πιο κοντά χρονικά την εύρεση νέων πρακτικών και σκευασμάτων που χρησιμοποιούν οι αθλητές και οι προπονητές για να βελτιώσουν αθέμιτα την αθλητική απόδοση. Οι σύγχρονες τεχνικές για την ανίχνευση του ντόπινγκ αίματος, αλλά και του ντόπινγκ με την ευρεία έννοια, έχουν στραφεί στον εντοπισμό βιοδεικτών και στην εξατομικευμένη παρακολούθηση ενός σύνθετου προφίλ για κάθε αθλητή. Το προφίλ αυτό συμπεριλαμβάνει πληθώρα πληροφοριών, οι οποίες συνδυαστικά μεταξύ τους και φυσικά συμπληρωματικά με τις κλασικές τεχνικές άμεσης ανίχνευσης των απαγορευμένων ουσιών, συμβάλλουν στη συλλογή όσο το δυνατόν περισσότερων αποδείξεων που τεκμηριώνουν την παραβίαση των κανονισμών αντι-ντόπινγκ.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώνεται στην αναζήτηση μεταβολιτών και βιοδεικτών έμμεσης ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών ή/και μεθόδων από τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA και τη συσχέτισή τους με το ντόπινγκ αίματος και τα εργαλεία που χρησιμοποιούν τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ για την ανίχνευσή του όπως το ABP. Βάσει των βιβλιογραφικών δεδομένων για έμμεση συσχέτισή τους με το ντόπινγκ αίματος, επιλέχθηκαν προς μελέτη ουσίες από την S1, S2, S3 και M2 κατηγορία του Καταλόγου.^[9] Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη μελέτη της πιθανής επίδρασης της χρήσης των ουσιών ή/και των μεθόδων αυτών στη διαδικασία της ερυθροποίησης, καθώς και στη μελέτη των μεταβολών που μπορεί να προκαλέσει η χρήση τους στις παραμέτρους του ABP, κυρίως της αιματολογικής, αλλά και της στεροειδούς ενότητας. Πιο συγκεκριμένα, η άμεση επίδραση της χρήσης των ουσιών αυτών στη διαδικασία της ερυθροποίησης κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί, όπου ήταν δυνατόν, με βάση τη μέτρηση των αιματολογικών παραμέτρων του ABP ή τη μέτρηση της έκκρισης ερυθροποιητίνης στα ούρα, ώστε να εξαχθούν πιθανά συμπεράσματα ως προς τη δράση αυτών των ουσιών σαν παράγοντες ή συμπαράγοντες που επιδρούν στην ερυθροποίηση. Παράλληλα απαραίτητη θεωρήθηκε η σύγκριση των μεθόδων ανίχνευσης μεταβολιτών και άλλων έμμεσων βιοδεικτών που χρησιμοποιήθηκαν.

Τα AAS χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπεία των αναιμιών πριν από τη σύνθεση των rHuEPOs, καθώς έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την ερυθροποίηση με δύο τρόπους. Αυξάνουν τη νεφρική σύνθεση της ερυθροποιητίνης και προάγουν τη διαφοροποίηση των ερυθροποιητικών βλαστικών κυττάρων στο μυελό των οστών.^[108,155,156] Η μεθυλονορτεστοστερόνη είναι από τα AAS των οποίων ο μεταβολισμός δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής μελετήθηκε το μεταβολικό προφίλ της μεθυλονορτεστοστερόνης με στόχο την αναζήτηση νέων μεταβολιτών με μεγαλύτερα παράθυρα ανίχνευσης. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στον έλεγχο μεταβολιτών φάσης II συζευγμένων με θειικό οξύ, όπου σύγχρονες μελέτες με δομικά ανάλογα στεροειδή έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό μεταβολιτών με μεγαλύτερα παράθυρα ανίχνευσης. Επίσης, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει σύγκριση της επίδρασης που έχει η χορήγηση της μεθυλονορτεστοστερόνης στη στεροειδή ενότητα του ABP και στα επίπεδα έκφρασης ερυθροποιητίνης στα ούρα σε σχέση με τους χρόνους απέκκρισης της ουσίας και των μεταβολιτών της επίσης στα ούρα.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση SARMs, εκτός από τα αναβολικά αποτελέσματα που επάγει με τις μειωμένες ανδρογονικές παρενέργειες, μπορεί να αλλάξει σημαντικά μεταξύ άλλων τα επίπεδα του αιματοκρίτη.^[111] Το LGD-4033 ως ένας νέος SARM, που εμφανίστηκε στο χώρο του ντόπινγκ τα τελευταία χρόνια, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Ενώ έχουν ανιχνευθεί κάποιοι μεταβολίτες του, δεν είναι ακόμη γνωστά τα παράθυρα ανίχνευσης και τα προφίλ έκκρισής τους. Έτσι, κρίθηκε σημαντική η in vivo μελέτη του ανθρώπινου μεταβολισμού (φάσης I και φάσης II) του LGD-4033, καθώς και σύγκριση της επίδρασης που έχει η χορήγηση του στη στεροειδή ενότητα του ABP και στα επίπεδα έκφρασης ερυθροποιητίνης στα ούρα σε σχέση με τους χρόνους απέκκρισης της ουσίας και των μεταβολιτών της επίσης στα ούρα.

Ένας από τους βασικότερους και πιο αναγκαίους στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εφαρμογή των προδιαγραφών του WADA για το ABP στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας, ώστε ο έλεγχος ντόπινγκ να εφαρμοστεί για πρώτη φορά στην Ελλάδα σε επίπεδο ελέγχου ντόπινγκ αίματος. Μεταξύ άλλων σημαντικών ενεργειών, ήταν απαραίτητη η επικύρωση της λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i και ο έλεγχος της ορθής λειτουργίας του μέσω συμμετοχής σε παγκόσμιο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών που πραγματοποιεί ο WADA. Ο αιματολογικός αναλυτής Sysmex XT-2000i είναι αυτός που χρησιμοποιείτο κατά το μεγαλύτερο μέρος της διάρκειας της διατριβής από όλα τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ παγκοσμίως, για τις αναλύσεις δειγμάτων αίματος για

ABP, συμβάλλοντας στην έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ αίματος με χρήση ερυθροποιητίνης, άλλων ESAs ή/και αυτόλογης μετάγγισης αίματος. Από την 1^η Ιουνίου του 2019 ο WADA καθιέρωσε ως υποχρεωτικό τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XN-1000 για τις παραπάνω αναλύσεις, οπότε στα πλαίσια της διατριβής πραγματοποιήθηκε η επικύρωση της λειτουργίας και του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XN-1000 και ο έλεγχος της ορθής λειτουργίας του μέσω συμμετοχής στο παγκόσμιο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών που πραγματοποιεί ο WADA.

Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη αποδεικνύει ότι οι β2-αδρενεργικοί υποδοχείς συμμετέχουν στα πρώτα στάδια της ερυθροποίησης κατά τα οποία τα προγονικά κύτταρα δε φέρουν υποδοχείς ερυθροποιητίνης.^[157] Επομένως, ένας β2-αγωνιστής θα μπορούσε ενεργοποιώντας τον αντίστοιχο υποδοχέα να ενεργοποιήσει την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης θεωρήθηκε σημαντικό να μελετηθεί η πιθανή βιοσυσσώρευση της σαλμετερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό μετά από πολλαπλή χορήγηση εισπνεόμενου φαρμακευτικού σκευάσματος που περιέχει την ουσία αυτή. Για τον έλεγχο της πιθανής βιοσυσσώρευσης σαλμετερόλης στον οργανισμό απαιτείται η ποσοτικοποίησή της σε βιολογικά δείγματα. Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η σαλμετερόλη και η προπιονική φλουτικαζόνη που συχνά χορηγείται μαζί της, εκκρίνονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα ούρα, και ανιχνεύονται δύσκολα στο αίμα, ενώ τονίζεται η σημαντικότητα της ανίχνευσης του μεταβολίτη της σαλμετερόλης, της α-υδροξυσαλμετερόλης, για τον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών. Κρίθηκε, οπότε, απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση UHPLC-HRMS μεθόδων για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουτικαζόνης σε ανθρώπινα ούρα, καθώς και σαλμετερόλης και προπιονικής φλουτικαζόνης σε ανθρώπινο πλάσμα σε συγκεντρώσεις επιπέδου pg/mL. Επιπλέον, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της πιθανής επίδρασης της βιοσυσσώρευσης σαλμετερόλης στη διαδικασία της ερυθροποίησης μέσω ελέγχου των επιπέδων της ερυθροποιητίνης στο αίμα, καθώς και η μελέτη της πιθανής επίδρασης στο ABP και στο προφίλ σιδήρου, με έλεγχο των παραμέτρων του ABP και εκτίμηση στο αίμα των επιπέδων του σιδήρου και των πρωτεϊνών του μεταβολισμού του.

Συνοπτικά, ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη έμμεσων βιοδεικτών για την ανίχνευση ντόπινγκ αίματος και χωρίζεται σε τέσσερα βασικά σημεία τα οποία και θα παρουσιαστούν ξεχωριστά στα επόμενα κεφάλαια. Πρόκειται για την *in vivo* μεταβολική μελέτη της μεθυλονορτεστοστερόνης και της επίδρασης της στο ABP στα επίπεδα της ερυθροποιητίνης, την *in vivo* μεταβολική μελέτη του LGD-4033 και της επίδρασης του στο ABP, την επικύρωση της λειτουργίας δύο αιματολογικών αναλυτών για

τις αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών για έλεγχο ABP και την in vivo μελέτη της βιοσυσσώρευσης της σαλμετερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό μετά από πολλαπλή χορήγηση και την επίδρασή της στο ABP, το προφίλ σιδήρου και τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

6.1 ΥΛΙΚΑ

6.1.1 ΓΥΑΛΙΝΑ ΥΛΙΚΑ

- Γυάλινοι ψηλοί βιδωτοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 15 mL, με πλαστικά πώματα.
- Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 10 mL, με γυάλινα εσφυρισμένα πώματα.
- Διακριβωμένες ογκομετρικές φιάλες όγκου 1, 2, 5, 10 και 20 mL.
- Ογκομετρικές φιάλες όγκου 1, 2, 5, 10, 20, 25 και 50 mL.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 10, 50, 100, 250, 500 και 1000 mL.
- Γυάλινες φιάλες διαλυτών με βιδωτό πώμα όγκου 250, 500 και 1000 mL.
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur 230 mm με ανοιχτό άκρο και φούσκα πλήρωσης.

6.1.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Πλαστικοί σωλήνες (falcons) όγκου 15 mL, με βιδωτό καπάκι.
- Πλαστικοί σωλήνες (falcons) όγκου 50 mL, με βιδωτό καπάκι.
- Πλαστικά φιαλίδια (tubes) όγκου 1,5 mL.
- Διαφανή φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα Clear LO Crimp Vial Marking Spot, διαστάσεων 12 x 32 mm, 11 mm και χωρητικότητας 1,5 mL.
- Διαφανή micro-inserts με κωνικό πυθμένα, διαστάσεων 30,75 x 6,0 mm, 15 mm χωρητικότητας 0,2 mL.
- Καπάκια για φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα 11 mm Aluminum Silver Crimp Cap, 1 m Clear PTFE/Red Rubber/PTFE.
- Καπάκια για φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα 11 mm Blue Snap Cap, Red PTFE/White silicone 0,004.
- Ψαλίδι ανοίγματος και κλεισίματος φιαλιδίων αυτόματου εισαγωγέα.
- Φυσίγγια SPE StrataTM-X-CW (33 μm) (Phenomenex)
- Φυσίγγια SPE ISOLUTE HCX (300 mg/10 mL) (Biotage)

- Φυσίγγια SPE OASIS WCX (3 cc, 60 mg, 60 μm) (Waters)
- Φυσίγγια SPE 6 cc OASIS MAX (30 μm) (Waters)
- Φίλτρα φυγοκέντρωσης για συμπύκνωση ούρων Amicon Ultra-15 (Millipore).
- Φίλτρα φυγοκέντρωσης για συμπύκνωση ούρων Amicon Ultra-4 (Millipore).
- Πλάκα ανοσοκαθαρισμού ανθρώπινης ερυθροποιητίνης (StemCell Technologies).
- Υποστηρικτικά φύλλα Gelbond για πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (GE Healthcare Biosciences).
- Λωρίδες ανόδου-καθόδου (electrode strips) (Sigma-Aldrich).
- Πηκτώματα Nu-Page 10% Bis-Tris Gel 1 mm x 10 well (Invitrogen).
- Υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς (Immobilon®-P) τύπου PVDF, με μέγεθος πόρων 0,45 μm (Millipore).
- Υδροφιλική μεμβράνη μεταφοράς Durapore, με μέγεθος πόρων 0,65 μm (Merck).
- Φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman (Munktell).
- Σωληνάρια συλλογής αίματος με EDTA BD Vacutainer.
- Ουροσυλλέκτες.
- Πλαστικά ρύγχη (tips) αυτόματων πιπετών και επαναληπτικής πιπέτας.
- Πλαστικές πιπέτες Pasteur.
- Πεχαμετρικοί χάρτες εύρους 0,0-6,0, 4,0-7,0, 6,5-10,0 και 7,0-14,0 (Merck).
- Μεταλλικές σπάτουλες.
- Πλαστικά σκαφίδια ζύγισης.
- Πλαστικά δοχεία εκπλύσεων και επωάσεων.
- Εργαστηριακά θερμόμετρα.
- Λαβίδες.

6.1.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

6.1.3.1 Υγρά αντιδραστήρια

- Ένζυμο β-γλυκουρονιδάση από *E.coli* K12 (Sigma-Aldrich).
- Μείγμα ενζύμων β-γλυκουρονιδάση και αρυλοσουλφατάση από *H. Pomatia* HP-2 (Sigma-Aldrich).
- N-μεθυλο-N-τριμεθυλο-σιλυλο-τριφθορο-ακεταμίδιο, MSTFA, καθαρότητας 98-100% (Pierce Biotechnology).

- 2-προπανθειόλη, PrSH (Sigma-Aldrich).
- Διθειοερυθριτόλη, DTE (Sigma-Aldrich).
- Φορμικό (μυρμηκικό) οξύ, HCOOH, καθαρότητας 98-100% (Sigma-Aldrich).
- Παγόμορφο οξικό οξύ, glacial acetic acid, καθαρότητας >99,7% (Panreac).
- Υδροχλωρικό οξύ 37% (Panreac).
- Φωσφορικό οξύ H₃PO₄ 85% (Merck).
- Μη-ιονικό απορρυπαντικό Tween 80 (Thermo Scientific).
- Ακρυλαμίδιο Acrylamide: bisacrylamide 29:1 (30% w/v) (Serva).
- Αμφολύτες Servalyt 2-4, 4-6, 6-8 βαθμίδωσης pI (Serva).
- NNN'N'-Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (Tetramethylethylenediamine) TEMED (VWR BDH PROLABO).
- NuPage MOPS SDS Running Buffer 20X (Novex).
- NuPage LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen).
- NuPage Antioxidant (Invitrogen).
- NuPage sample Reducing Agent 10X (Invitrogen).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα (MoAb) μύς ειδικού για την ανθρώπινη EPO (κλώνος AE7A5) (R & D Systems).
- Πολυκλωνικό βιοτινυλωμένο αντίσωμα αιγός ειδικό για IgG ανοσοσφαιρίνες μύς (Invitrogen).
- Σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης αγριοράπανου (HRP) (Thermo Scientific).
- Αντιδραστήριο εμφάνισης χημειοφωταύγειας SuperSignal West Femto chemiluminescence substrate (Thermo Scientific).

6.1.3.2 Στερεά αντιδραστήρια

- Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO₃, καθαρότητας 99,7-100,3% (Lach-ner).
- Άνυδρο ανθρακικό νάτριο, Na₂CO₃, καθαρότητας 99,8% (Lach-ner).
- Άνυδρο θειικό νάτριο, Na₂SO₄, καθαρότητας >99% (Panreac).
- Όξινο φωσφορικό κάλιο, K₂HPO₄, καθαρότητας >99% (Panreac).
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH₂HPO₄, καθαρότητας >98% (Panreac).
- Ιωδιούχο αμμώνιο, NH₄I, καθαρότητας 99,999% (Sigma-Aldrich).
- Φορμικό (μυρμηκικό) αμμώνιο, HCOONH₄, καθαρότητας 97% (Sigma-Aldrich).
- Τριχλωροξικό οξύ, TCA, καθαρότητας 97% (Sigma-Aldrich).

- Δισκία μείγματος αναστολέων πρωτεασών Complete (Sigma-Aldrich).
- Δισκία μείγματος φωσφορικών αλάτων PBS (Sigma-Aldrich).
- Ανθρακικό κάλιο, K_2CO_3 , καθαρότητας 99-101% (Sigma-Aldrich).
- Lauryl Sulfate SDS, καθαρότητας 99% (Sigma-Aldrich).
- Υπερθεϊκό αμμώνιο (ammonium persulfate), καθαρότητας 98-100% (Honeywell).
- Γλυκίνη, καθαρότητας >99% (Panreac).
- Γλυκίνη για ηλεκτροφόρηση, καθαρότητας 99-100% (Sigma-Aldrich).
- Tris-Base, καθαρότητας >99,9% (Fisher Bioreagents).
- Σακχαρόζη, καθαρότητας 99,5-100% (Sigma-Aldrich).
- Ουρία PlusOne, καθαρότητας 99,5-100% (GE Healthcare Bio-sciences).
- 1,4 διθειοθριτόλη, DTT, καθαρότητας 99% (Sigma-Aldrich).
- Γάλα άπαχο σε σκόνη τύπου Regilait (REGILAIT CS)

6.1.3.3 Διαλύτες

- Μεθανόλη, $MeOH$, CH_3OH , καθαρότητας 99,9% (Carlo Erba Reagenti SpA).
- Διαιθυλαιθέρας, $(C_2H_5)_2O$, καθαρότητας 99,8% (Sigma-Aldrich).
- Οξικός αιθυλεστέρας $CH_3COOC_2H_5$, καθαρότητας 99,8% (Labscan).
- Ακετόνη, CH_3COCH_3 , καθαρότητας 99,5% (ChemLab).
- Ακετονιτρίλιο, ACN , CH_3CN , καθαρότητας HPLC-MS (Carlo Erba Reagenti SpA).
- Μεθυλο-t-βουτυλαιθέρας, $CH_3OC(CH_3)_3$ καθαρότητας HPLC (Labscan).
- Διχλωρομεθάνιο, καθαρότητας HPLC (Fisher Scientific).
- Αιθανόλη, $EtOH$, CH_3CH_2OH , καθαρότητας HPLC (Panreac).
- Υπερκάθαρο νερό λαμβανόμενο από συσκευή διήθησης (Millipore).

6.1.3.4 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,0. Παρασκευή: Αραίωση 32,4 g K_2HPO_4 και 13,5 g KH_2HPO_4 σε 250 mL απιονισμένου νερού. Ανάδευση για 10 min και ρύθμιση του pH στο 7,0 με σταδιακή προσθήκη πυκνού φωσφορικού οξέος 85%.
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 1 M, pH 5,2. Παρασκευή: Ανάμιξη 232 mL διαλύματος οξικού οξέος 1 M και 768 mL διαλύματος οξικού νατρίου 1 M.

- Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 30% w/v. Παρασκευή: Ζυγίζονται 75 g ανθρακικού καλίου και διαλύονται σε 250 mL απιονισμένου νερού.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 3,75 M pH 7,4. Παρασκευή: Ζυγίζονται 227,14 g Tris-base και διαλύονται σε 300 mL υπερκάθαρου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με σταδιακή προσθήκη πυκνού υδροχλωρικού οξέος 37% και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι το 1 L με υπερκάθαρο νερό.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Παρασκευή: Αραίωση 13,3 mL του παραπάνω διαλύματος με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκο 1 L.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris/Γλυκίνη 50 mM / 192 mM pH 8,0. Παρασκευή: Αραίωση 6,04 gr Tris και 14,4 gr γλυκίνης σε 1 L υπερκάθαρου νερού.
- Διάλυμα οξικού οξέος, CH₃COOH, 3 M σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα.
- Διάλυμα χλωριούχου νατρίου, NaCl, 4 M σε διαλύτη απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα οξικού οξέος, CH₃COOH, 1 M σε διαλύτη απιονισμένο νερό.
- Διάλυμα οξικού νατρίου, CH₃COONa, 1 M σε διαλύτη απιονισμένο νερό.
- Στερεό ρυθμιστικό μείγμα NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1 w/w).
- Μείγμα παραγωγοποίησης MSTFA/NH₄I/2-PrSH (1000:4:3 v/w/v).
- Μείγμα παραγωγοποίησης MSTFA/NH₄I/DTE (1000:2:6 v/w/v).
- Διαλύτης A1 κινητής φάσης LC-TOF-MS: Διάλυμα φορμικού αμμωνίου 5 mM και φορμικού οξέος 0,1% (v/v) σε υπερκάθαρο νερό.
- Διαλύτης B1 κινητής φάσης LC-TOF-MS: Διάλυμα φορμικού αμμωνίου 5 mM και φορμικού οξέος 0,1% (v/v) σε ακετονιτρίλιο / υπερκάθαρο νερό (90/10 v/v).
- Διάλυμα ανασύστασης δειγμάτων: Διαλύτης A1 κινητής φάσης / Διαλύτης B1 κινητής φάσης (80/20 v/v).
- Διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS. Παρασκευή: διάλυση 5 δισκίων σε 1 L υπερκάθαρου νερού.
- Διάλυμα αναστολέων πρωτεασών Complete. Παρασκευή: διάλυση 1 δισκίου σε 10 mL υπερκάθαρου νερού.
- Διάλυμα έκλουσης για συλλογής ερυθροποιητίνης μετά από ανοσοκαθαρισμό σε πλάκα ELISA (elution buffer): Ανάμειξη 100 μL NuPage LDS Sample Buffer 4X, 40 μL NuPage sample Reducing Agent 10X και 260 μL υπερκάθαρου νερού.
- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου AMPS 2%. Παρασκευή: Αραίωση 0,2 g AMPS σε 1 mL υπερκάθαρο νερό.

- Διάλυμα παρασκευής πηκτώματος IEF: Αραίωση 14,71 g ουρίας και 1,75 g σακχαρόζης με προσθήκη 1,9 mL αμφολύτη 2-4, 1,9 mL αμφολύτη 4-6, 6,35 mL πολυακρυλαμιδίου και 14,5 mL υπερκάθαρου νερού. Μετά την ανάδευσή τους υπό κενό για 30 min, προσθήκη 310 μ L AMPS και 31 μ L TEMED και φόρτωση του διαλύματος στο εκμαγείο για το σχηματισμό πηκτώματος.
- Διάλυμα ηλεκτρολύτη ανόδου IEF. Παρασκευή: Αραίωση 716 μ L H_3PO_4 με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκο 25 mL.
- Διάλυμα ηλεκτρολύτη καθόδου IEF. Παρασκευή: Προσθήκη 1,5 mL αμφολύτη 6-8 σε 30 mL υπερκάθαρου νερού.
- Διάλυμα ηλεκτρολύτη ανόδου SDS-PAGE. Παρασκευή: Αραίωση 50 μ L NuPage MOPS SDS Running Buffer 20X με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκο 1 L.
- Διάλυμα ηλεκτρολύτη καθόδου SDS-PAGE. Παρασκευή: Αραίωση 500 μ L διαλύματος ηλεκτρολύτη ανόδου με NuPage Antioxidant μέχρι όγκο 200 mL.
- Διάλυμα ανοσοσύτωσης μετά από SDS-PAGE (blotting buffer). Παρασκευή: Διάλυση 5,8 g Tris-base, 2,9 g γλυκίνης και 0,375 g SDS σε 200 mL MeOH και έπειτα αραίωση με υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκο 1 L.
- Διάλυμα οξικού οξέος 0,7%. Παρασκευή: Αραίωση 7 mL οξικού οξέος σε υπερκάθαρο νερό μέχρι όγκο 1 L.
- Διάλυμα DTT 1M. Παρασκευή: 0,77 g DTT σε 3 mL υπερκάθαρο νερό.
- Διάλυμα βαθμονόμησης και ρύθμισης φασματομέτρου μαζών TOF-MS (ESI-L Low Concentration Tuning Mix, Agilent Technologies).

6.1.4 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Ως πρότυπες ουσίες χρησιμοποιήθηκαν η σαλμετερόλη (European Pharmacopoeia), η α-υδροξυσαλμετερόλη (GlaxoSmithKline) και η προπιονική φλουτικαζόνη (European Pharmacopoeia). Για την παρασκευή διαλυμάτων μεθυλονορτεστοστερόνης και LGD-4033 χρησιμοποιήθηκαν τα σκευάσματα που αναφέρονται στην επόμενη ενότητα. Ως εσωτερικά πρότυπα (Internal Standards, ISTDs) χρησιμοποιήθηκαν η μεθυλοτεστοστερόνη (Remek Pharmaceutical Laboratories), η ιμιπερανίνη (Sigma-Aldrich), η μεφρουσίδη (Sigma-Aldrich), η σαλμετερόλη-d5 (Alsachim) και η προπιονική φλουτικαζόνη-d5 (Alsachim). Με αραίωση κατάλληλων ποσοτήτων των παραπάνω ουσιών παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης ποιοτικού ή ποσοτικού προσδιορισμού. Τα διαλύματα εργασίας

προέκυψαν από νέες αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης με μεθανόλη. Όλα τα διαλύματα φυλάχθηκαν στους -20 °C.

6.1.5 ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

- Μεθυλονορτεστοστερόνη (Steraloids)
- Ligandrol (Neobolics)
- Serevent Diskus (GlaxoSmithKline)

6.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

6.2.1 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αυτόματες πιπέτες τύπου Finnriquette-ThermoLabsystems μεταβλητού όγκου 2-20, 20-200, 200-1000 και 1000-5000 µL.
- Αυτόματες πιπέτες τύπου Eppendorf μεταβλητού όγκου 2-20, 20-200, 200-1000 και 1000-5000 µL.
- Αυτόματη επαναληπτική πιπέτα τύπου Finnriquette-ThermoLabsystems μεταβλητού όγκου 10-5000 µL.
- Αυτόματες πολυπιπέτες τύπου Eppendorf μεταβλητού όγκου 5-200 και 50-500 µL.
- Σύριγγες Hamilton μεταβλητού όγκου έως 50, 100, 250 και 500 µL.
- Φυγόκεντροι Multifuge 3 S-R Heraeus, Hermle Z 510 και Hermle Z 513.
- Μικροφυγόκεντρος Hettich Mikro 20.
- Κλίβανοι Shimaden SR 30 και Protherm furnaces.
- Ανακινήτρες Heidolph Reax 2.
- Μαγνητικός αναδευτήρας Heidolph MR 3002.
- Αυτόματος αναδευτήρας τύπου περιδίνησης (vortex).
- Αυτόματος αναδευτήρας πλάκας ELISA PerkinElmer Delfia Plate Shaker.
- Αναδευτήρας ομοιγενοποίησης Stuart Roller Mixer SRT1.
- Πλατφόρμες ανακίνησης Stuart Platform Rocket STR6 και Stuart Gyro Rocket STR9.
- Συσκευή εξάτμισης με διανεμητής αέριου N2.
- Ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο Atago Pal-10S.

- Διανεμητής υγρών μέγιστου όγκου 10 mL (dispenser).
- Συσσκευή κενού VacMaster και αντλία κενού Buchi Vacuum-System B-169 .
- Συσσκευή κενού Bioblock Scientific.
- Μεταλλόλουτρα Techne DRI-BLOCK DB3 και Lab-Line Multi Block Heater .
- Υδατόλουτρο Line Scientific.
- Διακριβωμένοι αναλυτικοί ζυγοί Kern KB και AND GR-200.
- Συσσκευή Millipore για την παραγωγή υπερκάθαρου νερού.
- Σύστημα κοπής μεμβρανών Dahle 561.
- Συσσκευή αφαίρεσης GelBond Film Remover Pharmacia Biotech.

6.2.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ

- Σύστημα αεριοχρωματογραφίας Nexis GC 2030 με χρωματογραφική στήλη SGE BP X5 συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών GCMS-TQ8040 NX με τριπλό τετράπολο αναλυτή μαζών (Simadzu Corporation).
- Σύστημα αεριοχρωματογραφίας 6890N GC με χρωματογραφική στήλη HP Ultra 1-011 συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών Agilent 5973 με τετραπολικό αναλυτή μαζών (Agilent Technologies).
- Σύστημα υγροχρωματογραφικό υπερυψηλής απόδοσης 1200 LC Series με χρωματογραφική στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 και προστήλη Zorbax Eclipse Plus C18, συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών 6520 Accurate-Mass Q-TOF με αναλυτή μαζών χρόνο πτήσης (Agilent Technologies).
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με ισοηλεκτρική εστίαση Multiphor II Electrophoresis System (Pharmacia Biotech) με τροφοδοτικό EPS 3501XL (Amersham Biosciences) και κυκλοφορητή νερού Multitemp II (Pharmacia Biotech).
- Σύστημα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με SDS-PAGE XCell Sure Lock mini (Invitrogen) με τροφοδοτικό EPS 2A200 (Amersham Biosciences).
- Σύστημα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών TE77 SemiPhor Hoefer με τροφοδοτικό EPS 2A200 (Amersham Biosciences).
- Αναλυτής απεικόνισης φωταύγειας LAS-4000 (FUJIFILM Corporation).
- Αιματολογικός αναλυτής Sysmex XT-2000i με δείγματα ελέγχου XE e-check τριών επιπέδων.

- Αιματολογικός αναλυτής Sysmex XN-1000 με δείγματα ελέγχου XN-check τριών επιπέδων.
- Αυτόματος βιοχημικός αναλυτής BS-200 (Mindray) με το αντίστοιχο κιτ προσδιορισμού σιδήρου.
- Αυτόματος ανοσολογικός-ορμονολογικός αναλυτής Elecsys 2010 (Roche) με το αντίστοιχο κιτ προσδιορισμού φερριτίνης και τρανσφερίνης.
- Αυτόματος ανοσολογικός-ορμονολογικός αναλυτής Immulite 1000 (Siemens) με το αντίστοιχο κιτ προσδιορισμού ερυθροποιητίνης.
- Αυτόματο μηχάνημα ανοσοπροσδιορισμού με ELISA Best 2000 Biokit.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

7.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

Πραγματοποιήθηκε μελέτη με μονή χορήγηση σε υγιή εθελοντή δια του στόματος 10 mg μεθυλονορτεστοστερόνης υπό μορφή σκόνης, διαλυμένη σε EtOH:H₂O (30:70 v/v). Ο εθελοντής ήταν άνδρας, καυκάσιος, 47 ετών, 70 kg, 180 cm και δεν είχε λάβει κάποιο φαρμακευτικό σκεύασμα ή συμπλήρωμα διατροφής τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες πριν από τη μελέτη. Δείγματα ούρων συλλέχθηκαν πριν (0 h) και μετά τη χορήγηση μέχρι τις 192 h, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7.1. Τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν με GC-MS/MS για ανίχνευση μεταβολιτών φάσης II και για έλεγχο του προφίλ των στεροειδών και με IEF για εκτίμηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος”.

Πίνακας 7.1. Πίνακας καταγραφής στοιχείων συλλογής δειγμάτων ούρων μετά την απλή χορήγηση μεθυλονορτεστοστερόνης σε εθελοντή.

ΗΜΕΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΩΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	ΟΓΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (mL)
1 ^η Ημέρα	10:30	M940	0	250
1 ^η Ημέρα	12:30	M941	2	400
1 ^η Ημέρα	16:00	M942	5,5	500
1 ^η Ημέρα	18:30	M943	8	400
2 ^η Ημέρα	6:30	M944	20	250
2 ^η Ημέρα	10:30	M945	24	200
2 ^η Ημέρα	13:30	M946	27	500
2 ^η Ημέρα	15:30	M947	29	250
3 ^η Ημέρα	6:30	M948	44	250
3 ^η Ημέρα	12:30	M949	50	250
4 ^η Ημέρα	10:30	M950	72	250
5 ^η Ημέρα	10:30	M951	96	250
6 ^η Ημέρα	10:30	M952	120	250
7 ^η Ημέρα	10:30	M953	144	250
8 ^η Ημέρα	10:30	M954	168	250
9 ^η Ημέρα	10:30	M955	192	200

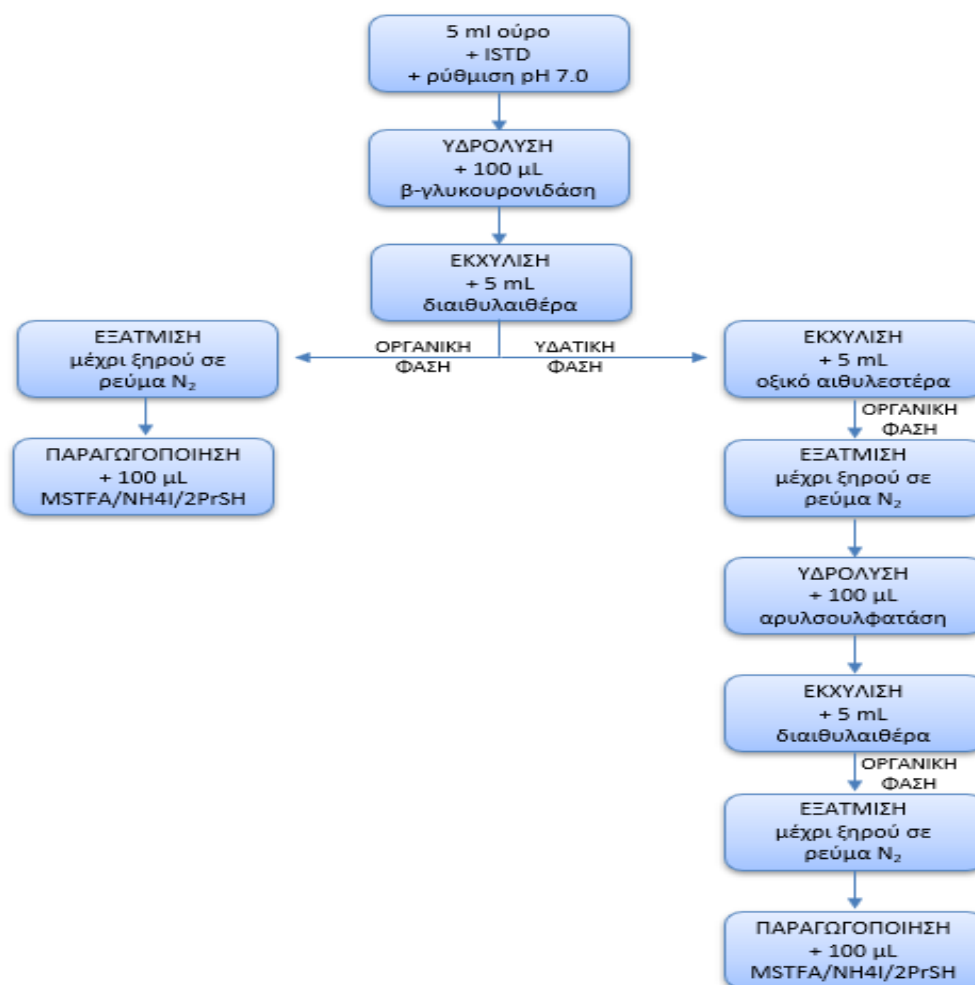
7.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

7.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II ΜΕ GC-MS/MS

Για την ανίχνευση των μεταβολιτών φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης ακολουθήθηκε μια παρασκευαστική διαδικασία με δύο στάδια (Εικόνα 7.1), η οποία εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα ούρων της μελέτης. Στο πρώτο στάδιο έγινε εκχύλιση των συζευγμένων με γλυκουρονικό οξύ μεταβολιτών (Σειρά A) και στο δεύτερο στάδιο έγινε εκχύλιση των συζευγμένων με θειικό οξύ μεταβολιτών (Σειρά B). Πιο συγκεκριμένα, σε 5 ml ούρων από κάθε δείγμα χωριστά έγινε προσθήκη μεθυλοτεστοστερόνης (50 µL από διάλυμα 5 µg/mL) ως εσωτερικό πρότυπο ISTD. Το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 7,0 με προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0. Ακολούθησε η προσθήκη 100 µL ενζύμου β-γλυκουρονιδάση από *E.coli* και τα δείγματα επώαστηκαν για 1,5 h στους 55 °C. Μετά την υδρόλυση το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 9,5 με προσθήκη στερεού ρυθμιστικού μείγματος ανθρακικών $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1 w/w). Τα υδρολυμένα πλέον στεροειδή που ήταν συζευγμένα με γλυκουρονικό οξύ εκχυλίστηκαν με LLE μετά από προσθήκη 5 mL διαιθυλαιθέρα. Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 min και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 rpm. Έπειτα, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες με εσμουρισμένα πώματα και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N_2 στους 60 °C. TMS παράγωγα παρασκευάστηκαν με προσθήκη 100 µL MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}/2\text{-PrSH}$ (1000:4:3 v/w/v) στο ξηρό υπόλειμμα και επώαση για 30 min στους 80 °C. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια (vials) για ανάλυση με GC-MS/MS (Σειρά A).

Στη συνέχεια, για την εκχύλιση των στεροειδών συζευγμένων με θειικό οξύ, προστέθηκαν 5 mL οξικού αιθυλεστέρα στην υδατική φάση της παραπάνω εκχύλισης, δηλαδή ουσιαστικά στα υπόλοιπα ούρα που είχαν απομείνει. Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 min και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 rpm. Έπειτα, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N_2 στους 60 °C. Έγινε εκ νέου προσθήκη του ISTD της μεθυλοτεστοστερόνης (50 µL από διάλυμα 5 µg/mL) και ρύθμιση του pH στο 5,2 με προσθήκη 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 5,2. Στη συνέχεια έγινε υδρόλυση με προσθήκη 100 µL ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης/αρυλσουλφατάσης από *H. Pomatia* και επώαση για 3 h στους 50 °C. Μετά την υδρόλυση, το pH ρυθμίστηκε στο 9,5 με προσθήκη στερεού ρυθμιστικού μείγματος ανθρακικών $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1 w/w). Τα υδρολυμένα πλέον στεροειδή που ήταν συζευγμένα με θειικό οξύ εκχυλίστηκαν με LLE μετά από προσθήκη 5 mL

διαιθυλαιθέρα. Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 min και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 rpm. Έπειτα, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες με εσφυρισμένα άκρα και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂ στους 60 °C. TMS παράγωγα παρασκευάστηκαν με προσθήκη 100 µL MSTFA/NH₄I/2-PrSH (1000:4:3 v/w/v) στο ξηρό υπόλειμμα και επώαση για 30 min στους 80 °C. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια (vials) για ανάλυση με GC-MS/MS (Σειρά Β).



Εικόνα 7.1. Σχηματική αναπαράσταση παρασκευαστικής πορείας υδρόλυσης και εκχύλισης ούρων για την ανίχνευση μεταβολιτών φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης.

7.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS/MS ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II

Η ανίχνευση των μεταβολιτών φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης έγινε με την ανάλυση των παραγωγοποιημένων εκχυλισμάτων της Σειράς Α και της Σειράς Β με GC-

MS/MS, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα αεριοχρωματογραφίας Nexis GC 2030 συνδεδεμένο με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών GCMS-TQ8040NX εξοπλισμένο με τριπλό τετράπολο αναλυτή μαζών (Simadzu Corporation, Kyoto, Japan). Αυτόματος δειγματολήπτης σε λειτουργία διαμερισμού (split mode) 10:1 χρησιμοποιήθηκε για την έκχυση του δείγματος με όγκο έκχυσης τα 2 μ L και θερμοκρασία στην επιφάνεια διασύνδεσης σταθερή στους 280 $^{\circ}$ C. Το σύστημα αεριοχρωματογραφίας ήταν εξοπλισμένο με μία τριχοειδή χρωματογραφική στήλη SGE BP X5 με ακινητοποιημένο και διασταυρούμενο πολυμερές το 5% διφαινυλο / 95% πολυσιλφενυλενο-σιλοξάνιο και διαστάσεις 30 m μήκος x 0,25 mm εσωτερική διάμετρο, 0,1 μ m πάχος στατικής φάσης. Τη στήλη διαπερνούσε αέριο ήλιο ως κινητή φάση με ροή 1,45 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είχε αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 160 $^{\circ}$ C η οποία αυξήθηκε στους 200 $^{\circ}$ C με ρυθμό αύξησης 10 $^{\circ}$ C/min, έπειτα στους 223 $^{\circ}$ C με ρυθμό αύξησης 2 $^{\circ}$ C/min, έπειτα στους 263 $^{\circ}$ C με ρυθμό αύξησης 6 $^{\circ}$ C/min και τέλος στους 310 $^{\circ}$ C με ρυθμό αύξησης 50 $^{\circ}$ C/min, όπου και διατηρήθηκε για 1,6 min. Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε το αργό με πίεση 4 bar. Η φασματομετρία μαζών πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (εύρος σάρωσης 40-800) ή σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (multiple-reaction monitoring, MRM).

7.2.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II

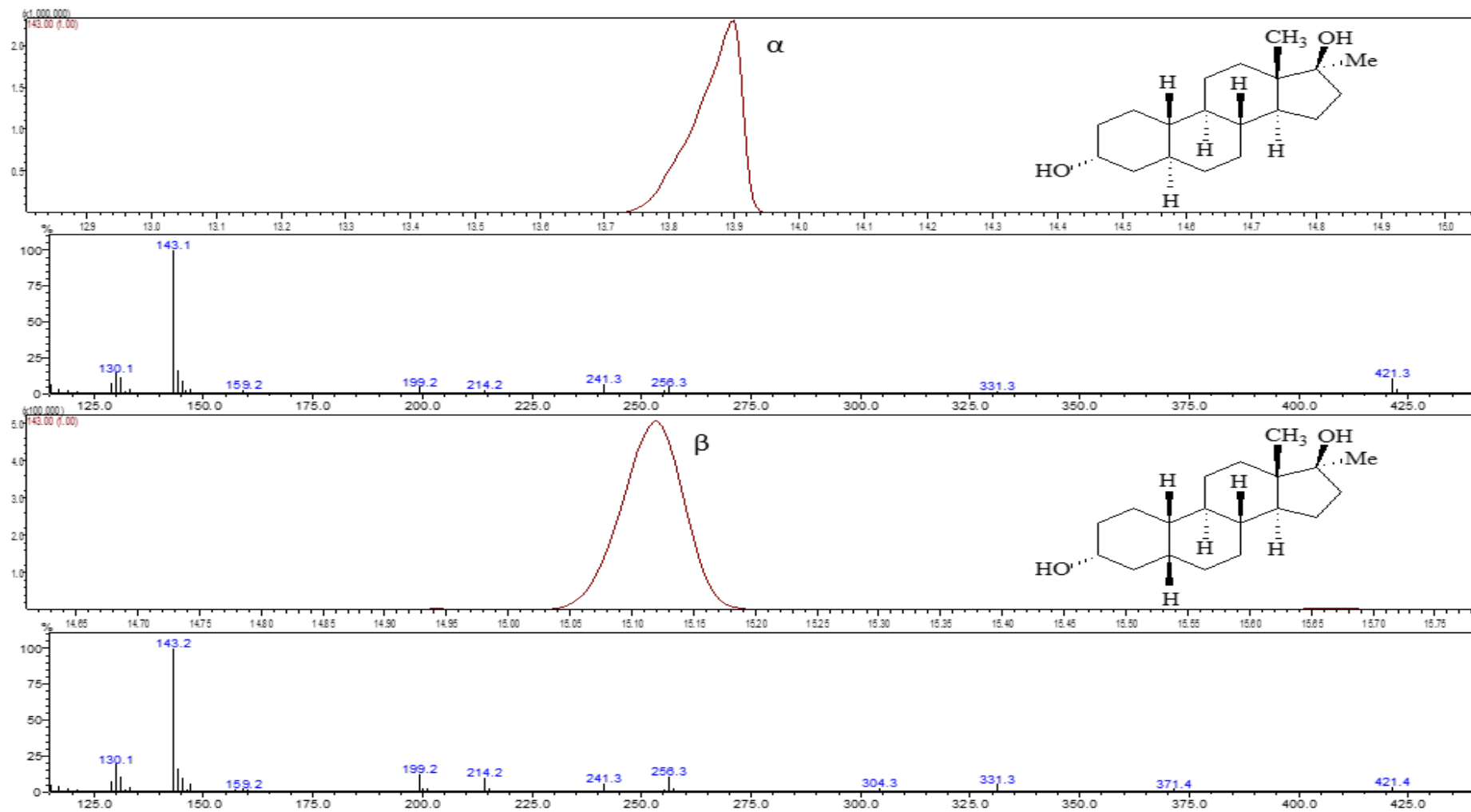
Μετά την ανάλυση των δειγμάτων της Σειράς A με GC-MS/MS ανιχνεύθηκαν τέσσερις μεταβολίτες φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ, οι οποίοι εντοπίστηκαν ως αποσυζευγμένοι μεταβολίτες λόγω της υδρόλυση των δειγμάτων ούρων με το ένζυμο β -γλυκουρονιδάση. Οι δύο μεταβολίτες ήταν οι γνωστοί από τη βιβλιογραφία 17 α -μεθυλο-5 α -εστρανο-3 α , 17 β -διόλη (M1) και 17 α -μεθυλο-5 β -εστρανο-3 α , 17 β -διόλη (M2). Ο M1 με μοριακό ιόν (m/z) 436.30 και χαρακτηριστικές μεταβάσεις 421.30 \rightarrow 331.25, 241.20 και 199.15 ανιχνεύθηκε μέχρι τις 72 h με χρόνο ανάσχεσης (retention time, RT) 13,81 min (Εικόνα 7.2 α). Όμοια, ο M2 με μοριακό ιόν (m/z) 436.30 και χαρακτηριστικές μεταβάσεις 421.30 \rightarrow 331.25, 241.20 και 199.15 ανιχνεύθηκε μέχρι τις 192 h με RT 15,18 min (Εικόνα 7.2 β).

Οι δύο νέοι μεταβολίτες 17 β -μεθυλο-5 β -εστρανο-3 α , 17 α -διόλη (M3) και 17 β -μεθυλο-5 α -εστρανο-3 α , 17 α -διόλη (M4) ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά. Στην ουσία ο M3 είναι επιμερές του M2 και ο M4 επιμερές του M1. Ο M3 με επίσης μοριακό ιόν (m/z) 436.30 και χαρακτηριστικές μεταβάσεις 421.30 \rightarrow 331.25, 241.20 και 199.15 ανιχνεύθηκε μέχρι τις

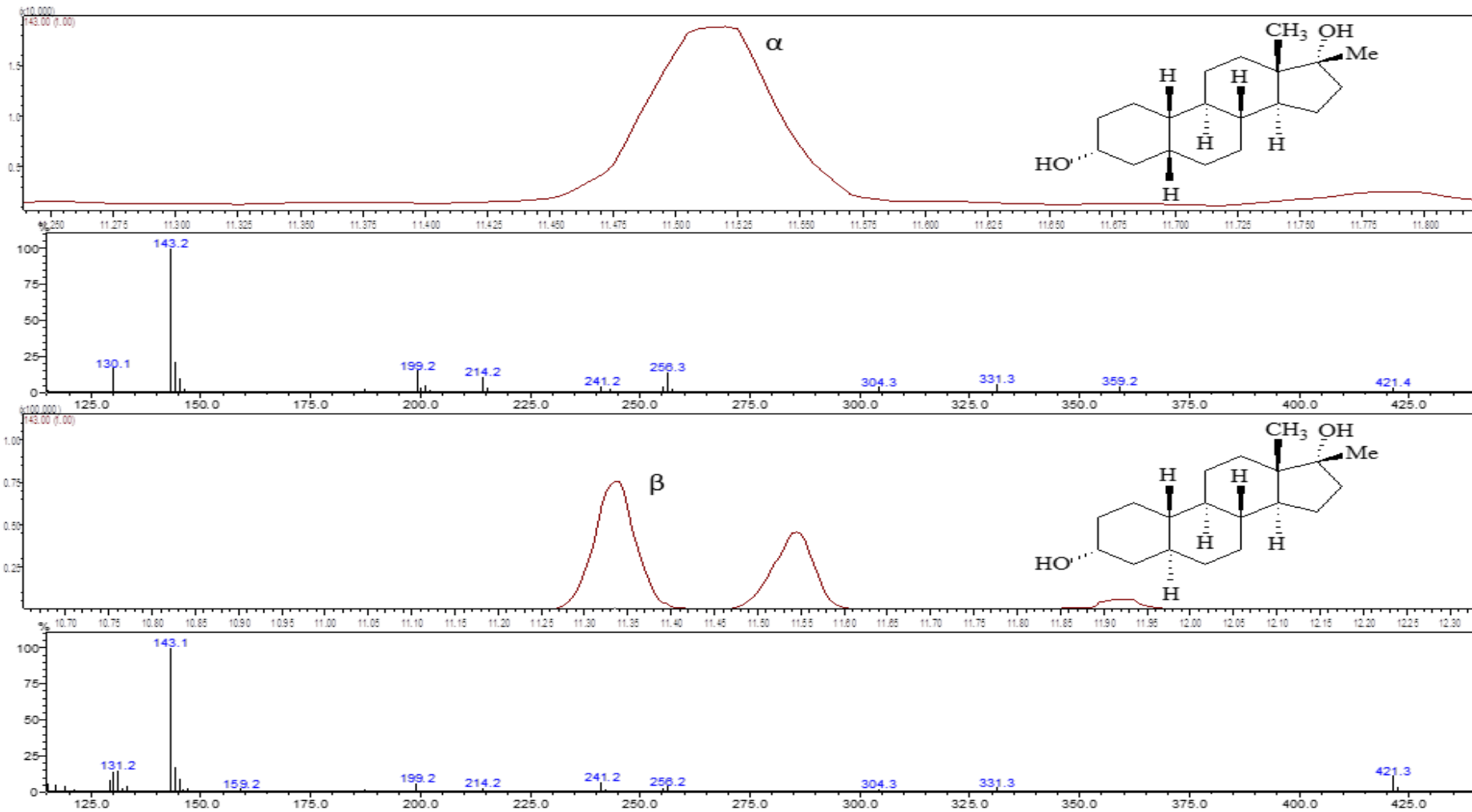
192 h με RT 11,53 min (Εικόνα 7.3 α). Τέλος, ο M4 με μοριακό ιόν (m/z) 436.30 και χαρακτηριστικές μεταβάσεις 421.30 → 331.25, 241.20 και 199.15 ανιχνεύθηκε μέχρι τις 192 h με RT 11,38 min (Εικόνα 7.3 β).

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων της Σειράς Β με GC-MS/MS ανιχνεύθηκαν τρεις μεταβολίτες φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης συζευγμένοι μεθειικό οξύ, οι οποίοι εντοπίστηκαν ως αποσυζευγμένοι μεταβολίτες λόγω της υδρόλυση των δειγμάτων ούρων με το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση/αρυλσουλφάση. Οι τρεις νέοι μεταβολίτες 17α-μεθυλο-5α-εστρανο-3α, 17β-διόλη 3α-θειικό άλας (S1), 17α-μεθυλο-5β-εστρανο-3α, 17β-διόλη 3α-θειικό άλας (S2) και 17β-μεθυλο-5β-εστρανο-3α, 17α-διόλη 3α-θειικό άλας (S3) ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά. Οι S1, S2 και S3 έχουν την ίδια δομή με τους M1, M2 και M3 αντίστοιχα με τοθειικό οξύ να έχει συζευχθεί στο υδροξύλιο του άνθρακα C3 και κατά αναλογία τον S3 να είναι επιμερές του S2. Ο S1 με μοριακό ιόν (m/z) 436.30 και χαρακτηριστικές μεταβάσεις 421.3 → 331.25, 241.20 και 199.15 ανιχνεύθηκε μέχρι τις 72 h με RT 13,81 min (Εικόνα 7.4 α). Ο S2 και ο S3 με τα ίδια φασματομετρικά χαρακτηριστικά με τον S1 ανιχνεύτηκαν μέχρι τις 192 h με RT 15,18 min (Εικόνα 7.4) και 11,53 min (Εικόνα 7.5), αντίστοιχα.

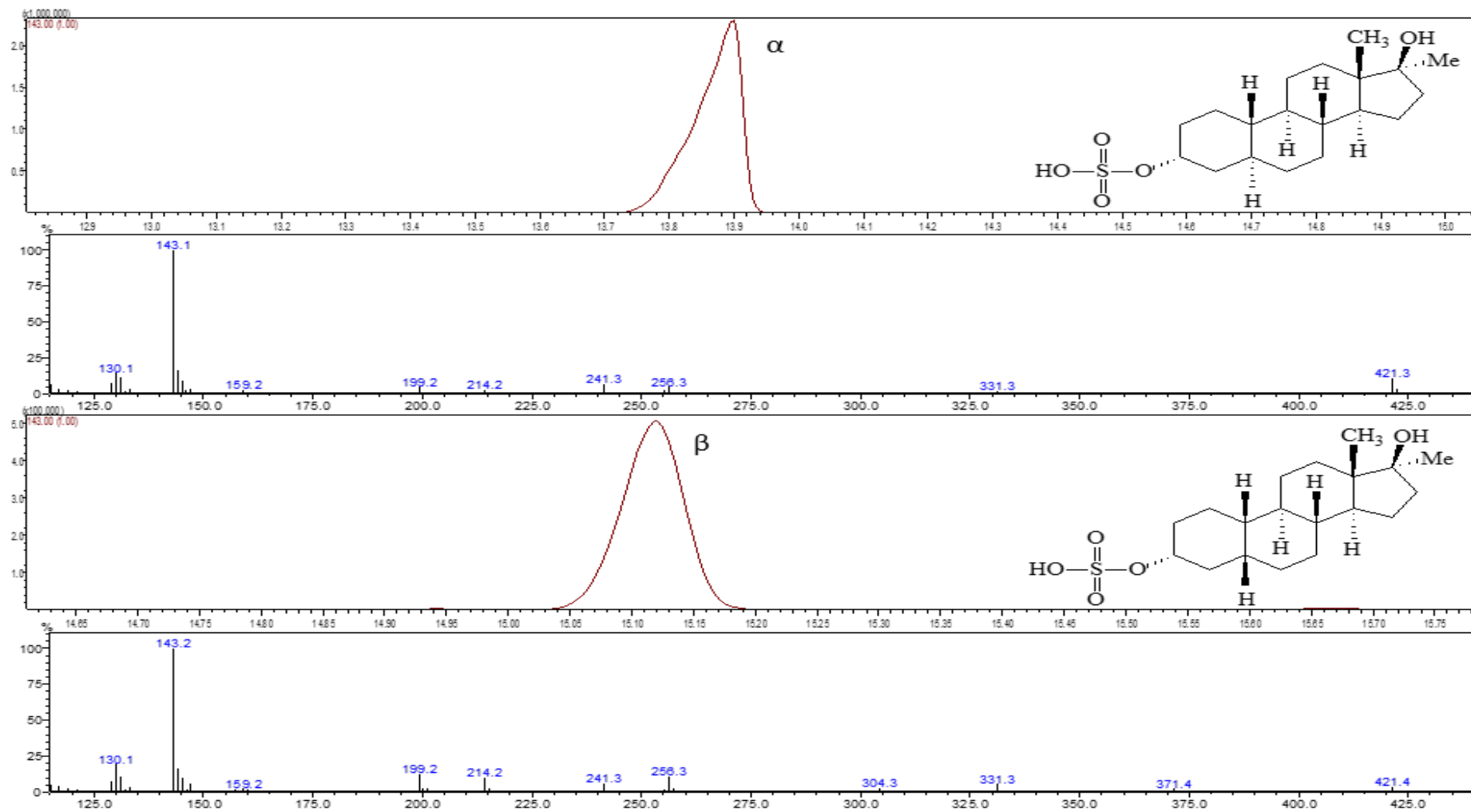
Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δείγματα της Σειράς Α ανιχνεύθηκε και ο μη αποσυζευγμένος μεταβολίτης S2. Η ανίχνευση του συζευγμένου S2 με m/z 331.3 και χαρακτηριστικές μεταβάσεις m/z 256.30 → 241.20, 227.15, 214.20 και 199.15 οφείλεται στην απομάκρυνση ενός μορίουθειικού οξέος στονθάλαμο εισαγωγής του δείγματος που βρίσκεται σε ψηλή θερμοκρασία 280 °C με συνέπεια την εισαγωγή ενός διπλού δεσμού στην θέση της υδροξυλομάδας της θέσης C3. Η ανάλυση αυτού του παραπροϊόντος είχε τη μορφή μιας τριπλής κορυφής γεγονός που δείχνει ότι η δημιουργία του παραπροϊόντος έχει μικρή εκλεκτικότητα. Κάθε μία κορυφή ανιχνεύθηκε με RT 9,14 min, 9,52 min και 9,71 min μέχρι τις 168 h, 144 h και 72 h, αντίστοιχα. Στη Σειρά Α ανιχνεύθηκε και η μητρική ουσία με m/z 432.20 και κύρια θυγατρικά ιόντα ανίχνευσης τα 287.25, 300.30 και 285.20. Η μητρική ουσία ανιχνεύθηκε με RT 17,17 min μέχρι τις 44 h μετά τη χορήγησή της. Επιπλέον, έγινε έλεγχος για υδροξυλιωμένους μεταβολίτες φάσης I, αλλά τα παράθυρα ανίχνευσης τους είχαν πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Οι χρόνοι ανίχνευσης για όλους τους ανιχνευθέντες μεταβολίτες φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.6.



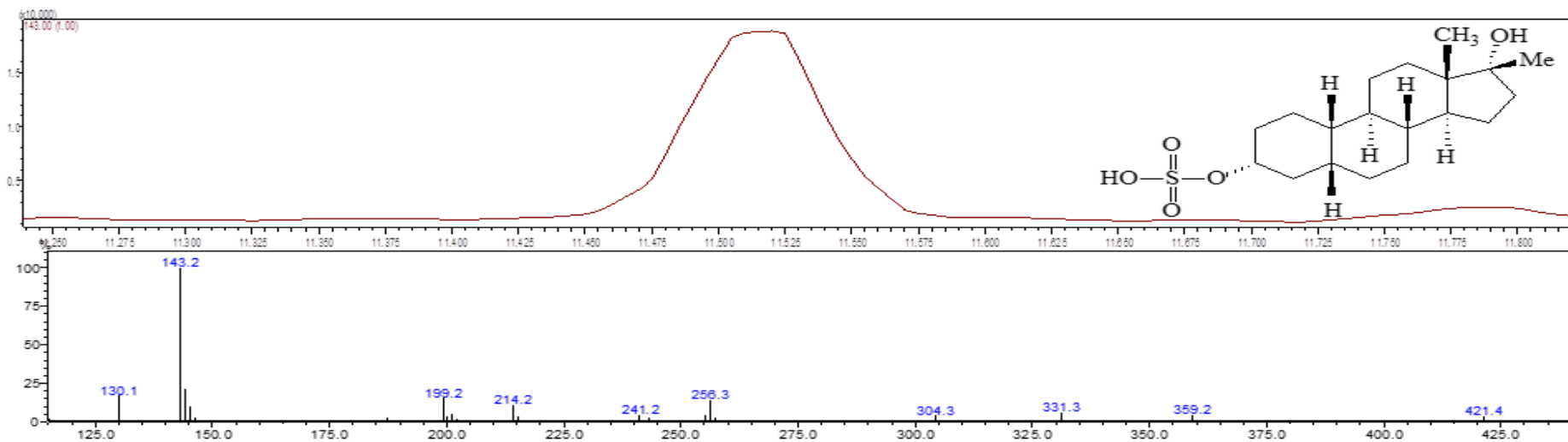
Εικόνα 7.2. Χημική δομή, χρωματογράφημα και φάσμα μαζών των αποσυζευγμένων μεταβολιτών της μεθυλονορτεστοστερόνης (α) M1, (β) M2.



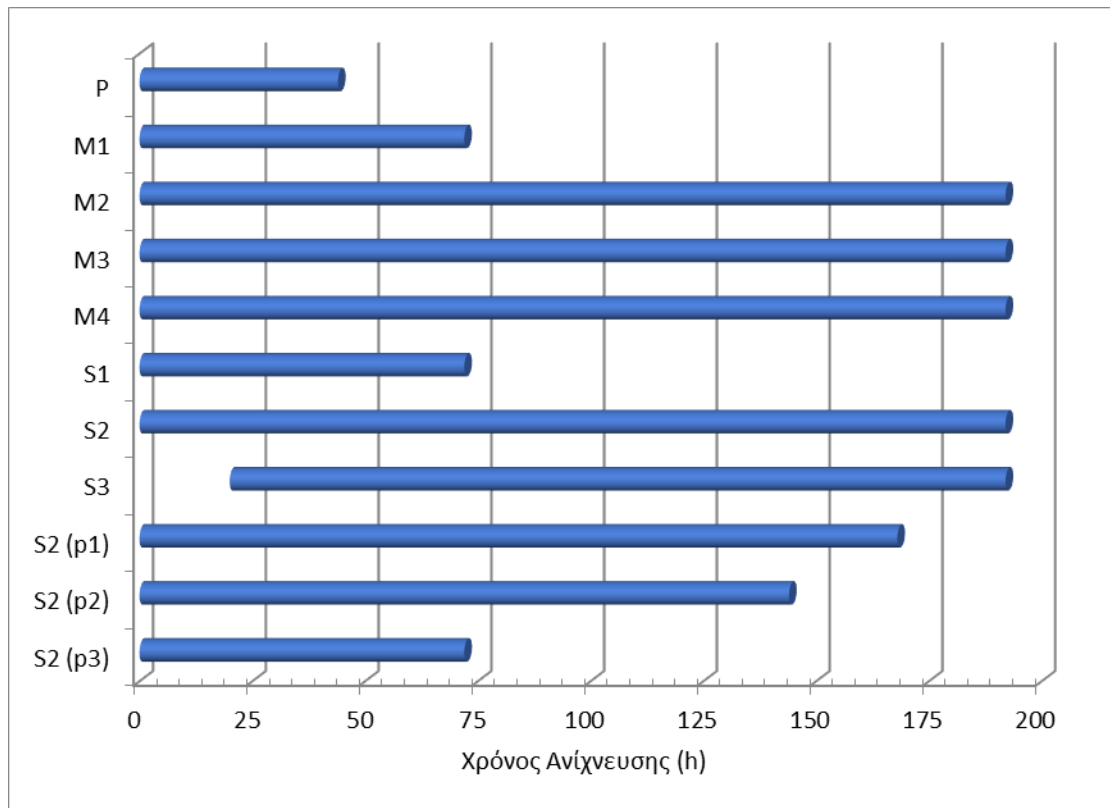
Εικόνα 7.3. Χημική δομή, χρωματογράφημα και φάσμα μαζών των αποσυζευγμένων μεταβολιτών της μεθυλονορτεστοστερόνης (α) M3, (β) M4.



Εικόνα 7.4. Χημική δομή, χρωματογράφημα και φάσμα μαζών των αποσυζευγμένων μεταβολιτών της μεθυλονορτεστοστερόνης (α) S1, (β) S2.



Εικόνα 7.5. Χημική δομή, χρωματογράφημα και φάσμα μαζών του αποσυζευγμένου μεταβολίτη της μεθυλονορτεστοστερόνης S3.



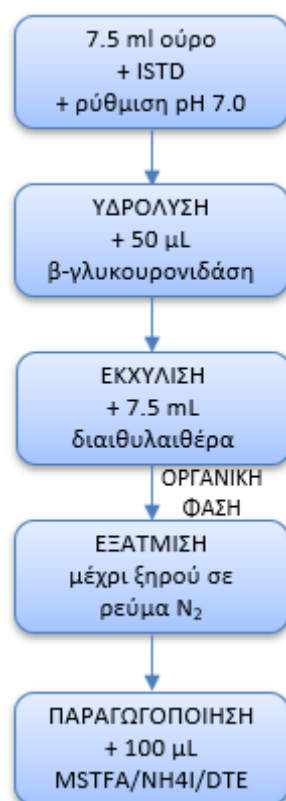
Εικόνα 7.6. Παράθυρα ανίχνευσης για τη μεθυλονορτεστοστρόνη (P) και τους μεταβολίτες φάσης II συζευγμένους με γλυκουρονικό οξύ (M1-M4) ή με θεικό οξύ (S1-S3) μετά τη χορήγηση 10 mg μεθυλονορτεστοστερόνης και ανάλυση των δειγμάτων ούρων με GC-MS/MS.

7.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

7.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΜΕ GC-MS/MS

Για τον έλεγχο του προφίλ των στεροειδών μετά την απλή χορήγηση μεθυλονορτεστοστερόνης ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία που ακολουθείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για τον έλεγχο δειγμάτων ούρων στα πλαίσια της στεροειδούς ενότητας του ABP (Εικόνα 7.7). Για έλεγχο προφίλ στεροειδών επιλέχθηκαν να αναλυθούν τα δείγματα με κωδικό εργαστηρίου M940, M944, M948, M954 και M955 που αντιστοιχούν σε 0, 20, 44, 168 και 195 h μετά τη χορήγηση, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, σε 7,5 ml ούρων από κάθε δείγμα χωριστά έγινε προσθήκη μεθυλοτεστοστερόνης (50 µL από διάλυμα 7,5 µg/mL) ως εσωτερικό πρότυπο ISTD. Το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 7,0 με προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών

pH 7,0. Ακολούθησε η προσθήκη 50 μL ενζύμου β -γλυκουρονιδάση από *E.coli* και τα δείγματα επώαστηκαν για 1,5 h στους 50 $^{\circ}\text{C}$. Μετά την υδρόλυση το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 9,0-10,0 με προσθήκη 1,4 g στερεού ρυθμιστικού μείγματος ανθρακικών $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1 w/w). Στη συνέχεια τα ούρα εκχυλίστηκαν με LLE μετά από προσθήκη 7,5 mL διαιθυλαιθέρα και 3 g άνυδρου Na_2SO_4 . Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 min και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 rpm. Έπειτα, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες με εσφυρισμένα πώματα και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N_2 στους 50 $^{\circ}\text{C}$. TMS παράγωγα παρασκευάστηκαν με προσθήκη 100 μL MSTFA/ NH_4I /DTE (1000:2:6 v/w/v) στο ξηρό υπόλειμμα και επώαση για 30 min στους 80 $^{\circ}\text{C}$. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια (vials) για ανάλυση με GC-MS/MS.



Εικόνα 7.7. Σχηματική αναπαράσταση παρασκευαστικής πορείας υδρόλυσης και εκχύλισης ούρων για τον έλεγχο του προφίλ των στεροειδών.

7.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS/MS ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

Ο έλεγχος του προφίλ των στεροειδών μετά τη χορήγηση της μεθυλονορτεστοστερόνης έγινε με την ανάλυση των παραγογοποιημένων οργανικών εκχυλισμάτων με GC-MS/MS, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα

αεριοχρωματογραφίας Nexis GC 2030 συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών GCMS-TQ8040NX εξοπλισμένο με τριπλό τετράπολο αναλυτή μαζών (Simadzu Corporation, Kyoto, Japan). Αυτόματος δειγματολήπτης σε λειτουργία διαμερισμού (split mode) 10:1 χρησιμοποιήθηκε για την έκχυση του δείγματος με όγκο έκχυσης τα 2 μL και θερμοκρασία στην επιφάνεια διασύνδεσης σταθερή στους 280 $^{\circ}\text{C}$. Το σύστημα αεριοχρωματογραφίας ήταν εξοπλισμένο με μία τριχοειδή χρωματογραφική στήλη SGE BP X5 με ακινητοποιημένο και διασταυρούμενο πολυμερές το 5% διφαινυλο / 95% πολυσιλφενυλενο-σιλοξάνιο και διαστάσεις 30 m μήκος x 0,25 mm εσωτερική διάμετρο, 0,1 μm πάχος στατικής φάσης. Τη στήλη διαπερνούσε αέριο ήλιο ως κινητή φάση με ροή 1,45 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είχε αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 160 $^{\circ}\text{C}$ η οποία αυξήθηκε στους 200 $^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό αύξησης 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, έπειτα στους 223 $^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό αύξησης 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, έπειτα στους 263 $^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό αύξησης 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ και τέλος στους 310 $^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό αύξησης 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, όπου και διατηρήθηκε για 1,6 min. Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε το αργό με πίεση 4 bar. Η φασματομετρία μαζών πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (εύρος σάρωσης 40-800).

7.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

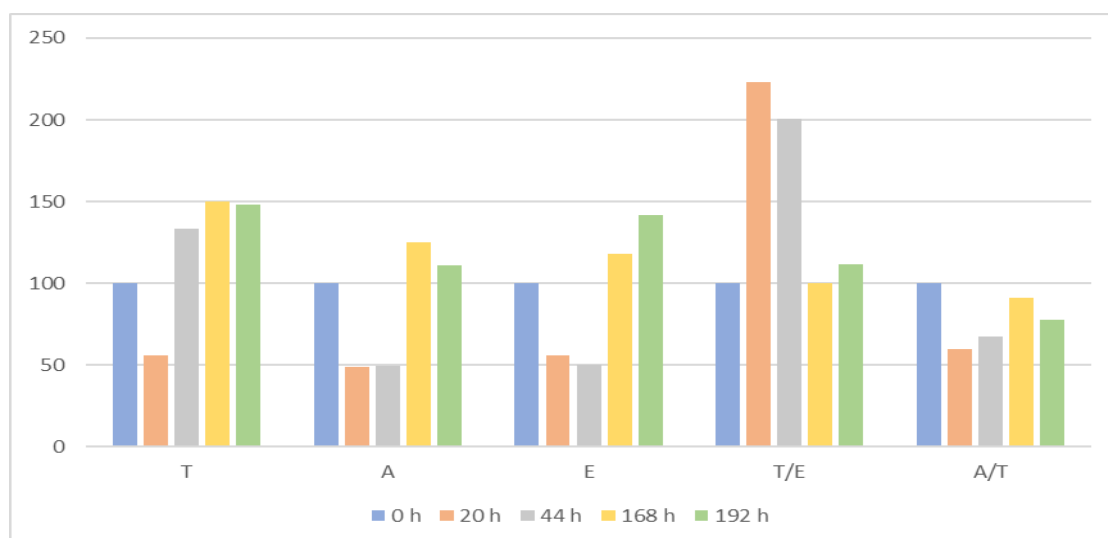
Μετά την ανάλυση των δειγμάτων με GC-MS/MS έγινε ποσοτικοποίηση των παραμέτρων της στεροειδούς ενότητας του ABP. Τα δείγματα της μεταβολικής μελέτης αναλύθηκαν μαζί με καμπύλη αναφοράς πέντε σημείων που περιλαμβάνει τα ενδογενή στεροειδή όπως αυτά ελέγχονται στο βιολογικό διαβατήριο των αθλητών. Οι αναλύτες που ελέγχθηκαν ήταν η τεστοστερόνη και η επιτεστοστερόνη με εύρος 7,5 έως 200 ng/ml, η ανδροστερόνη και η ετιοχολανολόνη με εύρος από 150 έως 4000 ng/ml και οι 5 α και 5 β 3 α ,17 β ανδροστανόλες με εύρος από 15 έως 400 ng/ml. Η καμπύλη αναφοράς έγινε με προσθήκη προτύπων διαλυμάτων σε συνθετικά ούρα λόγω της ενδογενούς φύσης αυτών των αναλυτών.

Στα πλαίσια του ελέγχου του προφίλ των στεροειδών ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση τεστοστερόνης (testosterone, T), επιτεστοστερόνης (epitestosterone, EpT), ανδροστερόνης (androsterone, A), ετιοχολανολόνης (etiocholanolone, Etio), 5 α -ανδροστανό-3 α ,17 β -διόλης (5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, 5 α Adiol) και 5 β -ανδροστανό-3 α ,17 β -διόλης (5 β -androstane-3 α ,17 β -diol, 5 β Adiol) στα ούρα και υπολογίστηκαν οι λόγοι T/E, A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol και 5 α Adiol/E που προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις των παραπάνω στεροειδών ορμονών (ng/mL), μετά από ανάλυση με GC-MS/MS (Πίνακας 7.2).

Πίνακας 7.2. Τιμές προφίλ στεροειδών μετά τη χορήγηση 10 mg μεθυλονορτεστοστερόνης.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ ABP	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)				
	0	20	44	168	192
T	7,59	4,25	10,1	11,4	11,2
A	543	267	268	680	603
Etio	1240	691	625	1461	1755
EpT	3,15	0,79	2,09	4,73	4,17
5αAdiol	28,3	23,2	20,7	38,8	40,5
5βAdiol	126	116	130	153	192
T/E	2,41	5,38	4,84	2,41	2,70
A/T	71,5	62,8	26,5	59,7	53,7
5αAdiol/5βAdiol	0,23	0,20	0,16	0,25	0,21
5αAdiol/EpT	39,8	147	62,3	32,3	46,1
A/E	0,44	0,39	0,43	0,47	0,34

Στην Εικόνα 7.8 παρουσιάζονται σε μορφή γραφήματος οι μεταβολές για τις τιμές πέντε βασικών παραμέτρων της στεροειδούς ενότητας του ABP, θεωρώντας ότι η εκάστοτε τιμή που αντιστοιχεί στο χρόνο πριν τη χορήγηση της μεθυλονορτεστοστερόνης (0 h) αποτελεί το 100% της συγκέντρωσης και οι τιμές από τις δειγματοληψίες μετά τη χορήγηση εκτιμώνται σε σχέση τη συγκέντρωση πριν τη χορήγηση.



Εικόνα 7.8. Γραφική απεικόνιση των μεταβολών του προφίλ των στεροειδών για τις παραμέτρους T, A, E, T/E και A/T, θεωρώντας πως η τιμή στο χρόνο 0 h αποτελεί το 100% της εκάστοτε τιμής.

7.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

7.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΜΕ ΙΕΦ

Για την εκτίμηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης στα ούρα μετά τη μονή χορήγηση μεθυλονορτεστοστερόνης ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία της μεθόδου σάρωσης που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών (Εικόνα 7.9). Για τον συγκεκριμένο σκοπό επιλέχθηκαν να αναλυθούν τα δείγματα με κωδικό εργαστηρίου M940, M948 και M953 που αντιστοιχούν σε 0, 44 και 144 h μετά τη χορήγηση, αντίστοιχα. Μαζί με τα δείγματα της μεταβολικής μελέτης παρασκευάστηκε και ένα λευκό δείγμα ούρου ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) και ένα διάλυμα συνθετικών ερυθροποιητινών ως θετικός μάρτυρας (positive control).



Εικόνα 7.9. Σχηματική απεικόνιση παρασκευαστικής διαδικασίας ανίχνευσης ερυθροποιητίνης με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με ΙΕΦ και ανοσοσύτωση πρωτεϊνών.

Αρχικά 20 mL ούρων από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 3500 rpm στους 20 °C μετά την προσθήκη 400 µL διαλύματος αναστολέων πρωτεασών (complete) και ρύθμιση του pH των ούρων με προσθήκη 2 mL διαλύματος Tris-HCL 3,75 M σε pH 7,4.

Ακολούθησε μεταφορά του μισού υπερκείμενου σε φίλτρο υπερδιήθησης Amicon Ultra-15 YM30 και φυγοκέντρηση για 15 min στα 3500 rpm στους 20 °C. Στο φίλτρο προστέθηκε το υπόλοιπο μισό υπερκείμενο της αρχικής φυγοκέντρησης και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση για 15 min στα 3500 rpm στους 20 °C. Το συνολικό διήθημα απορρίφθηκε και πραγματοποιήθηκε πλύση του κατακρατούμενου μέρους του φίλτρου με φυγοκέντρηση για 20 min στα 3500 rpm στους 20 °C μετά την προσθήκη 400 μL διαλύματος αναστολέων πρωτεασών (complete) και διαλύματος Tris-HCL 50 mM pH 7,4 μέχρι τη χαραγή του φίλτρου. Έπειτα, έγινε μεταφορά του πλυμένου κατακρατούμενου μέρους του φίλτρου σε φίλτρο Amicon Ultra-4 YM30 και φυγοκέντρηση για 60 min στα 3500 rpm στους 20 °C. Το τελικό συμπύκνωμα των ούρων, που εμπεριέχει μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 30 kDa, όπως η ερυθροποιητίνη, μεταφέρθηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf τα οποία φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυση με IEF.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με ισοηλεκτρική εστίαση χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα που περιλαμβάνει ένα διαχωριστικό θάλαμο με ψυκτική πλάκα, ηλεκτρόδια, πώμα προστασίας, κυκλοφορητή νερού και τροφοδοτικό. Παρασκευάστηκε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου IEF με βαθμίδωση pH 2,0 – 6,0 μέσω της χρήσης αμφολυτών-φορέων. Το πήκτωμα με το υποστηρικτικό φύλλο Gelbond τοποθετήθηκε στην ψυκτική πλάκα του συστήματος ηλεκτροφόρησης και πάνω στο πήκτωμα τοποθετήθηκαν οι λωρίδες ανόδου και καθόδου (electrode strips), εμποτισμένες με 2,5 mL διαλύματος ηλεκτρολύτη ανόδου και διαλύματος ηλεκτρολύτη καθόδου αντίστοιχα. Με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων πάνω στις λωρίδες και τη συναρμολόγηση της συσκευής έγινε ρύθμιση (prefocusing) του συστήματος για 60 min στα 250 V, 25 mA (1 mA/cm πηκτώματος) και 25 W (1 W/cm πηκτώματος). Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής το πήκτωμα ήταν έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών.

Από τα συμπυκνωμένα δείγματα ούρων χρησιμοποιήθηκαν 20 μL τα οποία, αφού ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου, θερμάνθηκαν για 5 min στους 70 °C σε μεταλλόλουτρο και έπειτα αμέσως βυθίστηκαν σε παγωμένες μεταλλικές υποδοχές για 1 min. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκε μη-ιονικό απορρυπαντικό Tween 80 σε τελική συγκέντρωση 1% (v/v). Σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώθηκαν 20 μL δείγματος, συναρμολογήθηκε εκ νέου η συσκευή με τοποθέτηση των ηλεκτροδίων πάνω στις λωρίδες και έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέχρι τα 4000 V.h. στα 2000 V, 25 mA (1 mA/cm πηκτώματος) και 25 W (1 W/cm πηκτώματος).

Μετά την επίτευξη του διαχωρισμού, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε διαδικασία διπλής ανοσοσύτωσης (western blotting), κατά την οποία το σύνολο των πρωτεϊνών

μεταφέρονται από το πήκτωμα σε υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς τύπου PVDF. Πιο συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης έγινε αφαίρεση του σημείου που ήταν τα πηγαδάκια και το πήκτωμα εκπλύθηκε με διάλυμα Tris/Γλυκίνη 50 mM/192 mM pH 8,0 για 3 min, ενώ έπειτα αφαιρέθηκε το υποστηρικτικό φύλλο Gelbond. Δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» μεταφοράς με κατά σειρά από κάτω προς τα επάνω 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, 1 υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς τύπου PVDF, 1 υδροφιλική μεμβράνη μεταφοράς Durapore, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες και 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, όλα σε διαστάσεις 24 cm x 7 cm και εμποτισμένα σε διάλυμα Tris/Γλυκίνη 50 mM/192 mM pH 8,0. Το «σάντουιτς» μεταφοράς τοποθετήθηκε πάνω στην άνοδο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς TE77 και από επάνω τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο καθόδου της συσκευής. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε για 30 min στα 168 mA, 200 V και 24 W.

Μετά το πέρας της πρώτης μεταφοράς η PVDF μεμβράνη που έφερε τις πρωτεΐνες αφού εκπλύθηκε με διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS επώαστηκε σε διάλυμα 5 mM DTT/PBS για 1 h στους 37 °C υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο. Έπειτα το διάλυμα του DTT απορρίφθηκε, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και ακολούθησε η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με επώαση σε διάλυμα 5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για περίπου 12 h στους 4 °C υπό ελαφριά ανάδευση. Στο τέλος της δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και ακολούθησε επώασή της με μονοκλωνικό αντίσωμα μύος MoAb ειδικό προς την ανθρώπινη ερυθροποιητίνη αραιωμένο με τίτλο 1/1000 σε 1% άπαχο γάλα τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 0,5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 10 min κάθε έκπλυση και δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» μεταφοράς με κατά σειρά από κάτω προς τα επάνω 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, τη μεμβράνη PVDF με τις πρωτεΐνες και το μονοκλωνικό αντίσωμα, 1 υδροφιλική μεμβράνη μεταφοράς Durapore, 1 δεύτερη υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς τύπου PVDF και 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, όλα σε διαστάσεις 24 cm x 7 cm και εμποτισμένα σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,7% (εκτός από τη μεμβράνη PVDF με τις πρωτεΐνες και το μονοκλωνικό αντίσωμα). Το «σάντουιτς» μεταφοράς τοποθετήθηκε πάνω στην άνοδο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς TE77 και από επάνω τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο καθόδου της συσκευής. Η μεταφορά των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε για 10 min στα 134 mA, 200 V και 24 W.

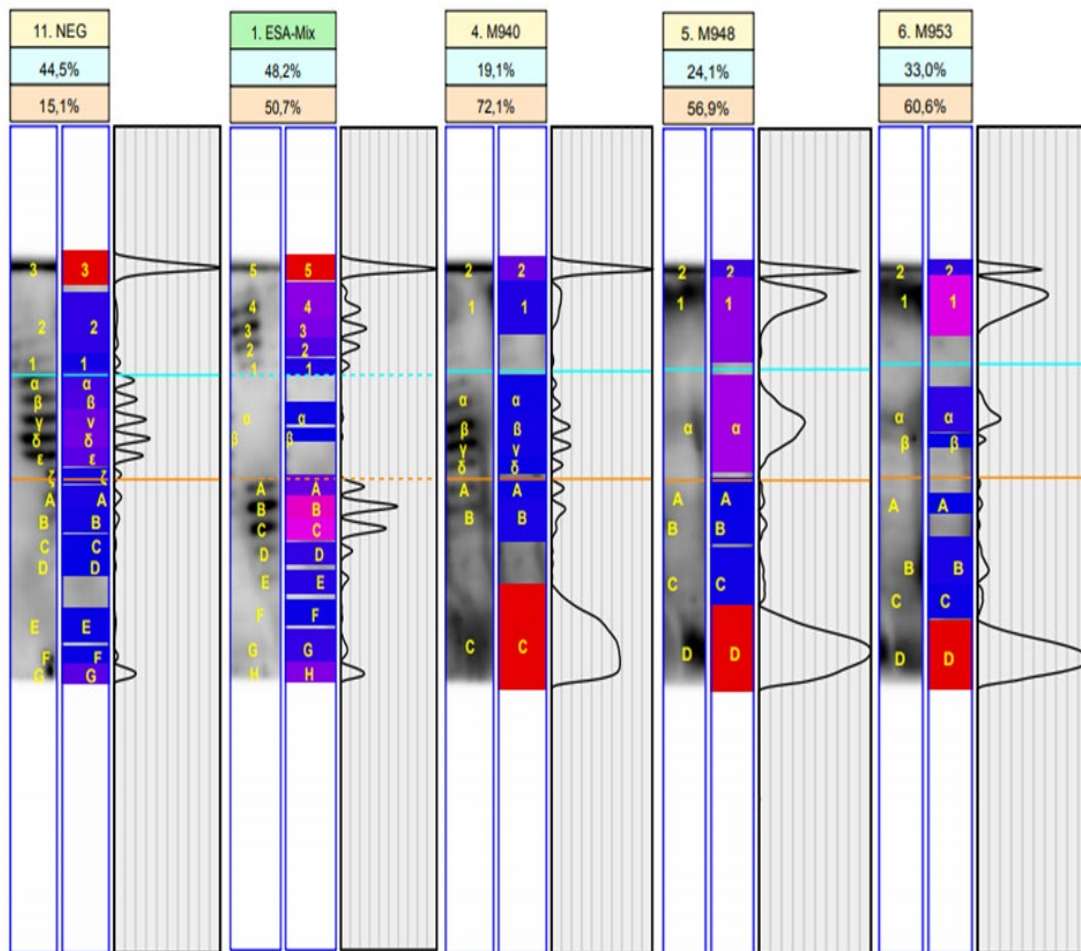
Μετά το πέρας της δεύτερης μεταφοράς η PVDF μεμβράνη που έφερε τα μονοκλωνικά αντισώματα αφού εκπλύθηκε με PBS και ακολούθησε η δέσμευση των μη

ειδικών θέσεων με επώαση σε διάλυμα 5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση. Στο τέλος της δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και ακολούθησε επώασή της με πολυκλωνικό βιοτινυλωμένο αντίσωμα αιγός ειδικό προς όλες τις ανοσοσφαιρίνες μύος του τύπου IgG αραιωμένο με τίτλο 1/1500 σε 1% άπαχο γάλα τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 0,5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 10 min κάθε έκπλυση και ακολούθησε επώασή της με 190 μL διαλύματος συμπλόου στρεπταβιδίνης-HRP σε 50 mL διαλύματος 1% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση. Τέλος η μεμβράνη που πλέον έφερε το σύμπλοκο μονοκλωνικό αντίσωμα-πολυκλωνικό βιοτινυλωμένο αντίσωμα-στρεπταβιδίνης-HRP ξεπλύθηκε 3 φορές με PBS για 10 min κάθε έκπλυση.

Η εμφάνιση του σήματος της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση υποστρώματος χημειοφωταύγειας για την HRP (παρουσία λουμινόλης 35 και H₂O₂) και τον αναλυτή απεικόνισης φωταύγειας LAS-4000. Το τελικό αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η δημιουργία μιας εικόνας που χαρτογραφεί την αρχική θέση και ποσότητα της ερυθροποιητίνης στο πήκτωμα μετά το διαχωρισμό με IEF.

7.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Η ανάλυση του ισοηλεκτρικού προφίλ της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με το ειδικό λογισμικό Gel Analysis System for Erythropoietin (GASepo, v1.3). Στην Εικόνα 7.10 παρουσιάζονται τα ισοηλεκτρικά προφίλ κατανομής των ερυθροποιητινών με πρώτο το προφίλ του αρνητικού μάρτυρα που έχει μόνο ενδογενή ερυθροποιητίνη, έπειτα του θετικού μάρτυρα που έχει μόνο εξωγενείς ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες και μετά των τριών δειγμάτων ούρων της μεταβολικής μελέτης μονής χορήγησης μεθυλονορτεστοστερόνης που αντιστοιχούν σε 0, 44 και 144 h μετά τη χορήγηση, αντίστοιχα. Στο πρώτο δείγμα της μελέτης πριν τη χορήγηση ανιχνεύθηκε ενδογενής ερυθροποιητίνη, ενώ στα άλλα δύο δείγματα που αντιστοιχούν στις δειγματοληψίες μετά τη χορήγηση οι ζώνες της ενδογενούς ερυθροποιητίνης έχουν χαμηλότερη ένταση, ενώ ήταν και λιγότερες σε αριθμό σε σχέση με τα πρότυπα προφίλ που έχουν καθοριστεί από τον WADA.



Εικόνα 7.10. Ισοηλεκτρικά προφίλ κατανομής ερυθροποιητινών στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά το διαχωρισμό με IEF για τον έλεγχο των επιπέδων ενδογενούς ερυθροποιητινής μετά τη μονή χορήγηση μεθυλονορτεστοστερόνης. Η γαλάζια και η πορτοκαλί γραμμή οριοθετούν την ενδογενή περιοχή, ενώ πάνω από τη γαλάζια γραμμή βρίσκεται η βασική περιοχή και κάτω από την πορτοκαλί γραμμή η όξινη περιοχή. Τα ελληνικά γράμματα καθορίζουν τις ζώνες στην ενδογενή περιοχή, οι αριθμοί στη βασική περιοχή και τα λατινικά γράμματα στην όξινη περιοχή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

IN VIVO MELETH LGD-4033

8.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ LGD-4033

Πραγματοποιήθηκε μελέτη με μονή χορήγηση σε υγιή εθελοντή δια του στόματος μιας κάψουλας του σκευάσματος Ligandrol που περιείχε 10 mg LGD-4033. Ο εθελοντής ήταν άνδρας, καυκάσιος, 49 ετών, 60 kg και δεν είχε λάβει κάποιο φαρμακευτικό σκεύασμα ή συμπλήρωμα διατροφής τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες πριν από τη μελέτη. Δείγματα ούρων συλλέχθηκαν πριν (0 h) και μετά τη χορήγηση μέχρι τις 494 h (σχεδόν 21 ημέρες), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8.1. Τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν με LC-MS(/MS) για ανίχνευση μεταβολιτών φάσης I και φάσης II, με GC-MS για έλεγχο του προφίλ των στεροειδών και με SDS-PAGE για εκτίμηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την Κυπριακή Αρχή Αντι-Ντόπινγκ (Cyprus Anti-Doping Authority, CyADA) και εγκρίθηκε από την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής Κύπρου (Αριθμός Απόφασης: ΕΕΒΚ 21.1.01.03/ 21.04.2017).

Πίνακας 8.1. Πίνακας καταγραφής στοιχείων συλλογής δειγμάτων ούρων μετά την απλή χορήγηση LGD-4033 σε εθελοντή.

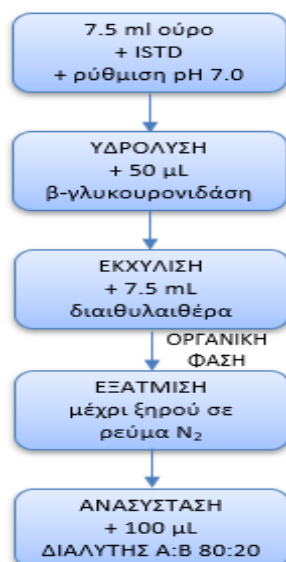
ΗΜΕΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΩΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	ΕΙΔΙΚΟ ΒΑΡΟΣ
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	23:00	BLANK1	-	1,029
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	7:30	BLANK2	-	1,028
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	23:00	BLANK3	-	1,030
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	8:20	BLANK4	-	1,022
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	20:00	BLANK5	-	1,021
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	7:40	BLANK6	-	1,022
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	21:30	BLANK7	-	1,021
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	8:00	BLANK8	-	1,029
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΓΗΣΗ	23:50	BLANK9	-	1,030
1 ^η Ημέρα	6:00	T0	0	1,026
1 ^η Ημέρα	8:00	D1-1	2	1,026
1 ^η Ημέρα	10:00	D1-2	4	1,025
1 ^η Ημέρα	10:30	D1-3	4,5	1,019
1 ^η Ημέρα	14:00	D1-4	8	1,020

1 ^η Ημέρα	16:20	D1-5	10,5	1,015
1 ^η Ημέρα	18:00	D1-6	12	1,015
1 ^η Ημέρα	21:00	D1-7	15	1,014
2 ^η Ημέρα	2:00	D2-1	20	1,011
2 ^η Ημέρα	6:00	D2-2	24	1,020
2 ^η Ημέρα	18:00	D2-3	36	1,020
3 ^η Ημέρα	6:00	D3-1	48	1,026
3 ^η Ημέρα	18:00	D3-2	60	1,022
4 ^η Ημέρα	6:00	D4-1	72	1,014
4 ^η Ημέρα	18:00	D4-2	84	1,021
5 ^η Ημέρα	6:00	D5-1	96	1,028
5 ^η Ημέρα	18:00	D5-2	108	1,026
6 ^η Ημέρα	6:00	D6-1	120	1,025
6 ^η Ημέρα	21:00	D6-2	135	1,020
7 ^η Ημέρα	7:30	D7-1	145,5	1,026
7 ^η Ημέρα	18:20	D7-2	156,5	1,022
8 ^η Ημέρα	6:00	D8-1	168	1,026
8 ^η Ημέρα	18:00	D8-2	180	1,022
9 ^η Ημέρα	7:00	D9-1	193	1,021
9 ^η Ημέρα	18:00	D9-2	204	1,020
10 ^η Ημέρα	6:00	D10-1	216	1,025
10 ^η Ημέρα	18:00	D10-2	228	1,026
11 ^η Ημέρα	6:00	D11-1	240	1,027
11 ^η Ημέρα	18:00	D11-2	252	1,031
12 ^η Ημέρα	6:00	D12-1	264	1,024
12 ^η Ημέρα	21:00	D12-2	279	1,020
13 ^η Ημέρα	6:00	D13-1	288	1,025
13 ^η Ημέρα	18:00	D13-2	300	1,025
14 ^η Ημέρα	6:00	D14-1	312	1,026
14 ^η Ημέρα	18:00	D14-2	324	1,010
15 ^η Ημέρα	7:00	D15-1	337	1,020
15 ^η Ημέρα	19:00	D15-2	349	1,025
16 ^η Ημέρα	7:00	D16-1	361	1,024
16 ^η Ημέρα	19:00	D16-2	373	1,020
17 ^η Ημέρα	7:00	D17-1	385	1,021
17 ^η Ημέρα	19:00	D17-2	397	1,014
18 ^η Ημέρα	7:00	D18-1	409	1,020
18 ^η Ημέρα	18:30	D18-2	420,5	1,027
19 ^η Ημέρα	6:00	D19-1	432	1,026
19 ^η Ημέρα	19:00	D19-2	445	1,024
20 ^η Ημέρα	7:00	D20-1	457	1,019
20 ^η Ημέρα	18:30	D20-2	468,5	1,030
21 ^η Ημέρα	7:00	D21-1	481	1,019
21 ^η Ημέρα	19:30	D21-2	494	1,019

8.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΚΑΙ ΦΑΣΗΣ II ΤΟΥ LGD-4033

8.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΜΕ LC-MS(/MS)

Για την ανίχνευση των μεταβολιτών φάσης I του LGD-4033 ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία σάρωσης που ακολουθείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για τον έλεγχο δειγμάτων ούρων σε επίπεδο ρουτίνας (Εικόνα 8.1), η οποία εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα ούρων της μελέτης. Μαζί με τα δείγματα της μεταβολικής μελέτης παρασκευάστηκαν ένα λευκό δείγμα ως αρνητικός μάρτυρας και πέντε δείγματα ελέγχου ως θετικοί μάρτυρες για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης με τελικές συγκεντρώσεις 5, 10, 40, 80 και 133 ng/mL μετά από προσθήκη σε 7,5 mL λευκών ούρων 7,5, 15, 60 μL από διάλυμα LGD-4033 συγκέντρωσης 5 μg/mL και 6, 10 μL από διάλυμα LGD-4033 συγκέντρωσης 100 μg/mL, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, σε 7,5 ml ούρων από κάθε δείγμα (δείγμα εθελοντή ή δείγμα ελέγχου) χωριστά έγινε προσθήκη διαλύματος μεθυλοτεστοστερόνης και μεφρουσίδης (100 μL από διάλυμα 7,5 μg/mL και 15 μg/mL) ως εσωτερικό πρότυπο ISTD. Το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 7,0 με προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0. Ακολούθησε η προσθήκη 50 μL ενζύμου β-γλυκουρονιδάση από *E.coli* και τα δείγματα επώαστηκαν για 1,5 h στους 50 °C. Μετά την υδρόλυση το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 9,0-10,0 με προσθήκη 1,4 g στερεού ρυθμιστικού μείγματος ανθρακικών NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1 w/w). Στη συνέχεια τα ούρα εκχυλίστηκαν με LLE μετά από προσθήκη 7,5 mL διαιθυλαιθέρα και 3 g άνυδρου Na₂SO₄. Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 min και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 rpm. Έπειτα, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂ στους 50 °C μετά την προσθήκη 50 μL διαλύματος CH₃COOH. Ακολούθησε ανασύσταση του ξηρού υπολείμματος με προσθήκη 100 μL μείγματος της κινητής φάσης της υγροχρωματογραφίας διαλύτης A : διαλύτης B (80:20 v/v). Το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια (vials) για ανάλυση με LC-MS(/MS).



Εικόνα 8.1. Σχηματική αναπαράσταση παρασκευαστικής πορείας υδρόλυσης και εκχύλισης ούρων για την ανίχνευση μεταβολιτών φάσης I του LGD-4033.

8.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ II ΜΕ LC-MS(/MS)

Για την ανίχνευση των μεταβολιτών φάσης II του LGD-4033 ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία της απλής αραιώσης των δειγμάτων ούρων (Εικόνα 8.2). Πιο συγκεκριμένα, σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες προστέθηκαν 50 µL μιπραμίνης από διάλυμα 5 µg/mL ως εσωτερικό πρότυπο ISTD, τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂ στους 50 °C. Έπειτα, προστέθηκαν 25 µL ούρων από κάθε δείγμα και 125 µL ACN για την αραιώση των ούρων. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια (vials) για ανάλυση με LC-MS(/MS).



Εικόνα 8.2. Σχηματική αναπαράσταση παρασκευαστικής πορείας αραιώσης ούρων για την ανίχνευση μεταβολιτών φάσης II του LGD-4033.

8.2.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ LC-MS ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΚΑΙ ΦΑΣΗΣ II

Η ανίχνευση των μεταβολιτών φάσης I και φάσης II του LGD-4033 πραγματοποιήθηκε στο υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC)

1200 LC Series (Agilent Technologies) που ήταν συνδεδεμένο με το φασματόμετρο μάζας 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies) που χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης μαζών. Το υγροχρωματογραφικό σύστημα διαθέτει απαερωτήρα κενού, δυαδική αντλία υψηλής πίεσης, αυτόματο δειγματολήπτη με ψυγμένο δίσκο δειγμάτων και φούρνο στήλης. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε με βαθμιδωτό τρόπο έκλουσης μείγμα διαλυτών A και B. Ο διαλύτης A ήταν H₂O και ο διαλύτης B ήταν μείγμα ACN/H₂O (90/10 v/v), ενώ και οι δύο περιείχαν φορμικό αμμώνιο συγκέντρωσης 5 mM και φορμικό οξύ 0,01% (v/v). Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,30 mL/min. Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που εφαρμόστηκε η αρχική αναλογία του διαλύτη B στην κινητή φάση ήταν 10% και στη συνέχεια αυξανόταν γραμμικά σε 80% μέχρι τα 9 min. Έπειτα, από 9 min μέχρι τα 10 min αυξανόταν γραμμικά μέχρι το 100%, όπου παρέμενε σταθερή μέχρι τα 13 min και τέλος μειωνόταν γραμμικά στην αρχική αναλογία (10%) μέχρι τα 13,5 min. Ακολουθούσαν 3,5 min για την εξισορρόπηση του συστήματος στην αρχική σύσταση της κινητής φάσης πριν την έναρξη της ανάλυσης του επόμενου δείγματος, με το συνολικό χρόνο ανάλυσης του δείγματος να είναι 17 min. Ο όγκος ένεσης δείγματος ήταν 5 μL. Για τον υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies) μήκους 100 mm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 1,8 μm, καθώς και μια προστήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies) μήκους 5 mm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 1,8 μm. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C.

Το φασματόμετρο μαζών διαθέτει ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), η οποία ρυθμίστηκε στην παραγωγή αρνητικών ιόντων (ESI-), ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης, σταθερής θερμοκρασίας μετατροπέα αναλογικού προς ψηφιακό σήματος που λειτουργεί στα 2 GHz (λειτουργία εκτεταμένου δυναμικού εύρους) και μια πολυκαναλική πλάκα που λειτουργεί στα 700 V. Το άζωτο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο ξήρανσης και νεφελοποίησης. Ενδεικτικά, η θερμοκρασία και ο ρυθμός ροής του αερίου αζώτου στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 330 °C και 10 L/min, αντίστοιχα και η πίεση του αερίου νεφελοποίησης στην τιμή 40 psi. Το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) και του διαχωριστή (skimmer voltage) στην έξοδο του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στα 3500 V και 65 V, αντίστοιχα. Το δυναμικό θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) ρυθμίστηκε στα 140 V και η ενέργεια σύγκρουσης (collision energy) στα 25-40 eV. Το εύρος σάρωσης των ανιχνευόμενων τιμών m/z ρυθμίστηκε σε 50-1100 και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 1 scan/sec. Η φασματομετρία μαζών

πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης και σε λειτουργία δίδυμης φασματομετρίας μαζών (MS/MS).

Η βαθμονόμηση του φασματομέτρου μαζών εκτελέστηκε πριν την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας αραιωμένο μείγμα αναφοράς 10 ενώσεων, που παρέχει ιόντα $[M+H]^+$ στο εύρος μάζας m/z 112.9856 - 2833.8731 (μείγμα συντονισμού χαμηλής συγκέντρωσης ESI-L, Agilent Technologies). Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη ακρίβεια, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε διόρθωση μαζών, εισάγοντας μία ένωση αναφοράς (εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ)-φωσφαζίνη (Agilent Technologies) με m/z 966.0007 σε αρνητικό τρόπο, ταυτόχρονα με τα δείγματα. Η ένωση αναφοράς εισήχθη συνεχώς στην πηγή ESI από έναν δεύτερο ορθογώνιο νεφελοποιητή.

8.2.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ LGD-4033 ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΑΣΗΣ I ΚΑΙ ΦΑΣΗΣ II

Μετά την ανάλυση με LC-MS των δειγμάτων που υπέστησαν υδρόλυση και εκχύλιση, η μητρική ουσία LGD-4033 με m/z 337.0771 ανιχνεύτηκε μέχρι τις 3,5 ημέρες με τη μορφή μιας διπλής κορυφής. Η πρώτη κορυφή είχε RT 10,4 min και η δεύτερη κορυφή RT 10,7 min. Παρατηρήθηκε ότι η πρώτη κορυφή ήταν μεγαλύτερη από τη δεύτερη στα δείγματα που αντιστοιχούσαν στις πρώτες 48 h περίπου μετά τη χορήγηση, ενώ σταδιακά με το πέρας της μελέτης απέκκρισης η δεύτερη κορυφή αυξανόταν δίνοντας μεγαλύτερα σήματα από την πρώτη. Η απέκκριση της μητρικής ουσίας ολοκληρώθηκε στις 3,5 ημέρες με την μέγιστη απέκκριση να εμφανίζεται στις 4,5 h με συγκέντρωση 1,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ωστόσο, το LGD-4033 ήταν δυνατόν να ανιχνεύεται ως προϊόν προσθήκης φορμικού (formate adduct) με m/z 383.0829 ακόμη και μέχρι τις 6,5 ημέρες. Το προϊόν προσθήκης φορμικού εμφάνιζε πάλι τη διπλή κορυφή με RT 10,4 min και RT 10,7 min, και τη δεύτερη κορυφή να αυξάνει με την αύξηση του χρόνου μετά τη χορήγηση (Εικόνα 8.3).

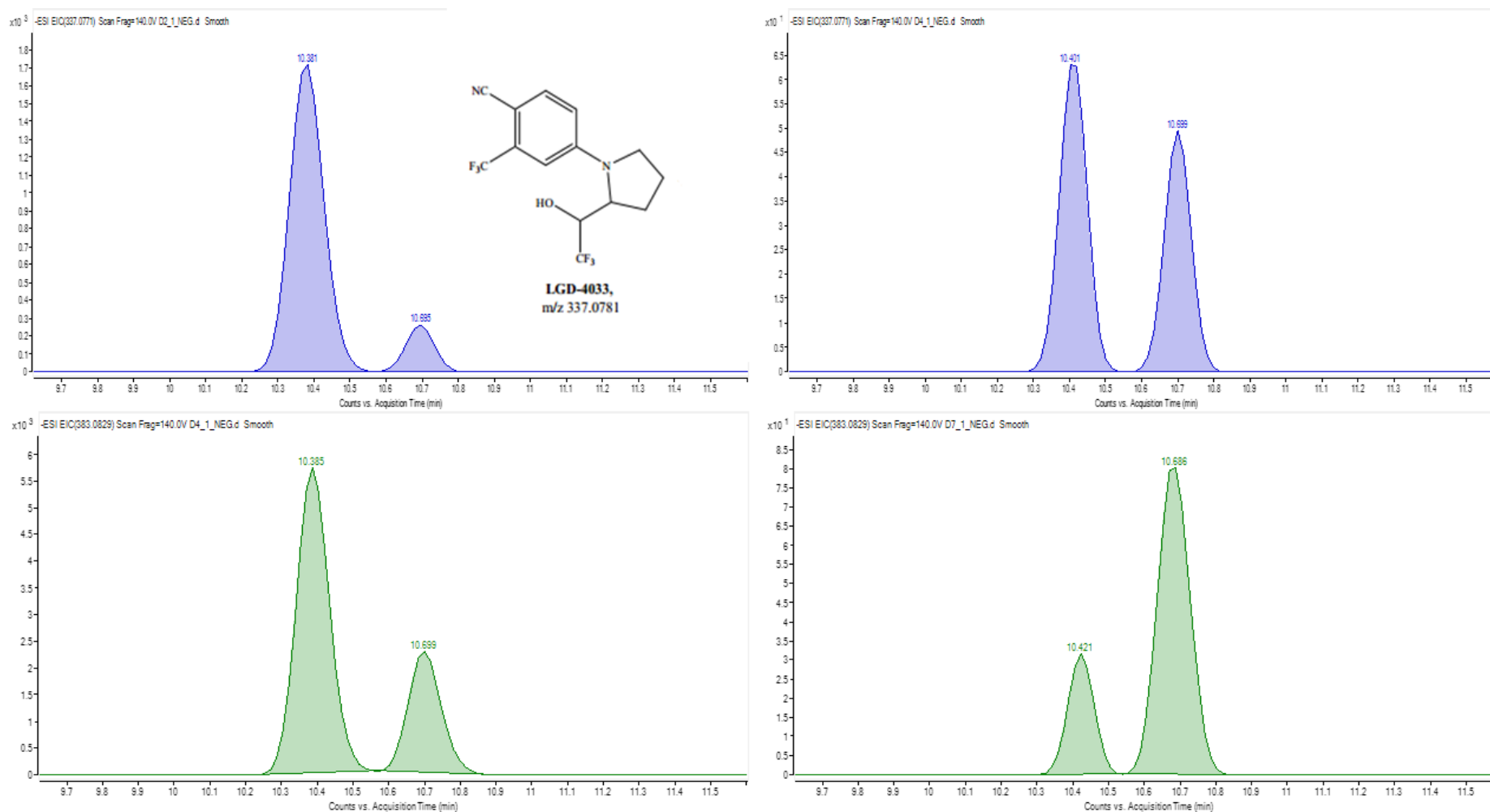
Ο υδροξυλιωμένος μεταβολίτης M1 με m/z 351.0568 εμφάνισε τρεις κορυφές. Η πρώτη κορυφή ήταν η κύρια και ανιχνεύτηκε μέχρι τις 9 ημέρες με RT 7,9 min. Η δεύτερη και η τρίτη κορυφή με RT 8,4 min και 8,8 min ανιχνεύτηκαν μέχρι τις 4 και τις 6,5 ημέρες, αντίστοιχα. Και ο M1 εμφάνισε μεγαλύτερα παράθυρα ανίχνευσης ως προϊόν προσθήκης φορμικού με m/z 397.0623 με τη δεύτερη και την τρίτη κορυφή να ανιχνεύονται μέχρι τις 10,5 και 13 ημέρες με τους ίδιους RT στα 8,4 min και 8,8 min. Μάλιστα η τρίτη κορυφή έδειξε να αυξάνει με την αύξηση του χρόνου μετά τη χορήγηση, ενώ η πρώτη κορυφή δεν έδωσε κάποιο σήμα (Εικόνα 8.4).

Ο υδροξυλιωμένος μεταβολίτης M2 με m/z 353.0730 ανιχνεύτηκε με τη μορφή συνεχόμενων κορυφών με εξέχουσα την κορυφή με RT 9,2 min, η οποία ανιχνεύτηκε μέχρι τις 4 ημέρες, ενώ οι άλλες τρεις μικρές κορυφές ήταν μη αξιολογήσιμες. Η ανίχνευση του M2 ως προϊόντος προσθήκης φορμικού με m/z 399.0779 υπέδειξε ως εξέχουσα κορυφή μια από τις τρεις προαναφερθείσες μικρές κορυφές, η οποία βελτίωσε λίγο το παράθυρο ανίχνευσης του M2 μέχρι της 5 ημέρες με RT 8,3 min. Ο επίσης υδροξυλιωμένος μεταβολίτης M3 με m/z 355.0877 ανιχνεύτηκε μέχρι τις 5 ημέρες με RT 8,1 min. Ο μεταβολίτης M4 με m/z 367.0886 προέκυψε μετά από υδροξυλίωση και μεθυλίωση και ανιχνεύτηκε μέχρι μόνο για 0,5 ημέρα (12 h) με RT 5,6 min. Τα παράθυρα ανίχνευσης τόσο για τον M3, όσο και για τον M4 δε βελτιώθηκαν όταν αναζητήθηκαν ως προϊόντα προσθήκης φορμικού (Εικόνα 8.5).

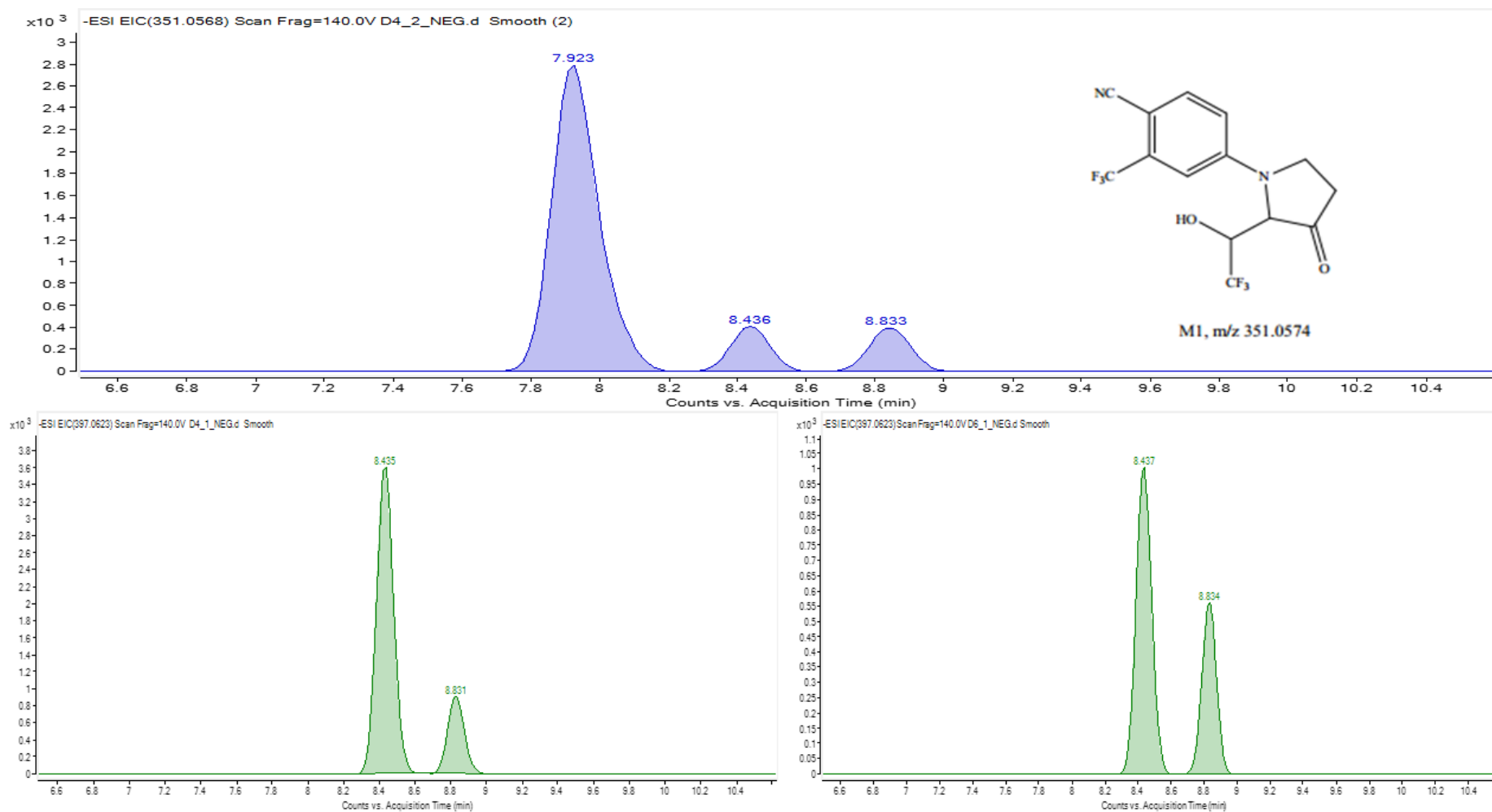
Ο μεταβολίτης M5, προϊόν διπλής υδροξυλίωσης, με m/z 369.0674 ανιχνεύτηκε με τη μορφή δύο σχεδόν ενωμένων κορυφών. Η πρώτη κορυφή είχε RT 7,8 min και ανιχνεύτηκε μέχρι τις 11 ημέρες. Η δεύτερη κορυφή με RT 8,0 min ανιχνεύτηκε μέχρι τις 20,5 ημέρες, δηλαδή σχεδόν μέχρι το τέλος της μεταβολικής μελέτης. Τα μεγάλα αυτά παράθυρα ανίχνευσης δεν ήταν μεγαλύτερα όταν ο M5 αναζητήθηκε ως προϊόν προσθήκης φορμικού (Εικόνα 8.6).

Ο μεταβολίτης M6 προϊόν τριπλής υδροξυλίωσης, με m/z 385.0629 ανιχνεύτηκε με τη μορφή δύο κορυφών. Η πρώτη κορυφή είχε RT 7,1 min και η δεύτερη 7,6 min, ενώ και οι δύο ανιχνεύθηκαν μέχρι τις 7 ημέρες με τη δεύτερη κορυφή να δίνει σταθερά μεγαλύτερα σήματα από την πρώτη. Ο M6 ανιχνεύεται για πρώτη φορά σε ανθρώπινα ούρα (Εικόνα 8.6).

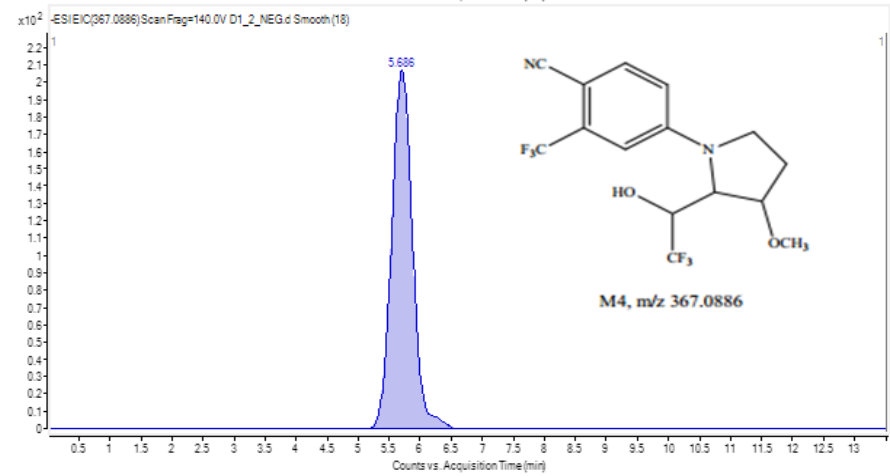
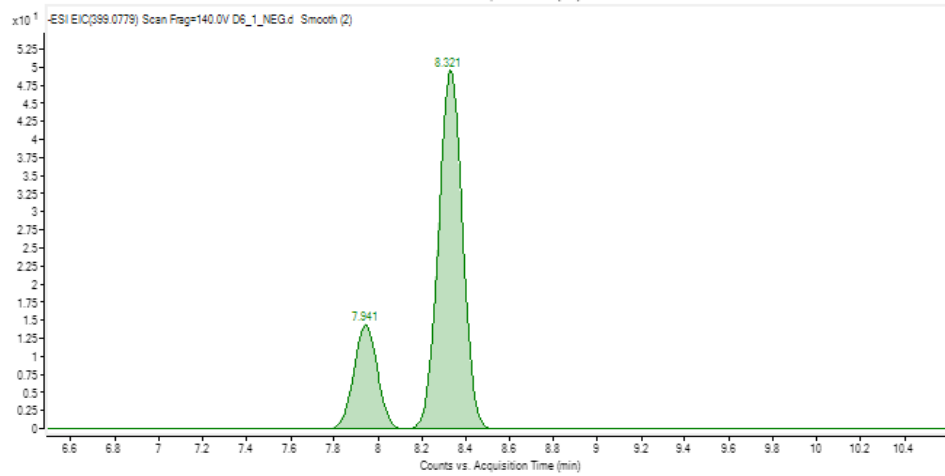
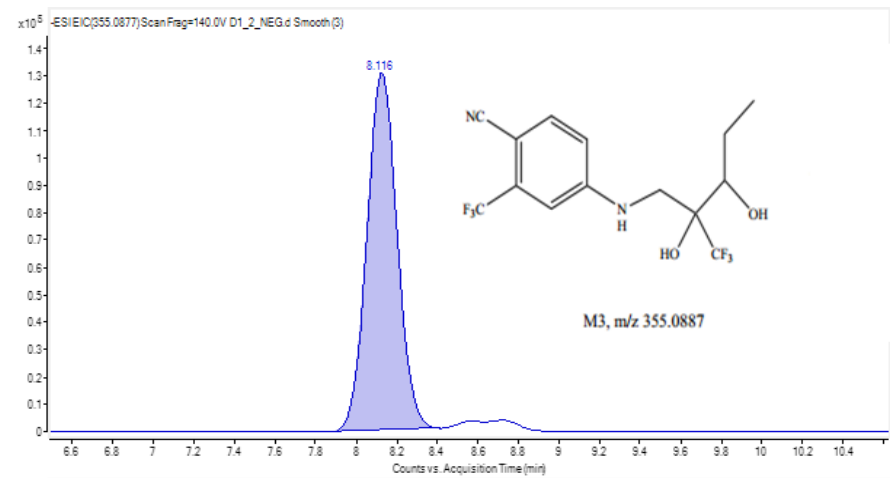
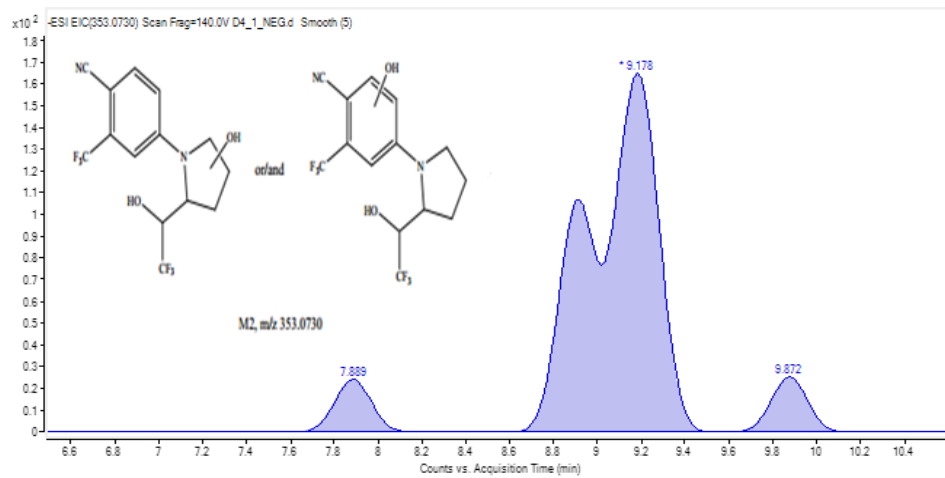
Μετά την ανάλυση με LC-MS των αραιωμένων δειγμάτων για την ανίχνευση μεταβολιτών φάσης II, η μητρική ουσία και οι μεταβολίτες M1, M2 και M3 ανιχνεύθηκαν ως μεταβολίτες συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, η μητρική ουσία ανιχνεύθηκε με τη μορφή γλυκουρονιδίου με m/z 513.1096 μέχρι τις 2,5 ημέρες με RT 6,9 min. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά την ανάλυση των δειγμάτων που είχαν υποστεί απλή αραιώση δεν ανιχνεύθηκε καθόλου μητρική ουσία σε ελεύθερη-μη συζευγμένη με γλυκουρονικό οξύ μορφή. Ο μεταβολίτης M1 ανιχνεύθηκε με τη μορφή γλυκουρονιδίου με m/z 527.0889 μέχρι τη 1,5 ημέρα με RT 5,9 min. Ο μεταβολίτης M2 ανιχνεύθηκε με τη μορφή γλυκουρονιδίου με m/z 529.1045 μέχρι τις 2,5 ημέρες με RT 5,8 min. Τέλος, ο μεταβολίτης M3 ανιχνεύθηκε με τη μορφή γλυκουρονιδίου με m/z 531.1199 μέχρι τις 2,5 ημέρες με RT 6,3 min (Εικόνα 8.7).



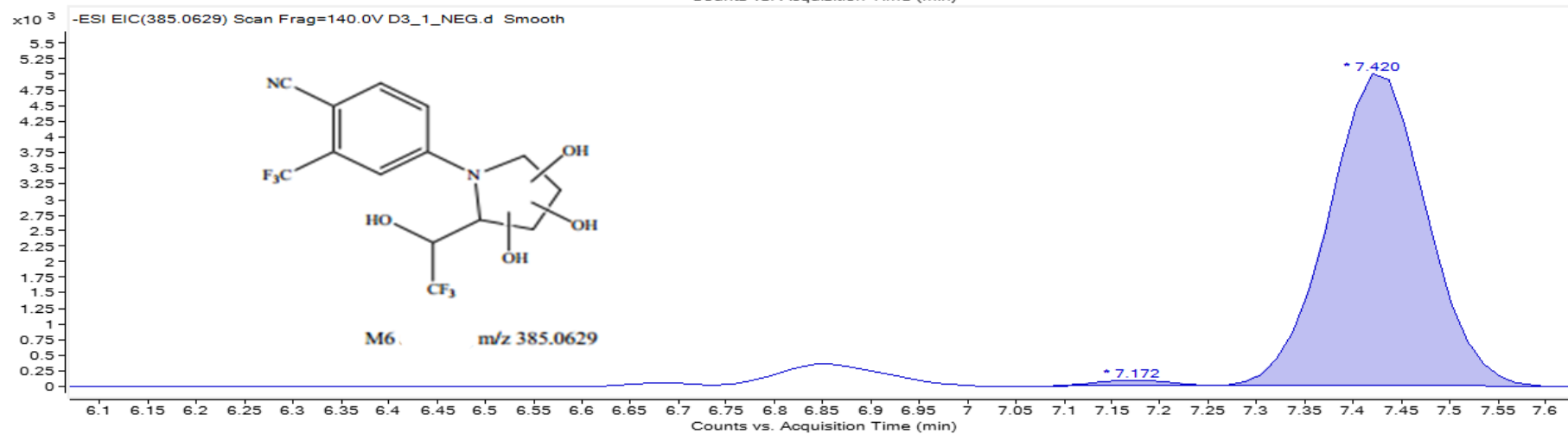
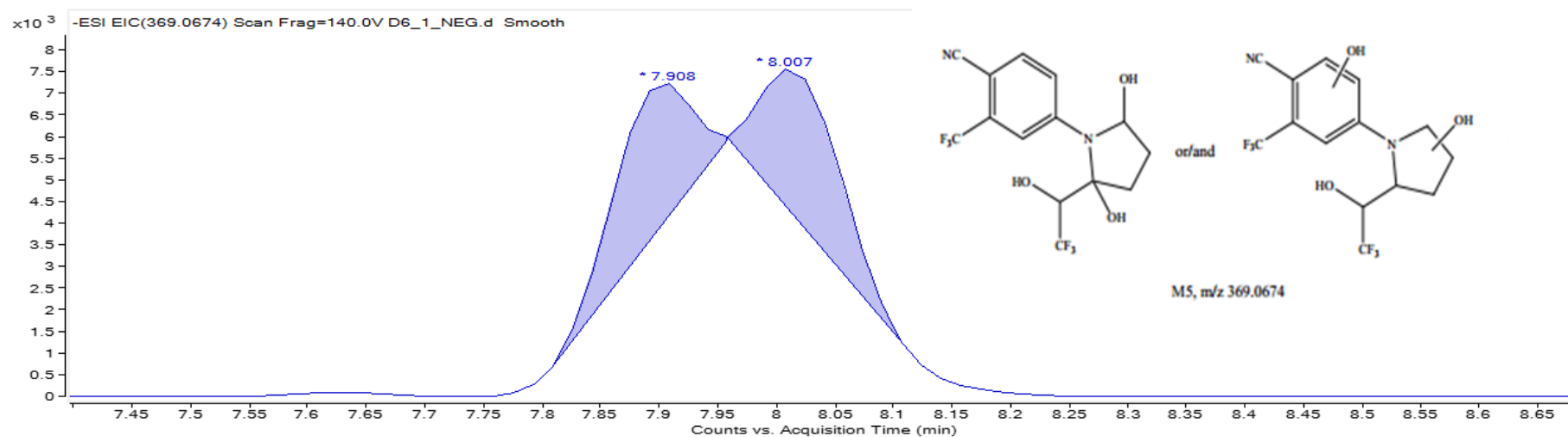
Εικόνα 8.3. Χρωματογραφήματα ανίχνευσης LGD-4033 ως ελεύθερη ένωση (μπλε) και προϊόν προσθήκης φορμικού (πράσινο) σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση της ουσίας (δεξιά η μεταγενέστερη).



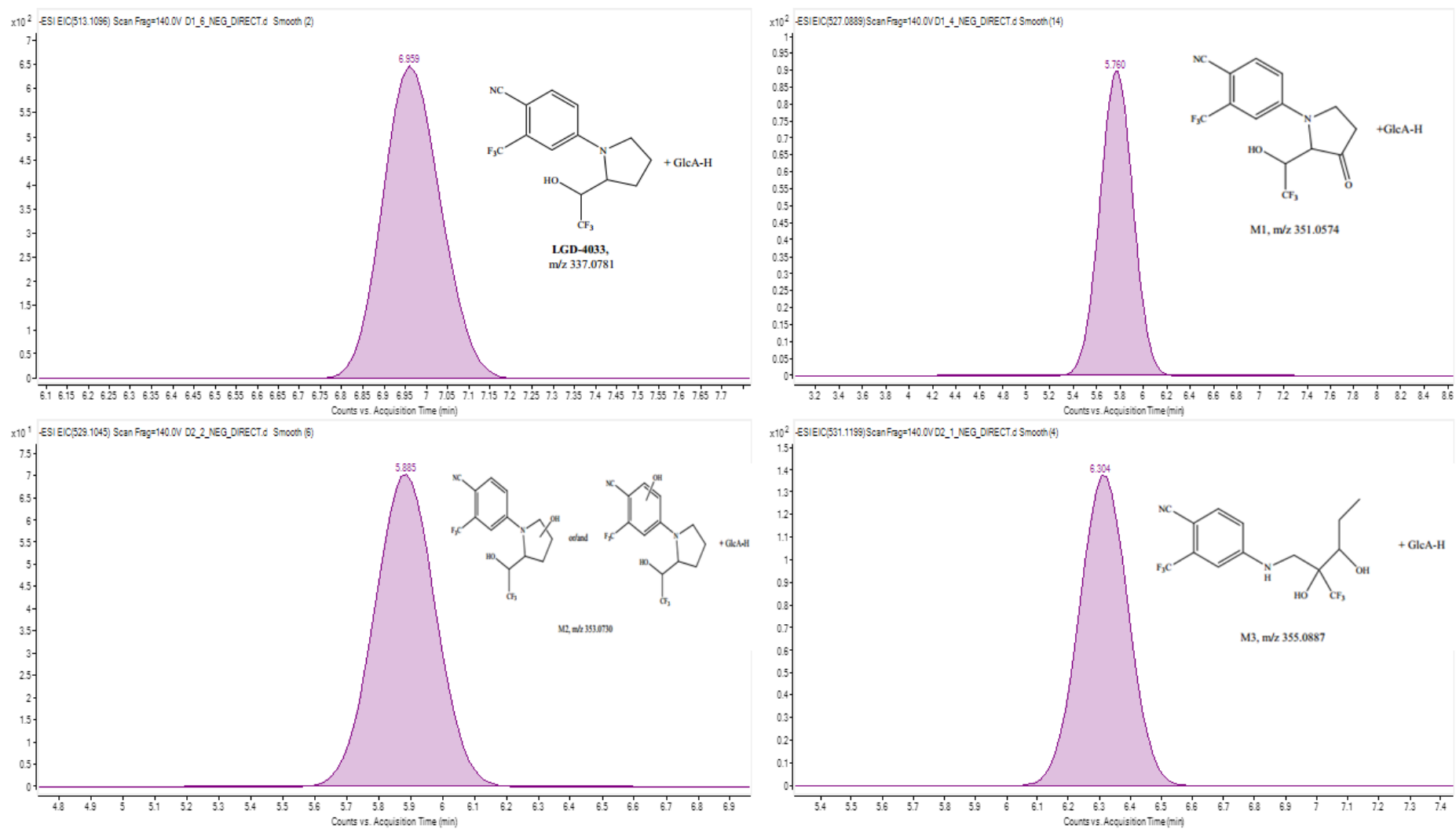
Εικόνα 8.4. Χρωματογραφήματα ανίχνευσης του μεταβολίτη φάσης I M1 ως ελεύθερη ένωση (μπλε) και προϊόν προσθήκης φορμικού (πράσινο) σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση της ουσίας (δεξιά η μεταγενέστερη).



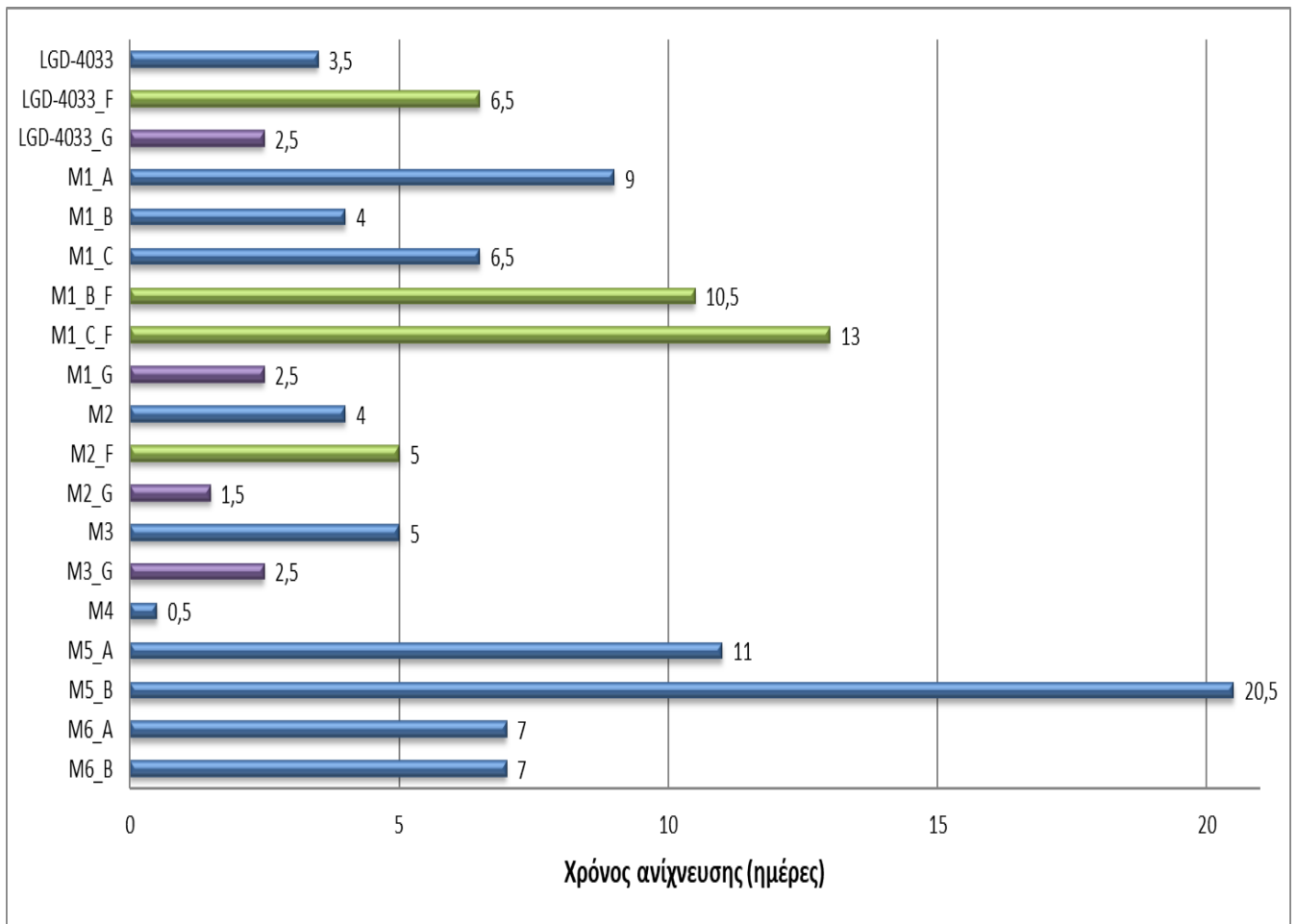
Εικόνα 8.5. Χρωματογραφήματα ανίχνευσης των μεταβολιτών φάσης I M2, ως ελεύθερη ένωση (μπλε) και προϊόν προσθήκης φορμικού (πράσινο), M3 και M4.



Εικόνα 8.6. Χρωματογραφήματα ανίχνευσης των μεταβολιτών φάσης I M5 και M6.



Εικόνα 8.7. Χρωματογραφήματα ανίχνευσης συζευγμένων με γλυκουρονικό οξύ μεταβολιτών φάσης II LGD-4030, M1, M2 και M3.



Εικόνα 8.8. Παράθυρα ανίχνευσης του LGD-4033 και των μεταβολιτών του σε ανθρώπινα ούρα μετά τη χορήγηση 10 mg LGD-4033. (M: μεταβολίτης, A: πρώτο ισομερές, B: δεύτερο ισομερές, C: τρίτο ισομερές, F: προϊόν προσθήκης φορμικού, G: συζευγμένο με γλυκουρονικό οξύ).

Η ταυτοποίηση της μητρικής ουσίας και των μεταβολιτών της έγινε μετά από ανάλυση με LC-MS/MS των δειγμάτων με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για κάθε m/z. Αναλύθηκαν τόσο τα δείγματα που είχαν υποστεί υδρόλυση και εκχύλιση, όσο και τα δείγματα που είχαν υποστεί απλή αραίωση. Στον Πίνακα 8.2 παρουσιάζονται τα κύρια θυγατρικά διαγνωστικά ιόντα για το LGD-4033 και κάθε μεταβολίτη του. Η ταυτοποίηση του M4 δεν ήταν εφικτή λόγω του πολύ χαμηλού σήματος. Τα φάσματα μαζών ήταν πανομοιότυπα μεταξύ των κορυφών που ανιχνεύθηκαν με το ίδιο m/z, τόσο για τη μητρική ουσία, όσο και για τους μεταβολίτες, εκτός από την περίπτωση του M6, όπου οι δύο κορυφές παρουσίασαν διαφορετικό φάσμα μεταξύ τους. Επιπλέον, η μητρική ουσία και οι M1,M2,M3 εμφάνισαν τα ίδια φάσματα μάζας μεταξύ της ελεύθερης μορφής και της συζευγμένης με γλυκουρονικό οξύ μορφής.

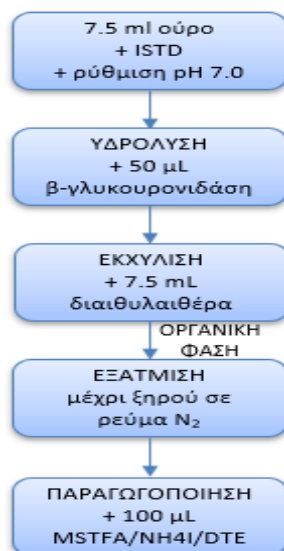
Πίνακας 8.2. Θυγατρικά διαγνωστικά ιόντα του LGD-4033 και των μεταβολιτών του μετά την ανάλυση με LC-MS/MS.

LGD-4033	M1	M2	M3	M5	M6-A	M6-B
267.0759	281.0536	283.0763	285.0902	351.0581	297.0535	251.0412
239.0449	263.0407	239.0453	257.0944	299.0678	269.0573	227.0445
211.0485	253.0221	227.0493	239.0826	281.0571	241.0573	225.0655
185.0325	237.0664	185.0335	237.0691	263.0470	185.0319	185.0315
170.0209	185.0329	170.0226	226.0388	255.0765	170.0200	170.0210
	170.0218		199.0525	237.0672		
			185.0370	185.0354		
			170.0257	170.0246		

8.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ LGD-4033

8.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΜΕ GC-MS

Για τον έλεγχο του προφίλ των στεροειδών μετά την απλή χορήγηση LGD-4033 ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία που ακολουθείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για τον έλεγχο δειγμάτων ούρων στα πλαίσια της στεροειδούς ενότητας του ABP (Εικόνα 8.9). Για έλεγχο προφίλ στεροειδών αναλύθηκαν όλα τα δείγματα της μεταβολικής μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, σε 7,5 ml ούρων από κάθε δείγμα χωριστά έγινε προσθήκη μεθυλοτεστοστερόνης (50 µL από διάλυμα 7,5 µg/mL) ως εσωτερικό πρότυπο ISTD. Το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 7,0 με προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0. Ακολούθησε η προσθήκη 50 µL ενζύμου β-γλυκουρονιδάση από *E.coli* και τα δείγματα επώαστηκαν για 1,5 h στους 50 °C. Μετά την υδρόλυση το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 9,0-10,0 με προσθήκη 1,4 g στερεού ρυθμιστικού μείγματος ανθρακικών NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1 w/w). Στη συνέχεια τα ούρα εκχυλίστηκαν με LLE μετά από προσθήκη 7,5 mL διαιθυλαιθέρα και 3 g άνυδρου Na₂SO₄. Τα δείγματα ανακινήθηκαν για 20 min και φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 2000 rpm. Έπειτα, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους κωνικούς σωλήνες με εσφυρισμένα άκρα και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂ στους 50 °C. TMS παράγωγα παρασκευάστηκαν με προσθήκη 100 µL MSTFA/NH₄I/DTE (1000:2:6 v/w/v) στο ξηρό υπόλειμμα και επώαση για 30 min στους 80 °C. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια (vials) για ανάλυση με GC-MS.



Εικόνα 8.9. Σχηματική αναπαράσταση παρασκευαστικής πορείας υδρόλυσης και εκχύλισης ούρων για τον έλεγχο του προφίλ των στεροειδών.

8.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ GC-MS ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

Ο έλεγχος του προφίλ των στεροειδών μετά τη χορήγηση του LGD-4033 έγινε με την ανάλυση των φιαλιδίων με GC-MS, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα αεριοχρωματογραφίας 6890N GC (Agilent Technologies) συζευγμένο με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών Agilent 5973 που είναι εξοπλισμένο με τετραπολικό αναλυτή μαζών. Αυτόματος δειγματολήπτης σε λειτουργία διαμερισμού (split mode) 15:1 χρησιμοποιήθηκε για την έκχυση του δείγματος με όγκο έκχυσης τα 2 µL και θερμοκρασία στη θύρα έγχυσης σταθερή στους 250 °C και επιφάνεια διασύνδεσης σταθερή στους 310 °C. Το σύστημα αεριοχρωματογραφίας ήταν εξοπλισμένο με μία τριχοειδή χρωματογραφική στήλη HP Ultra 1-011 με ακινητοποιημένο και διασταυρούμενο πολυμερές το 5% διφαινυλο / 95% διμεθυλο-σιλοξάνιο και διαστάσεις 17 m μήκος x 0,2 mm εσωτερική διάμετρο, 0,11 µm πάχος στατικής φάσης. Τη στήλη διαπερνούσε αέριο ήλιο ως κινητή φάση με ροή 1,1 mL/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είχε αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 180 °C η οποία αυξήθηκε στους 235 °C με ρυθμό αύξησης 3 °C/min, έπειτα στους 310 °C με ρυθμό αύξησης 30 °C/min, όπου και διατηρήθηκε για 3,15 min. Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε το αργό με πίεση 4 bar. Η φασματομετρία μαζών πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (εύρος σάρωσης 40-600) ή σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών ιόντων (selected ion monitoring, SIM).

8.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων με GC-MS έγινε ποσοτικοποίηση των παραμέτρων της στεροειδούς ενότητας του ABP. Τα δείγματα της μεταβολικής μελέτης αναλύθηκαν μαζί με καμπύλη αναφοράς πέντε σημείων που περιλαμβάνει τα ενδογενή στεροειδή όπως αυτά ελέγχονται στο βιολογικό διαβατήριο των αθλητών. Οι αναλύτες που ελέγχθηκαν ήταν η τεστοστερόνη και η επιτεστοστερόνη με εύρος 7,5 έως 200 ng/ml, η ανδροστερόνη και η ετιοχολανολόνη με εύρος από 150 έως 4000 ng/ml και οι 5α και 5β 3α-,17β ανδροστανόλες με εύρος από 15 έως 400 ng/ml. Η καμπύλη αναφοράς έγινε με προσθήκη προτύπων διαλυμάτων σε συνθετικά ούρα λόγω της ενδογενούς φύσης αυτών των αναλυτών.

Στα πλαίσια του ελέγχου του προφίλ των στεροειδών ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση τεστοστερόνης (testosterone, T), επιτεστοστερόνης (epitestosterone, EpT), ανδροστερόνης (androsterone, A), ετιοχολανολόνης (etiocholanolone, Etio), 5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (5α-androstane-3α,17β-diol, 5αAdiol) και 5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (5β-androstane-3α,17β-diol, 5βAdiol) στα ούρα και υπολογίστηκαν οι λόγοι T/E, A/T, A/Etio, 5αAdiol/5βAdiol και 5αAdiol/E που προκύπτουν από τις συγκεντρώσεις των παραπάνω στεροειδών ορμονών (ng/mL), μετά από ανάλυση με GC-MS (Πίνακας 8.3).

Πίνακας 8.3. Τιμές προφίλ στεροειδών μετά τη χορήγηση 10 mg LGD-4033.

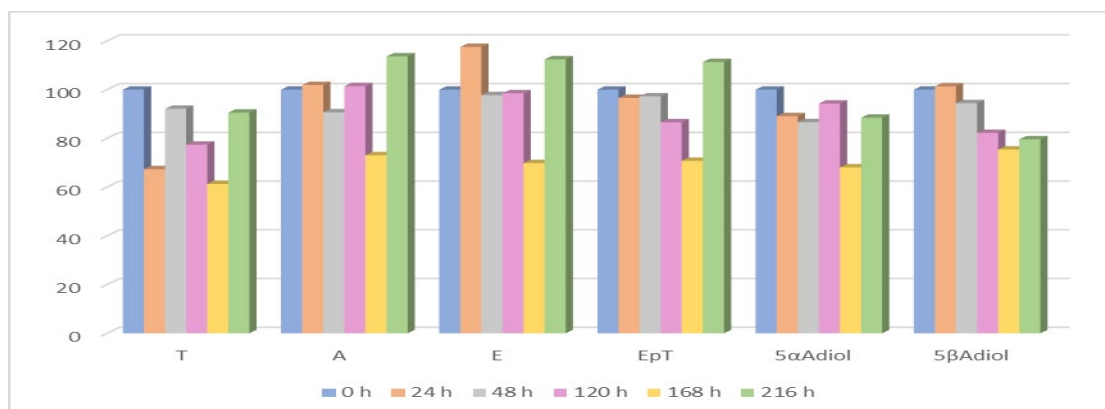
ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ ABP										
	T	A	Etio	EpT	5αAdiol	5βAdiol	T/E	A/T	5αAdiol/5βAdiol	5αAdiol/EpT	A/E
-	30,4	1921	1714	34,2	36,6	64,7	0,96	63,2	0,57	1,07	1,12
-	38,8	1566	1761	34,1	50,6	81,0	1,23	40,4	0,63	1,49	0,89
-	31,5	1592	1409	29,9	33,0	49,1	1,14	50,6	0,67	1,10	1,13
-	34,4	1470	1446	31,7	27,8	57,6	1,17	42,7	0,48	0,88	1,02
-	40,7	2013	2005	39,4	40,8	71,0	1,11	49,5	0,57	1,03	1,00
-	46,2	2194	2302	47,0	45,0	109,7	1,06	47,5	0,41	0,96	0,95
-	42,4	2310	2075	44,7	49,9	76,5	1,02	54,6	0,65	1,12	1,11
-	31,8	1345	1327	26,3	65,9	133,3	1,31	42,3	0,49	2,51	1,01
-	28,3	1163	1083	26,7	38,6	71,1	1,14	41,2	0,54	1,45	1,07
0	31,7	1366	1332	28,4	32,1	60,9	1,20	43,2	0,53	1,13	1,03
2	37,7	1712	1758	34,0	39,3	73,8	1,19	45,5	0,53	1,15	0,97
4	30,5	1484	1792	30,3	35,6	57,0	1,08	48,7	0,62	1,17	0,83
4.5	24,8	1290	1345	25,4	25,6	45,5	1,05	52,1	0,56	1,01	0,96
8	23,3	1349	1267	26,0	24,9	44,4	0,97	57,9	0,56	0,96	1,06
10.5	21,3	1287	1175	25,0	22,8	39,1	0,92	60,5	0,58	0,91	1,10

12	18,2	1049	992	19,5	21,6	46,8	1,01	57,7	0,46	1,11	1,06
15	16,4	1116	1141	21,8	21,2	44,2	0,81	68,1	0,48	0,97	0,98
20	25,3	1661	1815	35,0	40,2	89,7	0,81	65,6	0,45	1,15	0,92
24	21,3	1391	1565	27,4	28,6	61,8	0,87	65,3	0,46	1,04	0,89
36	17,6	941	880	21,3	19,6	31,3	0,93	53,5	0,63	0,92	1,07
48	29,2	1238	1302	27,6	27,8	57,5	1,19	42,5	0,48	1,01	0,95
60	16,9	1088	1133	22,4	20,2	39,8	0,85	64,5	0,51	0,90	0,96
72	29,1	1348	1309	33,3	26,8	54,0	0,98	46,3	0,50	0,80	1,03
84	28,0	1715	1524	27,9	30,9	48,0	1,13	61,2	0,64	1,11	1,13
96	34,9	1346	1422	25,9	26,0	61,6	1,52	38,6	0,42	1,01	0,95
108	22,7	1530	1427	22,7	27,6	43,7	1,12	67,4	0,63	1,21	1,07
120	24,5	1385	1312	24,6	30,3	50,1	1,12	56,6	0,60	1,23	1,06
135	15,3	963	841	17,0	17,5	28,9	1,01	63,0	0,61	1,03	1,14
145.5	26,7	1038	986	23,4	32,5	71,5	1,28	38,9	0,45	1,39	1,05
156.5	25,4	1764	1633	32,6	34,0	57,5	0,88	69,5	0,59	1,04	1,08
168	19,4	998	930	20,1	21,9	46,0	1,09	51,5	0,48	1,09	1,07
180	24,4	1554	1289	30,4	27,8	42,4	0,91	63,6	0,66	0,92	1,21
193	39,1	2219	2023	45,3	40,4	58,2	0,97	56,7	0,69	0,89	1,10
204	40,0	2368	2150	47,3	42,6	61,7	0,95	59,2	0,69	0,90	1,10
216	28,7	1552	1498	31,6	28,4	48,5	1,02	54,1	0,59	0,90	1,04
228	27,0	1787	1739	29,9	33,7	64,3	1,02	66,3	0,52	1,13	1,03
240	26,7	1523	1506	32,4	27,8	58,0	0,93	57,0	0,48	0,86	1,01
252	23,2	1577	1594	33,0	33,9	54,9	0,79	68,1	0,62	1,03	0,99
264	21,3	1240	1221	27,6	24,7	55,1	0,87	58,1	0,45	0,89	1,02
279	20,5	1449	1224	29,6	35,2	60,7	0,78	70,7	0,58	1,19	1,18
288	30,5	1647	1532	31,1	35,7	61,0	1,10	54,0	0,59	1,15	1,08
300	21,3	1293	1135	24,7	29,4	44,9	0,97	60,6	0,65	1,19	1,14
312	43,4	2192	1996	44,2	47,9	98,5	1,14	50,5	0,49	1,08	1,10
324	21,6	1438	1192	24,9	25,6	61,7	1,00	66,7	0,42	1,03	1,21
337	30,4	884	919	31,6	30,3	93,3	1,11	29,1	0,32	0,96	0,96
349	23,5	1809	1420	27,1	30,1	51,8	1,00	77,1	0,58	1,11	1,27
361	24,0	1453	1247	30,6	23,5	50,1	0,91	60,7	0,47	0,77	1,17
373	26,4	1701	1577	37,6	30,9	49,4	0,81	64,4	0,63	0,82	1,08
385	25,2	1412	1337	31,8	26,5	48,2	0,92	56,0	0,55	0,83	1,06
397	21,7	1376	1120	29,2	20,9	31,3	0,86	63,5	0,67	0,71	1,23
409	50,2	1756	1828	47,6	52,3	86,3	1,22	35,0	0,61	1,10	0,96
420.5	18,7	1260	1313	21,2	27,3	48,3	1,02	67,3	0,56	1,29	0,96
432	43,1	2202	1980	43,0	44,2	82,6	1,16	51,1	0,53	1,03	1,11
445	30,9	1921	1597	31,0	38,4	73,2	1,16	62,1	0,52	1,24	1,20
457	28,5	1777	1623	34,5	30,4	67,3	0,96	62,3	0,45	0,88	1,09
468.5	27,6	1540	1347	29,2	48,2	67,2	1,09	55,9	0,72	1,65	1,14
481	24,5	1239	1021	31,7	26,2	43,7	0,89	50,6	0,60	0,83	1,21
494	19,7	990	769	19,3	28,7	33,1	1,18	50,3	0,87	1,49	1,29

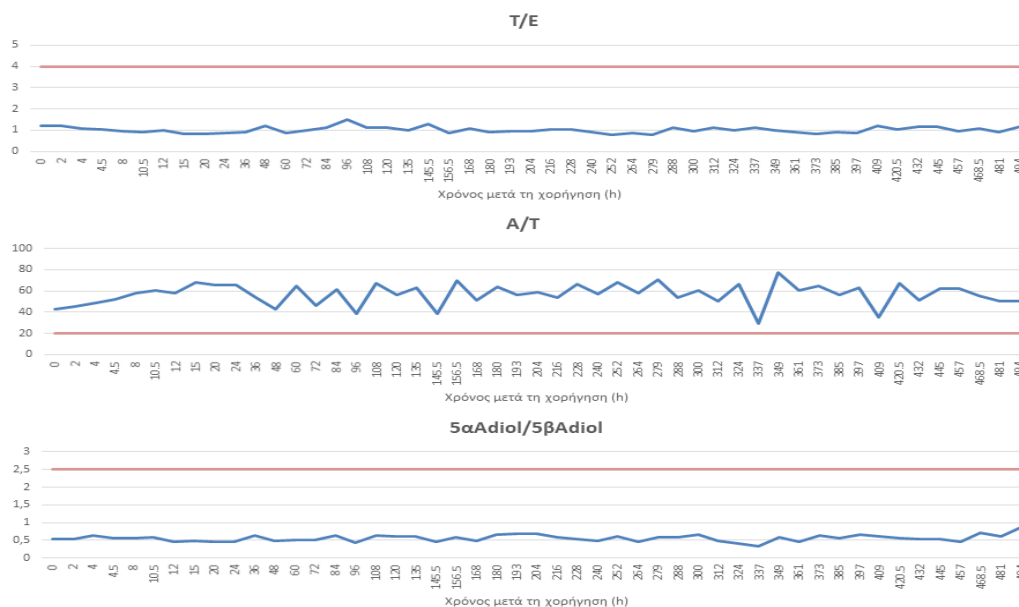
Στην Εικόνα 8.10 παρουσιάζονται σε μορφή γραφήματος οι μεταβολές για τις τιμές έξι βασικών παραμέτρων της στεροειδούς ενότητας του ABP, για τα δείγματα που

αντιστοιχούν στις χρονικές στιγμές 0, 24, 48, 120, 168 και 216 h μετά τη χορήγηση του LGD-4033 θεωρώντας ότι η εκάστοτε τιμή που αντιστοιχεί στο χρόνο πριν τη χορήγηση του LGD-4033 (0 h) αποτελεί το 100% της συγκέντρωσης και οι τιμές από τις δειγματοληψίες μετά τη χορήγηση εκτιμώνται σε σχέση τη συγκέντρωση πριν τη χορήγηση.

Επιπλέον στην Εικόνα 8.11 απεικονίζονται οι μεταβολές των λόγων T/E, A/T και 5αAdiol/5βAdiol της στεροειδούς ενότητας του ABP για το σύνολο των δειγμάτων μετά τη χορήγηση του LGD-4033, συγκριτικά με τις μέγιστες επιτρεπτές τιμές των λόγων (T/E <4, A/T >20 και 5αAdiol/5βAdiol <2.5).



Εικόνα 8.10. Γραφική απεικόνιση των μεταβολών του προφίλ των στεροειδών για τις παραμέτρους T, A, E, EpT, 5αAdiol, 5βAdiol θεωρώντας πως η τιμή στο χρόνο 0 h αποτελεί το 100% της εκάστοτε τιμής.

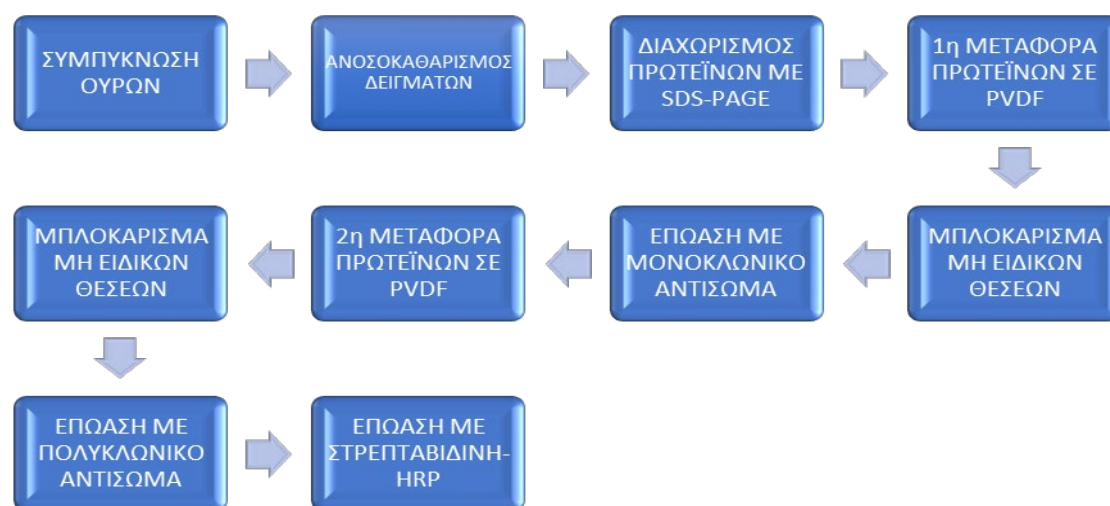


Εικόνα 8.11. Μεταβολές των λόγων T/E, A/T και 5αAdiol/5βAdiol της στεροειδούς ενότητας του ABP για το σύνολο των δειγμάτων μετά τη χορήγηση του LGD-4033.

8.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ LGD-4033

8.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΜΕ SDS-PAGE

Για την εκτίμηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης στα ούρα μετά την απλή χορήγηση LGD-4033 ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία της επιβεβαιωτικής μεθόδου που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών (Εικόνα 8.12). Για τον συγκεκριμένο σκοπό επιλέχθηκαν να αναλυθούν τα δείγματα με κωδικό εργαστηρίου T0, D2-1 και D7-1, που αντιστοιχούν σε 0, 20 και 145.5 h μετά τη χορήγηση, αντίστοιχα. Μαζί με τα δείγματα της μεταβολικής μελέτης παρασκευάστηκε και ένα λευκό δείγμα ούρου ως αρνητικός μάρτυρας (negative control).



Εικόνα 8.12. Σχηματική απεικόνιση παρασκευαστικής διαδικασίας ανίχνευσης ερυθροποιητίνης με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με SDS-PAGE και ανοσοσύτωση πρωτεϊνών.

Αρχικά 20 mL ούρων από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 3500 rpm στους 20 °C μετά την προσθήκη 400 µL διαλύματος αναστολέων πρωτεασών (complete) και ρύθμιση του pH των ούρων με προσθήκη 2 mL διαλύματος Tris-HCL 3,75 M pH 7,4. Ακολούθησε μεταφορά του μισού υπερκειμένου σε φίλτρο υπερδιήθησης Amicon Ultra-15 YM30 και φυγοκέντρωση για 15 min στα 3500 rpm στους 20 °C. Στο φίλτρο προστέθηκε το υπόλοιπο μισό υπερκείμενο της αρχικής φυγοκέντρωσης και επαναλήφθηκε η

φυγοκέντρηση για 15 min στα 3500 rpm στους 20 °C. Το συνολικό διήθημα απορρίφθηκε και πραγματοποιήθηκε πλύση του κατακρατούμενου μέρους του φίλτρου με φυγοκέντρηση για 20 min στα 3500 rpm στους 20 °C μετά την προσθήκη 400 μL διαλύματος αναστολέων πρωτεασών (complete) και διαλύματος Tris-HCL 50 mM pH 7,4 μέχρι τη χαραγή του φίλτρου. Έπειτα, έγινε μεταφορά του πλυμένου κατακρατούμενου μέρους του φίλτρου σε φίλτρο Amicon Ultra-4 YM30 και φυγοκέντρηση για 60 min στα 3500 rpm στους 20 °C. Το τελικό συμπύκνωμα των ούρων, που εμπεριέχει μόρια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 30 kDa, όπως η ερυθροποιητίνη, μεταφέρθηκε σε πλάκα ELISA που στον πυθμένα της φέρει αντίσωμα ειδικό για την ανθρώπινη ερυθροποιητίνη, η πλάκα καλύφθηκε με προστατευτική ταινία και αναδεύτηκε με οριζόντια κίνηση στα 600 rpm για περίπου 12 h στους 4 °C. Μετά το τέλος του ανοσοκαθαρισμού απορρίφθηκαν τα ούρα από την πλάκα και τα πηγαδάκια ξεπλύθηκαν 5 φορές με 300 μL διαλύματος φωσφορικών αλάτων PBS κάθε φορά. Έπειτα στέγνωσαν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 30 μL διαλύματος έκλυσης (elution buffer). Η πλάκα καλύφθηκε με προστατευτική ταινία και επώαστηκε για 5 min στους 90 °C σε θερμοαντήρα. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf και χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για την ανάλυση με SDS-PAGE.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με SDS-PAGE χρησιμοποιήθηκε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιλαμβάνει ένα διαχωριστικό θάλαμο, ηλεκτρόδια, πώμα προστασίας και τροφοδοτικό. Χρησιμοποιήθηκε έτοιμο εμπορικά διαθέσιμο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στον εσωτερικό θάλαμο της συσκευής ο οποίος γέμισε με διάλυμα ηλεκτρολύτη καθόδου SDS-PAGE. Σε κάθε πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώθηκαν 20 μL δείγματος, συμπληρώθηκε ο εξωτερικός θάλαμος της συσκευής με διάλυμα ηλεκτρολύτη ανόδου SDS-PAGE, συναρμολογήθηκε η συσκευή με τοποθέτηση των ηλεκτροδίων και έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης 150 V για 20 min και 120 V για περίπου 2 h.

Μετά την επίτευξη του διαχωρισμού, το πήκτωμα υποβλήθηκε σε διαδικασία διπλής ανοσοσύπωσης (western blotting), κατά την οποία το σύνολο των πρωτεϊνών μεταφέρονται από το πήκτωμα σε υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς τύπου PVDF. Πιο συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης έγινε αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο του, αφαίρεση σημείου που ήταν τα πηγαδάκια και το πήκτωμα εκπλύθηκε 2 φορές με διάλυμα ανοσοσύπωσης (blotting buffer) για 10 min κάθε έκπλυση. Δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» μεταφοράς με κατά σειρά από κάτω προς τα επάνω 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, 1 υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς τύπου PVDF, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τις διαχωρισμένες πρωτεΐνες και 9 φύλλα μεταφοράς

τύπου Wattman, όλα σε διαστάσεις 8 cm x 8 cm και εμποτισμένα σε διάλυμα blotting buffer. Το «σάντουιτς» μεταφοράς τοποθετήθηκε πάνω στην άνοδο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς TE77 και από επάνω τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο καθόδου της συσκευής. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε για 40 min στα 55 mA.

Μετά το πέρας της πρώτης μεταφοράς η PVDF μεμβράνη που έφερε τις πρωτεΐνες αφού εκπλύθηκε με PBS επώαστηκε σε διάλυμα 5 mM DTT/PBS για 1 h στους 37 °C υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο. Έπειτα το διάλυμα του DTT απορρίφθηκε, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και ακολούθησε η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με επώαση σε διάλυμα 5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για περίπου 12 h στους 4 °C υπό ελαφριά ανάδευση. Στο τέλος της δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και ακολούθησε επώασή της με μονοκλωνικό αντίσωμα μύος MoAb ειδικό προς την ανθρώπινη ερυθροποιητίνη αραιωμένο με τίτλο 1/1000 σε 1% άπαχο γάλα τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 0,5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 10 min κάθε έκπλυση και δημιουργήθηκε ένα «σάντουιτς» μεταφοράς με κατά σειρά από κάτω προς τα επάνω 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, τη μεμβράνη PVDF με τις πρωτεΐνες και το μονοκλωνικό αντίσωμα, 1 υδροφιλική μεμβράνη μεταφοράς Durapore, 1 δεύτερη υδροφοβική μεμβράνη μεταφοράς τύπου PVDF και 9 φύλλα μεταφοράς τύπου Wattman, όλα σε διαστάσεις 8 cm x 8 cm και εμποτισμένα σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,7% (εκτός από τη μεμβράνη PVDF με τις πρωτεΐνες και το μονοκλωνικό αντίσωμα). Το «σάντουιτς» μεταφοράς τοποθετήθηκε πάνω στην άνοδο της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς TE77 και από επάνω τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο καθόδου της συσκευής. Η μεταφορά των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε για 10 min στα 51 mA.

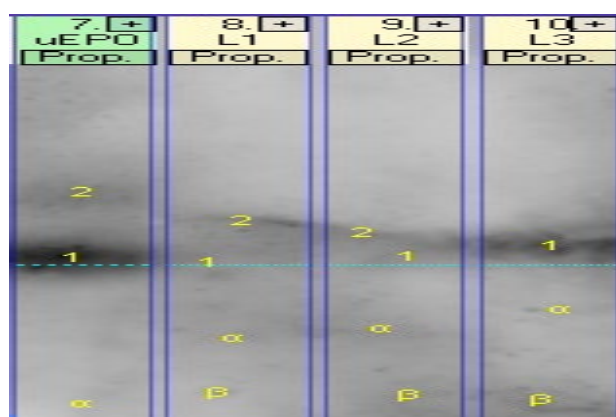
Μετά το πέρας της δεύτερης μεταφοράς η PVDF μεμβράνη που έφερε τα μονοκλωνικά αντισώματα αφού εκπλύθηκε με PBS και ακολούθησε η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με επώαση σε διάλυμα 5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση. Στο τέλος της δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων η μεμβράνη ξεπλύθηκε με PBS και ακολούθησε επώασή της με πολυκλωνικό βιοτινυλωμένο αντίσωμα αιγός ειδικό προς όλες τις ανοσοσφαιρίνες μύος του τύπου IgG αραιωμένο με τίτλο 1/1500 σε 1% άπαχο γάλα τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα 0,5% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 10 min κάθε έκπλυση και ακολούθησε επώασή της με 190 μL διαλύματος συμπλόου

στρεπταβιδίνης-HRP σε 50 mL διαλύματος 1% άπαχου γάλατος τύπου Regilait σε PBS για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφριά ανάδευση. Τέλος η μεμβράνη που πλέον έφερε το σύμπλοκο μονοκλωνικό αντίσωμα-πολυκλωνικό βιοτινυλωμένο αντίσωμα-στρεπταβιδίνης-HRP ξεπλύθηκε 3 φορές με PBS για 10 min κάθε έκπλυση.

Η εμφάνιση του σήματος της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση υποστρώματος χημειοφωταύγειας για την HRP (παρουσία λουμινόλης 35 και H₂O₂) και τον αναλυτή απεικόνισης φωταύγειας LAS-4000. Το τελικό αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η δημιουργία μιας εικόνας που χαρτογραφεί την αρχική θέση και ποσότητα της ερυθροποιητίνης στο πήκτωμα μετά το διαχωρισμό με SDS-PAGE.

8.4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ

Η ανάλυση του προφίλ κατανομής της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με το ειδικό λογισμικό Gel Analysis System for Erythropoietin (GASepo, v1.3). Στην Εικόνα 8.13 παρουσιάζονται τα προφίλ κατανομής των ερυθροποιητινών με πρώτο το προφίλ του αρνητικού μάρτυρα που έχει μόνο ενδογενή ερυθροποιητίνη και μετά τα προφίλ των τριών δειγμάτων ούρων L1, L2 και L3 της μεταβολικής μελέτης μονής χορήγησης LGD-4033 που αντιστοιχούν σε 0, 20 και 145.5 h μετά τη χορήγηση, αντίστοιχα. Σε κανένα δείγμα της μελέτης δεν ανιχνεύθηκε ενδογενής ερυθροποιητίνη, ούτε σε αυτό πριν τη χορήγηση, δείχνοντας ότι τα φυσιολογικά της επίπεδα ενδογενούς ερυθροποιητίνης του εθελοντή είναι χαμηλά.



Εικόνα 8.13. Προφίλ κατανομής ερυθροποιητινών στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά το διαχωρισμό με SDS-PAGE για τον έλεγχο των επιπέδων ενδογενούς ερυθροποιητίνης μετά τη μονή χορήγηση LGD-4033. Η γαλάζια γραμμή υποδεικνύει τη ζώνη της ενδογενούς ερυθροποιητίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

9.1 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ SYSMECH XT-2000i

9.1.1 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ SYSMECH XT-2000i

Για την επικύρωση της λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i και συγκεκριμένα της μεθόδου CBC+DIFF+RET χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γενικής εξέτασης αίματος ασθενών του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών “Ευαγγελισμός” στα οποία έγιναν μετρήσεις με τον συγκεκριμένο αιματολογικό αναλυτή για τις αιματολογικές μεταβλητές που ελέγχονται και κατά τον έλεγχο ντόπινγκ σε δείγματα αίματος αθλητών στα πλαίσια της αιματολογικής ενότητας του ABP (Πίνακας 9.1). Με βάση τις μετρήσεις αυτές αξιολογήθηκαν οι αιματολογικοί παράμετροι επικύρωσης του αναλυτή, σύμφωνα με τα κριτήρια του WADA.

Πίνακας 9.1. Αιματολογικές παράμετροι ελέγχου του ABP.

Όνομασία	Συντομογραφία	Μονάδα μέτρησης
Αιματοκρίτης	HCT	%
Αιμοσφαιρίνη	HGB	g/dL
Ερυθρά Αιμοσφαίρια	RBC	10 ⁶ /μL
Μέσος Όγκος Ερυθρών	MCV	fL
Μέση Περιεκτικότητα Αιμοσφαιρίνης	MCH	pg
Μέση Πυκνότητα Αιμοσφαιρίνης	MCHC	g/dL
Εύρος Κατανομής Ερυθρών - Τυπική Απόκλιση	RDW-SD	fL
Ποσοστό Δικτυοερυθροκυττάρων	RET%	%
Αριθμός Δικτυοερυθροκυττάρων	RET#	10 ⁶ /μL
Κλάσμα Ανώριμων Δικτυοερυθροκυττάρων	IRF	%
Λευκά Αιμοσφαίρια	WBC	10 ³ /μL
Αιμοπετάλια	PLT	10 ³ /μL

Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος με τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XT-2000i πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του WADA για τις αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών για έλεγχο μεταβολών του ABP. Συγκεκριμένα, τα δείγματα ελέγχου τριών επιπέδων, αφού έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min στη βάση στήριξης σωληναρίων, αναλύθηκαν εις διπλούν στο κλειστό σύστημα ανάλυσης. Τα αποτελέσματα

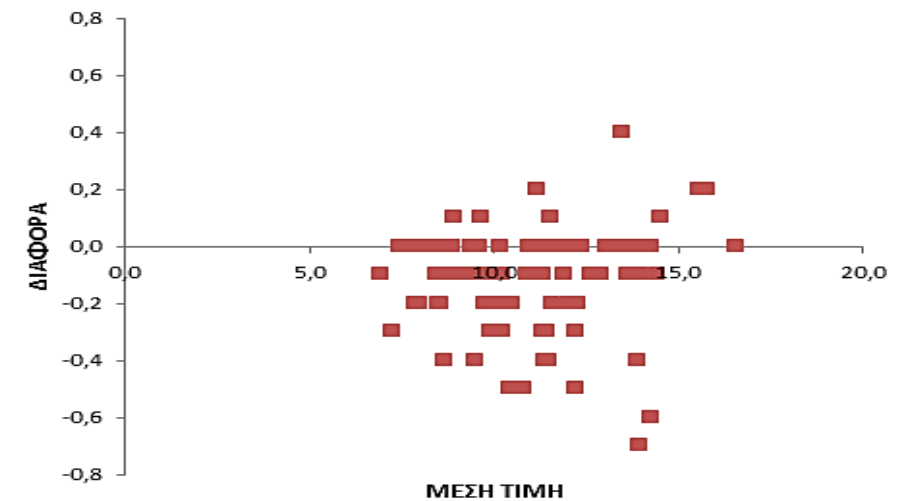
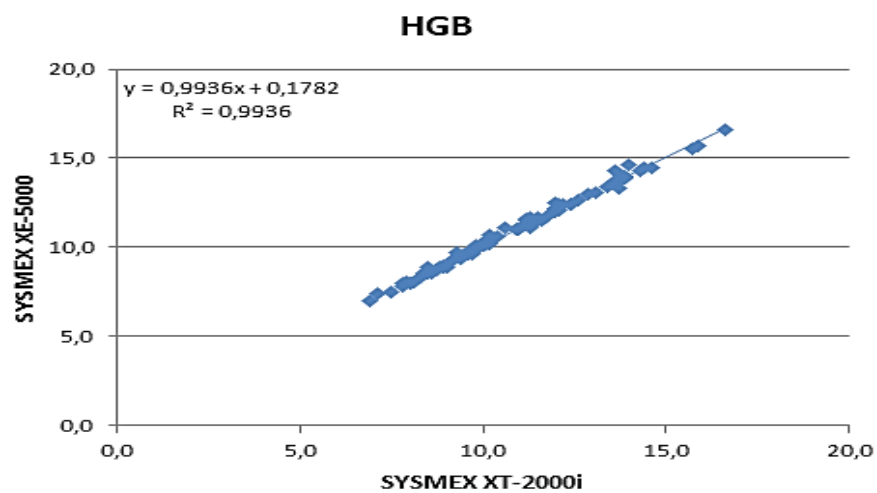
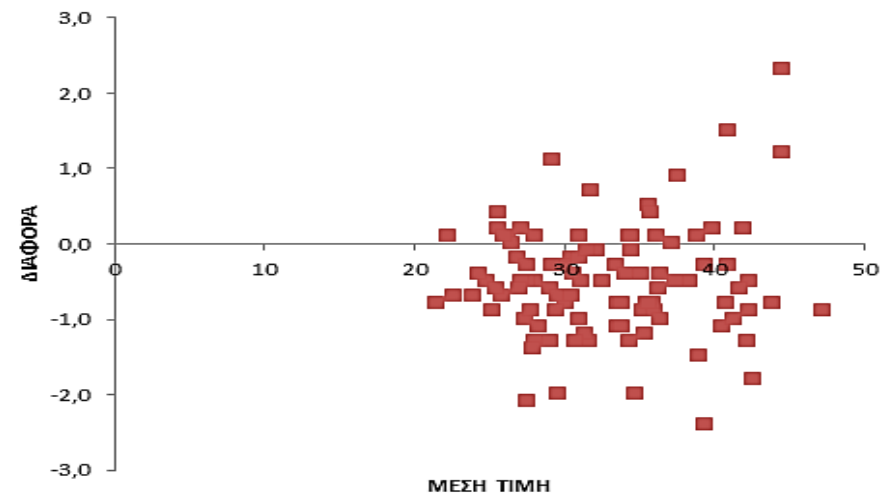
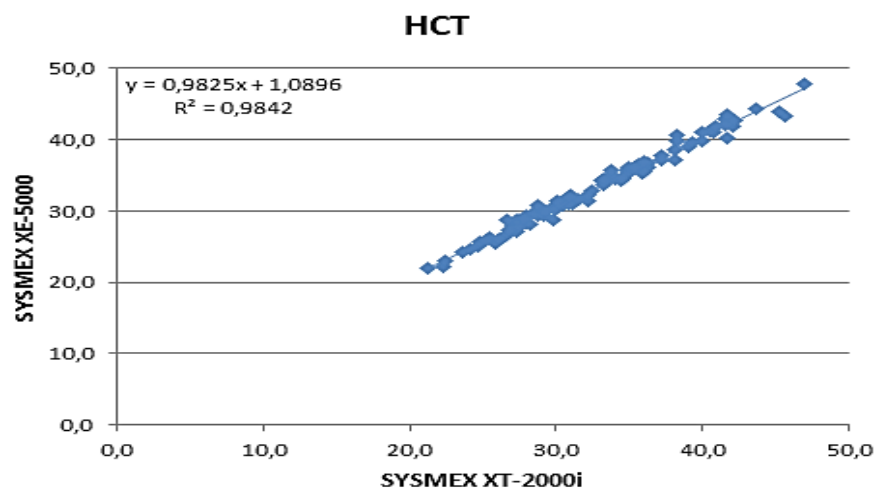
των δύο αυτών διαδοχικών μετρήσεων πληρούσαν τα κριτήρια του WADA, δηλαδή η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων για την HGB να μην είναι μεγαλύτερη από 0,1 και για το RET% να μην είναι μεγαλύτερη του 0,15 ή του 0,25 αν οι μετρήσεις είναι μικρότερες ή μεγαλύτερες του 0,1, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα δείγματα ολικού αίματος μεταφέρθηκαν από τους 4 °C σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύτηκαν για 15 min σε αναδευτή ομογενοποίησης που προκαλεί ταυτόχρονη κύλιση και ανακίνηση των φιαλιδίων συλλογής αίματος. Τα δείγματα αίματος έπειτα αναλύθηκαν δύο διαδοχικές φορές στο κλειστό σύστημα ανάλυσης, με τα αποτελέσματα των δύο αυτών διαδοχικών μετρήσεων να πληρούν τα κριτήρια του WADA, όπως στην ανάλυση των δειγμάτων ελέγχου. Στο τέλος της διαδικασίας αναλύθηκε άλλη μια φορά ένα δείγμα ελέγχου ανεξαρτήτου επιπέδου.

Αρχικά, για να αξιολογηθεί η συγκρισιμότητα (comparability) του αναλυτή πραγματοποιήθηκε σύγκριση της λειτουργίας του Sysmex XT-2000i με παρόμοιο αιματολογικό αναλυτή της ίδιας εταιρίας, τον Sysmex XE-5000 του Αιματολογικού Τμήματος του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών “Ευαγγελισμός”. Πιο συγκεκριμένα, για 5 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες 20 δείγματα (n=100) γενικής εξέτασης αίματος ασθενών του νοσοκομείου αναλύθηκαν από το νοσοκομείο με τον Sysmex XE-5000 και έπειτα την ίδια ημέρα μεταφέρθηκαν κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας, όπου και αναλύθηκαν με τον Sysmex XT-2000i. Έπειτα, έγινε σύγκριση των τιμών που προέκυψαν από τις δύο μετρήσεις για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, RET%, RET# και WBC, ύστερα από ανάλυση διακύμανσης (analysis of variation, ANOVA) για συσχέτιση (correlation). Η συγκρισιμότητα των δύο αιματολογικών αναλυτών εκφράστηκε μέσω του συντελεστή συσχέτισης R και της διαφοράς (difference, d) μεταξύ των δύο μετρήσεων (κατά μέση τιμή για τα 100 δείγματα), όπως φαίνεται στον Πίνακα 9.2. Η συσχέτιση των δύο αναλυτών αποδείχθηκε και με δοκιμασία t-test κατά ζεύγη, με τη διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων να μην θεωρείται στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας 5% σε 99 βαθμούς ελευθερίας.

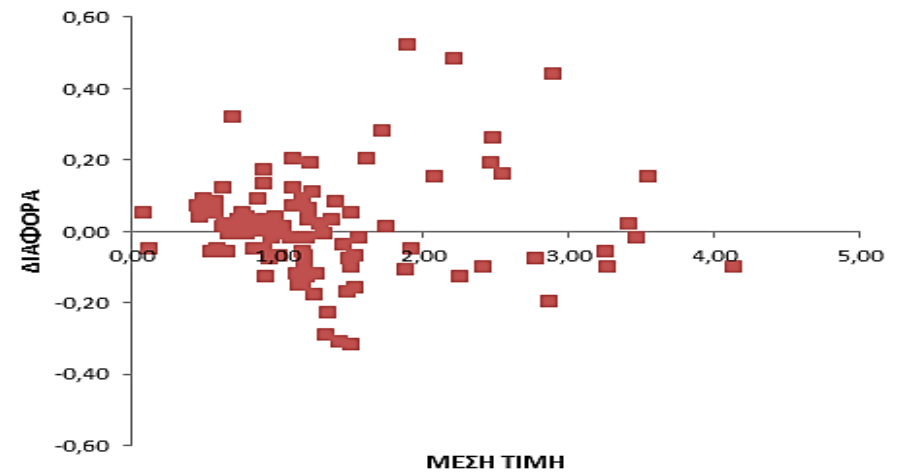
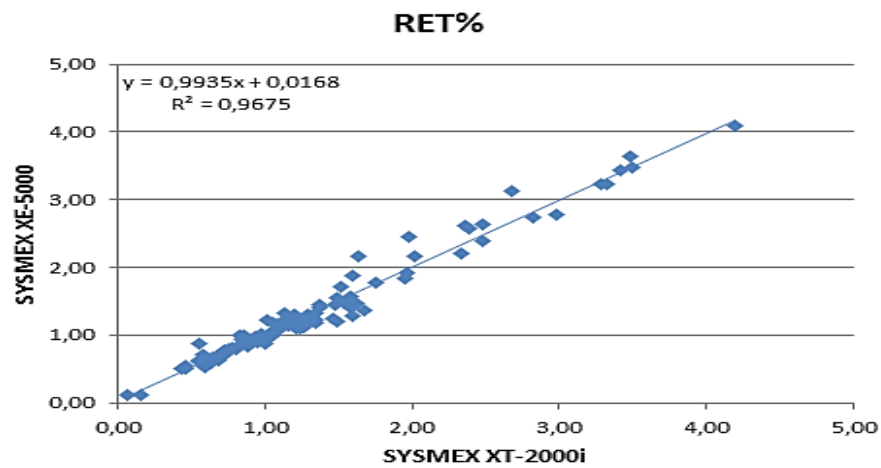
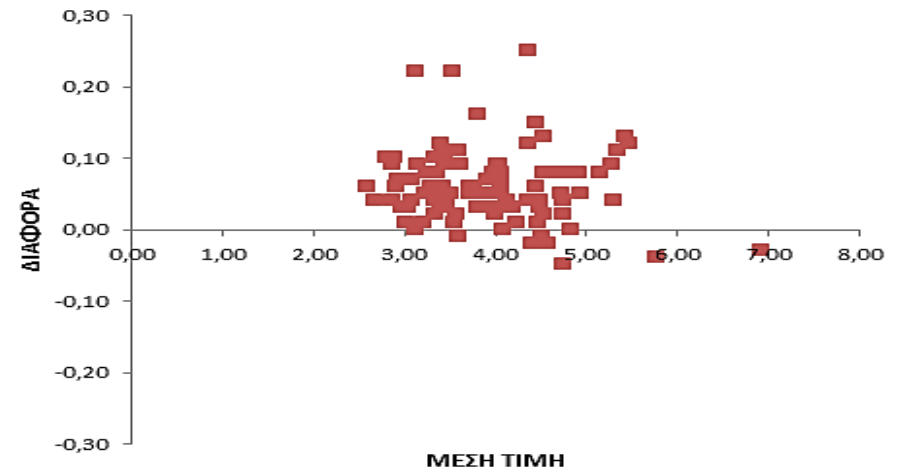
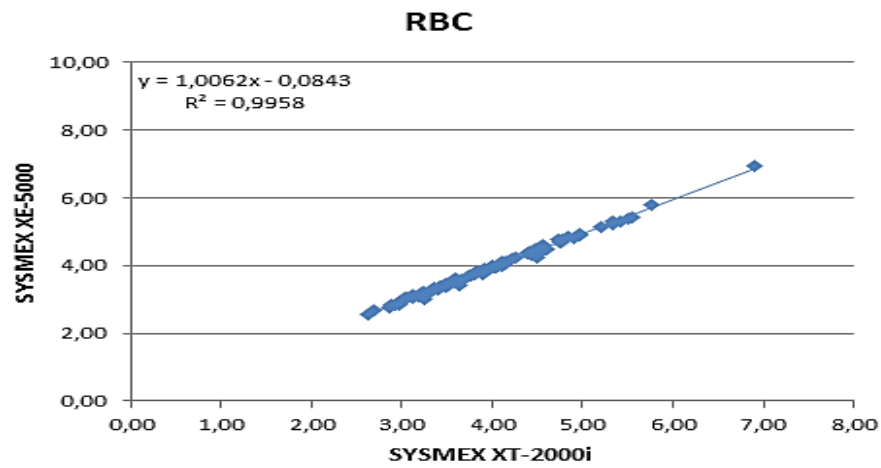
Πίνακας 9.2. Αποτελέσματα αξιολόγησης συγκρισιμότητας των δύο αιματολογικών αναλυτών.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	HCT	HGB	RBC	RET%	RET#	WBC
R	0,992	0,997	0,998	0,984	0,977	0,999
R²	0,984	0,994	0,996	0,968	0,954	0,997
ΔΙΑΦΟΡΑ (d)	-0,5	-0,1	0,06	0,01	0,0013	-0,40
SD_d	0,7	0,2	0,05	0,14	0,0063	0,35

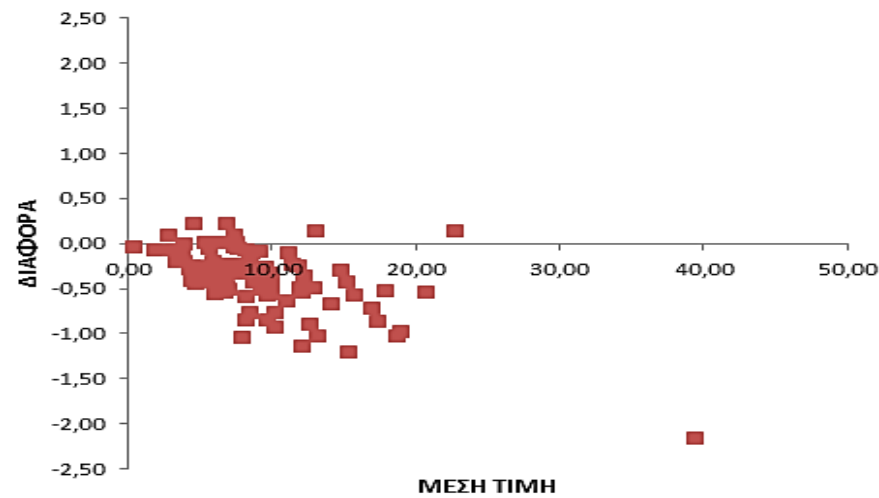
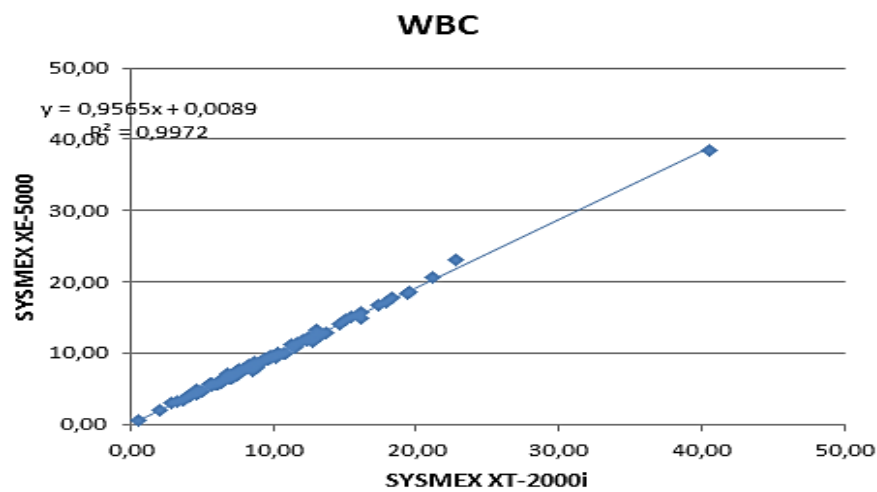
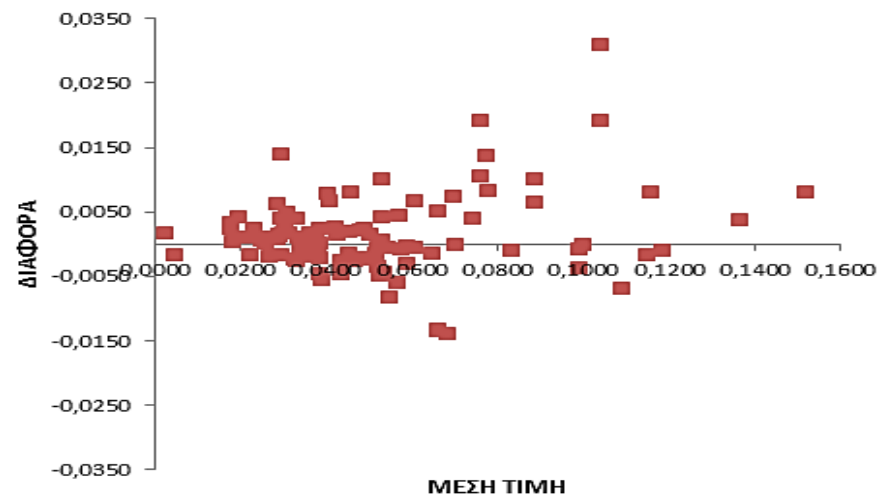
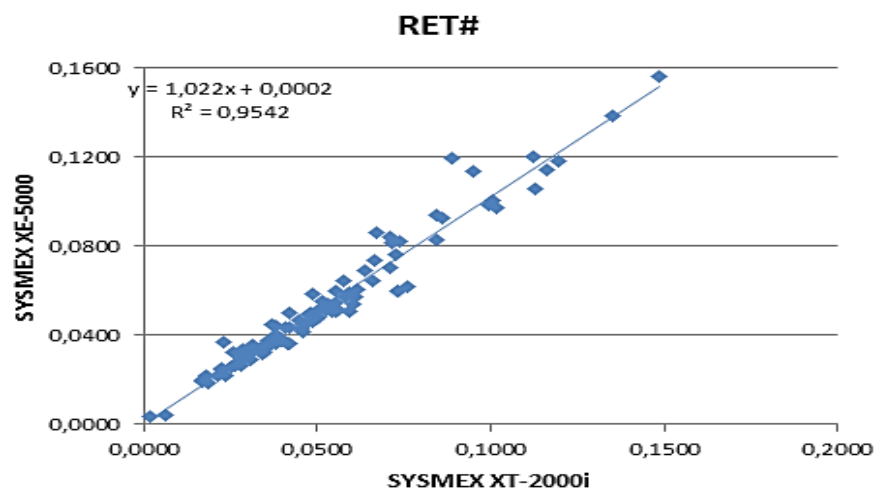
Επιπλέον, στην Εικόνα 9.1 παρουσιάζονται διαγράμματα συσχέτισης, για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, RET%, RET# και WBC, ενώ παρατίθενται και τα αντίστοιχα διαγράμματα Bland-Altman, τα οποία δείχνουν τη διασπορά των τιμών της μέσης τιμής των δύο μετρήσεων σε σχέση με τις τιμές της διαφοράς μεταξύ των δύο μετρήσεων.



Εικόνα 9.1.α. Ευθείες συσχέτισης και διαγράμματα Bland-Altman για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i.



Εικόνα 9.1.β. Ευθείες συσχέτισης και διαγράμματα Bland-Altman για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i.



Εικόνα 9.1.γ. Ευθείες συσχέτισης και διαγράμματα Bland-Altman για την αξιολόγηση της συγκρισιμότητας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i.

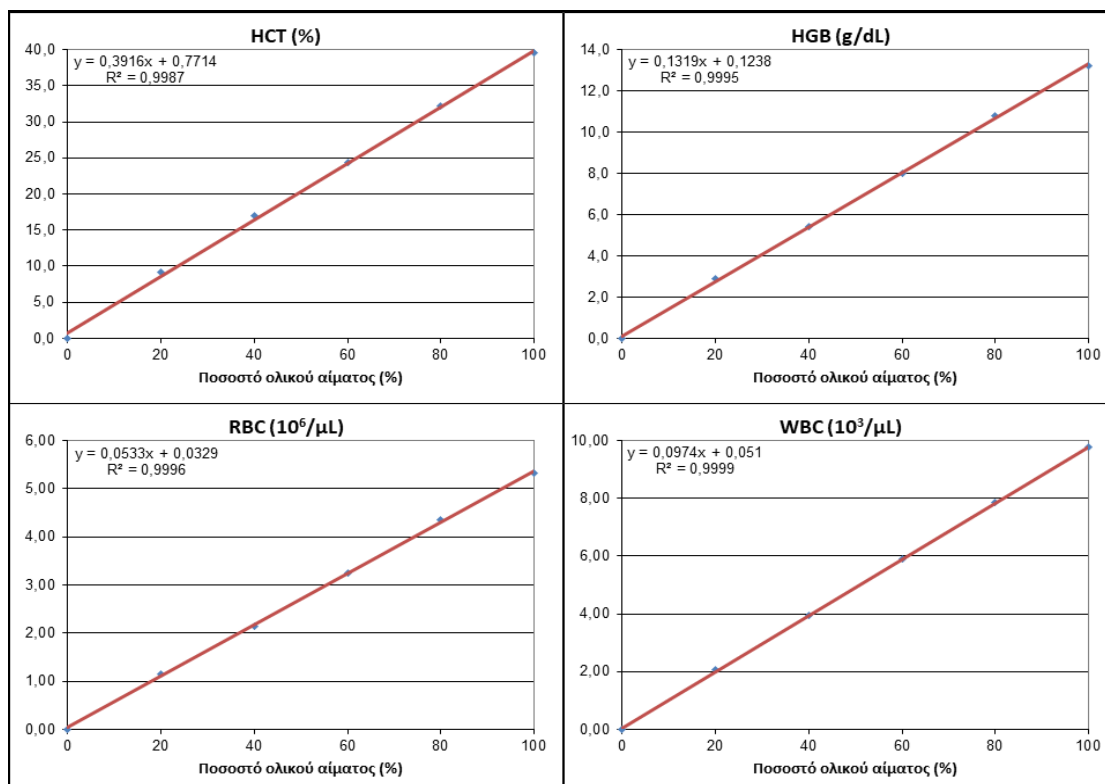
Η επαναληψιμότητα (repeatability), ή αλλιώς η πιστότητα εντός της ημέρας, και η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision), ή αλλιώς πιστότητα μεταξύ των ημερών, της μεθόδου αξιολογήθηκαν στο κλειστό σύστημα ανάλυσης. Ο όρος επαναληψιμότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών αναλύσεων ενός δείγματος κάτω από τις ίδιες συνθήκες και ελέγχθηκε με την ανάλυση 3 δειγμάτων ολικού αίματος για 10 συνεχόμενες φορές το καθένα σε 3 εργαστηριακές ημέρες (1 δείγμα/ημέρα). Ο όρος ενδιάμεση πιστότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων μετρήσεων του ίδιου δείγματος σε διαφορετικές ημέρες και ελέγχθηκε με την ανάλυση 1 ίδιου δείγματος 1 φορά για 10 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες (1 ανάλυση/ημέρα). Επειδή τα δείγματα ανθρώπινου ολικού αίματος δεν διατηρούν σταθερές τις αιματολογικές τους παραμέτρους με το πέρασμα των ημερών, η αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση τεχνητού δείγματος αίματος (δείγμα ελέγχου αιματολογικού αναλυτή). Και στις δύο περιπτώσεις η πιστότητα εκτιμήθηκε για το σύνολο των αιματολογικών παραμέτρων και εκφράστηκε μέσω της τυπικής απόκλισης (SD) και του συντελεστή διακύμανσης (CV%) των μετρήσεων, όπως φαίνονται στον Πίνακα 9.3.

Πίνακας 9.3. Αποτελέσματα αξιολόγησης επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας εκφρασμένα μέσω της τυπικής απόκλισης (SD) και του συντελεστή διακύμανσης (CV%) για το σύνολο των αιματολογικών παραμέτρων.

ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ					ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ		
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2	ΔΕΙΓΜΑ 3	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΔΕΙΓΜΑ 1
HCT	SD	0,1	0,3	0,3	HCT	SD	0,2
	CV%	0,54	0,76	0,80		CV%	0,66
HGB	SD	0,0	0,1	0,1	HGB	SD	0,2
	CV%	0,42	0,71	0,53		CV%	1,3
RBC	SD	0,02	0,04	0,03	RBC	SD	0,03
	CV%	0,57	0,77	0,78		CV%	0,57
MCV	SD	0,1	0,1	0,1	MCV	SD	0,4
	CV%	0,16	0,16	0,09		CV%	0,51
MCH	SD	0,1	0,3	0,3	MCH	SD	0,3
	CV%	0,56	0,98	1,2		CV%	1,01
MCHC	SD	0,2	0,3	0,4	MCHC	SD	0,5
	CV%	0,56	0,90	1,1		CV%	1,4
RDW-SD	SD	0,60	0,13	0,28	RDW-SD	SD	0,49
	CV%	1,1	0,29	0,51		CV%	1,1
RET%	SD	0,06	0,07	0,06	RET%	SD	0,05

	CV%	2,9	8,2	4,8		CV%	3,2
RET#	SD	0,0021	0,0034	0,0026	RET#	SD	0,0025
	CV%	2,9	8,2	4,7		CV%	3,7
IRF	SD	1,5	0,7	2,8	IRF	SD	3,4
	CV%	10	51	31		CV%	15
WBC	SD	0,11	0,16	0,06	WBC	SD	0,08
	CV%	0,69	1,6	0,86		CV%	1,1
PLT	SD	25	7	4	PLT	SD	4
	CV%	8,1	2,9	1,9		CV%	1,7

Η γραμμικότητα (linearity) του Sysmex XT-2000i ελέγχθηκε με την ανάλυση ενός δείγματος ολικού αίματος το οποίο αραιώθηκε με σταδιακή προσθήκη ομόλογου πλάσματος σε όγκους τέτοιους ώστε η τελική συγκέντρωση του ολικού αίματος να κυμαίνεται από 0-100% και να αυξάνει κατά 20%. Η γραμμικότητα εκφράστηκε μέσω διαγραμμάτων συσχέτισης με την εξίσωση της ευθείας και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης R^2 . Ο έλεγχος της γραμμικότητας σε κλειστό σύστημα ανάλυσης έγινε για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC και WBC (Εικόνα 9.2).



Εικόνα 9.2. Διαγράμματα γραμμικότητας αιματολογικού αναλυτή ως προς την συγκέντρωση του ολικού αίματος για τις μεταβλητές HCT, HGB, RBC και WBC.

Επιπλέον, ελέγχθηκε η επίδραση της τάσης (effect of drift) μέσω της ανάλυση μιας κοόρτης 5 δειγμάτων ολικού αίματος η οποία αναλύθηκε 6 φορές. Πρώτα αναλύθηκε 3 συνεχόμενες φορές και έπειτα από αναμονή 1 h αναλύθηκε άλλες 6 φορές. Κατά τη διάρκεια της 1 h τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν ξανά στους 4 °C και το πρωτόκολλο της ανάλυσης ξεκίνησε από την αρχή. Αφού υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τριών πρώτων αναλύσεων και ο μέσος όρος των τριών επόμενων αναλύσεων, υπολογίστηκε και η διαφορά μεταξύ των δύο αυτών μέσων όρων για κάθε ένα από τα 5 δείγματα. Η επίδραση της τάσης εκφράστηκε ως η μέση διαφορά ανάμεσα στα 5 δείγματα της κοόρτης. Στον Πίνακα 9.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου επίδρασης της τάσης για το σύνολο των αιματολογικών παραμέτρων.

Πίνακας 9.4. Αποτελέσματα υπολογισμού επίδρασης της τάσης για το σύνολο των αιματολογικών παραμέτρων.

	ΔΕΙΓΜΑ	HCT	HGB	RBC	MCV	MCH	MCHC	RDW-SD	RET%	RET#	IRF	WBC	PLT
1	M.O. 1	29,9	9,9	3,39	88,3	29,2	33,1	45,7	0,79	0,0266	2,5	9,95	179
	M.O. 2	29,9	9,9	3,38	88,4	29,2	33,0	46,1	0,68	0,0230	0,9	10,23	176
	ΔΙΑΦΟΡΑ	0,0	0,0	0,01	-0,2	0,0	0,1	-0,3	0,10	0,0036	1,6	-0,28	3
2	M.O. 1	28,3	9,5	4,46	63,4	21,4	33,7	35,8	0,84	0,0377	3,3	10,01	199
	M.O. 2	28,2	9,6	4,44	63,4	21,5	34,0	35,9	0,94	0,0418	3,4	10,16	206
	ΔΙΑΦΟΡΑ	0,1	0,0	0,02	0,0	-0,2	-0,3	-0,1	-0,10	-0,0041	-0,1	-0,15	-7
3	M.O. 1	23,5	8,2	2,81	83,5	29,2	34,9	38,6	0,11	0,0032	1,0	0,52	17
	M.O. 2	23,2	8,2	2,79	83,4	29,4	35,3	38,7	0,11	0,0031	1,0	0,56	16
	ΔΙΑΦΟΡΑ	0,2	0,0	0,02	0,1	-0,2	-0,4	-0,1	0,00	0,0000	0,1	-0,04	1
4	M.O. 1	32,0	10,2	4,03	79,4	25,3	31,9	44,9	0,86	0,0347	4,7	7,94	251
	M.O. 2	32,3	10,2	4,06	79,6	25,1	31,5	44,8	0,92	0,0374	5,0	7,94	253
	ΔΙΑΦΟΡΑ	-0,3	0,0	-0,03	-0,1	0,3	0,4	0,1	-0,06	-0,0028	-0,3	0,00	-2
5	M.O. 1	36,0	11,0	3,98	90,4	27,7	30,7	45,4	1,16	0,0462	6,7	5,76	285
	M.O. 2	35,8	11,0	3,95	90,6	27,9	30,9	45,1	1,09	0,0429	6,7	5,71	291
	ΔΙΑΦΟΡΑ	0,2	0,0	0,03	-0,2	-0,2	-0,2	0,2	0,07	0,0033	0,0	0,05	-6
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΑΣΗΣ		0,1	0,0	0,01	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,00	0,0000	0,3	-0,08	-2

Η τελευταία αναλυτική παράμετρος που αξιολογήθηκε ήταν ο έλεγχος επιμόλυνσης (carry over). Πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων ελέγχου του αιματολογικού αναλυτή. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν τρεις συνεχόμενες φορές το δείγμα ελέγχου υψηλού επιπέδου τιμών (high level 3, H) και το δείγμα ελέγχου χαμηλού επιπέδου τιμών (low level 1, L). Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε κλειστό σύστημα ανάλυσης με την σειρά H1, H2, H3, L1, L2, L3 και η επιμόλυνση για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, RDW-SD, RET%, RET#, IRF, WBC και PLT υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο $[(L1-L3)/(H1-H3)]*100$ (Πίνακας 9.5).

Πίνακας 9.5. Αποτελέσματα ελέγχου επιμόλυνσης.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Carry Over
HCT	-1,1
HGB	1,8
RBC	-1,1
RDW-SD	0,0
RET%	-3,5
RET#	-1,9
IRF	0,0
WBC	-0,06
PLT	0

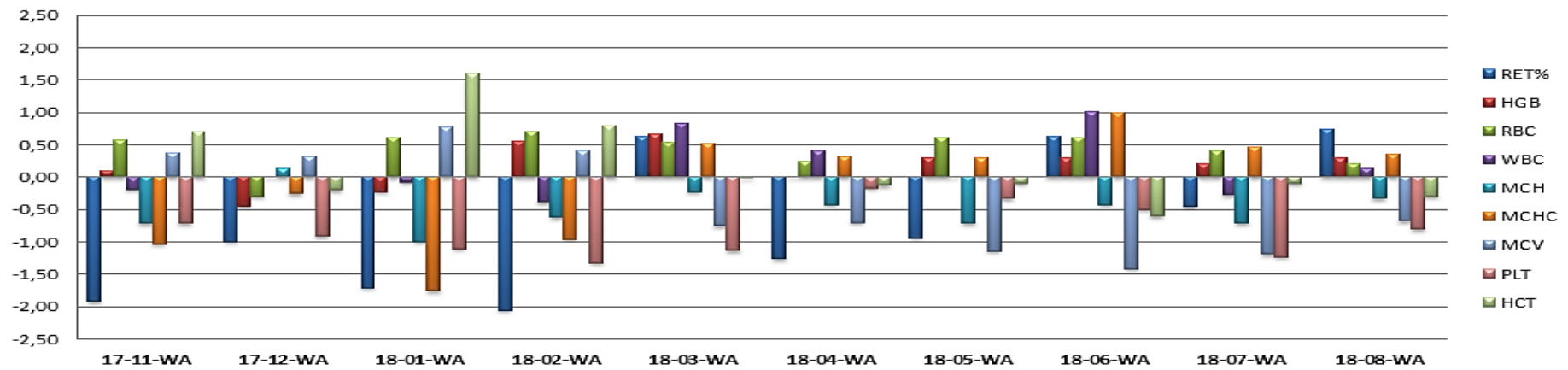
9.1.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ SYSMEX XT-2000i

Η ορθότητα (accuracy) των μετρήσεων του αιματολογικού αναλυτή αποτελεί την αναλυτική παράμετρο που εξετάζει την εγγύτητα της πειραματικής τιμής μιας αιματολογικής παραμέτρου προς τη θεωρητική τιμή της παραμέτρου έπειτα από την ανάλυση ενός δείγματος αίματος. Ο έλεγχος της ορθής λειτουργίας του Sysmex XT-2000i πραγματοποιήθηκε μέσω της συμμετοχής του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας στο παγκόσμιο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας (External Quality Assurance Services, EQAS) για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών στα πλαίσια της αιματολογικής ενότητας του ABP. Το πρόγραμμα αυτό πραγματοποιείται σε συνεργασία του WADA με το κέντρο ελέγχου ποιότητας της Ελβετίας (Center Switzerland Quality Control, CSCQ) (EQAS - WADA-CSCQ).

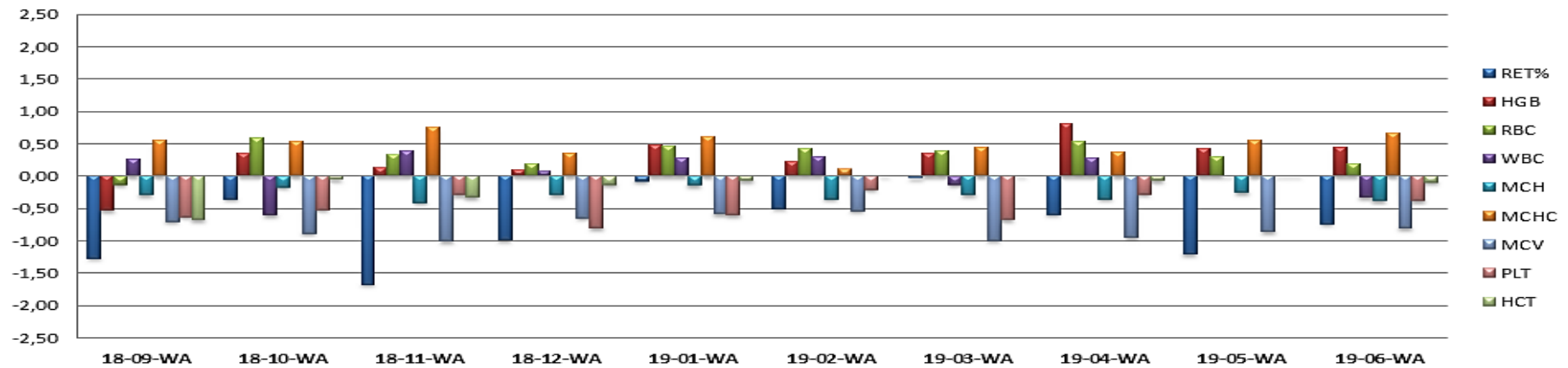
Στο παγκόσμιο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας EQAS-WADA-CSCQ γίνεται έλεγχος για εννέα από τις αιματολογικές παραμέτρους του ABP. Ο έλεγχος πραγματοποιείται κάθε μήνα παράλληλα σε όλα τα διαπιστευμένα από τον WADA Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ, με την ανάλυση δύο δειγμάτων συνθετικού αίματος χωρίς να είναι γνωστές οι πραγματικές τιμές των αιματολογικών παραμέτρων. Στο ένα δείγμα γίνεται έλεγχος μόνο για το RET%, ενώ στο άλλο δείγμα γίνεται έλεγχος για τις υπόλοιπες οκτώ αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, MCV, MCH, MCHC, WBC και PLT. Το πρωτόκολλο ανάλυσης των δειγμάτων είναι ίδιο με αυτό που περιγράφηκε στην ενότητα 9.1.1 και ακολουθείται για τις αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών για έλεγχο μεταβολών του ABP. Τα δείγματα αναλύονται επτά συνεχόμενες φορές το κάθε ένα και οι μέσοι όροι των επτά αυτών μετρήσεων αποστέλλονται στο φορέα που πραγματοποιεί τον έλεγχο.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ορθής λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i εκφράζονται με τον συντελεστή απόδοσης FAC-value και με το Z-Score. Ο FAC-value μετράει τη διαφορά μεταξύ της πειραματικής τιμής της ανάλυσης των δειγμάτων από τη θεωρητική τους τιμή-στόχο, σύμφωνα με το ποσοστό ανοχής του CSCQ. Ο FAC-value δεν εξαρτάται από τα αποτελέσματα των άλλων εργαστηρίων. Το Z-Score δείχνει πόσο μακριά είναι το αποτέλεσμα της μέτρησης του εργαστηρίου από την τιμή-στόχο, και υπολογίζεται εξαρτώμενο από τα αποτελέσματα και των άλλων εργαστηρίων. Η συμμετοχή στο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας έγινε μέχρι τη χρονική στιγμή που ο WADA επέτρεπε τη χρήση του Sysmex XT-2000i για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ορθότητας του Sysmex XT-2000i παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.3 και στην Εικόνα 9.4.

FAC value

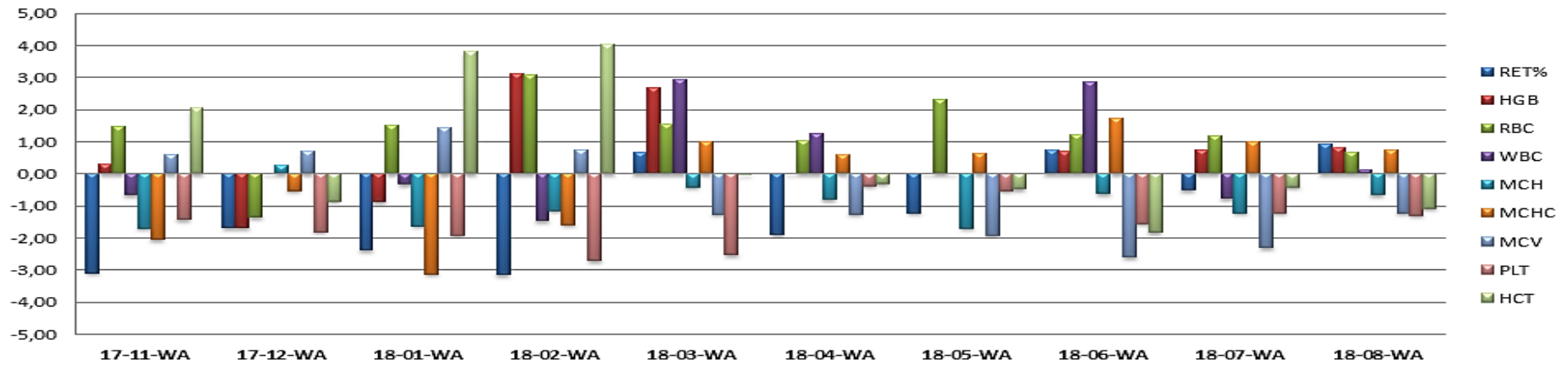


FAC value

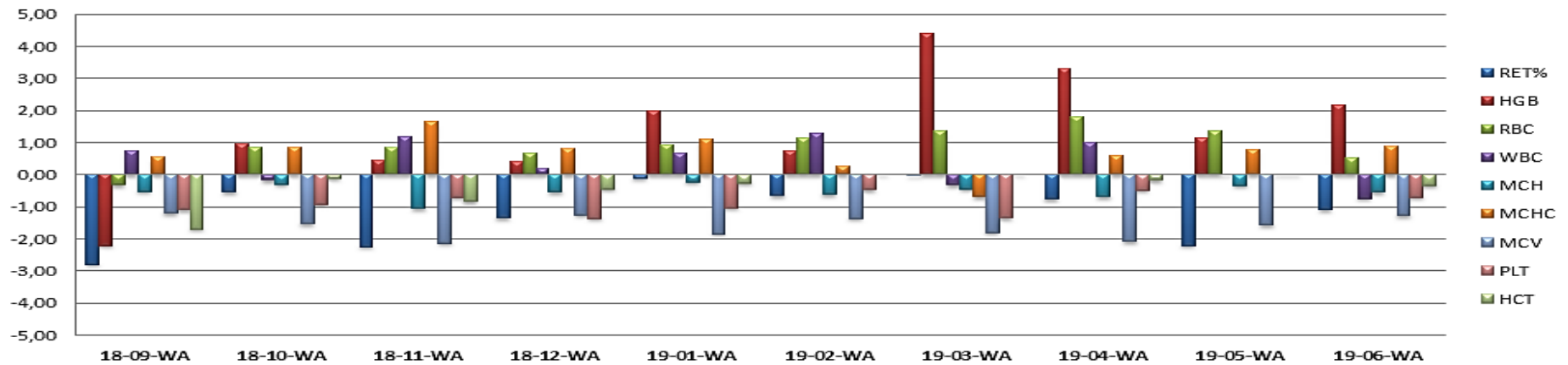


Εικόνα 9.3. Διαγράμματα απόδοσης FAC-value για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, MCV, MCH, MCHC, WBC, PLT και RET% κατά το χρονικό διάστημα 11/2017-06/2019.

Z-Score



Z-Score



Εικόνα 9.4. Διαγράμματα απόδοσης Z-Score για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, MCV, MCH, MCHC, WBC, PLT και RET% κατά το χρονικό διάστημα 11/2017-06/2019.

9.2 ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ SYSMECX XN-1000

9.2.1 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ SYSMECX XN-1000

Για την επικύρωση της λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XN-1000 και συγκεκριμένα της μεθόδου CBC+DIFF+RET χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γενικής εξέτασης αίματος ασθενών από ιδιωτικό μικροβιολογικό ιατρείο. Στα δείγματα αυτά έγιναν μετρήσεις με τον συγκεκριμένο αιματολογικό αναλυτή για τις αιματολογικές μεταβλητές που ελέγχονται και κατά τον έλεγχο ντόπινγκ σε δείγματα αίματος αθλητών στα πλαίσια της αιματολογικής ενότητας του ABP (Πίνακας 9.1). Σύμφωνα με τις νέες οδηγίες του WADA οι μόνες απαραίτητες παράμετροι επικύρωσης που έπρεπε να αξιολογηθούν ήταν η επαναληψιμότητα και η ενδιάμεση πιστότητα.

Η ανάλυση των δειγμάτων αίματος με τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XN-1000 πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του WADA για τις αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών για έλεγχο μεταβολών του ABP, όπως αναφέρθηκε λεπτομερώς στην ενότητα 9.1.1.

Η επαναληψιμότητα (repeatability), ή αλλιώς η πιστότητα εντός της ημέρας, και η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision), ή αλλιώς πιστότητα μεταξύ των ημερών, της μεθόδου αξιολογήθηκαν ομοίως με τον προηγούμενο αιματολογικό αναλυτή. Ο όρος επαναληψιμότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών αναλύσεων ενός δείγματος κάτω από τις ίδιες συνθήκες και ελέγχθηκε με την ανάλυση 3 δειγμάτων ολικού αίματος για 10 συνεχόμενες φορές το καθένα σε 3 εργαστηριακές ημέρες (1 δείγμα/ημέρα). Ο όρος ενδιάμεση πιστότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων μετρήσεων του ίδιου δείγματος σε διαφορετικές ημέρες και ελέγχθηκε με την ανάλυση 1 ίδιου δείγματος 1 φορά για 10 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες (1 ανάλυση/ημέρα). Επειδή τα δείγματα ανθρώπινου ολικού αίματος δεν διατηρούν σταθερές τις αιματολογικές τους παραμέτρους με το πέρασμα των ημερών, η αξιολόγηση της ενδιάμεσης πιστότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση τεχνητού δείγματος αίματος (δείγμα ελέγχου αιματολογικού αναλυτή). Και στις δύο περιπτώσεις η πιστότητα εκτιμήθηκε για το σύνολο των αιματολογικών παραμέτρων και εκφράστηκε μέσω της τυπικής απόκλισης (SD) και του συντελεστή διακύμανσης (CV%) των μετρήσεων, όπως φαίνονται στον Πίνακα 9.6.

Πίνακας 9.6. Αποτελέσματα αξιολόγησης επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης πιστότητας εκφρασμένα μέσω της τυπικής απόκλισης (SD) και του συντελεστή διακύμανσης (CV%) για το σύνολο των αιματολογικών παραμέτρων.

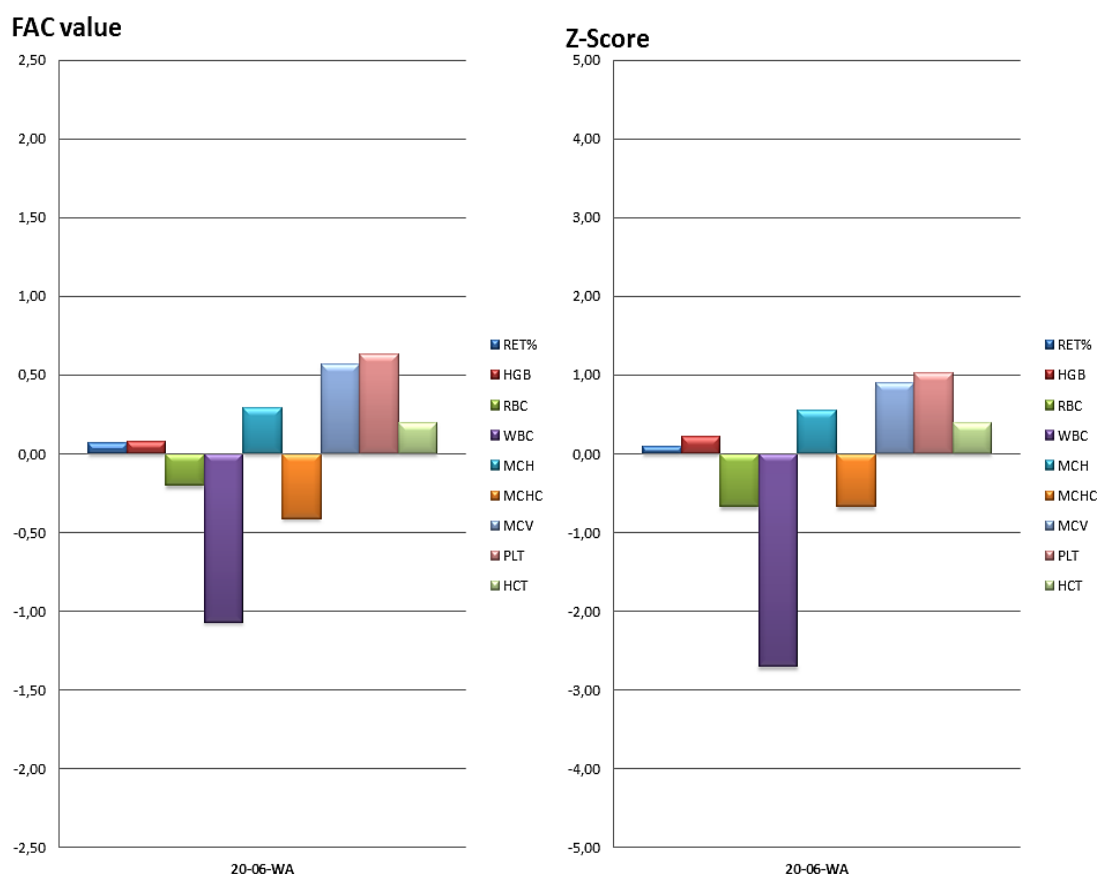
ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ					ΕΝΔΙΑΜΕΣΗ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ		
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΔΕΙΓΜΑ 1	ΔΕΙΓΜΑ 2	ΔΕΙΓΜΑ 3	ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΔΕΙΓΜΑ 1
HCT	SD	0,2	0,2	0,2	HCT	SD	0,7
	CV%	0,47	0,54	0,67		CV%	2,0
HGB	SD	0,1	0,0	0,1	HGB	SD	0,1
	CV%	0,47	0,35	0,66		CV%	0,72
RBC	SD	0,02	0,02	0,03	RBC	SD	0,04
	CV%	0,46	0,53	0,63		CV%	0,98
MCV	SD	0,1	0,2	0,2	MCV	SD	1,0
	CV%	0,19	0,19	0,23		CV%	1,3
MCH	SD	0,2	0,1	0,2	MCH	SD	0,3
	CV%	0,63	0,52	0,59		CV%	1,1
MCHC	SD	0,2	0,2	0,2	MCHC	SD	0,7
	CV%	0,58	0,54	0,60		CV%	2,1
RDW-SD	SD	0,3	0,2	0,2	RDW-SD	SD	1,3
	CV%	0,62	0,34	0,45		CV%	2,6
RET%	SD	0,06	0,08	0,08	RET%	SD	0,15
	CV%	2,8	3,6	3,8		CV%	7,0
RET#	SD	0,0029	0,0035	0,0038	RET#	SD	0,0066
	CV%	3,0	3,6	4,1		CV%	7,3
IRF	SD	2,9	2,2	2,0	IRF	SD	4,3
	CV%	7,2	5,3	5,6		CV%	8,6
WBC	SD	0,06	0,10	0,06	WBC	SD	0,10
	CV%	0,91	1,4	0,82		CV%	1,4
PLT	SD	7	5	7	PLT	SD	14
	CV%	2,6	2,0	2,6		CV%	5,2

9.2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ SYSMEX XN-1000

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, η ορθότητα (accuracy) των μετρήσεων του αιματολογικού αναλυτή αποτελεί την αναλυτική παράμετρο που εξετάζει την εγγύτητα της πειραματικής τιμής μιας αιματολογικής παραμέτρου προς τη θεωρητική τιμή της παραμέτρου έπειτα από την ανάλυση ενός δείγματος αίματος. Ο έλεγχος της ορθής λειτουργίας του Sysmex XN-1000 πραγματοποιήθηκε μέσω της συμμετοχής του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας στο παγκόσμιο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας EQAS-WADA-CSCQ για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών στα πλαίσια της

αιματολογικής ενότητας του ABP. Η διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων είναι ακριβώς ίδια με αυτήν που αναφέρθηκε για τον έλεγχο ορθότητας του Sysmex XT-2000i.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ορθής λειτουργίας του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XN-1000 εκφράζονται με τον συντελεστή απόδοσης FAC-value και με το Z-Score. Ο FAC-value μετράει τη διαφορά μεταξύ της πειραματικής τιμής της ανάλυσης των δειγμάτων από τη θεωρητική τους τιμή-στόχο, σύμφωνα με το ποσοστό ανοχής του CSCQ. Ο FAC-value δεν εξαρτάται από τα αποτελέσματα των άλλων εργαστηρίων. Το Z-Score δείχνει πόσο μακριά είναι το αποτέλεσμα της μέτρησης του εργαστηρίου από την τιμή-στόχο, και υπολογίζεται εξαρτώμενο από τα αποτελέσματα και των άλλων εργαστηρίων. Μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής είχε γίνει η συμμετοχή στο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας μόνο για έναν μήνα. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ορθότητας του Sysmex XN-1000 παρουσιάζονται Στην Εικόνα 9.5.



Εικόνα 9.5. Διαγράμματα απόδοσης FAC-value και Z-score για τις αιματολογικές παραμέτρους HCT, HGB, RBC, MCV, MCH, MCHC, WBC, PLT και RET% κατά τον 06/2020.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

10.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

Πραγματοποιήθηκε μελέτη με πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης σε υγιή εθελοντή του φαρμακευτικού σκευάσματος Serevent Diskus 50 μg (κόνις για εισπνοή σταθερών δόσεων). Η δοσολογία της χορήγησης που ακολουθήθηκε ήταν δύο εισπνοές των 50 μg δύο φορές την ημέρα (ανά 12 h) για 10 ημέρες, δηλαδή 100 μg σαλμετερόλης / 12 h και 200 μg σαλμετερόλης / 24 h. Αυτή είναι και η θεραπεία που χορηγείται συνήθως σε ασθενείς με προβλήματα άσθματος, καθώς και το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο χορήγησης σύμφωνα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA. Ο εθελοντής ήταν άνδρας, καυκάσιος, 29 ετών, 65 kg, 180 cm και δεν είχε λάβει κάποιο φαρμακευτικό σκεύασμα ή συμπλήρωμα διατροφής τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες πριν από τη μελέτη. Δείγματα αίματος και ούρων συλλέχθηκαν πριν (0 h) και κατά τη διάρκεια της πολλαπλής χορήγησης, καθώς και μέχρι 6 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.1 και στον Πίνακα 10.2. Τα δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν με φλεβοκέντηση σε σωληνάρια Vacuntainer με EDTA ως αντιπηκτικό παράγοντα και κάθε δείγμα αναλύθηκε αμέσως μετά την αιμοληψία με αιματολογικό αναλυτή για έλεγχο μεταβολών στις αιματολογικές παραμέτρους του ABP. Έπειτα, τα δείγματα ολικού αίματος φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 1600 rpm στους 4 °C για να διαχωριστεί το πλάσμα. Τα δείγματα πλάσματος αναλύθηκαν με LC-MS για να γίνει ποσοτικοποίηση της σαλμετερόλης και με ELISA για να γίνει εκτίμηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης. Τα δείγματα πλάσματος φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους. Τα δείγματα ορού συλλέχθηκαν σε σωληνάρια Vacuntainer χωρίς αντιπηκτικό παράγοντα, φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 4000 rpm στους 4 °C, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός του ορού και αναλύθηκαν αμέσως μετά με αυτόματους βιοχημικούς αναλυτές και ELISA για έλεγχο μεταβολών στο προφίλ σιδήρου. Τα δείγματα ούρων αναλύθηκαν με LC-MS για να γίνει ποσοτικοποίηση της σαλμετερόλης και της α -υδροξυσαλμετερόλης, ενώ τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης στα ούρα εκτιμήθηκαν έπειτα από ανάλυση με IEF και SDS-PAGE. Τα δείγματα ούρων φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσής τους.

Πίνακας 10.1. Πίνακας καταγραφής στοιχείων συλλογής δειγμάτων αίματος μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης σε εθελοντή.

ΗΜΕΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΩΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ	ΠΛΑΣΜΑ	ΟΡΟΣ
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ	14:00	BLANK	-192	X		
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ	14:00	BLANK	-144	X		
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ	14:00	BLANK	-72	X		
ΠΡΙΝ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ	14:00	BLANK	-24	X		
1 ^η Ημέρα	12:00	T0	0	X	X	X
1 ^η Ημέρα	13:00	D1-1	1	X	X	
2 ^η Ημέρα	14:00	D2-1	26	X	X	
3 ^η Ημέρα	14:00	D3-1	50	X	X	
4 ^η Ημέρα	14:00	D4-1	74	X	X	
7 ^η Ημέρα	14:00	D7-1	146	X	X	
10 ^η Ημέρα	14:00	D10-1	218	X	X	X
14 ^η Ημέρα	14:00	D14-1	314	X	X	
16 ^η Ημέρα	12:00	D16-1	360	X	X	

Πίνακας 10.2. Πίνακας καταγραφής στοιχείων συλλογής δειγμάτων ούρων μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης σε εθελοντή.

ΗΜΕΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΩΡΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	ΕΙΔΙΚΟ ΒΑΡΟΣ
1 ^η Ημέρα	12:00	T0	0	1,0113
1 ^η Ημέρα	16:00	D1-1	4	1,0172
1 ^η Ημέρα	22:00	D1-2	10	1,0142
1 ^η Ημέρα	01:00	D1-3	13	1,0166
1 ^η Ημέρα	06:00	D1-4	18	1,0103
2 ^η Ημέρα	12:00	D2-1	24	1,0180
2 ^η Ημέρα	16:00	D2-2	28	1,0148
2 ^η Ημέρα	20:30	D2-3	32,5	1,0120
3 ^η Ημέρα	12:00	D3-1	48	1,0133
3 ^η Ημέρα	18:00	D3-2	54	1,0148
3 ^η Ημέρα	00:00	D3-3	60	1,0127
4 ^η Ημέρα	12:00	D4-1	72	1,0138
4 ^η Ημέρα	00:00	D4-2	84	1,0096
5 ^η Ημέρα	12:00	D5-1	96	1,0073
5 ^η Ημέρα	01:00	D5-2	109	1,0097
6 ^η Ημέρα	19:00	D6-1	127	1,0086
6 ^η Ημέρα	00:00	D6-2	132	1,0126
6 ^η Ημέρα	02:00	D6-3	134	1,0070
7 ^η Ημέρα	14:00	D7-1	146	1,0079

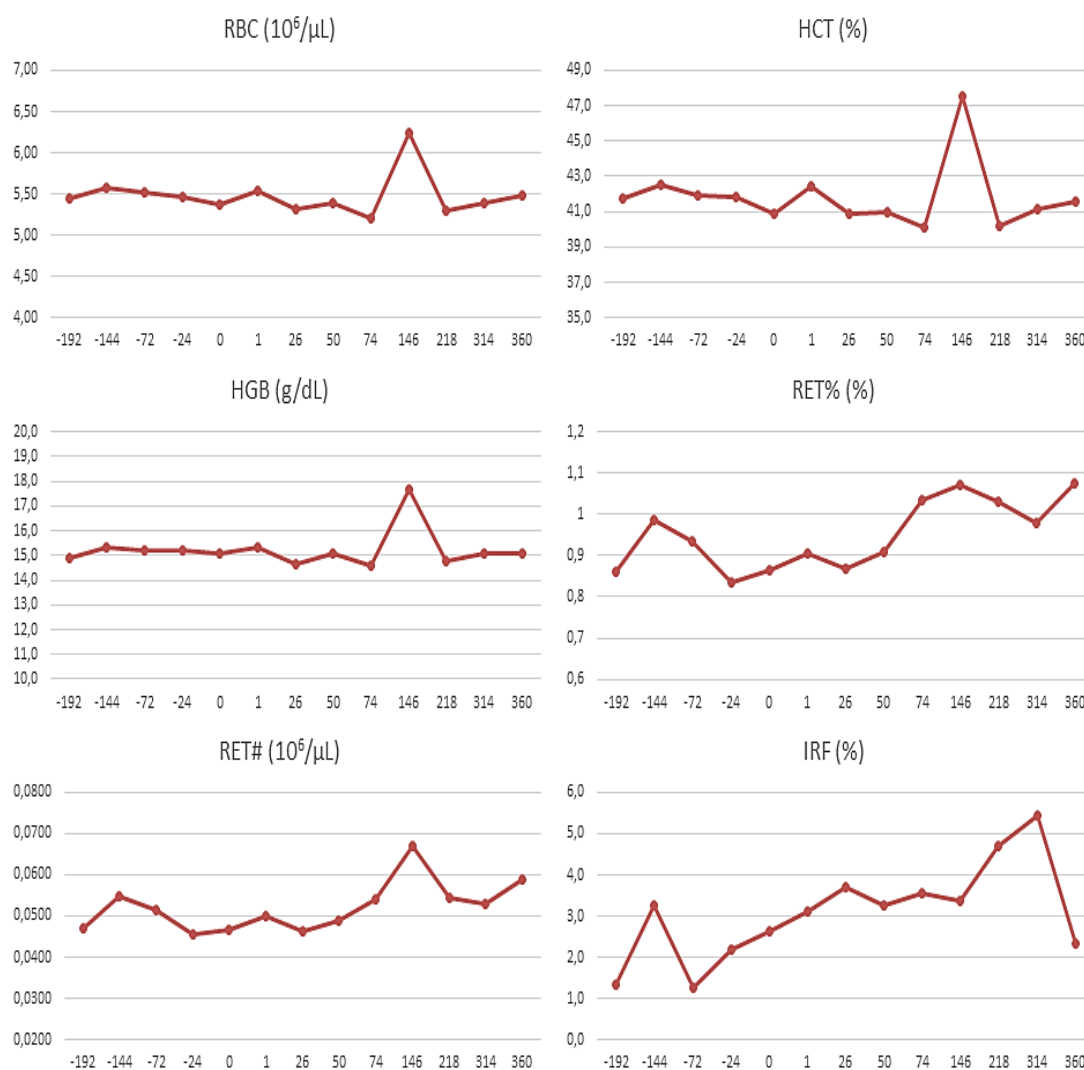
7 ^η Ημέρα	06:00	D7-2	162	1,0187
8 ^η Ημέρα	15:00	D8-1	171	1,0235
8 ^η Ημέρα	02:00	D8-2	182	1,0170
9 ^η Ημέρα	16:00	D9-1	196	1,0174
9 ^η Ημέρα	02:00	D9-2	206	1,0258
10 ^η Ημέρα	16:00	D10-1	220	1,0175
10 ^η Ημέρα	22:00	D10-2	226	1,0175
11 ^η Ημέρα	12:00	D11-1	240	1,0184
11 ^η Ημέρα	00:00	D11-2	252	1,0161
12 ^η Ημέρα	12:00	D12-1	264	1,0206
12 ^η Ημέρα	00:00	D12-2	276	1,0173
13 ^η Ημέρα	12:00	D13-1	288	1,0189
13 ^η Ημέρα	00:00	D13-2	300	1,0164
14 ^η Ημέρα	12:00	D14-1	312	1,0154
14 ^η Ημέρα	00:00	D14-2	324	1,0190
15 ^η Ημέρα	12:00	D15-1	336	1,0033
15 ^η Ημέρα	0:00	D15-2	348	1,0138
16 ^η Ημέρα	12:00	D16-1	360	1,0154

10.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΑΒΡ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

Τα δείγματα ολικού αίματος αναλύθηκαν την ίδια ημέρα της αιμοληψίας με τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XT-2000i σύμφωνα με την πορεία που περιεγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο και ακολουθείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για την ανάλυση δειγμάτων αίματος αθλητών στα πλαίσια της αιματολογικής ενότητας του ΑΒΡ. Συνοπτικά, τα δείγματα ολικού αίματος της μελέτης αναδεύτηκαν για 15 min σε αναδευτή ομογενοποίησης που προκαλεί ταυτόχρονη κύλιση και ανακίνηση των φιαλιδίων συλλογής αίματος, ενώ δεν υποβλήθηκαν νωρίτερα σε συνθήκες ψύξης, αφού αναλύθηκαν αμέσως μετά το τέλος της αιμοληψίας. Στη συνέχεια αναλύθηκαν δύο συνεχόμενες διαδοχικές φορές. Τα αποτελέσματα των δύο αυτών μετρήσεων θα έπρεπε να πληρούν τα κριτήρια του WADA, δηλαδή η διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων για την HGB να μην είναι μεγαλύτερη από 0,1 και για το RET% να μην είναι μεγαλύτερη του 0,15 ή του 0,25 αν οι μετρήσεις είναι μικρότερες ή μεγαλύτερες του 0,1, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 10.3 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων για όλες τις αιματολογικές παραμέτρους που ελέγχονται στα πλαίσια του ΑΒΡ.

Τα δείγματα ολικού αίματος που συλλέχθηκαν πριν την έναρξη της πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης χρησιμοποιήθηκαν ώστε να σχηματιστεί μια καλύτερη εικόνα του αιματολογικού προφίλ του εθελοντή. Οι μεταβολές στο προφίλ του εθελοντή για τις

αιματολογικές παραμέτρους RBC, HGB, HCT, RET%, RET# και IRF στα πλαίσια της μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.1.



Εικόνα 10.1. Μεταβολές στο προφίλ του εθελοντή για τις αιματολογικές παραμέτρους RBC, HGB, HCT, RET%, RET# και IRF του ABP σε σχέση με το χρόνο από την πρώτη χορήγηση σαλμετερόλης (0 h) μετά την ανάλυση των δειγμάτων ολικού αίματος με τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XT-2000i στα πλαίσια της μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης.

Πίνακας 10.3. Αποτελέσματα μέτρηση των αιματολογικών παραμέτρων του ABP μετά την ανάλυση των δειγμάτων ολικού αίματος με τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XT-2000i στα πλαίσια της μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης.

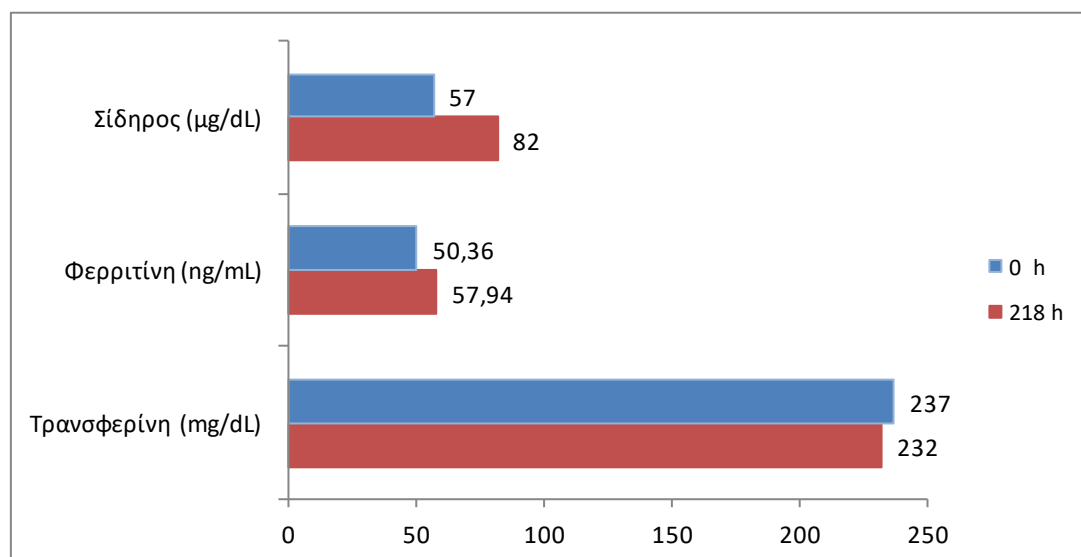
ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	-192	-144	-72	-24	0	1	26	50	74	146	218	314	360
WBC (10³/μL)	6,08	9,05	7,14	7,08	6,34	8,64	7,53	6,05	7,23	6,82	5,78	7,61	6,21
RBC (10⁶/μL)	5,45	5,57	5,51	5,46	5,38	5,54	5,31	5,39	5,21	6,24	5,30	5,40	5,48
HGB (g/dL)	14,9	15,3	15,2	15,2	15,1	15,3	14,7	15,1	14,6	17,7	14,8	15,1	15,1
HCT (%)	41,8	42,5	42,0	41,9	40,9	42,4	40,9	41,0	40,2	47,5	40,2	41,2	41,6
MCV (fL)	76,6	76,3	76,1	76,7	75,9	76,6	77,0	76,2	77,1	76,3	75,9	76,3	76,0
MCH (pg)	27,4	27,5	27,6	27,8	28,0	27,6	27,6	28,0	28,0	28,3	27,8	27,9	27,5
MCHC (g/dL)	35,7	36,0	36,2	36,3	36,9	36,1	35,8	36,7	36,4	37,1	36,7	36,6	36,2
PLT (10³/μL)	272	284	269	282	294	297	267	275	275	232	286	290	283
RDW-SD (fL)	36,0	35,8	35,2	35,8	34,7	35,6	35,9	35,5	35,9	36,8	34,8	35,3	34,7
RET% (%)	0,86	0,985	0,935	0,835	0,865	0,905	0,87	0,91	1,035	1,07	1,03	0,98	1,075
RET# (10⁶/μL)	0,0469	0,0549	0,0516	0,0456	0,0466	0,0501	0,0462	0,0490	0,0539	0,0671	0,0546	0,0529	0,0589
IRF (%)	1,4	3,3	1,3	2,2	2,7	3,1	3,7	3,3	3,6	3,4	4,7	5,5	2,4

10.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΣΙΔΗΡΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

Τα δείγματα ορού αναλύθηκαν την ίδια ημέρα της αιμοληψίας σε συνεργασία με ιδιωτικό μικροβιολογικό ιατρείο το οποίο εφαρμόζει σύστημα διαχείρισης ποιότητας σύμφωνα με το πρότυπο ISO 9001-2008. Οι μετρήσεις αφορούσαν στην ποσοτικοποίηση σιδήρου, φερριτίνης και τρανσφερίνης πριν την έναρξη της πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης (0 h) και κατά τη δέκατη και τελευταία ημέρα πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης (218 h). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τον έλεγχο των μεταβολών στο προφίλ σιδήρου εμφανίζονται στην Εικόνα 10.2

Η ποσοτικοποίηση του σιδήρου έγινε με τον αυτόματο βιοχημικό αναλυτή BS-200 της Mindray και χρήση κιτ προσδιορισμού το οποίο χρησιμοποιεί διάλυμα γουανιδίνης για την αποδέσμευση του σιδήρου από την τρανσφερίνη του ορού. Παρουσία ασκορβικού οξέος τα ιόντα Fe^{3+} του ορού ανάγονται προς Fe^{2+} τα οποία κατά την αντίδραση τους με τη χρωστική φερροζίνη σχηματίζουν χηλική ένωση ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 565 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του σιδήρου στο δείγμα.

Η ποσοτικοποίηση της φερριτίνης και της τρανσφερίνης έγινε με τον αυτόματο ανοσολογικό-ορμονολογικό αναλυτή Elecsys 2010 της Roche και χρήση των αντίστοιχων κιτ ανοσοπροσδιορισμού με ηλεκτροχημειοφωταύγεια.



Εικόνα 10.2. Αποτελέσματα μέτρηση παραμέτρων του προφίλ σιδήρου μετά την ανάλυση των δειγμάτων ορού στα πλαίσια της μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης.

10.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΣΣΥΣΩΡΕΥΣΗΣ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

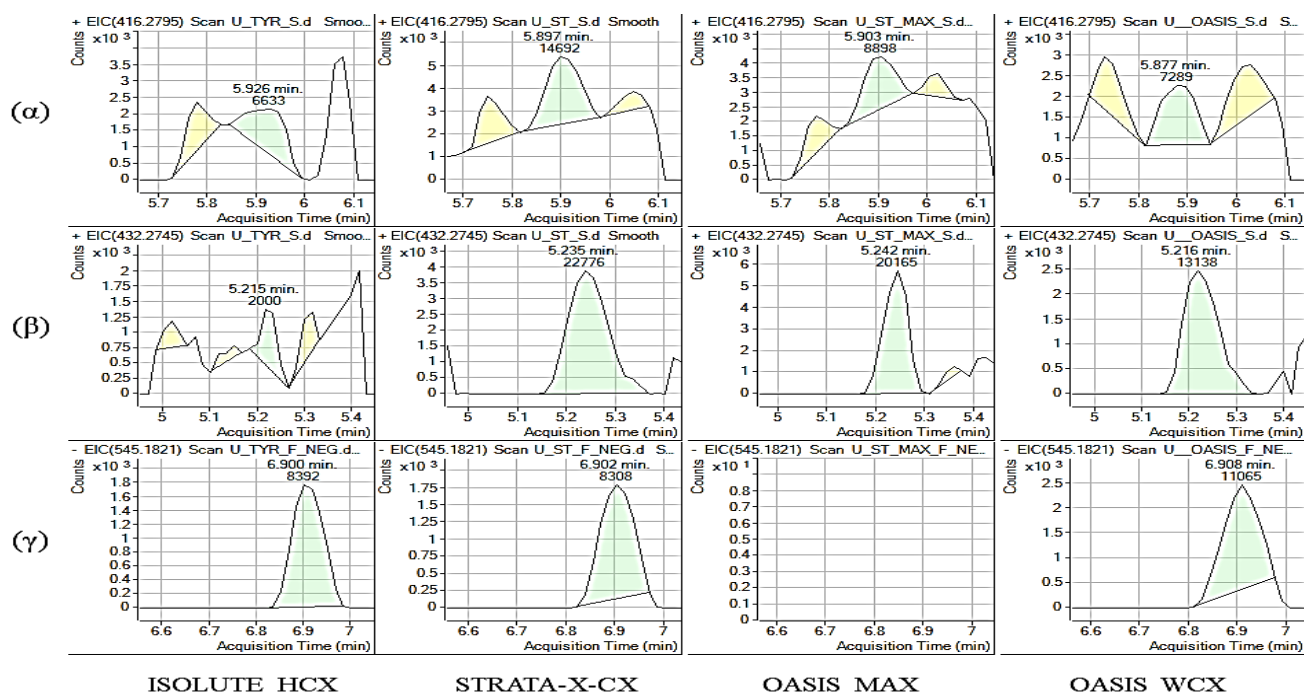
10.4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS

Στα πλαίσια της ανάπτυξη LC-MS μεθόδου για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε ούρα, καθώς και σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε πλάσμα ανθρώπου, διερευνήθηκαν οι δυνατότητες των ήδη δημοσιευμένων στη βιβλιογραφία μεθόδων εκχύλισης των παραπάνω ουσιών. Αυτά τα άρθρα αναφέρονται στην εκχύλιση διαφορετικού συνδυασμού των παραπάνω ουσιών σε ούρα ή πλάσμα, αλλά όχι στον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων των ουσιών, τόσο στα ούρα όσο και στο πλάσμα, και διαπιστώθηκε ότι η επιτευχθείσα ευαισθησία δεν ήταν επαρκής για την ταυτόχρονη εκχύλιση και ανίχνευση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης. Τόσο η ανάπτυξη όσο και η επικύρωση της LC-MS μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την CyADA, στα πλαίσια μιας φαρμακοκινητικής μελέτης μονής χορήγησης σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης, η οποία δεν σχετίζεται με την παρούσα διατριβή.

Πιο αναλυτικά, δοκιμάστηκαν μέθοδοι LLE για την παρασκευή δειγμάτων ούρων χρησιμοποιώντας διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες εκχύλισης, όπως διαιθυλαιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα, μεθυλο-t-βουτυλαιθέρα ή διχλωρομεθάνιο. Αυτοί οι διαλύτες ελέγχθηκαν για την εκχύλιση σαλμετερόλης σε δείγματα ούρων με συγκέντρωση 5 ng/mL, δίνοντας ικανοποιητικές τιμές ανάκτησης σαλμετερόλης, στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερες από 98%. Ωστόσο, όταν ελέγχθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις επιπέδου pg/mL και για τους τρεις αναλύτες, αυτές οι μέθοδοι LLE κρίθηκαν ακατάλληλες. Επιπλέον, άλλες μέθοδοι LLE δοκιμάστηκαν για παρασκευή δειγμάτων πλάσματος χρησιμοποιώντας μεθυλο-t-βουτυλαιθέρα, διαιθυλαιθέρα, ή καταβύθιση πρωτεϊνών με ACN ή τριχλωροοξικό οξύ. Η χρήση μεθυλο-t-βουτυλαιθέρα και η καθίζηση πρωτεϊνών με ACN έδωσαν ικανοποιητικές τιμές ανάκτησης σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης, όταν δοκιμάστηκαν σε δείγματα πλάσματος συγκέντρωσης 5 ng/mL. Ωστόσο, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μόνο η σαλμετερόλη μπορούσε να ανιχνευθεί με τη χρήση μεθυλο-t-βουτυλαιθέρα και μάλιστα όχι σε πιο χαμηλή συγκέντρωση από τα 250 pg/mL. Η χρήση υψηλότερων όγκων δειγμάτων ούρων ή πλάσματος για να ληφθεί η κατάλληλη ευαισθησία βρέθηκε να επηρεάζει τα σήματα που έδιναν οι αναλύτες λόγω επιδράσεων του υποστρώματος και θεωρήθηκε ακατάλληλη.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης SPE επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη μέθοδος για την παρασκευαστική προετοιμασία των δειγμάτων λόγω της μεγαλύτερης δυνατότητάς της για

ελαχιστοποίηση των επιδράσεων του υποστρώματος. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της μεθόδου δοκιμάστηκαν τέσσερα διαφορετικά φυσιγγία εκχύλισης μικτής λειτουργίας (mixed-mode cartridges) για την εκχύλιση και των τριών ουσιών. Τα φυσιγγία ISOLUTE HCX (300 mg/10mL) συνδυάζουν μη πολικούς (C8) και ισχυρούς κατιοντοανταλλακτικούς μηχανισμούς συγκράτησης, τα φυσιγγία Strata™-X-CW (33 μm) και τα OASIS® WCX (60 μm) περιέχουν ένα πολυμερές πληρωτικό υλικό αντίστροφης φάσης με ασθενείς κατιοντοανταλλακτικούς μηχανισμούς, ενώ τα φυσιγγία 6 cc OASIS MAX (30 μm) περιέχουν ένα πολυμερές πληρωτικό υλικό με ανιοντοανταλλακτικούς μηχανισμούς συγκράτησης. Όλα αυτά τα φυσιγγία εκχύλισης στερεάς φάσης χρησιμοποιούνται για την απομόνωση αναλυτών από πολύπλοκα υδατικά υποστρώματα, όπως ούρα και πλάσμα. Η σαλμετερόλη και η α-υδροξυσαλμετερόλη δεν μπορούσαν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας τα ISOLUTE HCX, ενώ η προπιονική φλουטיκαζόνη δεν ανιχνεύθηκε με τη χρήση των 6 cc OASIS MAX. Τα Strata™-X-CW εμφάνισαν υψηλότερη ευαισθησία από τα OASIS® WCX για την ανίχνευση της σαλμετερόλης και της α-υδροξυσαλμετερόλης (Εικόνα 10.3). Έτσι, τα Strata™-X-CW επιλέχθηκαν ως τα φυσιγγία με τη βέλτιστη επιλεκτικότητα και ευαισθησία εκχύλισης στερεάς φάσης για τη σαλμετερόλη, την α-υδροξυσαλμετερόλη και την προπιονική φλουטיκαζόνη από ούρα και πλάσμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις.



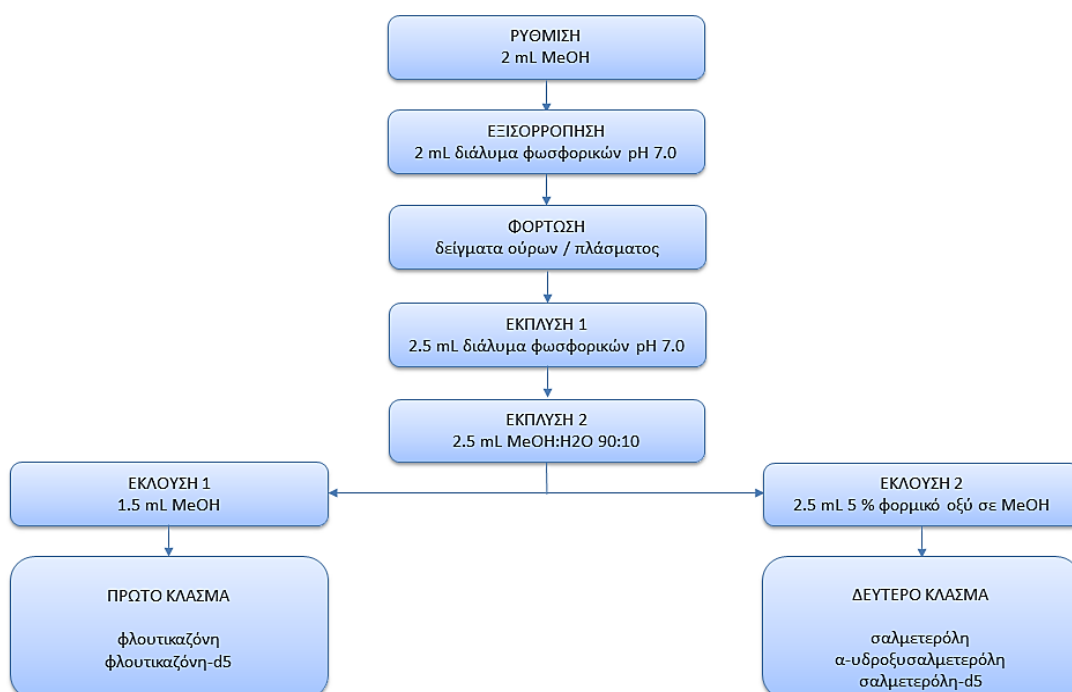
Εικόνα 10.3. Αποτελέσματα δοκιμής με διαφορετικά SPE φυσιγγία για την εκχύλιση (α) σαλμετερόλης, (β) α-υδροξυσαλμετερόλης και (γ) προπιονικής φλουטיκαζόνης.

Τα φυσίγγια Strata™-X-CW αποτελούνται από ένα πολυμερές πληρωτικό υλικό με μία καρβοξυλομάδα που επιτρέπει την πλήρη κατακράτηση βασικών ενώσεων με pK_a μεγαλύτερη από 8,0. Η σαλμετερόλη και η α -υδροξυσαλμετερόλη διαθέτουν μια βασική λειτουργική ομάδα (δευτερογενής αμίνη) με pK_a 8,6. Η προπιονική φλουτिकाζόνη είναι μια μη πολική ένωση που παραμένει σε ουδέτερη μορφή σε ολόκληρο το εύρος της κλίμακας του pH. Σε pH μεγαλύτερο του 5,0, όπως στην περίπτωση που το pH ρυθμίζεται στο 7,0, η καρβοξυλομάδα του πληρωτικού υλικού είναι αρνητικά φορτισμένη, η αμινομάδα της σαλμετερόλης και της α -υδροξυσαλμετερόλης είναι θετικά φορτισμένη, ενώ η προπιονική φλουτिकाζόνη έχει ουδέτερο φορτίο. Έτσι, ενώ η σαλμετερόλη και η α -υδροξυσαλμετερόλη συγκρατούνται επί του πληρωτικού υλικού των Strata™-X-CW μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ασθενών κατιοανταλλακτικών μηχανισμών, η προπιονική φλουτिकाζόνη συγκρατείται μόνο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Χρησιμοποιώντας έναν ισχυρό οργανικό διαλύτη όπως η μεθανόλη, η προπιονική φλουτिकाζόνη εκλύεται, ενώ η σαλμετερόλη και η α -υδροξυσαλμετερόλη συγκρατούνται λόγω ιοντοανταλλακτικών αλληλεπιδράσεων. Η έκλυση της σαλμετερόλης και της α -υδροξυσαλμετερόλης επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας έναν οξινισμένο ισχυρό οργανικό διαλύτη, όπως η μεθανόλη που περιέχει 5% φορμικό οξύ προκειμένου το pH να μειωθεί απότομα σε τιμές μικρότερες του 5,0 και να εξουδετερωθούν οι ιοντοανταλλακτικές αλληλεπιδράσεις. Αυτή η στρατηγική επιτρέπει το διαχωρισμό των δειγμάτων σε δύο κλάσματα, ένα που περιέχει την προπιονική φλουτिकाζόνη και ένα δεύτερο που περιέχει τη σαλμετερόλη και το μεταβολίτη της. Η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής δίνει πολύ πιο καθαρά τελικά εκχυλίσματα με υψηλή επιλεκτικότητα και χαμηλή επίδραση υποστρώματος που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση με υψηλή ευαισθησία και των τριών ενώσεων από ένα μόνο δείγμα.

10.4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ SPE ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ LC-MS

Για την παρασκευαστική επεξεργασία των δειγμάτων ούρων, σε 6 mL ούρων προστέθηκαν ως ISTDs 50 μ L διαλύματος μείγματος σαλμετερόλης-d5 και προπιονικής φλουτिकाζόνης-d5 συγκέντρωσης 130 ng/mL. Ακολούθησε η ρύθμιση του pH των ούρων στο 7,0 με προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια εκχύλισης Strata™-X-CW σε συσκευή κενού, τα οποία ρυθμίστηκαν/ενεργοποιήθηκαν αρχικά με προσθήκη 2 mL μεθανόλης και μετά με προσθήκη 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0. Στη συνέχεια έγινε φόρτωση των δειγμάτων ούρων στα φυσίγγια και ακολούθησαν τα στάδια των εκπλύσεων. Η πρώτη έκπλυση έγινε με προσθήκη 2,5 mL

ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0, ενώ η δεύτερη έκπλυση έγινε με προσθήκη 2,5 mL διαλύματος H₂O:MeOH (90:10 v/v). Η έκλυση της προπιονικής φλουטיκαζόνης και της προπιονικής φλουטיκαζόνης-d5 στο πρώτο κλάσμα έγινε με προσθήκη 1,5 mL μεθανόλης. Η έκλυση της σαλμετερόλης, της α-υδροξυσαλμετερόλης και της σαλμετερόλης-d5 στο δεύτερο κλάσμα έγινε με προσθήκη 2,5 mL διαλύματος 5% φορμικού (μυρμηκικού) οξέος σε μεθανόλη (Εικόνα 10.4). Τα δύο κλάσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂ στους 50 °C. Ακολούθησε ανασύσταση του ξηρού υπολείμματος του πρώτου κλάσματος με προσθήκη 100 μL ACN και του του ξηρού υπολείμματος του δεύτερου κλάσματος με προσθήκη 100 μL μείγματος της κινητής φάσης της υγροχρωματογραφίας διαλύτης A : διαλύτης B (80:20 v/v). Τα δύο μείγματα μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά φιαλίδια (vials) για ανάλυση με LC-MS.



Εικόνα 10.4. Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας SPE για την εκχύλιση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης από δείγματα ούρων και πλάσματος.

Για την παρασκευαστική επεξεργασία των δειγμάτων πλάσματος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στα 3500 rpm. Έπειτα 4 mL υπερκευμένου μεταφέρθηκαν σε σωλήνες τύπου Eppendorf και έγινε προσθήκη 20 μL διαλύματος μείγματος σαλμετερόλης-d5 και προπιονικής φλουטיκαζόνης-d5 συγκέντρωσης 130 ng/mL ως ISTDs. Μετά τη ρύθμιση του pH με προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0, ακολουθήθηκε η ίδια

ακριβώς διαδικασία με τα δείγματα ούρων για την SPE, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 10.4. Τα δύο κλάσματα, που προέκυψαν με τον ίδιο τρόπο, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N₂ στους 50 °C. Ακολούθησε ανασύσταση του ξηρού υπολείμματος του πρώτου κλάσματος με προσθήκη 75 μL ACN και του του ξηρού υπολείμματος του δεύτερου κλάσματος με προσθήκη 75 μL μείγματος της κινητής φάσης της υγροχρωματογραφίας διαλύτης A : διαλύτης B (80:20 v/v). Τα δύο μείγματα μεταφέρθηκαν σε διαφορετικά φιαλίδια (vials) για ανάλυση με LC-MS.

10.4.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ LC-MS

Η ποσοτικοποίηση της σαλμετερόλης, της α-υδροξυσαλμετερόλης και της προπιονικής φλουτিকাζόνης σε ούρα, καθώς και της σαλμετερόλης και της προπιονικής φλουτিকাζόνης σε πλάσμα πραγματοποιήθηκε στο υγροχρωματογραφικό σύστημα υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC) 1200 LC Series (Agilent Technologies) που ήταν συνδεδεμένο με το φασματόμετρο μάζας 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Technologies) που χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης μαζών. Το υγροχρωματογραφικό σύστημα διέθετε απαερωτήρα κενού, δυαδική αντλία υψηλής πίεσης, αυτόματο δειγματολήπτη με ψυγμένο δίσκο δειγμάτων και φούρνο στήλης. Οι συνθήκες υγροχρωματογραφίας επιλέχθηκαν έπειτα από πολλαπλές δοκιμές σε προγράμματα ισοκρατικής ή βαθμιδωτής έκλυσης με διαφορετική σύνθεση κινητής φάσης, όγκο έγχυσης δείγματος, ρυθμό ροής κινητής φάσης και χρωματογραφικές στήλες. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε με βαθμιδωτό τρόπο έκλυσης μείγμα διαλυτών A και B. Ο διαλύτης A ήταν H₂O και ο διαλύτης B ήταν μείγμα ACN/H₂O (90/10 v/v), ενώ και οι δύο περιείχαν φορμικό αμμώνιο συγκέντρωσης 5 mM και φορμικό οξύ 0,01% (v/v). Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,30 mL/min. Ο όγκος ένεσης δείγματος ήταν 10 μL. Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης, που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση όλων των ουσιών στα ούρα και της σαλμετερόλης στο πλάσμα, η αρχική αναλογία του διαλύτη B στην κινητή φάση ήταν 20% σταθερή για 2 min και στη συνέχεια αυξανόταν γραμμικά σε 100% μέχρι τα 5 min, όπου παρέμενε σταθερή μέχρι τα 6 min και τέλος μειωνόταν γραμμικά στην αρχική αναλογία (20%) μέχρι τα 8 min, όπου παρέμενε σταθερή μέχρι τα 9 min. Ακολουθούσε 1 min για την εξισορρόπηση του συστήματος στην αρχική κατάσταση πριν την έναρξη της ανάλυσης του επόμενου δείγματος, με το συνολικό χρόνο ανάλυσης του δείγματος να είναι 10 min. Στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης, που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση της προπιονικής φλουτিকাζόνης στο πλάσμα, η αρχική αναλογία του διαλύτη B στην κινητή φάση ήταν 50% και στη συνέχεια αυξανόταν γραμμικά σε 100% μέχρι τα 2 min, όπου παρέμενε σταθερή μέχρι τα 3 min και τέλος μειωνόταν γραμμικά στην αρχική αναλογία (50%) μέχρι τα 4 min, όπου παρέμενε

σταθερή μέχρι τα 5 min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης του δείγματος ήταν 5 min, καθώς δεν ήταν αναγκαίος ο επιπλέον χρόνος για την εξισορρόπηση του συστήματος στην αρχική κατάσταση πριν την έναρξη της ανάλυσης του επόμενου δείγματος. Για τον υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies) μήκους 100 mm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 1,8 μm. Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 35 °C.

Το φασματομέτρο μαζών διέθετε ορθογώνιας διάταξης πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), ορθογώνιας επιτάχυνσης αναλυτή χρόνου πτήσης, σταθερής θερμοκρασίας μετατροπέα αναλογικού προς ψηφιακό σήματος που λειτουργεί στα 2 GHz (λειτουργία εκτεταμένου δυναμικού εύρους) και μια πολυκαναλική πλάκα που λειτουργεί στα 700 V. Το άζωτο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο ξήρανσης και νεφελοποίησης. Ενδεικτικά, η θερμοκρασία και ο ρυθμός ροής του αερίου αζώτου στην πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκαν στους 330 °C και 10 L/min, αντίστοιχα και η πίεση του αερίου νεφελοποίησης στην τιμή 40 psi. Το δυναμικό του τριχοειδούς (capillary voltage) και του διαχωριστή (skimmer voltage) στην έξοδο του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στα 3500 V και 65 V, αντίστοιχα. Το δυναμικό θραυσματοποίησης της πηγής ιοντισμού (fragmentor voltage) έπειτα από βελτιστοποίηση ρυθμίστηκε στα 140 V. Το εύρος σάρωσης των ανιχνευόμενων τιμών m/z ρυθμίστηκε σε 50-1100 και η ταχύτητα σάρωσης ήταν 1 scan/sec. Η φασματομετρία μαζών πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης. Η πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκε σε θετικό τρόπο λειτουργίας (ESI+) για την ανίχνευση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και σαλμετερόλης-d5 με m/z 416.2795, 432.2745 και 421.3109, αντίστοιχα. Αντιθέτως, η πηγή ιοντισμού ρυθμίστηκε σε αρνητικό τρόπο λειτουργίας (ESI-) για την ανίχνευση της προπιονικής φλουτिकाζόνης και της προπιονικής φλουτिकाζόνης-d5. Παρατηρήθηκε ότι η ανίχνευση των δυο τελευταίων ήταν πιο ευαίσθητη όταν ανιχνεύονταν ως προϊόντα προσθήκη φορμικού με m/z 545.1821 και 550.2134, αντίστοιχα.

Η βαθμονόμηση του φασματομέτρου μαζών εκτελέστηκε πριν την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας αραιωμένο μείγμα αναφοράς 10 ενώσεων, που παρέχει ιόντα [M-H]⁺ στο εύρος μάζας m/z 118.0863-2721.8950 και ιόντα [M-H]⁻ στο εύρος μάζας m/z 112.9856 - 2833.8731 (μείγμα συντονισμού χαμηλής συγκέντρωσης ESI-L, Agilent Technologies). Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη ακρίβεια, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης πραγματοποιήθηκε διόρθωση μαζών, εισάγοντας μία ένωση αναφοράς (εξάκις-(1H,1H,3H-τετραφλουοροπροποξυ)-φωσφαζίνη (Agilent Technologies) με m/z 922.0098 σε θετικό τρόπο ηλεκτροψεκασμού και m/z 966.0007 σε αρνητικό τρόπο ηλεκτροψεκασμού, ταυτόχρονα με τα δείγματα. Η ένωση αναφοράς εισήχθη συνεχώς στην πηγή ESI από έναν δεύτερο ορθογώνιο νεφελοποιητή.

10.4.4 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τις προδιαγραφές του WADA και διεθνείς οδηγίες.^[11,158,159] Συγκεκριμένα, για την επικύρωση της μεθόδου στα ούρα παρασκευάστηκαν 5 καμπύλες αναφοράς των 5 σημείων για 5 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες με προσθήκη σε λευκό ούρο σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε τελική συγκέντρωση 0,10, 0,25, 0,50, 1,00 και 2,00 ng/mL και α-υδροξυσαλμετερόλης σε τελική συγκέντρωση 1,00, 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 ng/mL. Τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν εις διπλούν μαζί με δύο λευκά δείγματα ούρου που περιείχαν μόνο ISTDs και καμία από τις προς ποσοτικοποίηση ουσίες. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δείγματα ποιοτικού ελέγχου (quality control samples) με προσθήκη σε λευκό ούρο σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε τελική συγκέντρωση 0,25, 1,00 και 2,00 ng/mL και α-υδροξυσαλμετερόλης σε τελική συγκέντρωση 2,50, 10,00 και 20,00 ng/mL. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν εις τριπλούν. Παρομοίως, για την επικύρωση της μεθόδου στο πλάσμα παρασκευάστηκαν 5 καμπύλες αναφοράς των 5 σημείων για 5 διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες με προσθήκη σε λευκό δείγμα πλάσματος σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε τελική συγκέντρωση 0,050, 0,075, 0,100, 0,250 και 0,500 ng/mL. Τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν εις διπλούν μαζί με δύο λευκά δείγματα πλάσματος που περιείχαν μόνο ISTDs και καμία από τις προς ποσοτικοποίηση ουσίες. Επιπλέον, παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου με προσθήκη σε λευκό δείγμα πλάσματος σαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε τελική συγκέντρωση 0,25, 1,00 και 2,00 ng/mL. Τα δείγματα ελέγχου παρασκευάστηκαν εις τριπλούν. Το σύνολο των δειγμάτων ούρων και πλάσματος, δηλαδή λευκά δείγματα, δείγματα πρότυπης καμπύλης αναφοράς και δείγματα ελέγχου, παρασκευάστηκαν με την SPE πορεία επεξεργασίας δειγμάτων που αναφέρθηκε παραπάνω και αναλύθηκαν με την προς επικύρωση LC-MS μέθοδο εις διπλούν.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων μετά την ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων με LC-MS υπολογίστηκε ο λόγος της περιοχής κάτω από την καμπύλη ολοκλήρωσης της εκάστοτε ουσίας ποσοτικοποίησης προς την αντίστοιχη περιοχή του εσωτερικού προτύπου (area ratio). Τα πειραματικά δεδομένα από τον υπολογισμό των παραπάνω λόγων και οι θεωρητικές τιμές συγκέντρωσης των δειγμάτων επεξεργάστηκαν με ανάλυση διακύμανσης (analysis of variation, ANOVA) για παλινδρόμηση (regression analysis). Με την ανάλυση παλινδρόμησης εξετάζεται η σχέση μεταξύ δύο ή περισσότερων μεταβλητών με σκοπό την πρόβλεψη των τιμών της μιας, μέσω των τιμών της άλλης. Το αποτέλεσμα αυτής της αυτοματοποιημένης στατιστικής ανάλυσης δίνει μεταξύ άλλων τη γραφική παράσταση της

καμπύλης αναφοράς και την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης. Ο άξονας y της γραφικής παράστασης συμβολίζει το area ratio, ενώ ο άξονας x τη θεωρητική συγκέντρωση της κάθε ουσίας. Η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης είναι της μορφής $y = bx + a$, όπου a η τομή επί της αρχής των αξόνων και b η κλίση της ευθείας. Η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης εκφράζει και την ευαισθησία (sensitivity) της μεθόδου, η οποία αντιπροσωπεύει την αλλαγή στην απόδοση του σήματος (απόκριση οργάνου), που αντιστοιχεί σε αλλαγή της συγκέντρωσης της μετρούμενης ουσίας στα δείγματα. Η ανάλυση διακύμανσης για παλινδρόμηση υπολογίζει και το συντελεστή συσχέτισης R , καθώς και το τετράγωνο αυτού (R^2) που ερμηνεύει το πόσο συσχετίζεται η μεταβολή της μιας μεταβλητής σε σχέση με την μεταβολή της άλλης. Ακόμα, υπολογίζεται το τυπικό σφάλμα ($S_{x/y}$), οι παράγοντες a και b της εξίσωσης της ευθείας παλινδρόμησης και η τυπική απόκλιση αυτών. Με αυτόν τον τρόπο έγινε και ο προσδιορισμός της πειραματικής συγκέντρωσης κάθε ουσίας στα δείγματα. Οι πίνακες της ανάλυσης των δεδομένων των καμπυλών αναφοράς παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση διακύμανσης για παλινδρόμηση με συντελεστής στάθμισης $1/x$, υπάρχει γραμμικότητα μεταξύ των μετρούμενων λόγων σήματος των αναλυτών και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Πιο αναλυτικά, οι καμπύλες βαθμονόμησης αποδείχθηκαν γραμμικές ($n = 5$) για τη σαλμετερόλη, την α -υδροξυσαλμετερόλη και την προπιονική φλουטיκαζόνη, σε δείγματα ούρων και για τη σαλμετερόλη και την προπιονική φλουטיκαζόνη σε δείγματα πλάσματος. Σε όλες τις περιπτώσεις το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης ήταν μεγαλύτερο από 0,9991 και οι πειραματικές συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης (% bias) ήταν μικρότερες από το 15% της θεωρητικής συγκέντρωσης σαλμετερόλης, α -υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης. Ο χρόνος ανάσχεσης της σαλμετερόλης και της σαλμετερόλης-d5 στα ούρα και στο πλάσμα ήταν 5,9 min, της α -υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα 5,3 min και της προπιονικής φλουטיκαζόνης και της προπιονικής φλουטיκαζόνης-d5 στα ούρα ήταν 6,9 min, ενώ στο πλάσμα 3,3 min.

Το όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) της μεθόδου ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία οι αναλύτες μπορούν να αναγνωριστούν αξιόπιστα, με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα. Το LOD υπολογίστηκε από την αναλογία σήματος προς θόρυβο ($S/N \geq 3$) και με ανάλυση των λευκών δειγμάτων ούρων και πλάσματος με τους αναλύτες σε μειωμένες συγκεντρώσεις μέχρι το σημείο που ο ποσοστιαίος συντελεστής διακύμανσης (CV%) είναι μικρότερος του 20%. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (limit of quantification, LOQ) ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία οι αναλύτες μπορούν να αναγνωριστούν αλλά και να ποσοτικοποιηθούν αξιόπιστα, με αποδεκτή ακρίβεια και πιστότητα. Το LOQ

εκτιμήθηκε από την αναλογία σήματος προς θόρυβο ($S/N \geq 10$) και με ανάλυση των λευκών δειγμάτων ούρων και πλάσματος με τους αναλύτες σε μειωμένες συγκεντρώσεις μέχρι το σημείο που ο CV% είναι μικρότερος του 20%. Στα ούρα, το LOQ της μεθόδου βρέθηκε 0,10 ng/mL τόσο για σαλμετερόλη όσο και για την προπιονική φλουטיκαζόνη και 1,00 ng/mL για την α-υδροξυσαλμετερόλη. Το αντίστοιχο LOD της μεθόδου βρέθηκε 0,05 ng/mL τόσο για σαλμετερόλη όσο και για την προπιονική φλουטיκαζόνη και 0,50 ng/mL για την α-υδροξυσαλμετερόλη. Στο πλάσμα, το LOQ της μεθόδου βρέθηκε 0,050 ng/mL τόσο για σαλμετερόλη όσο και για την προπιονική φλουטיκαζόνη. Το αντίστοιχο LOD της μεθόδου βρέθηκε 0,025 ng/mL τόσο για σαλμετερόλη όσο και για την προπιονική φλουטיκαζόνη.

Η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου, δηλαδή η εγγύτητα της πειραματικής συγκέντρωσης των δειγμάτων προς τη θεωρητική συγκέντρωση, αξιολογήθηκε και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου για όλες τις ουσίες. Ως μέτρο της ορθότητας χρησιμοποιήθηκε το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Relative Error, %Er = $100 * (\text{πειραματική} - \text{θεωρητική}) / \text{θεωρητική}$) συνολικά και για τις 5 εργαστηριακές ημέρες (Πίνακας 10.4). Η επαναληψιμότητα (repeatability) ή αλλιώς η πιστότητα εντός της ημέρας και η ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision) ή αλλιώς πιστότητα μεταξύ των ημερών αξιολογήθηκαν και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου για όλες τις ουσίες. Ο όρος επαναληψιμότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων προσδιορισμών στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Ο όρος ενδιάμεση πιστότητα περιγράφει το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων μετρήσεων, που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή, διαφορετική συσκευή, ίδιο ή διαφορετικά εργαστήρια, και/ή διαφορετικούς χρόνους. Με τη βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης για μονό παράγοντα (single factor analysis of variance, ANOVA) υπολογίστηκαν για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης ξεχωριστά η επαναληψιμότητα % Sr (n=6) και η ενδιάμεση πιστότητα % Si (n=6x5) (Πίνακας 10.4).

Η εκτίμηση της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας της μεθόδου έγινε βάσει των πειραματικών συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου στο χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης για όλες τις ουσίες. Ο όρος αβεβαιότητα (uncertainty) περιγράφει μια παράμετρο που σχετίζεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που μπορούν λογικά να αποδοθούν στη μετρούμενη παράμετρο. Η αβεβαιότητα δεν προσδίδει αμφιβολία για το κύρος της μέτρησης, αντίθετα η γνώση της αβεβαιότητας προσδίδει αυξημένη εμπιστοσύνη για το κύρος του αποτελέσματος της μέτρησης, καθώς περιγράφει το εύρος των τιμών της μετρούμενης παραμέτρου. Όταν η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση είναι

γνωστή ως τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty). Η τυπική αβεβαιότητα που λαμβάνει υπόψη όλες τις πηγές σφάλματος (π.χ. σφάλματα διαλυμάτων, σφάλματα πιπετών κ.α.), βάσει του νόμου διαδόσεως σφάλματος, ονομάζεται συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combined standard uncertainty). Ο υπολογισμός της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας της μεθόδου έγινε με την βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης για μονό παράγοντα (single factor analysis of variance, ANOVA) (Πίνακας 10.4).

Επιπρόσθετα, για τον υπολογισμό της επί της εκατό ανάκτησης (% recovery) της μεθόδου συγκρίθηκε το area ratio δείγματος ελέγχου προς το area ratio λευκού δείγματος στο οποίο έγινε προσθήκη των αναλυτών σε ισοδύναμες συγκεντρώσεις μετά την εκχύλιση του ούρου με SPE. Η ανάκτηση της μεθόδου εκτιμήθηκε στο μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου για όλες τις ουσίες (Πίνακας 10.4). Στο μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου για όλες τις ουσίες υπολογίστηκε και ο ποσοστιαίος συντελεστής υποστρώματος, που εκφράζει την επίδραση του υποστρώματος (matrix effect) στην ανίχνευση των ουσιών. Ο ποσοστιαίος συντελεστής υποστρώματος ισούται με το ποσοστό του λόγου της περιοχής κάτω από την καμπύλη ολοκλήρωσης του λευκού δείγματος στο οποίο έγινε προσθήκη των αναλυτών μετά την εκχύλιση του ούρου με SPE προς την αντίστοιχη περιοχή κάτω από την καμπύλη ολοκλήρωσης δείγματος (διαλύματος) ίσης συγκέντρωσης απουσία υποστρώματος, αφού πρώτα αυτός ο λόγος αφαιρεθεί από την μονάδα (Πίνακας 10.4).

Πίνακας 10.4. Αποτελέσματα αναλυτικών παραμέτρων επικύρωσης LC-MS μεθόδου.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΟΥΡΑ			ΠΛΑΣΜΑ	
	σαλμετερόλη	α-υδροξυσαλμετερόλη	φλουτικαζόνη	σαλμετερόλη	φλουτικαζόνη
Γραμμικότητα (n=5)	$R^2 > 0,9996$	$R^2 > 0,9998$	$R^2 > 0,9997$	$R^2 > 0,9991$	$R^2 > 0,9998$
Εύρος γραμμικότητας (ng/mL)	0,10 – 2,00	1,00 – 20,0	0,10 – 2,00	0,025-0,500	0,025-0,500
Ευαισθησία (slope)	1,477	1,057	1,865	2,569	2,751
Ορθότητα	% $E_r < 0,7$	% $E_r < 6,7$	% $E_r < 1,8$	% $E_r < 1,5$	% $E_r < 0,7$
Επαναληψιμότητα (n=6)	% $s_r < 7,3$	% $s_r < 8,6$	% $s_r < 8,9$	% $s_r < 6,5$	% $s_r < 6,3$
Ενδιάμεση Πιστότητα (n=6x5)	% $s_i < 7,5$	% $s_i < 9,7$	% $s_i < 9,1$	% $s_i < 7,7$	% $s_i < 7,4$
Ανάκτηση	108,2%	101,0%	91,7%	102,0%	88,3%
Επίδραση Υποστρώματος	84,9%	86,0%	88,8%	80,5%	87,3%
Όριο Ανίχνευσης LOD (ng/mL)	0,05	0,50	0,05	0,025	0,025
Όριο Ποσοτικοποίησης LOQ (ng/mL)	0,10	1,00	0,10	0,050	0,050
Συνδυασμένη Τυπική Αβεβαιότητα (Uc)	3,6%	6,1%	4,8%	3,9%	4,6%

Επιπλέον, η επιλεκτικότητα (selectivity) της μεθόδου για την ανίχνευση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε ούρα και πλάσμα ελέγχθηκε με την ανάλυση 10 λευκών δειγμάτων και άλλων 10 λευκών δειγμάτων στα οποία είχε γίνει προσθήκη των προς ανίχνευση ουσιών σε συγκέντρωση ίση με το LOQ της μεθόδου. Οι κορυφές που συνεκλούονταν ήταν μικρότερες από 5% από τις κορυφές των προς ανίχνευση ουσιών. Η ειδικότητα (specificity) της μεθόδου για την ανίχνευση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουטיκαζόνης σε ούρα και πλάσμα παρουσία πολλών ακόμη ουσιών με παρόμοια δομή ελέγχθηκε με την ανάλυση τριών διαφορετικών δειγμάτων ελέγχου στα οποία είχαν προστεθεί πριν την παρασκευαστική επεξεργασία ένα μείγμα με 189 παράγοντες ντόπινγκ, συμπεριλαμβανομένων και άλλων β2-αγωνιστών, σε συγκέντρωση διπλάσια από το ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο απόδοσης (MRPL), όπως ορίζεται από τον WADA. Μετά την ανάλυση των δειγμάτων δεν εντοπίστηκαν παρεμποδίσεις στην ανίχνευση των τριών ουσιών. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις στην ανίχνευση των τριών ουσιών μετά την ανάλυση 25 λευκών δειγμάτων ούρων και 25 λευκών δειγμάτων πλάσματος.

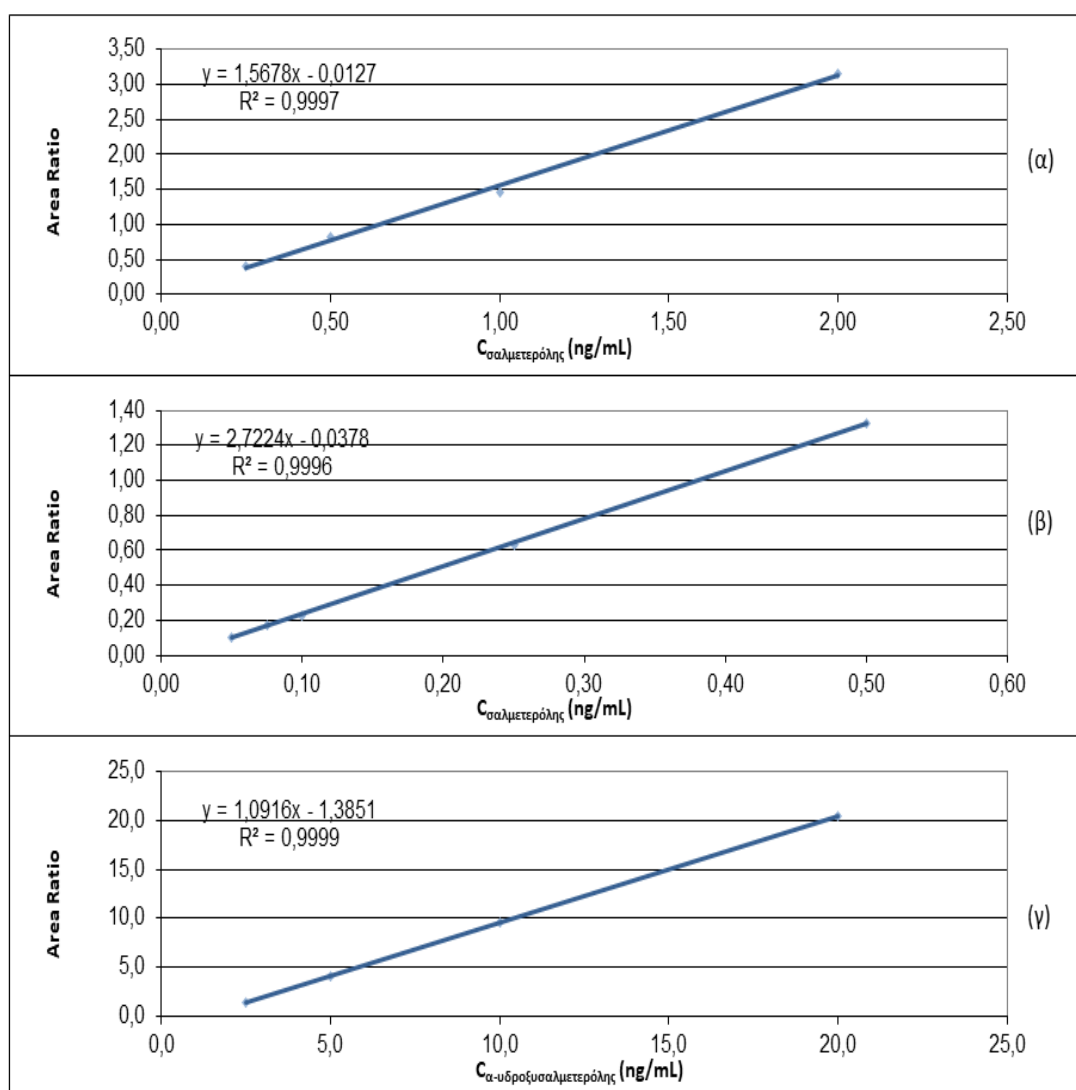
Ο όρος επιμόλυνση ή πιο ορθά επιμόλυνση εκ μεταφοράς δείγματος (carry over) αναφέρεται στο αναλυτικό φαινόμενο κατά το οποίο το σήμα ενός δείγματος κατά την ανάλυση είναι ψευδές, λόγω ανάμιξης με ποσότητα προηγούμενου σε σειρά ανάλυσης δείγματος. Για παράδειγμα, αυτό μπορεί να οφείλεται σε μη σωστή έκπλυση της στήλης μετά από κάθε ανάλυση, σε μη καθαρισμό του συστήματος εισαγωγής δείγματος μετά από κάθε ένεση, σε επιμόλυνση του φασματομέτρου μαζών από ιόντα προηγούμενου δείγματος ή ακόμη και σε παρασκευαστικά σφάλματα. Για τον έλεγχο της επιμόλυνσης 4 διαφορετικά λευκά δείγματα ούρων και πλάσματος αναλύθηκαν μετά το δείγμα της καμπύλης αναφοράς με την υψηλότερη συγκέντρωση, χωρίς να παρατηρηθούν φαινόμενα επιμόλυνσης.

10.4.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΜΕ LC-MS

Το σύνολο των δειγμάτων ούρων και πλάσματος που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης παρασκευάστηκαν με την SPE πορεία που περιεγράφηκε παραπάνω και αναλύθηκαν με την επικυρωμένη μέθοδο LC-MS για ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σαλμετερόλης σε ούρα και πλάσμα και α-υδροξυσαλμετερόλης σε ούρα. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων ούρων προηγήθηκε η ανάλυση μιας καμπύλης αναφοράς σε ούρα, όμοιας με αυτήν της διαδικασίας επικύρωσης, ενώ το αντίστοιχο έγινε και με τα δείγματα πλάσματος. Στην Εικόνα 10.5 παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις των

καμπυλών αναφοράς και οι εξισώσεις παλινδρόμησης μετά την επεξεργασία των δεδομένων των καμπυλών αναφοράς με ανάλυση διακύμανσης για παλινδρόμηση.

Με βάση την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης υπολογίστηκε η συγκέντρωση της σαλμετερόλης και της α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.5. Η κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων έγινε έπειτα από διόρθωση με το ειδικό βάρος των δειγμάτων ούρων. Η συγκέντρωση της σαλμετερόλης σε όλα τα δείγματα πλάσματος ήταν μικρότερη του LOQ της μεθόδου.



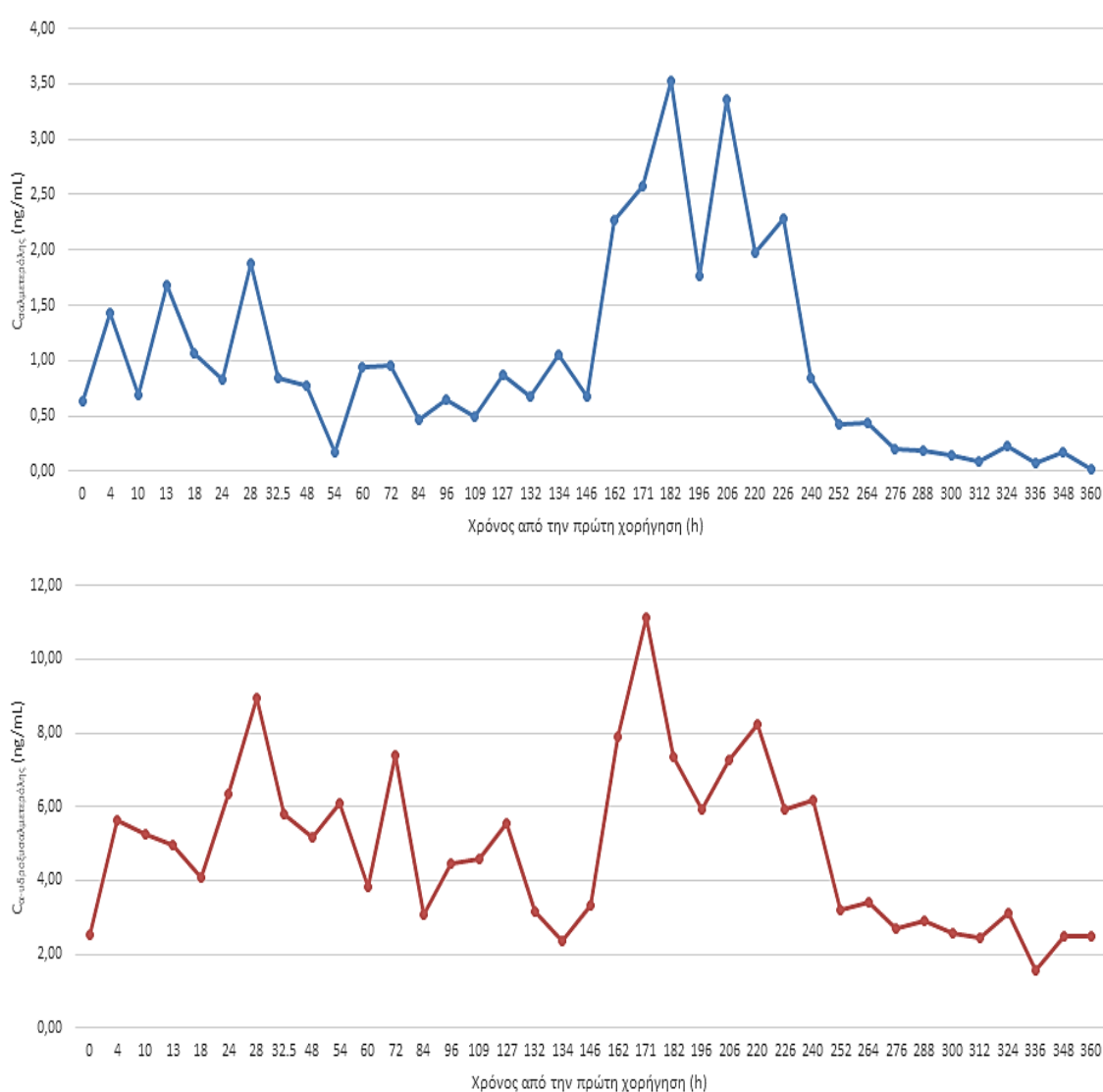
Εικόνα 10.5. Ευθεία και εξισώσεις παλινδρόμησης για την ποσοτικοποίηση (α) σαλμετερόλης σε ούρα, (β) σαλμετερόλης σε πλάσμα και (γ) α-υδροξυσαλμετερόλης σε ούρα.

Πίνακας 10.5. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης σαλμετερόλης και α-υδροξυσαλμετερόλης σε ούρα μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (h)	ΕΙΔΙΚΟ ΒΑΡΟΣ	C _{σαλμετερόλης} (ng/mL)	C _{α-υδροξυσαλμετερόλης} (ng/mL)
T0	0	1,0113	0,64	2,54
D1-1	4	1,0172	1,44	5,64
D1-2	10	1,0142	0,69	5,25
D1-3	13	1,0166	1,69	4,95
D1-4	18	1,0103	1,06	4,10
D2-1	24	1,018	0,83	6,36
D2-2	28	1,0148	1,87	8,96
D2-3	32,5	1,012	0,85	5,79
D3-1	48	1,0133	0,78	5,16
D3-2	54	1,0148	0,17	6,11
D3-3	60	1,0127	0,94	3,85
D4-1	72	1,0138	0,96	7,39
D4-2	84	1,0096	0,47	3,07
D5-1	96	1,0073	0,65	4,47
D5-2	109	1,0097	0,49	4,57
D6-1	127	1,0086	0,87	5,55
D6-2	132	1,0126	0,67	3,15
D6-3	134	1,007	1,05	2,36
D7-1	146	1,0079	0,67	3,31
D7-2	162	1,0187	2,27	7,92
D8-1	171	1,0235	2,57	11,11
D8-2	182	1,017	3,53	7,33
D9-1	196	1,0174	1,76	5,93
D9-2	206	1,0258	3,37	7,29
D10-1	220	1,0175	1,98	8,23
D10-2	226	1,0175	2,28	5,91
D11-1	240	1,0184	0,84	6,17
D11-2	252	1,0161	0,42	3,18
D12-1	264	1,0206	0,44	3,40
D12-2	276	1,0173	0,19	2,68
D13-1	288	1,0189	0,18	2,90
D13-2	300	1,0164	0,14	2,57
D14-1	312	1,0154	0,09	2,43
D14-2	324	1,019	0,23	3,11

D15-1	336	1,0033	0,07	1,55
D15-2	348	1,0138	0,17	2,47
D16-1	360	1,0154	0,01	2,48

Η βιοσυσσώρευση της σαλμετερόλης και της α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα παρατηρήθηκε μετά από συσχέτιση των συγκεντρώσεων σε σχέση με το χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας (Εικόνα 10.6). Η μέγιστη συγκέντρωση σαλμετερόλης υπολογίστηκε στα 3,53 ng/mL, κατά την 8^η ημέρα δειγματοληψίας, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση α-υδροξυσαλμετερόλης υπολογίστηκε στα 11,11 ng/mL πάλι κατά την 8^η ημέρα δειγματοληψίας.

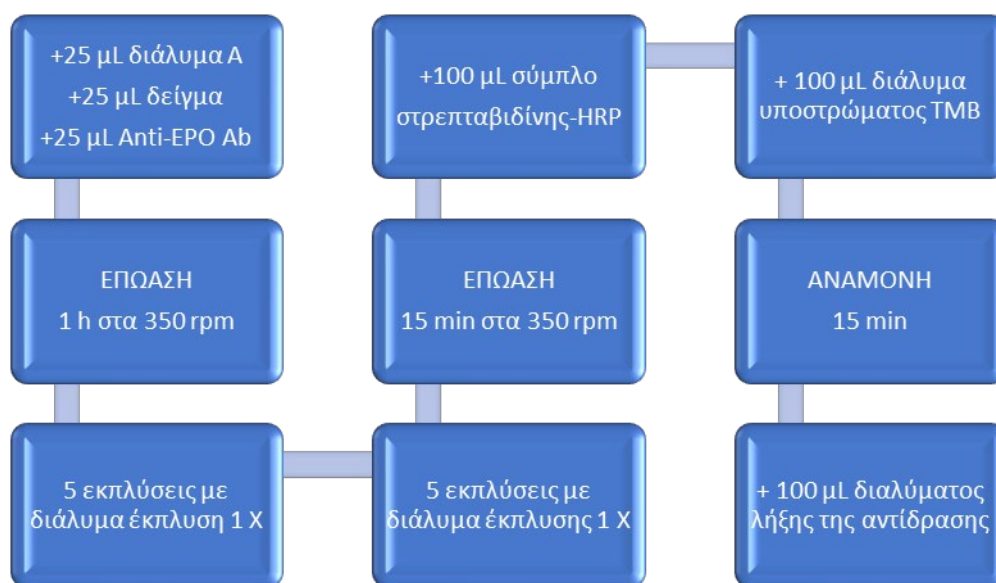


Εικόνα 10.6. Γραφική αναπαράσταση βιοσυσσώρευσης σαλμετερόλης και α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα μετά από ανάλυση με LC-MS.

10.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

10.5.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΜΕ ELISA

Η εκτίμηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης στο πλάσμα μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης πραγματοποιήθηκε με ELISA και χρήση του αντίστοιχου κιτ Human Erythropoietin ELISA kit (Stemcell Technologies). Το σύνολο των δειγμάτων πλάσματος της μελέτης αναλύθηκε με τη συγκεκριμένη πορεία, η οποία συνοπτικά περιγράφεται στην Εικόνα 10.7. Η μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχάνημα ELISA BEST 2000.



Εικόνα 10.7. Παρασκευαστική διαδικασία εκτίμησης επιπέδων ερυθροποιητίνης με ELISA.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς που παρασκευάστηκε και αναλύθηκε μαζί με τα δείγματα σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ σε εύρος 0 – 100 mU/mL. Στην Εικόνα 10.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μέτρησης και η απεικόνισή του σε σχέση με το χρόνο από την πρώτη χορήγηση σαλμετερόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση εμφανίζεται κατά την 7^η ημέρα της πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης και υπολογίστηκε στα 5,23 mU/mL.



Εικόνα 10.8. Αποτελέσματα μέτρησης ερυθροποιητίνης σε πλάσμα με ELISA μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης.

10.5.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ IMMULITE

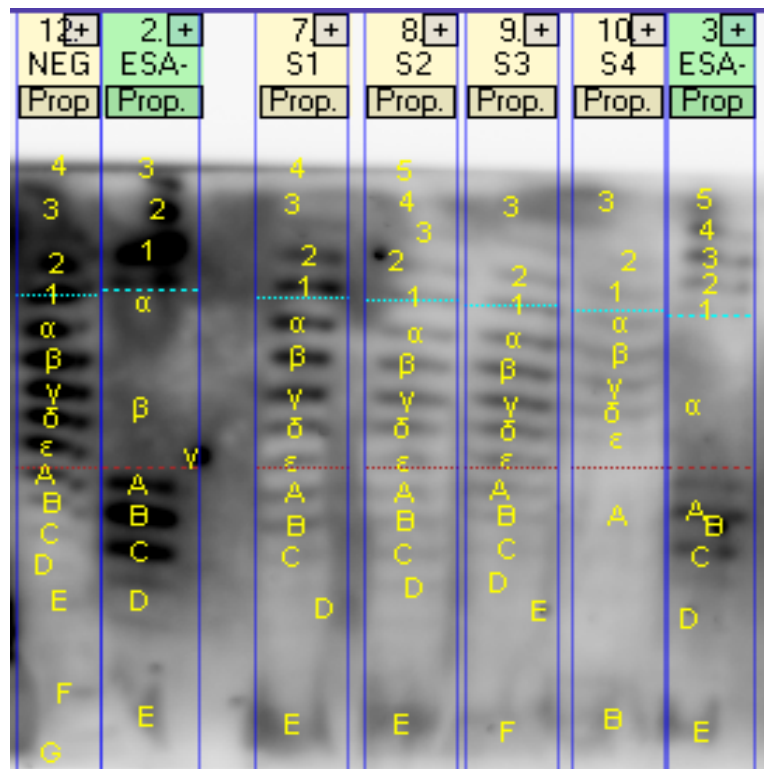
Η αρχική εκτίμηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης στα ούρα μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης πραγματοποιήθηκε με αυτόματο ανοσολογικό-ορμονολογικό αναλυτή Immulite 1000 και τη χρήση του αντίστοιχου κιτ προσδιορισμού. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται από το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας σε περιπτώσεις όπου τα δείγματα ούρων των αθλητών δεν εμφανίζουν κανονικά προφίλ κατανομής και απαιτείται ο έλεγχος της ύπαρξης ενδογενούς ερυθροποιητίνης. Ωστόσο, μετά την ανάλυση των δειγμάτων ούρων όλες οι τιμές ήταν μικρότερες από το LOQ της μεθόδου (< 1 mU/mL). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ο έλεγχος των επιπέδων της ερυθροποιητίνης με τις κλασικές ηλεκτροφορητικές τεχνικές.

10.5.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ IEF

Για την εκτίμηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης στα ούρα μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης ακολουθήθηκε η παρασκευαστική διαδικασία της μεθόδου σάρωσης που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών σε δείγματα ούρων αθλητών, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 7. Για τον συγκεκριμένο σκοπό επιλέχθηκαν να αναλυθούν τα δείγματα με κωδικό εργαστηρίου T0, D3-1, D7-1 και D10-2 που αντιστοιχούν σε 0, 48, 146 και 226 h μετά την πρώτη χορήγηση, αντίστοιχα. Μαζί με τα δείγματα της μελέτης παρασκευάστηκε και ένα λευκό δείγμα

ούρου ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) και δύο διαλύματα συνθετικών ερυθροποιητινών ως θετικοί μάρτυρες (positive control).

Η ανάλυση του ισοηλεκτρικού προφίλ της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με το ειδικό λογισμικό Gel Analysis System for Erythropoietin (GASepo, v1.3). Στην Εικόνα 10.9 παρουσιάζονται τα ισοηλεκτρικά προφίλ κατανομής των ερυθροποιητινών με πρώτο το προφίλ του αρνητικού μάρτυρα που έχει μόνο ενδογενή ερυθροποιητίνη, έπειτα του θετικού μάρτυρα που έχει μόνο εξωγενείς ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες, στη συνέχεια των τριών δειγμάτων ούρων της μεταβολικής μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης και τέλος το προφίλ του δεύτερου θετικού μάρτυρα. Τα δείγματα της πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης εμφάνισαν σταδιακή μείωση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης όσο αυξανόταν ο χρόνος από την πρώτη χορήγηση.

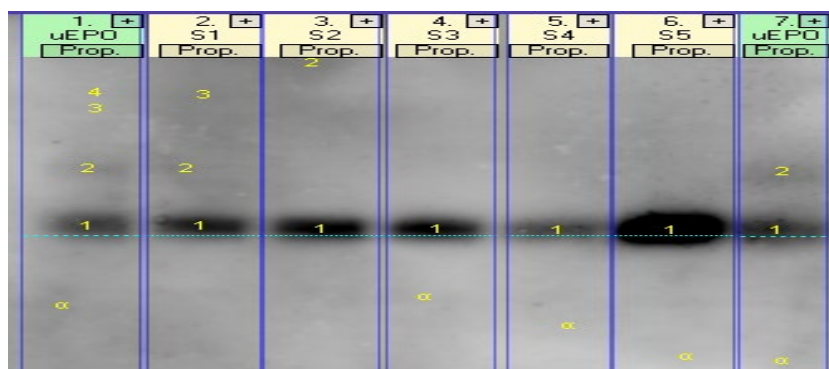


Εικόνα 10.9. Ισοηλεκτρικά προφίλ κατανομής ερυθροποιητινών στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά το διαχωρισμό με IEF για τον έλεγχο των επιπέδων ενδογενούς ερυθροποιητίνης μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης. Η γαλάζια και η κόκκινη γραμμή οριοθετούν την ενδογενή περιοχή, ενώ πάνω από τη γαλάζια γραμμή βρίσκεται η βασική περιοχή και κάτω από την πορτοκαλί γραμμή η όξινη περιοχή. Τα ελληνικά γράμματα καθορίζουν τις ζώνες στην ενδογενή περιοχή, οι αριθμοί στη βασική περιοχή και τα λατινικά γράμματα στην όξινη περιοχή.

10.5.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ SDS-PAGE

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων την ανάλυσης ούρων με IEF έγινε και εκτίμηση των επιπέδων ερυθροποιητίνης στα ούρα μετά την πολλαπλή χορήγηση σαλμετερόλης ακολουθώντας την παρασκευαστική διαδικασία της επιβεβαιωτικής μεθόδου που πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών σε δείγματα ούρων αθλητών, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 8. Για τον συγκεκριμένο σκοπό επιλέχθηκαν να αναλυθούν τα δείγματα με κωδικό εργαστηρίου T0, D3-1, D7-1, D10-2 και D16-1 που αντιστοιχούν σε 0, 48, 146, 226 και 360 h μετά την πρώτη χορήγηση, αντίστοιχα. Μαζί με τα δείγματα της μελέτης παρασκευάστηκε και δύο λευκά δείγματα ούρου ως αρνητικοί μάρτυρες (negative control).

Η ανάλυση του προφίλ κατανομής της ερυθροποιητίνης πραγματοποιήθηκε με το ειδικό λογισμικό Gel Analysis System for Erythropoietin (GASepo, v1.3). Στην Εικόνα 10.10 παρουσιάζονται τα προφίλ κατανομής των ερυθροποιητινών με πρώτο το προφίλ του αρνητικού μάρτυρα που έχει μόνο ενδογενή ερυθροποιητίνη, μετά τα προφίλ των πέντε δειγμάτων ούρων της μελέτης πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης και τέλος το προφίλ του δεύτερου αρνητικού μάρτυρα που έχει μόνο ενδογενή ερυθροποιητίνη. Στα πρώτα χρονικά δείγματα της μελέτης πολλαπλής χορήγησης τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης ήταν σχετικά σταθερά, ωστόσο παρατηρήθηκε έντονη μείωση επιπέδων ερυθροποιητίνης στα ούρα στο δείγμα που αντιστοιχεί στην τελευταία ημέρα της πολλαπλής χορήγησης. Αντίθετα, το δείγμα που αντιστοιχεί στις 6 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης παρουσίασε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα ερυθροποιητίνης, πολύ μεγαλύτερα και από το δείγμα πριν την έναρξη της χορήγησης.



Εικόνα 10.10. Προφίλ κατανομής στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά το διαχωρισμό με SDS-PAGE για τον έλεγχο των επιπέδων ερυθροποιητίνης μετά τη χορήγηση σαλμετερόλης. Η γαλάζια γραμμή υποδεικνύει τη ζώνη της ενδογενούς ερυθροποιητίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

11.1 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΟΝΟΡΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗΣ

Με την in vivo μελέτη που πραγματοποιήθηκε μετά τη μονή χορήγηση 10 mg μεθυλονορτεστοστερόνης σε εθελοντή εντοπίστηκαν νέοι μεταβολίτες, μετά την ανάλυση δειγμάτων ούρων με GC-MS/MS, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ ως βιοδείκτες για την ανίχνευση της κατάχρησης μεθυλονορτεστοστερόνης από τους αθλητές.

Για πρώτη φορά έγινε έλεγχος για την παρουσία μεταβολιτών φάσης II της μεθυλονορτεστοστερόνης συζευγμένων με θειικό οξύ. Μετά την ανάλυση των δειγμάτων ούρων με GC-MS/MS ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά οι S1, S2 και S3 μεταβολίτες συζευγμένοι με θειικό οξύ στο υδροξύλιο του άνθρακα C3 του στεροειδούς. Οι δύο από τους τρεις μεταβολίτες, ο S2 και ο S3, ανιχνεύθηκαν μέχρι το τέλος της μεταβολικής μελέτης (192 h), ενώ ο S1 μέχρι τις 72 h.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολίτης S2 ανιχνεύθηκε και στη σειρά των δειγμάτων υδρολυμένων με β-γλυκουρονιδάση για τον εντοπισμό των γλυκουρονιδίων, χωρίς να υπάρχει η δράση της αρυλσουλφατάσης. Επομένως, ο S2 ανιχνεύθηκε σε ακέραια μορφή, και εκχυλίστηκε από τον διαιθυλαιθέρα, χωρίς να είναι αποσυζευγμένο το θειικό οξύ από το υδροξύλιο του άνθρακα C3. Είναι η πρώτη φορά, με βάση τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές γνώσεις, που κάποιος μεταβολίτης συζευγμένος με θειικό οξύ εκχυλίζεται με χρήση διαιθυλαιθέρα.^[115]

Επιπροσθέτως, έγινε έλεγχος και των μεταβολιτών φάσης II που εκκρίνονται συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ μετά από ενζυμική αποσύζευξη και ανάλυση με GC-MS/MS. Ανιχνεύθηκαν οι M3 και M4, μεταβολίτες φάσης II, οι οποίοι παρουσιάζονται για πρώτη φορά, συμπληρώνοντας τις γνώσεις για τον μεταβολισμό της μεθυλονορτεστοστερόνης.^[117-119] Οι μεταβολίτες αυτοί ανιχνεύθηκαν μάλιστα μέχρι το τέλος της μεταβολικής μελέτης (192 h) δίνοντας ένα αρκετά καλό χρονικό παράθυρο ανίχνευσης. Οι επίσης συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ μεταβολίτες φάσης II M1 και M2 εντοπίστηκαν επιβεβαιώνοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα, ωστόσο στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (72 h και 192 h) σε σχέση με τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών.^[119]

Η σημαντικότητα των μεταβολιτών ως βιοδεικτών ανίχνευσης καταδεικνύεται από την απέκκριση της μεθυλονορτεστοστερόνης στις 44 h ώρες μετά τη χορήγηση, παρουσιάζοντας μικρότερο παράθυρο ανίχνευσης από όλους τους μεταβολίτες φάσης II που ανιχνεύθηκαν.

Επιπλέον, η στεροειδής ενότητα του ABP παρουσίασε μεταβολές κατά τις πρώτες 48 h ώρες μετά τη χορήγηση με τα ενδογενή ανδρογόνα να παρουσιάζουν μειωμένες συγκεντρώσεις στα ούρα μετά από έλεγχο του προφίλ των στεροειδών με GC-MS/MS. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται σε κάποιο φαινόμενο αρνητικής ανάδρασης, κατά το οποίο η ανταγωνιστική ενεργοποίηση των υποδοχέων ανδρογόνων από τη μεθυλονορτεστοστερόνη σηματοδοτεί στον οργανισμό του εθελοντή τον κορεσμό των υποδοχέων και την μείωση της παραγωγής ενδογενών ανδρογόνων. Μετά τις 48 h από τη χορήγηση της μεθυλονορτεστοστερόνης η ενδογενής παραγωγή ανδρογόνων επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα, καθώς πραγματοποιήθηκε μονή χορήγηση της ουσίας, η οποία σε 44 h είχε αποβληθεί από τον οργανισμό του εθελοντή.

Το προφίλ των στεροειδών πιθανώς να μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος βιοδείκτης ανίχνευσης χρήσης μεθυλονορτεστοστερόνης, ωστόσο οι μεταβολίτες φάσης II, έχοντας σαφώς μεγαλύτερα παράθυρα ανίχνευσης, θεωρούνται προτιμότεροι για το σκοπό αυτό.

Τέλος, η εκτίμηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης στα ούρα με ηλεκτροφορητικές τεχνικές δε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης ανίχνευσης χρήσης μεθυλονορτεστοστερόνης. Η μονή χορήγηση μεθυλονορτεστοστερόνης έδειξε να μειώνει τα επίπεδα ερυθροποιητίνης 44 h μετά τη χορήγηση. Η μείωση αυτή μοιάζει να είναι αποτέλεσμα κάποιας φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού του εθελοντή. Δεν θα μπορούσε να οφείλεται στη χορήγηση της ουσίας, καθώς τα AAS αυξάνουν την ερυθροποίηση, αλλά ακόμη και αν η μεθυλονορτεστοστερόνη μείωνε τη συγκέντρωση ερυθροποιητίνης στα ούρα, κατά την ανάλυση του δείγματος που αντιστοιχεί στις 144 h μετά τη χορήγηση, όπου η μεθυλονορτεστοστερόνη έχει αποβληθεί πλήρως, η ερυθροποιητίνη θα έπρεπε να είχε επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα.^[108,155,156]

11.2 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ LGD-4033

Με την in vivo μελέτη που πραγματοποιήθηκε μετά τη μονή χορήγηση 10 mg LGD-4033 σε εθελοντή εντοπίστηκαν πλούσιο προφίλ μεταβολιτών, για τους οποίους έγινε για πρώτη φορά μελέτη των χρονικών παραθύρων ανίχνευσης και των προφίλ έκκρισής τους στα ούρα μετά από ανάλυση με LC-MS.

Μετά την υδρόλυση των δειγμάτων ούρων έξι μεταβολίτες φάσης I ανιχνεύτηκαν. Οι M1, M2 και M3 μετά από υδροξυλίωση, ο M4 μετά από υδροξυλίωση και μεθυλίωση, ο M5 μετά από διπλή υδροξυλίωση και ο M6 μετά από τριπλή υδροξυλίωση. Οι M1-M5 επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών για την ύπαρξή τους, ενώ ο M6 ανιχνεύθηκε πρώτη φορά σε ανθρώπινα ούρα.^[124-127] Όσον αφορά στα παράθυρα ανίχνευσης, κάθε μεταβολίτης είχε το δικό του προφίλ έκκρισης, με τους M1 και M2 να εμφανίζουν μεγαλύτερα παράθυρα ανίχνευσης όταν ανιχνεύονται ως προϊόντα προσθήκης φορμικού. Ο M5 είχε το μεγαλύτερο παράθυρο ανίχνευσης μέχρι τις 20,5 ημέρες, σχεδόν δηλαδή μέχρι το τέλος της μελέτης (21 ημέρες), αποτελώντας το βασικό προτεινόμενο βιοδείκτη ελέγχου κατάχρησης LGD-4033 για δείγματα που έχουν υποστεί υδρόλυση/εκχύλιση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, εκτός από τον M4 που ανιχνεύθηκε μόλις για 12 h, όλοι οι υπόλοιποι μεταβολίτες φάσης I είχαν μεγαλύτερα παράθυρα ανίχνευσης από την μητρική ουσία, η οποία ανιχνεύθηκε μέχρι τις 3,5 ημέρες, ενισχύοντας τη σημαντικότητα της χρήσης βιοδεικτών. Η μητρική ουσία εμφάνισε επίσης βελτιωμένο παράθυρο ανίχνευσης όταν ανιχνεύθηκε ως προϊόν προσθήκης φορμικού. Η μέγιστη απέκκριση του LGD-4033 εμφανίστηκε στις 4,5 h μετά τη χορήγηση με συγκέντρωση 1,7 µg/mL.

Μετά την ανάλυση δειγμάτων ούρων που είχαν υποστεί απλή αραιώση, επιβεβαιώθηκε ο εντοπισμός τεσσάρων μεταβολιτών φάσης II.^[126,127] Πρόκειται για τη συζευγμένη με γλυκουρονικό οξύ μορφή του LGD-4033 και των τριών υδροξυλιωμένων M1, M2 και M3. Φαίνεται ότι οι προσθήκη λιγότερων υποκαταστατών κατά τη φάση I του μεταβολισμού επιτρέπει τον σχηματισμό μεταβολιτών φάσης II. Ωστόσο, τα παράθυρα ανίχνευσης των γλυκουρονιδίων ήταν μικρότερα (μέχρι 2,5 ημέρες) από τα αντίστοιχα παράθυρα των υδρολυμένων δειγμάτων (Εικόνα 8.8). Επομένως, οι μεταβολίτες φάσης I θεωρούνται πιο αξιόπιστοι βιοδείκτες για την ανίχνευση της χρήσης LGD-4033 από τους μεταβολίτες φάσης II συζευγμένους με γλυκουρονικό οξύ, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου μεταβολίτες φάσης II συζευγμένοι με θειικό οξύ.

Επιπλέον, η στεροειδής ενότητα του ABP δεν παρουσίασε μεταβολές στις παραμέτρους μετά τη χορήγηση του LGD-4033, με τα ενδογενή ανδρογόνα να παρουσιάζουν σταθερές συγκεντρώσεις στα ούρα μετά από έλεγχο του προφίλ των στεροειδών με GC-MS. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την άποψη ότι οι SARMS δρουν με διαφορετικό μηχανισμό από τα AAS.^[111,120] Μάλιστα το LGD-4033 είχε μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στον οργανισμό (3,5 ημέρες) από την μεθυλονορτεστοστερόνη (44 h), οπότε αν δρούσαν μέσω του ίδιου μηχανισμού θα μπορούσε να προκαλέσει εντονότερο φαινόμενο αρνητικής ανάδρασης κατά

της παραγωγής ενδογενών ανδρογόνων. Έτσι, το προφίλ των στεροειδών δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έμμεσος βιοδείκτης ανίχνευσης χρήσης LGD-4033.

Ομοίως, η εκτίμηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης στα ούρα με ηλεκτροφορητικές τεχνικές δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης ανίχνευσης χρήσης LGD-4033. Η μονή χορήγηση LGD-4033 έδειξε να μην αυξάνει τα ενδογενή επίπεδα ερυθροποιητίνης έως και 145,5 h μετά τη χορήγηση. Το αποτέλεσμα της εκτίμησης δεν μπορεί να είναι σαφές, καθώς ο εθελοντής έδειξε να έχει εκ φυσικού χαμηλά επίπεδα ενδογενούς ερυθροποιητίνης, αφού δεν ανιχνεύθηκε ερυθροποιητίνη στο δείγμα ούρου που συλλέχθηκε πριν τη χορήγηση της ουσίας (T0).

11.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Η σύγκριση του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XE-5000 έδειξε μια πολύ καλή συσχέτιση και συμφωνία για την πλειοψηφία των αιματολογικών μεταβλητών με μικρές διαφορές μεταξύ των δύο οργάνων, γεγονός που υποδηλώνει μια καλή ειδικότητα για τον SYSMEX XT-2000i. Επιπλέον, ο προς αξιολόγηση αναλυτής εμφάνισε άριστη επαναληψιμότητα και ενδιαμέση πιστότητα με τα αποτελέσματα να είναι πολύ κάτω από τα κριτήρια του WADA και αρκετά καλή γραμμικότητα σε εύρος 0-100%.^[77] Δεν παρατηρήθηκε επίδραση τάσης ή επιμόλυνση, με τους ελέγχους να δίνουν μηδενικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Μετά την αξιολόγηση όλων των αναλυτικών αυτών χαρακτηριστικών η λειτουργία του αιματολογικού αναλυτή Sysmex XT-2000i του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας, κρίθηκε κατάλληλη για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών στα πλαίσια του ABP.

Επίσης, ο αιματολογικός αναλυτής Sysmex XN-1000 αξιολογήθηκε, σύμφωνα με τις νέες οδηγίες του WADA, μόνο για τις αναλυτικές παραμέτρους της επαναληψιμότητας και της ενδιαμέσης πιστότητας, δίνοντας τιμές εντός των κριτηρίων του WADA για όλες τις αιματολογικές παραμέτρους.^[77] Επομένως, και ο αιματολογικός αναλυτής Sysmex XN-1000 του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας, κρίθηκε κατάλληλος για αναλύσεις δειγμάτων αίματος αθλητών στα πλαίσια του ABP.

Όσον αφορά στην ορθότητα της λειτουργίας των αιματολογικών αναλυτών, όπως αυτή ελέγχθηκε μέσω του προγράμματος εξωτερικού ελέγχου ποιότητας του WADA, κρίθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητική ειδικά για τον Sysmex XT-2000i, καθώς ο Sysmex XN-1000 συμμετείχε στο πρόγραμμα μόνο μία φορά μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Οι μόνες τιμές FAC-value που είναι εκτός του ορίου αποδοχής (2,0 κατά απόλυτη τιμή), αντιστοιχούν σε

προβλήματα που υπήρχαν με τη διαδικασία ανάλυσης των δειγμάτων, τα οποία και επιλύθηκαν. Οι τιμές του Z-score που είναι μεγαλύτερες του 2,0 κατά απόλυτη τιμή δεν ήταν αποδεκτές, όμως δεν αφορούσαν τη λειτουργία του συγκεκριμένου αναλυτή, αλλά προβλήματα που υπήρχαν με τα δείγματα σε όλα τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ.

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας πληρεί τις προδιαγραφές του WADA, ώστε να αναλύει δείγματα αίματος αθλητών στα πλαίσια του ABP και ο έλεγχος ντόπινγκ μπορεί να εφαρμοστεί για πρώτη φορά στην Ελλάδα σε επίπεδο ελέγχου ντόπινγκ αίματος σε συνθήκες ρουτίνας μέσω ελέγχου μεταβολών των αιματολογικών παραμέτρων του ABP.

11.4 IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΣΑΛΜΕΤΕΡΟΛΗΣ

Η in vivo μελέτη της πολλαπλής χορήγησης εισπνεόμενης σαλμετερόλης με χορήγηση σε εθελοντή τη μέγιστη επιτρεπόμενη δοσολογία από τον WADA, δηλαδή, 100 mg / 12 h, για 10 ημέρες απέδειξε τόσο τη βιοσυσώρευση της σαλμετερόλης στον οργανισμό του εθελοντή, όσο και τη συσχέτιση της βιοσυσώρευσης αυτής με έμμεσους βιοδείκτες ντόπινγκ αίματος.^[9]

Για τον έλεγχο της βιοσυσώρευσης της σαλμετερόλης τα δείγματα ούρων και πλάσματος της μελέτης αναλύθηκαν με LC-MS, έπειτα από παρασκευαστική κατεργασία με SPE. Οι UHPLC-HRMS μέθοδοι επικυρώθηκαν ως κατάλληλες, σύμφωνα με τις οδηγίες του WADA, για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλης και προπιονικής φλουτικαζόνης σε ανθρώπινα ούρα και για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση σαλμετερόλης και προπιονικής φλουτικαζόνης σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος, σε συγκεντρώσεις επιπέδου pg/mL.^[11]

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με LC-MS απέδειξαν ότι η πολλαπλή χορήγηση εισπνεόμενης σαλμετερόλης οδηγεί σε βιοσυσώρευση της ουσίας στον οργανισμό, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις στα ούρα. Η βιοσυσώρευση της σαλμετερόλης ξεκινά να εμφανίζεται την 7^η ημέρα της πολλαπλής χορήγησης, ενώ εξαλείφεται κατά την 1^η ημέρα μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης. Η μέγιστη συγκέντρωση σαλμετερόλης υπολογίστηκε στα 3,53 ng/mL, κατά την 8^η ημέρα χορήγησης. Η σαλμετερόλη δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα πλάσματος, επιβεβαιώνοντας τις χαμηλές συγκεντρώσεις της στο αίμα, που έχουν αναφερθεί από άλλες μελέτες.^[144,146,147,149]

Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η βιβλιογραφική γνώση ότι ο μεταβολίτης της σαλμετερόλης, α-υδροξυσαλμετερόλη, είναι καταλληλότερος για την ανίχνευση της χρήσης σαλμετερόλης δίνοντας υπερτριπλάσιες συγκεντρώσεις στα ούρα μετά την ανάλυση των δειγμάτων της

μελέτης.^[146,147] Το φαινόμενο της βιοσυσσώρευση απεικονίστηκε και μέσω των συνεχώς αυξανόμενων συγκεντρώσεων α-υδροξυσαλμετερόλης. Και στην περίπτωση του μεταβολίτη η βιοσυσσώρευση ξεκινά να εμφανίζεται την 7^η ημέρα της πολλαπλής χορήγησης, ενώ εξαλείφεται κατά την 1^η ημέρα μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης. Η μέγιστη συγκέντρωση α-υδροξυσαλμετερόλης υπολογίστηκε στα 11,11 ng/mL πάλι κατά την 8^η ημέρα χορήγησης.

Η ανάλυση των δειγμάτων ολικού αίματος με τον αιματολογικό αναλυτή Sysmex XT-2000i έδειξε μία αύξηση στις αιματολογικές παραμέτρους RBC, HGB, HCT, RET%, RET# και IRF του ABP. Οι φυσιολογικές τιμές του αιματολογικού προφίλ του εθελοντή είχαν προσδιοριστεί με ανάλυση δειγμάτων αίματος μέχρι και 8 ημέρες πριν την έναρξη της πολλαπλής χορήγησης. Οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων επανήλθαν στις αρχικές τιμές προ της χορήγησης σε δείγματα που αναλύθηκαν μέχρι και 6 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης. Η αύξηση των αιματολογικών παραμέτρων του ABP παρατηρήθηκε κατά την 7^η ημέρα της χορήγησης, δηλαδή σε κοντινή χρονική στιγμή με την εμφάνιση της βιοσυσσώρευσης της σαλμετερόλης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, έπειτα από την ανάλυση των δειγμάτων ορού με βιοχημικό και ανοσολογικό αναλυτή, παρατηρήθηκαν μεταβολές και στο προφίλ του σιδήρου. Συγκρίνοντας δείγματα ακριβώς πριν την έναρξη και μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης σαλμετερόλης, εμφανίστηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα του σιδήρου (30,1%) και της φερριτίνης (13,1%) στον ορό. Η τρανσφερίνη του ορού εμφάνισε μικρή μείωση (-2,2%).

Επιπροσθέτως, η εκτίμηση των επιπέδων της ερυθροποιητίνης στα ούρα με ηλεκτροφορητικές τεχνικές καταδεικνύει μια σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης, με το δείγμα που αντιστοιχεί στην 10^η ημέρα και τελευταία ημέρα της χορήγησης να εμφανίζει την μεγαλύτερη μείωση. Η μείωση αυτή πιθανώς να οφείλεται σε φαινόμενο αρνητικής ανάδρασης, κατά το οποίο σηματοδοτείται ο οργανισμός του εθελοντή να μην παράγει ενδογενή ερυθροποιητίνη. Αυτό δείχνει να σχετίζεται επίσης με τη βιοσυσσώρευση σαλμετερόλης, καθώς η μείωση της ερυθροποιητίνης στα ούρα εμφανίζεται την ημέρα που ξεκινά να παρατηρείται και η βιοσυσσώρευση. Ακόμη, μετά την ολοκλήρωση της πολλαπλής χορήγησης και την εξάλειψη της βιοσυσσώρευσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην ενδογενή ερυθροποιητίνη των ούρων, με τα επίπεδα της να είναι πολύ μεγαλύτερα ακόμη και από το δείγμα που αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή πριν την έναρξη της χορήγησης. Τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης στο πλάσμα επηρεάζονται σε μικρό βαθμό από τη βιοσυσσώρευση, μετά από ποσοτικοποίηση με ELISA, λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής της ερυθροποιητίνης στο αίμα.

Όλες οι παραπάνω μεταβολές ενισχύουν τα αποτελέσματα μελετών που αποδεικνύουν ότι οι β2-αδρενεργικοί υποδοχείς συμμετέχουν στα πρώτα στάδια της ερυθροποίησης κατά τα οποία τα προγονικά κύτταρα δεν φέρουν υποδοχείς ερυθροποιητίνης.^[157] Επομένως, η σαλμετερόλη ως ένας β2-αγωνιστής θα μπορούσε ενεργοποιώντας τον αντίστοιχο υποδοχέα να ενεργοποιήσει την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, οδηγώντας στην αύξηση των αιματολογικών παραμέτρων του ABP και στην αρνητική ανάδραση στην παραγωγή ενδογενούς ερυθροποιητίνης.

Εν κατακλείδι, οι έμμεσοι βιοδείκτες δείχνουν να μεταβάλλονται κυρίως μετά από πολλαπλή χορήγηση, με εξαίρεση τους μεταβολίτες οι οποίοι είναι χρήσιμοι βιοδείκτες για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών και μετά από μονή χορήγηση. Η πολλαπλή χορήγηση είναι η τακτική που ακολουθείται από τους αθλητές, ώστε να επιτύχουν την αθέμιτη βελτίωση της αθλητικής τους απόδοσης. Επιπλέον, οι αθλητές συχνά χρησιμοποιούν ταυτόχρονα περισσότερες από μία απαγορευμένες ουσίες, συνήθως σε μικροδόσεις. Οι μικροδόσεις χορήγησης καθιστούν τις ουσίες μη ανιχνεύσιμες με μεθόδους άμεσης ανίχνευσης. Κάθε μία απαγορευμένη ουσία αθροιστικά μπορεί να μην μεταβάλει τους έμμεσους βιοδείκτες, ωστόσο η επίδραση των ουσιών είναι αθροιστική, προκαλώντας τελικά ανιχνεύσιμες μεταβολές στους έμμεσους βιοδείκτες. Έτσι, η χρήση των βιοδεικτών αποτελεί το ισχυρότερο εργαλείο που διαθέτουν τα Εργαστήρια Ελέγχου Ντόπινγκ για την ανίχνευση του ντόπινγκ αίματος, και το ABP μελλοντικά θα πρέπει να συμπληρωθεί με την προσθήκη περισσότερων έμμεσων βιοδεικτών εξατομικευμένης παρακολούθησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. World Anti-Doping Agency (WADA), 2015. World Anti-Doping Code 2015 with 2019 amendments, 2015. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada_anti-doping_code_2019_english_final_revised_v1_linked.pdf (accessed 21 April 2020).
2. <https://sportsanddrugs.procon.org/historical-timeline/> (accessed 21 April 2020).
3. <http://atlantablackstar.com/2013/08/14/the-top-10-doping-scadals-that-rocked-the-sports-world/4/> (accessed 21 April 2020).
4. Σακελλαρίου, Π., 2015. Ποσοτικός προσδιορισμός σαλβουταμόλης και εφεδρινών σε ούρα αθλητών με απευθείας ένεση ούρων για τον έλεγχο ντόπινγκ με χρήση LCQTOFMS.
5. McLaren, R.H., 2016. The independent person report. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/20160718_ip_report_newfinal.pdf (accessed 21 April 2020).
6. Thevis, M., 2010. Mass Spectrometry in Sports drug testing, Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays, Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry.
7. Thevis, M., Schanzer, W., 2007. Mass spectrometry in sports drug testing: Structure characterization and analytical assays. Mass Spectrometry Reviews. 26, 79-107.
8. <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/international-standards> (accessed 21 April 2020).
9. World Anti-Doping Agency (WADA), 2020. Prohibited List. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list_0.pdf (accessed 1 June 2020).
10. World Anti-Doping Agency (WADA), 2020. Testing and Investigations. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isti_march2020_0.pdf (accessed 1 June 2020).
11. World Anti-Doping Agency (WADA), 2020. International Standard for Laboratories. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_nov2019.pdf (accessed 1 June 2020).

12. World Anti-Doping Agency (WADA), 2019. Therapeutic Use Exemptions. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/istue_2019_en_new.pdf (accessed 1 June 2020).
13. World Anti-Doping Agency (WADA), 2018. Protection of Privacy and Personal Information. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/ispppi-final_en.pdf (accessed 1 June 2020).
14. <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/technical-documents-index> (accessed 21 April 2020).
15. World Anti-Doping Agency (WADA), 2019. Technical Document-TD2014DL- Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold Substances. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019dl_v2_finalb.pdf (accessed 1 June 2020).
16. World Anti-Doping Agency (WADA), 2019. Document-TD2014MRPL-Minimu Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf (accessed 1 June 2020).
17. <http://www.oaka.com.gr/υποστήριξη-αθλητών/έλεγχος-ντόπινγκ/η-καθημερινή-δραστηριότητα/> (accessed 1 June 2020).
18. Thevis, M., Geyer, H., Tretzel, L., Schänzer, W., 2016. Sports drug testing using complementary matrices: Advantages and limitations. *J Pharm Biomed Anal*, 130,220-230.
19. World Anti-Doping Agency (WADA), 2016. Blood Sample Collection Guidelines. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_blood_sample_collection_v5_sep_t_2016.pdf (accessed 1 June 2020).
20. http://en.wikipedia.org/wiki/Abortion_doping (accessed 21 April 2020).
21. Wells, D.J., 2008. Gene doping: the hype and the reality. *British Journal of Pharmacology*. 154, 623-631.
22. http://en.wikipedia.org/wiki/Technology_doping (accessed 21 April 2020).
23. Jelkmann, W., Lundby, C., 2011. Blood doping and its detection. *Blood*. 118, 2395-2404.
24. <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/blood-doping> (accessed 21 April 2020).

25. Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., Τσακόπουλος, Μ., 2011. Φυσιολογία του ανθρώπου. Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού. 8η έκδοση. Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
26. Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας (ΕΕΚΧ-ΚΒ), 2005. 13^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο "ΘΕΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ", Κείμενα διαλέξεων.
27. Λουκόπουλος, Δ., Πολίτου, Μ., 2015. Μαθήματα Αιματολογίας. Κλινική Αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση Αίματος. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα.
28. Atkinson, T.S., Kahn, M.J., 2019. Blood doping: Then and now. A narrative review of the history, science and efficacy of blood doping in elite sport. *Blood Rev.* 39, 100632.
29. Salamin, O., Kuuranne, T., Saugy, M., Leuenberger, N., 2017. Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 464, 75-87.
30. Jelkmann, W., 2016. Erythropoietin. *Front Horm Res.* 47,115-27.
31. Κεφαλά-Αγοροπούλου, Κ., Καρατζά-Ξιφιλίδου, Ε., 2007. Νεώτερες απόψεις για το μεταβολισμό του σιδήρου. *Παιδιατρική Βορείου Ελλάδος.* 19:156-162.
32. Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B.M., Favrat, B., Tissot, J.D., 2014. Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother.* 41,213-21.
33. Heuberger, J.A.A.C., Cohen, A.F., 2018. Review of WADA Prohibited Substances: Limited Evidence for Performance-Enhancing Effects. *Sports Med.* 49, 525-539.
34. Jelkmann, W., 2012. The Disparate Roles of Cobalt in Erythropoiesis, and Doping Relevance. *Open Journal of Hematology.* 2012, 3-6.
35. Reichel, C., Gmeiner, G., Walpurgis, K., Thevis, M., 2018. Updated protocols for the detection of Sotatercept and Luspatercept in human serum. *Drug Test Anal.* 10, 1708-1713.
36. Walpurgis, K., Thomas, A., Lange, T., Reichel, C., Geyer, H., Thevis, M., 2018 Combined detection of the ActRII-Fc fusion proteins Sotatercept (ActRIIA-Fc) and Luspatercept (modified ActRIIB-Fc) in serum by means of immunoaffinity purification, tryptic digestion, and LC-MS/MS. *Drug Test Anal.* 10, 1714-1721.
37. Mennini, T., De Paola, M., Bigini, P., Mastrotto, C., Fumagalli, E., Barbera, S., Mengozzi, M., Viviani, B., Corsini, E., Marinovich, M., Torup, L., Van Beek, J., Leist, M., Brines, M., Cerami, A., Ghezzi, P., 2006. Nonhematopoietic Erythropoietin Derivatives Prevent Motoneuron Degeneration In Vitro and In Vivo. *Mol Med.* 12, 153–160.

38. Oliveira, C.D., Bairros, A.V., Yonamine, M., 2014. Blood doping: risks to athletes' health and strategies for detection. *Subst Use Misuse*. 49, 1168-81.
39. Peters, C., Schulz, T., Michna, H., 2002. *Biomedical Side Effects of Doping (Project of the European Union)*. Verlag SPORT und BUCH Strauß.
40. Fitch, K.D., 2017. Blood doping at the Olympic Games. *J Sports Med Phys Fitness*. 57, 1526-32.
41. Varlet-Marie, E., Ashenden, M., Lasne, F., Sicart, M.T., Marion, B., de Ceaurriz, J., Audran, M., 2004. Detection of hemoglobin-based oxygen carriers in human serum for doping analysis: confirmation by size-exclusion HPLC. *Clin Chem*. 50, 723-31.
42. Mathurin J.C., de Ceaurriz J., Audran M., Krafft M.P. Detection of perfluorocarbons in blood by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr*, 15, 443-451, 2001.
43. Giuliani N., Saugy M., Augsburger M., Varlet V. Blood monitoring of perfluorocarbon compounds (F-tert-butylcyclohexane, perfluoromethyldecalin and perfluorodecalin) by headspace-gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 144, 196-203, 2015.
44. Nelson, M., Popp, H., Sharpe, K., Ashenden, M., 2003. Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica*. 88, 1284-1295.
45. Giraud, S., Robinson, N., Mangin, P., Saugy, M., 2008. Scientific and forensic standards for homologous blood transfusion anti-doping analyses. *Forensic Sci Int*. 179, 23-33.
46. Athanasiadou, I., Voss, S., Lyris, E., Aljaber, A., Alsayrafi, M., Georgakopoulos, C., 2016. Analytical progresses of the World Anti-Doping Agency Olympic laboratories: a 2016 update from London to Rio. *Bioanalysis*. 8, 2265-2279.
47. Manokhina, I., Rupert, J.L., 2013. A DNA-based method for detecting homologous blood doping. *Anal. Bioanal. Chem*. 405, 9693–9701.
48. Stampella, A., Di Marco, S., Pirri, D., de la Torre, X., Botrè, F., Donati, F., 2016. Application of DNA-based forensic analysis for the detection of homologous transfusion of whole blood and of red blood cell concentrates in doping control. *Forensic Sci. Int*. 265, 204–210.
49. Pottgiesser, T., Schumacher, Y.O., 2013. Current strategies of blood doping detection. *Anal Bioanal Chem*. 405, 9625-39.
50. Lasne, F. and de Ceaurriz, J., 2000. Recombinant erythropoietin in urine, *Nature*. 405, 635.

51. Franz, S.E., 2009. Erythropoiesis-stimulating agents: development, detection and dangers, *Drug Test Anal.* 1, 245-9.
52. Catlin, D.H., Breidbach, A., Elliott, S. and Glaspy, J., 2002. Comparison of the isoelectric focusing patterns of darbepoetin alfa, recombinant human erythropoietin, and endogenous erythropoietin from human urine. *Clin Chem.* 48, 2057-9.
53. Kohler, M., Ayotte, C., Desharnais, P., Flenker, U., Ludke, S., Thevis, M., Volker-Schanzer, E. and Schanzer, W., 2008. Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med.* 29, 1-6.
54. Citartan, M., Gopinath, S.C.B., Chen, Y., Lakshmi Priya, T., Tang, T.H., 2015. Monitoring recombinant human erythropoietin abuse among athletes. *Biosensors and Bioelectronics.* 63, 86–98.
55. Reichel, C., Abzieher, F. and Geisendorfer, T., 2009. SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA- and EPO-doping in blood. *Drug Test Anal.* 1, 494-504.
56. World Anti-Doping Agency (WADA), 2014. WADA Technical Document – TD2014EPO. Harmonization of analysis and reporting of erythropoiesis stimulating agents (ESAs) by electrophoretic techniques. <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-TD2014EPO-v1-Harmonization-of-Analysis-and-Reporting-of-ESAs-by-Electrophoretic-Techniques-EN.pdf> (accessed 21 April 2020).
57. Reichel, C., Thevis, M., 2012. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug Test Anal.* 4, 818-29.
58. Postnikov, P., Krotov, G., Mesonzhnik, N., Efimova, Y., Rodchenkov, G., 2015. Fc-fragment removal allows the EPO-Fc fusion protein to be detected in blood samples by IEF PAGE. *Drug Test. Anal.* 7, 999.
59. Leuenberger, N., Saugy, J., Mortensen, R.B., Schatz, P.J., Giraud, S., Saugy, M., 2011. Methods for detection and confirmation of Hematide™/peginesatide in anti-doping samples. *Forensic Sci Int.* 213, 15-9.
60. Reichel, C., Farmer, L., Gmeiner, G., Walpurgis, K., Thevis, M., 2018. Detection of Sotatercept (ACE-011) in human serum by SAR-PAGE and western single blotting. *Drug Test Anal.* 10, 927-937.
61. Desharnais, P., Naud, J.F., Ayotte, C., 2017. Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. *Drug Test Anal.* 9, 1744-1752.

62. Franco Fraguas, L., Carlsson, J. and Lonnberg, M., 2008. Lectin affinity chromatography as a tool to differentiate endogenous and recombinant erythropoietins. *J Chromatogr A*. 1212, 82-8.
63. Dehnes, Y., Shalina, A. and Myrvold, L., 2013. Detection of recombinant EPO in blood and urine samples with EPO WGA MAIIA, IEF and SAR-PAGE after microdose injections. *Drug Test Anal.* 5, 861-9.
64. Hansson, A., Thevis, M., Cox, H., Miller, G., Eichner, D., Bondesson, U., Hedeland, M., 2017. Investigation of the metabolites of the HIF stabilizer FG-4592 (roxadustat) in five different in vitro models and in a human doping control sample using high resolution mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 134, 228-236.
65. Eichner, D., Van Wagoner, R.M., Brenner, M., Chou, J., Leigh, S., Wright, L.R., Flippin, L.A., Martinelli, M., Krug, O., Schänzer, W., Thevis, M., 2017. Implementation of the prolyl hydroxylase inhibitor Roxadustat (FG-4592) and its main metabolites into routine doping controls. *Drug Test Anal.* 9, 1768-1778.
66. Thevis, M., Milosovich, S., Licea-Perez, H., Knecht, D., Cavalier, T., Schanzer, W., 2016. Mass spectrometric characterization of a prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863, its bishydroxylated metabolite, and its implementation into routine doping controls. *Drug Test. Anal.* 8, 858.
67. Dib, J., Mongongu, C., Buisson, C., Molina, A., Schänzer, W., Thuss, U., Thevis, M., 2017. Mass spectrometric characterization of the hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizer drug candidate BAY 85-3934 (molidustat) and its glucuronidated metabolite BAY-348, and their implementation into routine doping controls. *Drug Test Anal.* 9, 61-67.
68. Moller, I., Thomas, A., Geyer, H., Schanzer, W. and Thevis, M., 2012. Development and validation of a mass spectrometric detection method of peginesatide in dried blood spots for sports drug testing. *Anal Bioanal Chem.* 403, 2715-24.
69. Möller, I., Thomas, A., Delahaut, P., Geyer, H., Schänzer, W., Thevis, M., 2012. Mass spectrometric detection of peginesatide in human urine in doping control analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 70, 512-7.
70. Mesonzhnik, N.V., Postnikov, P.V., Appolonova, S.A., Krotov, G.I., 2018. Characterization and Detection of Erythropoietin Fc Fusion Proteins Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 17, 689-697.
71. Guan, F., Uboh, C.E., Soma, L.R., Birksz, E. and Chen, J., 2009. Identification of darbepoetin alfa in human plasma by liquid chromatography coupled to mass spectrometry for doping control. *Int J Sports Med.* 30, 80-6.

- 72.** Vogel, M., Thomas, A., Schänzer, W., Thevis, M., 2015. EPOR-Based Purification and Analysis of Erythropoietin Mimetic Peptides from Human Urine by Cys-Specific Cleavage and LC/MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26, 1617–1625.
- 73.** Sottas, P.E., Robinson, N., Rabin, O., Saugy, M., 2011. The athlete biological passport. *Clin Chem.* 57, 969-76.
- 74.** Salamin, O., De Angelis, S., Tissot, J.D., Saugy, M., Leuenberger, N., 2016. Autologous Blood Transfusion in Sports: Emerging Biomarkers. *Transfus Med Rev.* 30, 109-15.
- 75.** Parisotto, R., Wu, M., Ashenden, M.J., Emslie, K.R., Gore, C.J., Howe, C., Kazlauskas, R., Sharpe, K., Trout, G.J., Xie, M., 2001. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica.* 86, 128-137.
- 76.** Sottas, P.E., Robinson, N., Giraud, S., Taroni, F., Kamber, M., Mangin, P., Saugy, M., 2006. Statistical classification of abnormal blood profiles in athletes. *Int J Biostatistics.* 2, Article 3.
- 77.** World Anti-Doping Agency (WADA), 2019. ISL-Athlete Biological Passport Operating Guidelines. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v71.pdf (accessed 21 April 2020).
- 78.** Hill, V.L., Simpson, V.Z., Higgins, J.M., Stevens, R.A., Metcalf, J.A., Baseler, M., 2009. Evaluation of the Performance of the Sysmex XT-2000i Hematology Analyzer with Whole Bloods Stored at Room Temperature. *Lab Med.* 40, 709–718.
- 79.** Damsgaard, R., Munch, T., Mørkeberg, J., Mortensen, S.P., Gonzalez-Alonso, J., 2006. Effects of blood withdrawal and reinfusion on biomarkers of erythropoiesis in humans: implications for antidoping strategies. *Haematologica.* 91, 1006-1008.
- 80.** Krzyzanski, W., Perez-Ruixo, J.J., 2007. An assessment of recombinant human erythropoietin effect on reticulocyte production rate and lifespan distribution in healthy subjects. *Pharm Res.* 24, 758-772.
- 81.** Dehnes, Y., Hemmersbach, P., 2011. Effect of single doses of methoxypolyethylene glycolepoetin beta (CERA, Mircera) and epoetin delta (Dyneo) on isoelectric erythropoietin profiles and haematological parameters. *Drug Test Anal.* 3, 291-9.
- 82.** World Anti-Doping Agency (WADA), 2019. 2018 ANTI-DOPING TESTING FIGURES. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf (accessed 21 April 2020).

83. Heuberger, J.A.A.C., van Eenoo, P., Rotmans, J.I., Gal, P., Stuurman, F.E., Post, T.E., Daniels, J.M.A., Ram, H., de Hon, O., Burggraaf, J., Cohen, A.F., 2019. Sensitivity and specificity of detection methods for erythropoietin doping in cyclists. *Drug Test Anal.* 11, 1290-1301.
84. Martino, M., Gledhill, N., Jamnik, V., 2002. High VO₂max with no history of training is primarily due to high blood volume. *Med Sci Sports Exerc.* 34, 966-971.
85. Segura, J., Monfort, N., Ventura, R., 2012. Detection methods for autologous blood doping. *Drug Test Anal.* 4, 876-81.
86. Segura, J., Lundby, C., 2014. Blood doping: potential of blood and urine sampling to detect autologous transfusion. *Br J Sports Med.* 48, 837-41.
87. Leuenberger, N., Jan, N., Pradervand, S., Robinson, N., Saugy, M., 2011. Circulating microRNAs as long-term biomarkers for the detection of erythropoiesis-stimulating agent abuse. *Drug Test Anal.* 3, 771-6.
88. Voss, S.C., Jaganjac, M., Al-Thani, A.M., Grivel, J.C., Raynaud, C.M., Al-Jaber, H., Al Menhali, A.S., Merenkov, Z.A., Alsayrafi, M., Latiff, A., Georgakopoulos, C., 2017. Analysis of RBC-microparticles in stored whole blood bags - a promising marker to detect blood doping in sports? *Drug Test Anal.* 9, 1794-1798.
89. Nikolovski, Z., De La Torre, C., Chiva, C., Borràs, E., Andreu, D., Ventura, R., Segura, J., 2012. Alterations of the erythrocyte membrane proteome and cytoskeleton network during storage-a possible tool to identify autologous blood transfusion. *Drug Test Anal.* 4, 882-90.
90. Marrocco, C., Pallotta, V., D'alessandro, A., Alves, G., Zolla, L., 2012. Red blood cell populations and membrane levels of peroxiredoxin 2 as candidate biomarkers to reveal blood doping. *Blood Transfus.* 10, 71-7.
91. Cox, H.D., Miller, G.D., Lai, A., Cushman, D., Eichner, D., 2017. Detection of autologous blood transfusions using a novel dried blood spot method. *Drug Test Anal.* 9, 1713-1720.
92. Todosenko, N.M., Shmarov, V.A., Malashchenko, V.V., Meniailo, M.E., Melashchenko, O.B., Gazatova, N.D., Goncharov, A.G., Seledtsov, V.I., 2016. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int Immunopharmacol.* 36, 277-281.
93. Wood, M.A., Goldman, N., DePierri, K., Somerville, J., Riggs, J.E., 2016. Erythropoietin increases macrophage-mediated T cell suppression. *Cell Immunol.* 306-307, 17-24.

94. Lippi, G., Aloe, R., Avanzinia, P., Banfib, G., 2015. Measurement of iron in serum and EDTA plasma for screening of blood transfusion in sports. *Drug Test. Analysis.* 7, 253–254.
95. Leuenberger, N., Barras, L., Nicoli, R., Robinson, N., Baume, N., Lion, N., Barelli, S., Tissot, J.D., Saugy, M., 2016. Heparin as a new biomarker for detecting autologous blood transfusion. *American Journal of Hematology.* 91, 5.
96. Lainé, F., Laviolle, B., Ropert, M., Bouguen, G., Morcet, J., Hamon, C., Massart, C., Westermann, M., Deugnier, Y., Loralé O., 2012. Early effects of erythropoietin on serum hepcidin and serum iron bioavailability in healthy volunteers. *Eur J Appl Physiol.* 112, 1391-7.
97. Jelkmann, W., 2015. The ESA scenario gets complex: from biosimilar epoetins to activin traps, *Nephrol Dial Transplant.* 30, 553-9.
98. Abbas, I.M., Hoffmann, H., Montes-Bayón, M., Weller, M.G., 2018. Improved LC-MS/MS method for the quantification of hepcidin-25 in clinical samples. *Anal Bioanal Chem.* 410, 3835-3846.
99. Kautz, L., Jung, G., Valore, E.V., Rivella, S., Nemeth, E., Ganz, T., 2014. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* 46, 678-84.
100. Honda, H., Kobayashi, Y., Onuma, S., Shibagaki, K., Yuza, T., Hirao, K., Yamamoto, T., Tomosugi, N., Shibata, T., 2016. Associations among Erythroferrone and Biomarkers of Erythropoiesis and Iron Metabolism, and Treatment with Long-Term Erythropoiesis-Stimulating Agents in Patients on Hemodialysis. *PLoS One.* 11, e0151601.
101. Μαρσέλος, Μ., 2006. Συνοπτική Φαρμακολογία. Τόμος Ι. Ακαδημαϊκό Σύγγραμμα Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
102. Mandel, H.G., Way, E.L., 1979. *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition.* Melbourne: Krieger Publishing Company. p.179.
103. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Gardner, P., 2011. *Pharmacology.* New York: Churchill Livingstone. 7th edition.
104. Walsh, C.T.R., Schwartz-Bloom, R.D., 2004. *Pharmacology: Drug Actions and Reactions.* Taylor & Francis.
105. Hoffmeister, T., Schwenke, D., Krug, O., Wachsmuth, N., Geyer, H., Thevis, M., Byrnes, W.C., Schmidt, W.F.J., 2018. Effects of 3 weeks of oral low dose cobalt. *Front Physiol.* 9, 1289.
106. Snow, D.H., 1993. Anabolic steroids. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 563-576.

- 107.** Reynolds, J.E.F., 2002. Martindale-the Extra Pharmacopoeia. 33rd edition. London, UK: Pharmaceutical Press.
- 108.** Casavant, M.J., Blake, K., Griffith, J., Yates, A., Copley, M., 2007. Consequences of Use of Anabolic Androgenic Steroids. *Pediatr Clin N Am.* 54, 677–690.
- 109.** Strano-Rossi, S., Fiore, C., Chiarotti, M., Centini, F., 2011. Analytical Techniques in Androgen Anabolic Steroids (AASs) Analysis for Antidoping and Forensic Purposes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 11, 451-458.
- 110.** Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 813–827.
- 111.** Parr, M.K., Muller-Scholl, A., 2018. Pharmacology of doping agents-mechanisms promoting muscle hypertrophy. *AIMS Molecular Science.* 5(2):131-159.
- 112.** Lippi, G., Franchini, M., Banfi, G., 2011. Biochemistry and Physiology of Anabolic Androgenic Steroids Doping. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 11, 362-373.
- 113.** Nieschlag, E., Vorona, E., 2015. Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions. *European Journal of Endocrinology.* 173, R47–R58.
- 114.** <https://www.drugs.com/international/normethandrone.html> (accessed 1 June 2020).
- 115.** Sakellariou, P., Kiouisi, P., Fragkaki, A.G., Lyris, E., Petrou, M., Georgakopoulos, C., Angelis, Y.S., 2020. Alternative markers for Methylnortestosterone misuse in human urine. *Drug Test Anal.* doi: 10.1002/dta.2887.
- 116.** Yu, N.H., Ho, E.N.M., Leung, D.K.K., Wan, T.S.M., 2005. Screening of anabolic steroids in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 37, 1031-1038.
- 117.** Parr, M.K., Opfermann, G., Schanzer, W., 2006. Detection of new 17-alkylated anabolic steroids on WADA 2006 list. In: *Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of Manfred Donike Workshop on Dope Analysis.* Köln, Sportverlag Strauss.
- 118.** Parr, M.K., Fußhöller, G., Gütschow, M, Hess, C., Schänzer, W., 2010. GC-MS(/MS) investigations on long-term metabolites of 17-methyl steroids. In: *Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of Manfred Donike Workshop on Dope Analysis.* Köln, Sportverlag Strauss.
- 119.** Chundela, Z., Große, J., 2013. Metabolites of methylnortestosterone, In: *Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of Manfred Donike Workshop on Dope Analysis.* Köln, Sportverlag Strauss.

- 120.** Thevis, M., and Schänzer, W., 2010. Synthetic anabolic agents: steroids and nonsteroidal selective androgen receptor modulators. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 195, 99-126.
- 121.** Choi, S.M., Lee, B.M., 2015. Comparative safety evaluation of selective androgen receptor modulators and anabolic androgenic steroids. *Expert Opin Drug Saf.* 14, 1773–1785.
- 122.** Thevis, M., and Schänzer, W., 2010. Detection of SARMS in doping control analysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 464, 34-45.
- 123.** Fragkaki, A.G., Sakellariou, P., Kiousi, P., Kioukia-Fougia, N., Tsivou, M., Petrou, M., Angelis, Y., 2018. Human in vivo metabolism study of LGD-4033. *Drug Test Anal.* 10, 1635-1645.
- 124.** Geldof, L., Pozo, O.J., Lootens, L., Morthier, W., Van Eenoo, P., Deventer, K., 2016. In vitro metabolism study of a black market product containing SARM LGD-4033. *Drug Test. Anal.* doi/10.1002/dta.1930.
- 125.** Thevis, M., Lagojda, A., Kuehne, D., Thomas, A., Dib, J., Hansson, A., Hedelnad, M., Bondesson, U., Wigger, T., Karst, U., Schanzer, W., 2015. Characterization of a non-approved selective androgen receptor modulator drug candidate sold via the Internet and identification of in vitro generated phase-I metabolites for human sports drug testing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29, 991-9.
- 126.** Sobolevsky, T., Dikunets, M., Dudko, G., Rodchenkov, G., 2015. Metabolism study of the selective androgen receptor modulator LGD-4033, in: W.Schanzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck (Eds.), *Recent Adv. Doping Anal, Sport & Strauss*, Cologne.
- 127.** Cox, H.D., Eichner, D., 2017. Detection of LGD-4033 and its metabolites in athlete urine samples. *Drug Test. Anal.* 9, 127-34.
- 128.** Hansson, A., Knych, H., Stanley, S., Berntson, E., Jackson, L., Bondesson, U., Thevis, M., Hedeland, M., 2018. Equine in vivo-derived metabolites of the SARM LGD-4033 and comparison with human and fungal metabolites *J. Chromatogr. B.* 1074-1075, 91-8.
- 129.** Sgrò, P., Sansone, M., Sansone, A., Romanelli, F., Di Luigi, L., 2008. Effects of erythropoietin abuse on exercise performance. *Phys Sportsmed.* 46, 105-115.
- 130.** Arcasoy, M.O., 2008. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol.* 141, 14-31.
- 131.** Sytkowski, A.J., 2007. Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells. *Sci STKE.* pe38.

- 132.** Ekblom, B., Berglund, B., 1991. Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power in man. *Scand J Med Sci Sports.* 1, 88-93.
- 133.** Thomsen, J.J., Rentsch, R.L., Robach, P., 2007. Prolonged administration of recombinant human erythropoietin increases submaximal performance more than maximal aerobic capacity. *Eur J Appl Physiol.* 101, 481-486.
- 134.** Skibeli, V., Nissen-Lie, G., and Torjesen, P., 2001. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood.* 98, 3626-34.
- 135.** Macdougall, I.C., Roberts, D.E., Coles, G.A. and Williams, J.D., 1991. Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin). *Clin Pharmacokinet.* 20, 99-113.
- 136.** Egrie, J.C., Dwyer, E., Browne, J.K., Hitz, A. and Lykos, M.A., 2003. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol.* 31, 290-9.
- 137.** Macdougall, I.C., Robson, R., Opatrna, S., Liogier, X., Pannier, A., Jordan, P., Dougherty, F.C. and Reigner, B., 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 1, 1211-5.
- 138.** Stead, R.B., Lambert, J., Wessels, D., 2006. Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1, double-blind, placebo-controlled, doseescalation study in healthy volunteers. *Blood.* 108, 1830-1834.
- 139.** Lamon, S., Robinson, N., Sottas, P.E., 2007. Possible origins of undetectable EPO in urine samples. *Clin Chim Acta.* 385, 61-66.
- 140.** Thevis, M., Maurer, J., Kohler, M., Geyer, H., Schanzer, W., 2007. Proteases in doping control analysis. *Int J Sports Med.* 28, 545-549.
- 141.** Johnson, M., 2006. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 117, 18-24.
- 142.** Fragkaki, A.G., Georgakopoulos, C., Sterk, S., Nielen, M.W.F., 2013. Sports doping: Emerging designer and therapeutic β 2-agonists. *Clinica Chimica Acta.* 425, 242-258.

- 143.** Wolfart, B., Wuestenfeld, J.C., Kindermann, W., 2010. Ergogenic Effects of Inhaled β 2Agonists in Non-Asthmatic Athletes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 39, 75-87.
- 144.** Deventer, K., Pozo, O.J., Delbeke, F.T., Van Eenoo, I.P., 2011. Quantitative detection of inhaled salmeterol in human urine and relevance to doping control analysis. *Ther Drug Monit*. 33, 627-631.
- 145.** Anderson, S.D., Fitch, K., Perry, C.P., Sue-Chu, M., Crapo, R., McKenzie, D., Magnussen, H., 2003. Responses to bronchial challenge submitted for approval to use inhaled beta2-agonists before an event at the 2002 Winter Olympics. *J Allergy Clin Immunol*. 111, 45-50.
- 146.** Cazzola, M., Testi, R., Matera, M.G., 2002. Clinical pharmacokinetics of salmeterol. *Clin Pharmacokinet*. 41, 19-30.
- 147.** Hostrup, M., Kalsen, A., Elers, J., Henninge, J., Hemmersbach, P., Dalhoff, K, Pedersen, L., Backer, V., 2012. Urine concentrations of inhaled salmeterol and its metabolite α -hydroxysalmeterol in asthmatic and non-asthmatic subjects. *Journal of Sports Medicine and Doping Studies*. 2, 2.
- 148.** Jacobson, G.A., Hostrup, M., Narkowicz, C.K., Nichols, D.S., Haydn Walters, E., 2017. Enantioselective disposition of (R)-salmeterol and (S)-salmeterol in urine following inhaled dosing and application to doping control. *Drug Test Anal*. 9, 1262-1266.
- 149.** Soulele, K., Macheras, P., Silvestro, L., Rizea Savu, S., Karalis, V., 2015. Population pharmacokinetics of fluticasone propionate/salmeterol using two different dry powder inhalers. *Eur J Pharm Sci*. 80, 33-42.
- 150.** Korpi-Steiner, N.L., Netzel, B.C., Seegmiller, J.C., Hagan, J.B., Singh, R.J., 2010. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urinary fluticasone propionate-17 β -carboxylic acid for monitoring compliance with inhaled-fluticasone propionate therapy. *Steroids*. 75, 77-82.
- 151.** Callejas, S.L., Biddlecombe, R.A., Jones, A.E., Joyce, K.B., Pereira, Al., Pleasance, S., 1998. Determination of the glucocorticoid fluticasone propionate in plasma by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 718, 243-50.
- 152.** Byrro, R.M., César, I.C., de Santana e Silva Cardoso, F.F., Mundim, I.M., Teixeira, L. de S., Bonfim, R.R., Gomes, S.A., Pianetti, G.A., 2012. A rapid and sensitive HPLC-APCI-MS/MS method determination of fluticasone in human plasma: application for a bioequivalency study in nasal spray formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 61, 38-43.

- 153.** Capka, V., Carter, S.J., 2007. Minimizing matrix effects in the development of a method for the determination of salmeterol in human plasma by LC/MS/MS at low pg/mL concentration levels. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 856, 285-293.
- 154.** Carter, S.J., Cápka, V., 2008. Investigation of interaction between salmeterol and fluticasone propionate and its effect on quantitative accuracy of an LC/MS/MS assay in human plasma at low pg/mL concentrations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 876, 163-169.
- 155.** Shahani, S., Braga-Basaria, M., Maggio, M., Basaria, S., 2009. Androgens and erythropoiesis: past and present. *J Endocrinol Invest.* 32, 704-716.
- 156.** Hartgens, F., Kuipers, H., 2004. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sports Med.* 34, 513-54.
- 157.** Hasan, S., Mosier, M.J., Szilagyi, A., Gamelli, R.L., Muthumalaiappan, K., 2017. Discrete β -adrenergic Mechanisms Regulate Early and Late Erythropoiesis in Erythropoietin-Resistant Anemia. *Surgery.* 162(4):901-916.
- 158.** Miller, J.C., Miller, J.N., 2005. *Statistics for Analytical Chemistry*, 5th edition, Ellis Horwood, Chichester, England.
- 159.** Eurachem, 2014. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, second edition.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΥΗΡΛC-MS ΜΕΘΟΔΟΥ

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στα ούρα 1^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	5.633	22.397	0,25	0,10	-1,6
STD1_A2	0,10	5.450	21.500	0,25	0,10	-0,2
STD1_B1	0,10	4.668	19.648	0,24	0,09	-11,0
STD1_B2	0,10	5.411	20.721	0,26	0,10	4,9
Mean		5291	21067	0,25	0,10	
% RSD		8,1	5,5	3,9	6,8	-2,0
STD2_A1	0,25	8.800	19.021	0,46	0,24	-3,7
STD2_A2	0,25	10.124	19.834	0,51	0,27	9,2
STD2_B1	0,25	8.259	18.405	0,45	0,23	-7,4
STD2_B2	0,25	8.205	18.871	0,43	0,22	-11,2
Mean		8847	19033	0,46	0,24	
% RSD		10,1	3,1	7,1	9,2	-3,3
STD3_A1	0,50	15.992	18.795	0,85	0,50	0,5
STD3_A2	0,50	14.193	19.191	0,74	0,43	-14,5
STD3_B1	0,50	16.138	18.792	0,86	0,51	1,6
STD3_B2	0,50	14.853	16.384	0,91	0,54	8,0
Mean		15294	18290	0,84	0,49	
% RSD		6,1	7,0	8,4	9,6	-1,1
STD4_A1	1,00	23.844	15.165	1,57	0,99	-1,1
STD4_A2	1,00	25.198	15.336	1,64	1,04	3,7
STD4_B1	1,00	27.985	17.480	1,60	1,01	0,8
STD4_B2	1,00	30.649	18.091	1,69	1,07	7,1
Mean		26919	16518	1,63	1,03	
% RSD		11,2	9,0	3,3	3,5	2,6
STD5_A1	2,00	50.967	16.214	3,14	2,05	2,4
STD5_A2	2,00	48.868	16.890	2,89	1,88	-6,0
STD5_B1	2,00	52.876	16.386	3,23	2,10	5,2
STD5_B2	2,00	48.646	16.438	2,96	1,92	-3,8
Mean		50339	16482	3,06	1,99	
% RSD		3,9	1,7	5,1	5,3	-0,5

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	7.247	15.537	0,47	0,24	-2,7
CTRL1_A2	0,25	8.313	16.165	0,51	0,28	10,2
CTRL1_B1	0,25	5.768	13.181	0,44	0,22	-10,4
CTRL1_B2	0,25	6.430	14.213	0,45	0,23	-6,4
CTRL1_C1	0,25	6.493	14.162	0,46	0,24	-4,8
CTRL1_C2	0,25	5.428	11.147	0,49	0,26	2,9
Mean		6613	14068	0,47	0,25	
% RSD		15,8	12,7	5,8	7,5	-1,9
CTRL2_A1	1,00	21.233	14.345	1,48	0,93	-7,3
CTRL2_A2	1,00	21.586	14.651	1,47	0,92	-7,8
CTRL2_B1	1,00	19.340	12.128	1,59	1,00	0,4
CTRL2_B2	1,00	16.046	10.045	1,60	1,01	0,6
CTRL2_C1	1,00	18.307	10.690	1,71	1,08	8,4
CTRL2_C2	1,00	21.417	12.498	1,71	1,08	8,4
Mean		19655	12393	1,60	1,00	
% RSD		11,2	15,1	6,6	7,1	0,5
CTRL3_A1	2,00	41.314	12.456	3,32	2,17	8,3
CTRL3_A2	2,00	42.177	14.101	2,99	1,95	-2,7
CTRL3_B1	2,00	36.046	12.299	2,93	1,91	-4,7
CTRL3_B2	2,00	39.773	12.579	3,16	2,06	3,0
CTRL3_C1	2,00	39.073	12.754	3,06	1,99	-0,3
CTRL3_C2	2,00	38.731	12.037	3,22	2,10	4,9
Mean		39519	12704	3,11	2,03	
% RSD		5,5	5,7	4,7	4,8	1,4

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στα ούρα 2^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	14.476	51.688	0,28	0,11	7,8
STD1_A2	0,10	11.306	42.967	0,26	0,10	-4,7
STD1_B1	0,10	11.308	42.146	0,27	0,10	-0,9
STD1_B2	0,10	10.459	36.462	0,29	0,11	12,8
Mean		11887	43316	0,27	0,10	
% RSD		14,9	14,5	3,9	7,7	3,7
STD2_A1	0,25	15.778	31.943	0,49	0,27	6,1
STD2_A2	0,25	12.236	27.835	0,44	0,23	-9,9
STD2_B1	0,25	12.018	24.763	0,49	0,26	3,6
STD2_B2	0,25	11.155	21.928	0,51	0,28	10,5
Mean		12797	26617	0,48	0,26	
% RSD		16,0	16,1	6,2	8,6	2,6
STD3_A1	0,50	20.272	23.367	0,87	0,54	8,1
STD3_A2	0,50	16.732	22.532	0,74	0,45	-10,3
STD3_B1	0,50	15.424	21.516	0,72	0,43	-14,1
STD3_B2	0,50	16.538	22.840	0,72	0,43	-13,0
Mean		17242	22564	0,76	0,46	
% RSD		12,2	3,5	9,3	11,2	-7,3
STD4_A1	1,00	28.958	18.832	1,54	1,03	3,4
STD4_A2	1,00	27.452	19.102	1,44	0,96	-4,0
STD4_B1	1,00	35.448	21.297	1,66	1,13	12,8
STD4_B2	1,00	32.175	21.136	1,52	1,02	2,3
Mean		31008	20092	1,54	1,04	
% RSD		11,5	6,5	6,1	6,7	3,6
STD5_A1	2,00	55.797	21.212	2,63	1,84	-8,0
STD5_A2	2,00	55.367	19.031	2,91	2,04	2,2
STD5_B1	2,00	59.376	19.543	3,04	2,14	7,0
STD5_B2	2,00	54.795	19.850	2,76	1,94	-3,2
Mean		56334	19909	2,83	1,99	
% RSD		3,7	4,7	6,3	6,6	-0,5
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	8.857	19.925	0,44	0,23	-8,4
CTRL1_A2	0,25	9.234	19.239	0,48	0,26	2,0
CTRL1_B1	0,25	7.765	15.362	0,51	0,27	9,5
CTRL1_B2	0,25	6.936	14.629	0,47	0,25	0,3
CTRL1_C1	0,25	6.848	15.308	0,45	0,23	-7,6
CTRL1_C2	0,25	6.084	12.580	0,48	0,26	3,1
Mean		7621	16174	0,47	0,25	
% RSD		16,2	17,5	4,9	6,8	-0,2
CTRL2_A1	1,00	23.670	15.636	1,51	1,02	1,7
CTRL2_A2	1,00	24.732	18.970	1,30	0,86	-13,8
CTRL2_B1	1,00	22.250	13.351	1,67	1,13	12,9
CTRL2_B2	1,00	20.969	12.540	1,67	1,13	13,3
CTRL2_C1	1,00	22.987	13.906	1,65	1,12	11,9
CTRL2_C2	1,00	22.162	14.078	1,57	1,06	6,1
Mean		22795	14747	1,56	1,05	
% RSD		5,7	15,6	9,1	9,9	5,4
CTRL3_A1	2,00	43.939	14.597	3,01	2,12	6,0
CTRL3_A2	2,00	44.971	15.566	2,89	2,03	1,5
CTRL3_B1	2,00	43.057	14.285	3,01	2,12	6,1
CTRL3_B2	2,00	40.004	14.267	2,80	1,97	-1,6
CTRL3_C1	2,00	38.550	12.069	3,19	2,25	12,7
CTRL3_C2	2,00	22.443	7.673	2,92	2,06	2,8
Mean		38827	13076	2,97	2,09	
% RSD		21,6	22,1	4,5	4,7	4,6

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στα ούρα 3^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	4.996	14.374	0,35	0,10	0,8
STD1_A2	0,10	3.891	11.499	0,34	0,09	-5,7
STD1_B1	0,10	4.078	11.210	0,36	0,11	12,3
STD1_B2	0,10	4.174	11.370	0,37	0,11	14,7
Mean		4285	12113	0,35	0,11	
% RSD		11,4	12,5	3,8	9,1	5,5
STD2_A1	0,25	5.199	9.148	0,57	0,26	3,0
STD2_A2	0,25	4.457	8.355	0,53	0,23	-6,9
STD2_B1	0,25	6.131	10.983	0,56	0,25	0,1
STD2_B2	0,25	5.721	11.135	0,51	0,22	-12,5
Mean		5377	9905	0,54	0,24	
% RSD		13,4	13,9	4,5	7,3	-4,1
STD3_A1	0,50	8.663	8.678	1,00	0,56	12,6
STD3_A2	0,50	8.141	8.227	0,99	0,56	11,3
STD3_B1	0,50	8.925	8.953	1,00	0,56	12,4
STD3_B2	0,50	8.565	10.153	0,84	0,45	-9,4
Mean		8574	9003	0,96	0,53	
% RSD		3,8	9,1	7,9	10,1	6,7
STD4_A1	1,00	15.386	9.580	1,61	0,99	-0,6
STD4_A2	1,00	13.830	9.075	1,52	0,94	-6,4
STD4_B1	1,00	13.071	8.599	1,52	0,93	-6,7
STD4_B2	1,00	12.094	7.739	1,56	0,96	-3,6
Mean		13595	8748	1,55	0,96	
% RSD		10,2	9,0	2,6	3,0	-4,3
STD5_A1	2,00	24.213	7.652	3,16	2,10	5,0
STD5_A2	2,00	24.380	8.071	3,02	2,00	-0,1
STD5_B1	2,00	23.689	7.683	3,08	2,04	2,2
STD5_B2	2,00	21.271	7.335	2,90	1,91	-4,3
Mean		23388	7685	3,04	2,01	
% RSD		6,2	3,9	3,7	3,9	0,7
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	3.901	7.527	0,52	0,22	-11,2
CTRL1_A2	0,25	4.953	8.214	0,60	0,28	12,9
CTRL1_B1	0,25	4.194	7.251	0,58	0,26	5,9
CTRL1_B2	0,25	3.815	7.185	0,53	0,23	-7,6
CTRL1_C1	0,25	4.094	6.892	0,59	0,28	10,3
CTRL1_C2	0,25	4.710	8.045	0,59	0,27	7,9
Mean		4278	7519	0,57	0,26	
% RSD		10,7	6,9	6,2	9,7	3,0
CTRL2_A1	1,00	14.938	9.421	1,59	0,98	-2,0
CTRL2_A2	1,00	13.472	8.722	1,54	0,95	-4,9
CTRL2_B1	1,00	12.067	6.803	1,77	1,11	11,4
CTRL2_B2	1,00	12.834	8.511	1,51	0,92	-7,5
CTRL2_C1	1,00	13.396	8.299	1,61	1,00	0,0
CTRL2_C2	1,00	12.387	7.392	1,68	1,04	4,4
Mean		13182	8191	1,62	1,00	
% RSD		7,7	11,5	5,9	6,8	0,2
CTRL3_A1	2,00	20.812	6.728	3,09	2,05	2,5
CTRL3_A2	2,00	21.239	7.987	2,66	1,74	-12,9
CTRL3_B1	2,00	19.540	6.832	2,86	1,88	-5,8
CTRL3_B2	2,00	21.316	6.494	3,28	2,18	9,2
CTRL3_C1	2,00	25.740	8.804	2,92	1,93	-3,5
CTRL3_C2	2,00	25.644	8.247	3,11	2,06	3,1
Mean		22382	7515	2,99	1,98	
% RSD		11,8	12,7	7,3	7,9	-1,2

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στα ούρα 4^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	5.940	25.464	0,23	0,11	12,6
STD1_A2	0,10	3.704	15.739	0,24	0,11	14,0
STD1_B1	0,10	3.249	14.461	0,22	0,11	6,8
STD1_B2	0,10	3.002	13.503	0,22	0,11	5,3
Mean		3974	17292	0,23	0,11	
% RSD		33,8	31,9	2,8	3,9	9,7
STD2_A1	0,25	5.617	11.957	0,47	0,27	8,4
STD2_A2	0,25	5.400	11.875	0,45	0,26	4,4
STD2_B1	0,25	5.856	13.406	0,44	0,25	-0,4
STD2_B2	0,25	5.751	13.402	0,43	0,24	-2,5
Mean		5656	12660	0,45	0,26	
% RSD		3,5	6,8	4,1	4,8	2,5
STD3_A1	0,50	9.416	12.583	0,75	0,46	-8,4
STD3_A2	0,50	10.308	12.556	0,82	0,51	1,3
STD3_B1	0,50	10.117	11.812	0,86	0,53	6,1
STD3_B2	0,50	8.375	10.266	0,82	0,50	0,6
Mean		9554	11804	0,81	0,50	
% RSD		9,2	9,2	5,6	6,1	-0,1
STD4_A1	1,00	14.668	10.027	1,46	0,94	-6,3
STD4_A2	1,00	17.344	12.108	1,43	0,92	-8,4
STD4_B1	1,00	19.322	12.687	1,52	0,98	-2,3
STD4_B2	1,00	18.763	11.426	1,64	1,06	5,7
Mean		17524	11562	1,52	0,97	
% RSD		11,9	9,9	6,1	6,4	-2,8
STD5_A1	2,00	34.708	11.811	2,94	1,93	-3,7
STD5_A2	2,00	33.958	11.393	2,98	1,95	-2,3
STD5_B1	2,00	29.545	9.237	3,20	2,10	5,0
STD5_B2	2,00	28.672	9.077	3,16	2,07	3,7
Mean		31721	10379	3,07	2,01	
% RSD		9,6	13,7	4,2	4,3	0,7
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	4.833	10.163	0,48	0,27	10,0
CTRL1_A2	0,25	4.243	9.888	0,43	0,24	-2,5
CTRL1_B1	0,25	5.231	10.908	0,48	0,28	11,1
CTRL1_B2	0,25	4.584	10.528	0,44	0,25	-0,8
CTRL1_C1	0,25	4.575	10.505	0,44	0,25	-0,7
CTRL1_C2	0,25	4.514	10.487	0,43	0,24	-2,1
Mean		4663	10413	0,45	0,26	
% RSD		7,2	3,4	5,2	6,1	2,5
CTRL2_A1	1,00	18.272	12.470	1,47	0,94	-6,2
CTRL2_A2	1,00	20.201	12.023	1,68	1,08	8,2
CTRL2_B1	1,00	17.858	11.602	1,54	0,99	-1,2
CTRL2_B2	1,00	18.550	11.288	1,64	1,06	5,8
CTRL2_C1	1,00	19.355	12.832	1,51	0,97	-3,3
CTRL2_C2	1,00	15.256	10.689	1,43	0,91	-8,7
Mean		18249	11817	1,54	0,99	
% RSD		9,2	6,7	6,4	6,7	-0,9
CTRL3_A1						
CTRL3_A2						
CTRL3_B1	2,00	31.383	10.259	3,06	2,01	0,3
CTRL3_B2	2,00	32.715	10.542	3,10	2,04	1,8
CTRL3_C1	2,00	26.594	8.232	3,23	2,12	6,1
CTRL3_C2	2,00	23.041	6.972	3,30	2,17	8,5
Mean		28433	9001	3,17	2,08	
% RSD		15,7	18,9	3,6	3,6	4,2

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στα ούρα 5^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	6.052	30.651	0,20	0,10	-4,1
STD1_A2	0,10	4.751	24.318	0,20	0,09	-5,4
STD1_B1	0,10	4.655	22.461	0,21	0,10	1,8
STD1_B2	0,10	3.641	18.167	0,20	0,10	-2,3
Mean		4775	23899	0,20	0,10	-2,5
% RSD		20,7	21,7	2,6	3,2	
STD2_A1	0,25	7.876	16.845	0,47	0,26	4,0
STD2_A2	0,25	7.228	16.048	0,45	0,25	-0,2
STD2_B1	0,25	7.428	16.990	0,44	0,24	-3,4
STD2_B2	0,25	7.526	15.957	0,47	0,26	5,0
Mean		7515	16460	0,46	0,25	1,3
% RSD		3,6	3,2	3,5	3,8	
STD3_A1	0,50	12.036	14.435	0,83	0,48	-3,5
STD3_A2	0,50	11.986	13.439	0,89	0,52	3,5
STD3_B1	0,50	13.017	15.469	0,84	0,49	-2,6
STD3_B2	0,50	11.700	13.142	0,89	0,52	3,3
Mean		12185	14121	0,86	0,50	0,2
% RSD		4,7	7,5	3,6	3,8	
STD4_A1	1,00	22.900	13.672	1,67	0,99	-0,7
STD4_A2	1,00	23.054	14.603	1,58	0,93	-6,5
STD4_B1	1,00	25.045	14.302	1,75	1,04	4,0
STD4_B2	1,00	27.013	15.694	1,72	1,02	2,2
Mean		24503	14568	1,68	1,00	-0,3
% RSD		7,9	5,8	4,5	4,6	
STD5_A1	2,00	44.364	14.176	3,13	1,88	-6,1
STD5_A2	2,00	47.597	14.871	3,20	1,92	-4,0
STD5_B1	2,00	45.177	12.891	3,50	2,10	5,2
STD5_B2	2,00	45.171	12.915	3,50	2,10	5,0
Mean		45577	13713	3,33	2,00	0,0
% RSD		3,1	7,1	5,9	6,0	
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	7.717	17.782	0,43	0,24	-4,2
CTRL1_A2	0,25	7.659	17.397	0,44	0,24	-2,7
CTRL1_B1	0,25	9.005	21.450	0,42	0,23	-7,6
CTRL1_B2	0,25	8.905	19.904	0,45	0,25	-0,9
CTRL1_C1	0,25	8.040	17.042	0,47	0,26	5,0
CTRL1_C2	0,25	8.419	18.567	0,45	0,25	0,6
Mean		8291	18690	0,44	0,25	-1,6
% RSD		7,0	9,1	4,0	4,4	
CTRL2_A1	1,00	33.969	21.567	1,58	0,93	-6,7
CTRL2_A2	1,00	36.784	21.560	1,71	1,01	1,2
CTRL2_B1	1,00	34.791	21.937	1,59	0,94	-6,1
CTRL2_B2	1,00	35.814	21.868	1,64	0,97	-2,9
CTRL2_C1	1,00	39.035	22.726	1,72	1,02	1,9
CTRL2_C2	1,00	37.527	22.153	1,69	1,00	0,5
Mean		36320	21969	1,65	0,98	-2,0
% RSD		5,1	2,0	3,8	3,9	
CTRL3_A1	2,00	81.890	26.598	3,08	1,85	-7,7
CTRL3_A2	2,00	81.991	27.250	3,01	1,80	-9,8
CTRL3_B1	2,00	77.079	24.875	3,10	1,86	-7,1
CTRL3_B2	2,00	78.978	26.130	3,02	1,81	-9,4
CTRL3_C1	2,00	72.211	21.332	3,39	2,03	1,6
CTRL3_C2	2,00	70.920	22.047	3,22	1,93	-3,5
Mean		77178	24705	3,14	1,88	-6,0
% RSD		6,1	10,0	4,6	4,6	

Καμπύλη αναφοράς α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα 1^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	1,00	23.820	22.397	1,06	1,00	-0,1
STD1_A2	1,00	23.842	21.500	1,11	1,05	4,8
STD1_B1	1,00	20.606	19.648	1,05	0,98	-1,8
STD1_B2	1,00	22.716	20.721	1,10	1,03	3,4
Mean		22746	21067	1,08	1,02	
% RSD		6,7	5,5	2,6	3,0	1,6
STD2_A1	2,50	52.505	19.021	2,76	2,84	13,7
STD2_A2	2,50	48.004	19.834	2,42	2,47	-1,1
STD2_B1	2,50	48.440	18.405	2,63	2,70	8,1
STD2_B2	2,50	47.000	18.871	2,49	2,55	2,0
Mean		48987	19033	2,58	2,64	
% RSD		4,9	3,1	5,9	6,2	5,7
STD3_A1	5,00	78.454	18.795	4,17	4,38	-12,4
STD3_A2	5,00	80.493	19.191	4,19	4,40	-12,0
STD3_B1	5,00	82.511	18.792	4,39	4,61	-7,7
STD3_B2	5,00	78.393	16.384	4,78	5,04	0,8
Mean		79963	18290	4,39	4,61	
% RSD		2,5	7,0	6,5	6,7	-7,8
STD4_A1	10,00	154.410	15.165	10,18	10,91	9,1
STD4_A2	10,00	154.227	15.336	10,06	10,77	7,7
STD4_B1	10,00	157.058	17.480	8,99	9,61	-3,9
STD4_B2	10,00	168.313	18.091	9,30	9,95	-0,5
Mean		158502	16518	9,63	10,31	
% RSD		4,2	9,0	6,0	6,1	3,1
STD5_A1	20,00	318.380	16.214	19,64	21,18	5,9
STD5_A2	20,00	314.917	16.890	18,65	20,10	0,5
STD5_B1	20,00	292.623	16.386	17,86	19,25	-3,8
STD5_B2	20,00	292.363	16.438	17,79	19,17	-4,2
Mean		304571	16482	18,48	19,92	
% RSD		4,6	1,7	4,7	4,7	-0,4
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	2,50	42.136	15.537	2,71	2,79	11,6
CTRL1_A2	2,50	41.266	16.165	2,55	2,62	4,7
CTRL1_B1	2,50	36.657	13.181	2,78	2,86	14,6
CTRL1_B2	2,50	38.696	14.213	2,72	2,80	12,1
CTRL1_C1	2,50	35.014	14.162	2,47	2,53	1,2
CTRL1_C2	2,50	30.056	11.147	2,70	2,77	10,9
Mean		37304	14068	2,66	2,73	
% RSD		11,9	12,7	4,4	4,7	9,2
CTRL2_A1	10,00	132.305	14.345	9,22	9,86	-1,4
CTRL2_A2	10,00	152.339	14.651	10,40	11,14	11,4
CTRL2_B1	10,00	126.187	12.128	10,40	11,15	11,5
CTRL2_B2	10,00	105.413	10.045	10,49	11,25	12,5
CTRL2_C1	10,00	109.339	10.690	10,23	10,96	9,6
CTRL2_C2	10,00	125.774	12.498	10,06	10,78	7,8
Mean		125226	12393	10,14	10,86	
% RSD		13,5	15,1	4,7	4,7	8,6
CTRL3_A1	20,00	257.593	12.456	20,68	22,31	11,6
CTRL3_A2	20,00	270.151	14.101	19,16	20,66	3,3
CTRL3_B1	20,00	247.028	12.299	20,09	21,67	8,3
CTRL3_B2	20,00	236.299	12.579	18,79	20,26	1,3
CTRL3_C1	20,00	246.902	12.754	19,36	20,88	4,4
CTRL3_C2	20,00	242.927	12.037	20,18	21,77	8,9
Mean		250150	12704	19,71	21,26	
% RSD		4,8	5,7	3,7	3,7	6,3

Καμπύλη αναφοράς α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα 2^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	1,00	67.072	51.688	1,30	0,93	-7,0
STD1_A2	1,00	54.125	42.967	1,26	0,89	-11,1
STD1_B1	1,00	56.104	42.146	1,33	0,97	-3,4
STD1_B2	1,00	49.027	36.462	1,34	0,98	-1,9
Mean		56582	43316	1,31	0,94	
% RSD		13,4	14,5	2,9	4,3	-5,9
STD2_A1	2,50	77.922	31.943	2,44	2,16	-13,5
STD2_A2	2,50	73.091	27.835	2,63	2,36	-5,5
STD2_B1	2,50	69.717	24.763	2,82	2,57	2,7
STD2_B2	2,50	65.226	21.928	2,97	2,74	9,6
Mean		71489	26617	2,71	2,46	
% RSD		7,5	16,1	8,5	10,2	-1,7
STD3_A1	5,00	112.452	23.367	4,81	4,72	-5,5
STD3_A2	5,00	108.064	22.532	4,80	4,70	-5,9
STD3_B1	5,00	114.241	21.516	5,31	5,26	5,2
STD3_B2	5,00	103.790	22.840	4,54	4,43	-11,3
Mean		109637	22564	4,87	4,78	
% RSD		4,3	3,5	6,6	7,2	-4,4
STD4_A1	10,00	198.396	18.832	10,54	10,90	9,0
STD4_A2	10,00	198.218	19.102	10,38	10,73	7,3
STD4_B1	10,00	213.335	21.297	10,02	10,34	3,4
STD4_B2	10,00	206.991	21.136	9,79	10,10	1,0
Mean		204235	20092	10,18	10,51	
% RSD		3,6	6,5	3,3	3,5	5,1
STD5_A1	20,00	376.062	21.212	17,73	18,66	-6,7
STD5_A2	20,00	382.781	19.031	20,11	21,23	6,2
STD5_B1	20,00	370.573	19.543	18,96	19,99	0,0
STD5_B2	20,00	364.453	19.850	18,36	19,34	-3,3
Mean		373467	19909	18,79	19,81	
% RSD		2,1	4,7	5,4	5,5	-1,0
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	2,50	56.179	19.925	2,82	2,57	2,9
CTRL1_A2	2,50	52.570	19.239	2,73	2,48	-0,9
CTRL1_B1	2,50	47.138	15.362	3,07	2,84	13,6
CTRL1_B2	2,50	45.208	14.629	3,09	2,86	14,6
CTRL1_C1	2,50	41.054	15.308	2,68	2,42	-3,1
CTRL1_C2	2,50	35.608	12.580	2,83	2,58	3,4
Mean		46293	16174	2,87	2,63	
% RSD		16,2	17,5	6,0	7,0	5,1
CTRL2_A1	10,00	161.633	15.636	10,34	10,68	6,8
CTRL2_A2	10,00	179.536	18.970	9,46	9,74	-2,6
CTRL2_B1	10,00	143.221	13.351	10,73	11,10	11,0
CTRL2_B2	10,00	136.204	12.540	10,86	11,25	12,5
CTRL2_C1	10,00	140.658	13.906	10,11	10,44	4,4
CTRL2_C2	10,00	145.486	14.078	10,33	10,68	6,8
Mean		151123	14747	10,31	10,65	
% RSD		10,8	15,6	4,8	5,0	6,5
CTRL3_A1	20,00	293.396	14.597	20,10	21,22	6,1
CTRL3_A2	20,00	291.011	15.566	18,70	19,70	-1,5
CTRL3_B1	20,00	267.846	14.285	18,75	19,76	-1,2
CTRL3_B2	20,00	259.255	14.267	18,17	19,14	-4,3
CTRL3_C1	20,00	248.825	12.069	20,62	21,78	8,9
CTRL3_C2	20,00	161.867	7.673	21,10	22,29	11,5
Mean		253700	13076	19,57	20,65	
% RSD		19,0	22,1	6,1	6,2	3,2

Καμπύλη αναφοράς α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα 3^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	1,00	25.248	14.374	1,76	0,92	-7,5
STD1_A2	1,00	20.441	11.499	1,78	0,94	-6,0
STD1_B1	1,00	18.623	11.210	1,66	0,86	-14,5
STD1_B2	1,00	18.939	11.370	1,67	0,86	-14,2
Mean		20813	12113	1,72	0,89	
% RSD		14,7	12,5	3,5	4,9	-10,5
STD2_A1	2,50	33.434	9.148	3,65	2,32	-7,3
STD2_A2	2,50	31.585	8.355	3,78	2,41	-3,7
STD2_B1	2,50	45.366	10.983	4,13	2,67	6,6
STD2_B2	2,50	45.399	11.135	4,08	2,63	5,1
Mean		38946	9905	3,91	2,50	
% RSD		19,2	13,9	5,9	6,7	0,2
STD3_A1	5,00	68.480	8.678	7,89	5,42	8,5
STD3_A2	5,00	64.811	8.227	7,88	5,41	8,3
STD3_B1	5,00	67.576	8.953	7,55	5,17	3,4
STD3_B2	5,00	72.379	10.153	7,13	4,86	-2,7
Mean		68311	9003	7,61	5,22	
% RSD		4,6	9,1	4,7	5,0	4,4
STD4_A1	10,00	141.957	9.580	14,82	10,50	5,0
STD4_A2	10,00	137.309	9.075	15,13	10,73	7,3
STD4_B1	10,00	107.536	8.599	12,51	8,81	-11,9
STD4_B2	10,00	103.332	7.739	13,35	9,43	-5,7
Mean		122534	8748	13,95	9,87	
% RSD		16,2	9,0	8,9	9,2	-1,3
STD5_A1	20,00	206.613	7.652	27,00	19,43	-2,8
STD5_A2	20,00	207.456	8.071	25,70	18,48	-7,6
STD5_B1	20,00	223.529	7.683	29,09	20,97	4,8
STD5_B2	20,00	215.553	7.335	29,39	21,18	5,9
Mean		213288	7685	27,80	20,02	
% RSD		3,7	3,9	6,3	6,4	0,1
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	2,50	31.994	7.527	4,25	2,75	10,1
CTRL1_A2	2,50	29.792	8.214	3,63	2,30	-8,1
CTRL1_B1	2,50	25.119	7.251	3,46	2,18	-12,9
CTRL1_B2	2,50	25.251	7.185	3,51	2,21	-11,4
CTRL1_C1	2,50	29.211	6.892	4,24	2,74	9,8
CTRL1_C2	2,50	29.452	8.045	3,66	2,32	-7,2
Mean		28470	7519	3,79	2,42	
% RSD		9,6	6,9	9,4	10,8	-3,3
CTRL2_A1	10,00	121.004	9.421	12,84	9,05	-9,5
CTRL2_A2	10,00	119.122	8.722	13,66	9,65	-3,5
CTRL2_B1	10,00	109.310	6.803	16,07	11,42	14,2
CTRL2_B2	10,00	120.385	8.511	14,14	10,01	0,1
CTRL2_C1	10,00	108.730	8.299	13,10	9,24	-7,6
CTRL2_C2	10,00	104.727	7.392	14,17	10,02	0,2
Mean		113880	8191	14,00	9,90	
% RSD		6,2	11,5	8,2	8,5	-1,0
CTRL3_A1	20,00	194.932	6.728	28,97	20,88	4,4
CTRL3_A2	20,00	202.441	7.987	25,35	18,22	-8,9
CTRL3_B1	20,00	170.839	6.832	25,01	17,97	-10,1
CTRL3_B2	20,00	163.966	6.494	25,25	18,15	-9,3
CTRL3_C1	20,00	227.372	8.804	25,83	18,57	-7,1
CTRL3_C2	20,00	226.432	8.247	27,46	19,77	-1,2
Mean		197664	7515	26,31	18,93	
% RSD		13,6	12,7	6,0	6,1	-5,4

Καμπύλη αναφοράς α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα 4^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	1,00	44.768	25.464	1,76	0,86	-14,1
STD1_A2	1,00	27.540	15.739	1,75	0,85	-14,9
STD1_B1	1,00	25.441	14.461	1,76	0,86	-14,0
STD1_B2	1,00	24.656	13.503	1,83	0,93	-7,2
Mean		30601	17292	1,77	0,87	
% RSD		31,1	31,9	2,0	4,1	-12,6
STD2_A1	2,50	40.136	11.957	3,36	2,48	-0,9
STD2_A2	2,50	39.797	11.875	3,35	2,47	-1,1
STD2_B1	2,50	45.659	13.406	3,41	2,53	1,1
STD2_B2	2,50	44.253	13.402	3,30	2,42	-3,1
Mean		42461	12660	3,35	2,47	
% RSD		6,9	6,8	1,3	1,7	-1,0
STD3_A1	5,00	79.058	12.583	6,28	5,44	8,8
STD3_A2	5,00	71.061	12.556	5,66	4,81	-3,8
STD3_B1	5,00	67.785	11.812	5,74	4,89	-2,2
STD3_B2	5,00	59.316	10.266	5,78	4,93	-1,4
Mean		69305	11804	5,86	5,02	
% RSD		11,8	9,2	4,8	5,7	0,3
STD4_A1	10,00	112.528	10.027	11,22	10,44	4,4
STD4_A2	10,00	131.791	12.108	10,88	10,10	1,0
STD4_B1	10,00	139.965	12.687	11,03	10,25	2,5
STD4_B2	10,00	126.175	11.426	11,04	10,26	2,6
Mean		127615	11562	11,05	10,26	
% RSD		9,0	9,9	1,3	1,4	2,6
STD5_A1	20,00	258.943	11.811	21,92	21,27	6,4
STD5_A2	20,00	255.827	11.393	22,45	21,81	9,0
STD5_B1	20,00	172.276	9.237	18,65	17,96	-10,2
STD5_B2	20,00	173.810	9.077	19,15	18,46	-7,7
Mean		215214	10379	20,54	19,88	
% RSD		22,6	13,7	9,4	9,8	-0,6
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	2,50	31.407	10.163	3,09	2,21	-11,7
CTRL1_A2	2,50	31.656	9.888	3,20	2,32	-7,2
CTRL1_B1	2,50	34.964	10.908	3,21	2,32	-7,0
CTRL1_B2	2,50	36.376	10.528	3,46	2,58	3,1
CTRL1_C1	2,50	38.731	10.505	3,69	2,81	12,4
CTRL1_C2	2,50	36.527	10.487	3,48	2,60	4,2
Mean		34944	10413	3,35	2,47	
% RSD		8,3	3,4	6,7	9,2	-1,0
CTRL2_A1	10,00	142.064	12.470	11,39	10,61	6,1
CTRL2_A2	10,00	147.323	12.023	12,25	11,48	14,8
CTRL2_B1	10,00	128.989	11.602	11,12	10,33	3,3
CTRL2_B2	10,00	128.847	11.288	11,41	10,63	6,3
CTRL2_C1	10,00	153.280	12.832	11,95	11,17	11,7
CTRL2_C2	10,00	127.896	10.689	11,97	11,19	11,9
Mean		138066	11817	11,68	10,90	
% RSD		8,0	6,7	3,7	4,0	9,0
CTRL3_A1						
CTRL3_A2						
CTRL3_B1	20,00	224.112	10.259	21,85	21,19	6,0
CTRL3_B2	20,00	235.538	10.542	22,34	21,70	8,5
CTRL3_C1	20,00	161.363	8.232	19,60	18,92	-5,4
CTRL3_C2	20,00	149.013	6.972	21,37	20,71	3,6
Mean		192507	9001	21,29	20,63	
% RSD		22,7	18,9	5,6	5,9	3,2

Καμπύλη αναφοράς α-υδροξυσαλμετερόλης στα ούρα 5^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΚΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	1,00	51.430	30.651	1,68	1,12	12,4
STD1_A2	1,00	38.919	24.318	1,60	1,05	5,3
STD1_B1	1,00	33.150	22.461	1,48	0,94	-6,2
STD1_B2	1,00	30.832	18.167	1,70	1,14	14,2
Mean		38583	23899	1,61	1,06	
% RSD		23,9	21,7	6,2	8,7	6,4
STD2_A1	2,50	53.017	16.845	3,15	2,48	-0,9
STD2_A2	2,50	46.719	16.048	2,91	2,26	-9,6
STD2_B1	2,50	52.781	16.990	3,11	2,44	-2,4
STD2_B2	2,50	50.491	15.957	3,16	2,49	-0,3
Mean		50752	16460	3,08	2,42	
% RSD		5,8	3,2	3,8	4,4	-3,3
STD3_A1	5,00	87.084	14.435	6,03	5,14	2,7
STD3_A2	5,00	79.576	13.439	5,92	5,03	0,7
STD3_B1	5,00	86.693	15.469	5,60	4,74	-5,2
STD3_B2	5,00	79.144	13.142	6,02	5,13	2,5
Mean		83124	14121	5,90	5,01	
% RSD		5,2	7,5	3,4	3,7	0,2
STD4_A1	10,00	156.271	13.672	11,43	10,11	1,1
STD4_A2	10,00	161.914	14.603	11,09	9,79	-2,1
STD4_B1	10,00	164.729	14.302	11,52	10,19	1,9
STD4_B2	10,00	176.708	15.694	11,26	9,95	-0,5
Mean		164906	14568	11,32	10,01	
% RSD		5,2	5,8	1,7	1,8	0,1
STD5_A1	20,00	345.954	14.176	24,40	22,06	10,3
STD5_A2	20,00	371.726	14.871	25,00	22,60	13,0
STD5_B1	20,00	249.674	12.891	19,37	17,42	-12,9
STD5_B2	20,00	257.169	12.915	19,91	17,92	-10,4
Mean		306131	13713	22,17	20,00	
% RSD		20,2	7,1	13,3	13,5	0,0
ΔΕΙΓΜΑ	ΚΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	2,50	52.307	17.782	2,94	2,29	-8,5
CTRL1_A2	2,50	50.986	17.397	2,93	2,28	-8,9
CTRL1_B1	2,50	59.921	21.450	2,79	2,15	-13,9
CTRL1_B2	2,50	60.991	19.904	3,06	2,40	-4,0
CTRL1_C1	2,50	58.999	17.042	3,46	2,77	10,7
CTRL1_C2	2,50	62.647	18.567	3,37	2,69	7,5
Mean		57642	18690	3,09	2,43	
% RSD		8,4	9,1	8,6	10,1	-2,8
CTRL2_A1	10,00	246.511	21.567	11,43	10,11	1,1
CTRL2_A2	10,00	270.643	21.560	12,55	11,14	11,4
CTRL2_B1	10,00	270.051	21.937	12,31	10,92	9,2
CTRL2_B2	10,00	273.932	21.868	12,53	11,12	11,2
CTRL2_C1	10,00	289.287	22.726	12,73	11,30	13,0
CTRL2_C2	10,00	282.395	22.153	12,75	11,32	13,2
Mean		272137	21969	12,38	10,98	
% RSD		5,4	2,0	4,0	4,1	9,8
CTRL3_A1	20,00	576.017	26.598	21,66	19,53	-2,4
CTRL3_A2	20,00	562.159	27.250	20,63	18,58	-7,1
CTRL3_B1	20,00	617.221	24.875	24,81	22,43	12,2
CTRL3_B2	20,00	648.119	26.130	24,80	22,43	12,1
CTRL3_C1	20,00	406.472	21.332	19,05	17,13	-14,3
CTRL3_C2	20,00	418.404	22.047	18,98	17,06	-14,7
Mean		538065	24705	21,66	19,53	
% RSD		19,0	10,0	12,2	12,5	-2,4

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στα ούρα 1^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	2.417	10.166	0,24	0,09	-7,8
STD1_A2	0,10	2.081	8.677	0,24	0,09	-6,5
STD1_B1	0,10	2.220	8.130	0,27	0,11	13,0
STD1_B2	0,10	2.027	8.016	0,25	0,10	1,1
Mean		2186	8747	0,25	0,10	0,0
% RSD		8,0	11,3	6,5	9,6	
STD2_A1	0,25	3.946	8.405	0,47	0,23	-8,5
STD2_A2	0,25	4.141	8.635	0,48	0,23	-6,2
STD2_B1	0,25	4.722	9.317	0,51	0,25	0,2
STD2_B2	0,25	4.939	9.356	0,53	0,26	5,2
Mean		4437	8928	0,50	0,24	-2,3
% RSD		10,6	5,4	5,3	6,4	
STD3_A1	0,50	8.289	9.330	0,89	0,48	-5,0
STD3_A2	0,50	8.686	9.735	0,89	0,48	-4,5
STD3_B1	0,50	7.546	8.631	0,87	0,47	-6,6
STD3_B2	0,50	7.409	8.494	0,87	0,47	-6,9
Mean		7982	9047	0,88	0,47	-5,7
% RSD		7,6	6,5	1,1	1,2	
STD4_A1	1,00	17.945	9.150	1,96	1,11	10,7
STD4_A2	1,00	16.220	8.764	1,85	1,04	4,2
STD4_B1	1,00	17.823	9.744	1,83	1,03	2,9
STD4_B2	1,00	17.859	9.707	1,84	1,04	3,5
Mean		17462	9341	1,87	1,05	5,3
% RSD		4,7	5,0	3,3	3,4	
STD5_A1	2,00	32.553	9.200	3,54	2,04	1,8
STD5_A2	2,00	31.063	9.359	3,32	1,91	-4,7
STD5_B1	2,00	32.219	9.620	3,35	1,92	-3,8
STD5_B2	2,00	32.082	8.957	3,58	2,06	3,0
Mean		31979	9284	3,45	1,98	-0,9
% RSD		2,0	3,0	3,8	3,9	
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	3.908	8.248	0,47	0,23	-7,5
CTRL1_A2	0,25	4.136	7.808	0,53	0,26	5,6
CTRL1_B1	0,25	4.338	8.846	0,49	0,24	-3,6
CTRL1_B2	0,25	4.176	7.962	0,52	0,26	4,4
CTRL1_C1	0,25	3.822	8.050	0,47	0,23	-7,3
CTRL1_C2	0,25	3.775	7.937	0,48	0,23	-7,1
Mean		4026	8142	0,49	0,24	-2,6
% RSD		5,6	4,6	5,2	6,2	
CTRL2_A1	1,00	12.683	6.991	1,81	1,02	2,0
CTRL2_A2	1,00	13.100	7.563	1,73	0,97	-2,8
CTRL2_B1	1,00	15.701	7.929	1,98	1,12	11,8
CTRL2_B2	1,00	16.363	8.383	1,95	1,10	10,1
CTRL2_C1	1,00	16.019	8.306	1,93	1,09	8,8
CTRL2_C2	1,00	15.233	7.506	2,03	1,15	14,7
Mean		14850	7780	1,91	1,07	7,4
% RSD		10,6	6,8	5,8	6,1	
CTRL3_A1	2,00	29.083	8.675	3,35	1,93	-3,7
CTRL3_A2	2,00	30.228	8.687	3,48	2,00	0,0
CTRL3_B1	2,00	30.685	8.188	3,75	2,16	7,9
CTRL3_B2	2,00	31.631	9.461	3,34	1,92	-4,0
CTRL3_C1	2,00	32.032	8.054	3,98	2,29	14,7
CTRL3_C2	2,00	31.971	8.477	3,77	2,17	8,6
Mean		30938	8590	3,61	2,08	3,9
% RSD		3,8	5,8	7,2	7,3	

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στα ούρα 2^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	2.861	11.158	0,26	0,11	12,7
STD1_A2	0,10	1.912	7.739	0,25	0,11	7,5
STD1_B1	0,10	2.061	7.957	0,26	0,11	14,2
STD1_B2	0,10	2.200	8.561	0,26	0,11	13,0
Mean		2259	8854	0,25	0,11	11,8
% RSD		18,5	17,8	2,1	2,7	
STD2_A1	0,25	4.568	8.566	0,53	0,27	7,8
STD2_A2	0,25	4.849	9.305	0,52	0,26	5,0
STD2_B1	0,25	4.646	9.920	0,47	0,23	-6,9
STD2_B2	0,25	4.792	10.208	0,47	0,23	-6,7
Mean		4714	9500	0,50	0,25	-0,2
% RSD		2,7	7,7	6,8	7,7	
STD3_A1	0,50	8.948	9.841	0,91	0,48	-3,5
STD3_A2	0,50	9.372	9.170	1,02	0,55	9,2
STD3_B1	0,50	8.389	9.493	0,88	0,47	-6,4
STD3_B2	0,50	8.433	9.855	0,86	0,45	-9,6
Mean		8786	9590	0,92	0,49	-2,6
% RSD		5,3	3,4	7,9	8,5	
STD4_A1	1,00	17.846	9.298	1,92	1,05	5,4
STD4_A2	1,00	17.861	10.280	1,74	0,95	-4,9
STD4_B1	1,00	19.812	10.759	1,84	1,01	1,0
STD4_B2	1,00	19.718	11.088	1,78	0,97	-2,6
Mean		18809	10356	1,82	1,00	-0,2
% RSD		5,9	7,5	4,4	4,5	
STD5_A1	2,00	34.082	9.277	3,67	2,05	2,4
STD5_A2	2,00	35.388	9.399	3,77	2,10	5,0
STD5_B1	2,00	37.227	10.566	3,52	1,96	-1,9
STD5_B2	2,00	36.456	10.651	3,42	1,91	-4,7
Mean		35788	9973	3,60	2,00	0,2
% RSD		3,8	7,4	4,2	4,3	
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	4.512	8.947	0,50	0,25	1,2
CTRL1_A2	0,25	4.454	9.390	0,47	0,24	-5,6
CTRL1_B1	0,25	4.927	9.137	0,54	0,27	9,1
CTRL1_B2	0,25	4.686	8.432	0,56	0,28	12,9
CTRL1_C1	0,25	4.492	8.406	0,53	0,27	8,0
CTRL1_C2	0,25	4.277	8.562	0,50	0,25	0,1
Mean		4558	8812	0,52	0,26	4,3
% RSD		4,9	4,6	5,8	6,6	
CTRL2_A1	1,00	14.968	8.184	1,83	1,00	0,3
CTRL2_A2	1,00	13.324	7.306	1,82	1,00	0,0
CTRL2_B1	1,00	18.424	9.635	1,91	1,05	5,0
CTRL2_B2	1,00	18.156	9.726	1,87	1,02	2,5
CTRL2_C1	1,00	18.662	9.650	1,93	1,06	6,3
CTRL2_C2	1,00	18.643	9.103	2,05	1,13	12,7
Mean		17029	8934	1,90	1,04	4,5
% RSD		13,5	11,0	4,4	4,5	
CTRL3_A1	2,00	33.202	9.588	3,46	1,93	-3,6
CTRL3_A2	2,00	32.782	9.402	3,49	1,94	-2,9
CTRL3_B1	2,00	34.871	9.550	3,65	2,04	1,8
CTRL3_B2	2,00	35.381	10.492	3,37	1,88	-6,1
CTRL3_C1	2,00	35.179	9.514	3,70	2,06	3,1
CTRL3_C2	2,00	33.340	8.494	3,93	2,19	9,5
Mean		34126	9507	3,60	2,01	0,3
% RSD		3,3	6,7	5,6	5,7	

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στα ούρα 3^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	1.075	6.232	0,17	0,11	12,8
STD1_A2	0,10	898	5.111	0,18	0,11	14,3
STD1_B1	0,10	867	4.933	0,18	0,11	14,4
STD1_B2	0,10	895	5.149	0,17	0,11	13,4
Mean		934	5356	0,17	0,11	13,7
% RSD		10,2	11,0	0,9	0,7	
STD2_A1	0,25	2.739	5.570	0,49	0,27	9,3
STD2_A2	0,25	2.797	6.767	0,41	0,23	-6,5
STD2_B1	0,25	2.659	5.238	0,51	0,28	12,4
STD2_B2	0,25	2.838	5.657	0,50	0,28	11,3
Mean		2758	5808	0,48	0,27	6,6
% RSD		2,8	11,4	9,2	8,3	
STD3_A1	0,50	6.249	6.565	0,95	0,50	0,9
STD3_A2	0,50	6.896	7.416	0,93	0,49	-1,3
STD3_B1	0,50	5.272	5.689	0,93	0,49	-1,7
STD3_B2	0,50	5.682	6.034	0,94	0,50	-0,2
Mean		6025	6426	0,94	0,50	-0,6
% RSD		11,7	11,7	1,2	1,2	
STD4_A1	1,00	12.110	6.471	1,87	0,97	-3,4
STD4_A2	1,00	12.555	6.314	1,99	1,03	2,5
STD4_B1	1,00	13.294	7.823	1,70	0,88	-12,0
STD4_B2	1,00	12.983	7.251	1,79	0,93	-7,4
Mean		12736	6965	1,84	0,95	-5,1
% RSD		4,0	10,1	6,7	6,5	
STD5_A1	2,00	29.206	7.073	4,13	2,10	5,0
STD5_A2	2,00	28.772	7.497	3,84	1,95	-2,3
STD5_B1	2,00	22.269	5.622	3,96	2,02	0,8
STD5_B2	2,00	21.790	5.485	3,97	2,02	1,1
Mean		25509	6419	3,98	2,02	1,2
% RSD		15,8	15,8	3,0	3,0	
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	3.196	6.678	0,48	0,27	6,6
CTRL1_A2	0,25	3.237	6.270	0,52	0,29	14,2
CTRL1_B1	0,25	3.392	6.876	0,49	0,27	9,6
CTRL1_B2	0,25	3.266	6.307	0,52	0,29	14,5
CTRL1_C1	0,25	3.432	8.889	0,39	0,22	-12,0
CTRL1_C2	0,25	4.073	10.770	0,38	0,22	-13,6
Mean		3433	7632	0,46	0,26	3,2
% RSD		9,5	23,8	13,7	12,3	
CTRL2_A1	1,00	13.069	6.726	1,94	1,00	0,2
CTRL2_A2	1,00	11.352	6.318	1,80	0,93	-7,1
CTRL2_B1	1,00	12.541	6.235	2,01	1,04	3,7
CTRL2_B2	1,00	11.723	6.450	1,82	0,94	-6,1
CTRL2_C1	1,00	14.276	7.343	1,94	1,00	0,3
CTRL2_C2	1,00	13.362	6.629	2,02	1,04	3,9
Mean		12721	6617	1,92	0,99	-0,9
% RSD		8,5	6,1	4,9	4,8	
CTRL3_A1	2,00	24.052	5.586	4,31	2,19	9,5
CTRL3_A2	2,00	22.812	6.248	3,65	1,86	-7,0
CTRL3_B1	2,00	26.043	6.550	3,98	2,02	1,2
CTRL3_B2	2,00	23.776	6.994	3,40	1,73	-13,3
CTRL3_C1	2,00	29.081	7.760	3,75	1,91	-4,6
CTRL3_C2	2,00	28.433	8.191	3,47	1,77	-11,5
Mean		25700	6888	3,76	1,91	-4,3
% RSD		10,1	14,1	9,0	8,9	

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στα ούρα 4^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	1.819	8.226	0,22	0,11	14,0
STD1_A2	0,10	1.378	6.383	0,22	0,11	11,3
STD1_B1	0,10	1.150	5.747	0,20	0,10	3,1
STD1_B2	0,10	1.223	5.636	0,22	0,11	11,8
Mean		1392	6498	0,21	0,11	10,0
% RSD		21,5	18,4	4,3	4,3	
STD2_A1	0,25	2.753	5.525	0,50	0,26	2,9
STD2_A2	0,25	2.941	6.245	0,47	0,24	-2,8
STD2_B1	0,25	3.080	5.942	0,52	0,27	7,1
STD2_B2	0,25	3.099	6.036	0,51	0,27	6,1
Mean		2968	5937	0,50	0,26	3,3
% RSD		5,4	5,1	4,3	4,3	
STD3_A1	0,50	6.513	6.526	1,00	0,52	3,1
STD3_A2	0,50	6.999	7.029	1,00	0,51	2,9
STD3_B1	0,50	5.789	6.271	0,92	0,48	-4,6
STD3_B2	0,50	6.029	6.198	0,97	0,50	0,5
Mean		6333	6506	0,97	0,50	0,5
% RSD		8,5	5,8	3,6	3,6	
STD4_A1	1,00	11.133	6.055	1,84	0,95	-5,0
STD4_A2	1,00	12.125	6.690	1,81	0,94	-6,3
STD4_B1	1,00	13.365	7.001	1,91	0,99	-1,3
STD4_B2	1,00	13.085	6.923	1,89	0,98	-2,3
Mean		12427	6667	1,86	0,96	-3,7
% RSD		8,2	6,4	2,4	2,4	
STD5_A1	2,00	28.685	7.404	3,87	2,00	0,1
STD5_A2	2,00	27.700	7.308	3,79	1,96	-2,0
STD5_B1	2,00	23.217	5.980	3,88	2,01	0,4
STD5_B2	2,00	22.974	5.666	4,05	2,10	4,8
Mean		25644	6590	3,90	2,02	0,8
% RSD		11,6	13,6	2,8	2,8	
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	3.229	5.910	0,55	0,28	12,9
CTRL1_A2	0,25	3.122	6.666	0,47	0,24	-3,3
CTRL1_B1	0,25	3.360	6.962	0,48	0,25	-0,3
CTRL1_B2	0,25	3.056	6.870	0,44	0,23	-8,1
CTRL1_C1	0,25	3.316	7.765	0,43	0,22	-11,8
CTRL1_C2	0,25	3.615	8.646	0,42	0,22	-13,7
Mean		3283	7137	0,46	0,24	-4,1
% RSD		6,1	13,3	10,1	10,1	
CTRL2_A1	1,00	12.189	5.958	2,05	1,06	5,8
CTRL2_A2	1,00	11.281	6.247	1,81	0,93	-6,7
CTRL2_B1	1,00	11.895	6.367	1,87	0,97	-3,4
CTRL2_B2	1,00	12.077	6.609	1,83	0,94	-5,5
CTRL2_C1	1,00	13.170	6.375	2,07	1,07	6,8
CTRL2_C2	1,00	13.586	6.680	2,03	1,05	5,1
Mean		12366	6373	1,94	1,00	0,3
% RSD		6,9	4,1	6,2	6,2	
CTRL3_A1	2,00	23.570	5.910	3,99	2,06	3,1
CTRL3_A2	2,00	22.625	6.062	3,73	1,93	-3,5
CTRL3_B1	2,00	24.288	6.274	3,87	2,00	0,1
CTRL3_B2	2,00	24.638	6.465	3,81	1,97	-1,5
CTRL3_C1	2,00	29.307	8.232	3,56	1,84	-8,0
CTRL3_C2	2,00	29.948	8.317	3,60	1,86	-6,9
Mean		25729	6877	3,76	1,94	-2,8
% RSD		12,1	16,0	4,3	4,3	

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στα ούρα 5^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,10	1.819	8.527	0,21	0,11	6,7
STD1_A2	0,10	1.413	6.346	0,22	0,11	11,5
STD1_B1	0,10	1.002	5.109	0,20	0,10	-2,2
STD1_B2	0,10	709	4.096	0,17	0,09	-14,1
Mean		1236	6019	0,20	0,10	0,5
% RSD		39,2	31,7	10,8	11,2	
STD2_A1	0,25	2.451	5.121	0,48	0,24	-2,6
STD2_A2	0,25	3.004	5.653	0,53	0,27	8,3
STD2_B1	0,25	5.802	10.944	0,53	0,27	8,1
STD2_B2	0,25	3.500	7.328	0,48	0,24	-2,8
Mean		3689	7262	0,50	0,26	2,8
% RSD		39,9	36,2	6,0	6,1	
STD3_A1	0,50	6.162	6.757	0,91	0,47	-6,6
STD3_A2	0,50	6.598	6.258	1,05	0,54	8,1
STD3_B1	0,50	7.677	8.275	0,93	0,48	-4,9
STD3_B2	0,50	7.773	7.372	1,05	0,54	8,1
Mean		7052	7166	0,99	0,51	1,2
% RSD		11,3	12,1	7,9	7,9	
STD4_A1	1,00	16.072	8.589	1,87	0,96	-3,8
STD4_A2	1,00	17.791	9.439	1,88	0,97	-3,1
STD4_B1	1,00	20.538	10.609	1,94	1,00	-0,4
STD4_B2	1,00	21.998	11.477	1,92	0,99	-1,4
Mean		19100	10029	1,90	0,98	-2,2
% RSD		14,0	12,7	1,5	1,6	
STD5_A1	2,00	29.668	7.929	3,74	1,93	-3,6
STD5_A2	2,00	29.763	7.700	3,87	1,99	-0,4
STD5_B1	2,00	24.740	6.332	3,91	2,01	0,6
STD5_B2	2,00	25.161	6.164	4,08	2,10	5,1
Mean		27333	7031	3,90	2,01	0,4
% RSD		10,1	13,0	3,6	3,6	
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,25	2.700	5.703	0,47	0,24	-3,6
CTRL1_A2	0,25	3.073	6.744	0,46	0,23	-7,3
CTRL1_B1	0,25	2.832	5.799	0,49	0,25	-0,6
CTRL1_B2	0,25	2.468	5.711	0,43	0,22	-12,2
CTRL1_C1	0,25	2.965	6.212	0,48	0,24	-2,8
CTRL1_C2	0,25	3.087	5.866	0,53	0,27	7,3
Mean		2854	6006	0,48	0,24	-3,2
% RSD		8,4	6,8	6,7	6,8	
CTRL2_A1	1,00	11.202	5.501	2,04	1,05	4,7
CTRL2_A2	1,00	11.393	5.792	1,97	1,01	1,2
CTRL2_B1	1,00	11.637	5.989	1,94	1,00	-0,1
CTRL2_B2	1,00	12.340	6.481	1,90	0,98	-2,1
CTRL2_C1	1,00	10.469	5.833	1,79	0,92	-7,7
CTRL2_C2	1,00	9.634	5.792	1,66	0,85	-14,5
Mean		11113	5898	1,88	0,97	-3,1
% RSD		8,5	5,5	7,1	7,2	
CTRL3_A1	2,00	23.992	5.810	4,13	2,13	6,4
CTRL3_A2	2,00	24.346	5.903	4,12	2,12	6,2
CTRL3_B1	2,00	20.335	4.872	4,17	2,15	7,5
CTRL3_B2	2,00	20.285	5.333	3,80	1,96	-2,0
CTRL3_C1	2,00	26.390	7.040	3,75	1,93	-3,5
CTRL3_C2	2,00	25.201	6.820	3,70	1,90	-4,8
Mean		23425	5963	3,95	2,03	1,6
% RSD		10,9	14,0	5,5	5,6	

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στο πλάσμα 1^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΑΜΑ
STD1_A1	0,050	3123	27891	0,11	0,045	-9,1
STD1_A2	0,050	4427	31885	0,14	0,056	12,3
STD1_B1	0,050	2323	19195	0,12	0,049	-1,9
STD1_B2	0,050	3043	23697	0,13	0,052	4,0
Mean		3229	25667	0,13	0,051	
% RSD		27,1	21,3	9,1	8,9	1,4
STD2_A1	0,075	3696	21037	0,18	0,071	-5,5
STD2_A2	0,075	4153	21188	0,20	0,079	5,3
STD2_B1	0,075	4550	24631	0,18	0,074	-0,7
STD2_B2	0,075	4393	23816	0,18	0,074	-0,9
Mean		4198	22668	0,19	0,075	
% RSD		8,9	8,1	4,5	4,4	-0,5
STD3_A1	0,100	5103	22544	0,23	0,091	-9,0
STD3_A2	0,100	6703	25333	0,26	0,106	6,3
STD3_B1	0,100	6222	24624	0,25	0,102	1,5
STD3_B2	0,100	7129	28434	0,25	0,101	0,7
Mean		6289	25234	0,25	0,100	
% RSD		13,9	9,7	6,5	6,4	-0,1
STD4_A1	0,250	16366	25773	0,64	0,254	1,5
STD4_A2	0,250	16773	28659	0,59	0,234	-6,4
STD4_B1	0,250	18338	30084	0,61	0,244	-2,5
STD4_B2	0,250	22416	33612	0,67	0,267	6,6
Mean		18473	29532	0,62	0,250	
% RSD		15,0	11,0	5,6	5,6	-0,2
STD5_A1	0,500	35823	25381	1,41	0,563	12,6
STD5_A2	0,500	30966	26573	1,17	0,465	-7,0
STD5_B1	0,500	35415	31454	1,13	0,449	-10,1
STD5_B2	0,500	35909	27385	1,31	0,523	4,7
Mean		34528	27698	1,25	0,500	
% RSD		6,9	9,5	10,5	10,5	0,0
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΑΜΑ
CTRL1_A1						
CTRL1_A2						
CTRL1_B1	0,075	845	5212	0,16	0,065	-12,8
CTRL1_B2	0,075	1248	6449	0,19	0,078	3,9
CTRL1_C1	0,075	1896	9782	0,19	0,078	4,1
CTRL1_C2	0,075	944	5792	0,16	0,066	-12,3
Mean		1233	6809	0,178	0,072	
% RSD		38,4	30,0	10,1	10,0	-4,2
CTRL2_A1	0,250	2330	3966	0,59	0,235	-6,0
CTRL2_A2	0,250	3873	5943	0,65	0,260	4,2
CTRL2_B1	0,250	5344	9717	0,55	0,220	-12,0
CTRL2_B2	0,250	6086	8927	0,68	0,272	9,0
CTRL2_C1	0,250	5455	8750	0,62	0,249	-0,3
CTRL2_C2	0,250	5051	7429	0,68	0,272	8,7
Mean		4690	7455	0,629	0,251	
% RSD		29,1	29,0	8,4	8,3	0,6
CTRL3_A1	0,500	14494	10956	1,32	0,528	5,6
CTRL3_A2	0,500	15359	11663	1,32	0,525	5,1
CTRL3_B1	0,500	17440	13950	1,25	0,499	-0,2
CTRL3_B2	0,500	16643	12199	1,36	0,544	8,9
CTRL3_C1	0,500	15450	12050	1,28	0,512	2,3
CTRL3_C2	0,500	17738	12539	1,41	0,564	12,9
Mean		16187	12226	1,325	0,529	
% RSD		8,0	8,2	4,4	4,4	5,8

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στο πλάσμα 2^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,050	4794	38958	0,12	0,051	1,9
STD1_A2	0,050	4074	36756	0,11	0,046	-7,3
STD1_B1	0,050	3489	27723	0,13	0,052	4,0
STD1_B2	0,050	2817	22356	0,13	0,052	4,1
Mean		3794	31448	0,12	0,050	
% RSD		22,2	24,7	5,9	5,4	0,7
STD2_A1	0,075	4774	25531	0,19	0,075	-0,1
STD2_A2	0,075	4451	25470	0,17	0,070	-6,2
STD2_B1	0,075	5675	29468	0,19	0,077	2,7
STD2_B2	0,075	6743	34140	0,20	0,079	5,2
Mean		5411	28652	0,19	0,075	
% RSD		19,0	14,3	5,2	4,9	0,4
STD3_A1	0,100	7394	27860	0,27	0,104	4,4
STD3_A2	0,100	6599	27180	0,24	0,096	-4,1
STD3_B1	0,100	6796	26870	0,25	0,100	-0,3
STD3_B2	0,100	8136	32018	0,25	0,100	0,2
Mean		7231	28482	0,25	0,100	
% RSD		9,6	8,4	3,6	3,5	0,1
STD4_A1	0,250	16148	24818	0,65	0,249	-0,3
STD4_A2	0,250	18595	27511	0,68	0,259	3,4
STD4_B1	0,250	18260	29253	0,62	0,239	-4,3
STD4_B2	0,250	20451	31561	0,65	0,248	-0,7
Mean		18364	28286	0,65	0,249	
% RSD		9,6	10,1	3,3	3,2	-0,5
STD5_A1	0,500	35397	29350	1,21	0,458	-8,4
STD5_A2	0,500	36519	27159	1,34	0,510	2,0
STD5_B1	0,500	42815	32835	1,30	0,495	-1,1
STD5_B2	0,500	41986	29468	1,42	0,540	8,0
Mean		39179	29703	1,32	0,501	
% RSD		9,6	7,9	6,9	6,8	0,1
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1						
CTRL1_A2	0,075	1723	9652	0,18	0,072	-4,3
CTRL1_B1	0,075	972	4831	0,20	0,080	7,0
CTRL1_B2						
CTRL1_C1	0,075	1142	6306	0,18	0,073	-3,0
CTRL1_C2	0,075	730	4495	0,16	0,066	-12,4
Mean		1142	6321	0,18	0,073	
% RSD		37,0	37,3	8,8	8,2	-3,2
CTRL2_A1	0,250	3436	5063	0,68	0,260	3,9
CTRL2_A2	0,250	3706	5499	0,67	0,258	3,1
CTRL2_B1	0,250	6130	8664	0,71	0,270	8,2
CTRL2_B2	0,250	5322	7851	0,68	0,259	3,7
CTRL2_C1	0,250	5091	7412	0,69	0,263	5,1
CTRL2_C2	0,250	3254	4620	0,70	0,269	7,7
Mean		4490	6518	0,69	0,263	
% RSD		26,3	25,6	2,1	2,1	5,3
CTRL3_A1	0,500	15019	11649	1,29	0,489	-2,2
CTRL3_A2	0,500	11467	8519	1,35	0,510	2,1
CTRL3_B1	0,500	16817	12659	1,33	0,504	0,8
CTRL3_B2	0,500	16990	12639	1,34	0,510	1,9
CTRL3_C1	0,500	17190	13154	1,31	0,496	-0,9
CTRL3_C2	0,500	16423	12151	1,35	0,512	2,5
Mean		15651	11795	1,33	0,503	
% RSD		14,0	14,3	1,9	1,9	0,7

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στο πλάσμα 3^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1						
STD1_A2	0,050	4860	39981	0,12	0,047	-6,1
STD1_B1	0,050	6346	44999	0,14	0,055	10,1
STD1_B2	0,050	3471	28308	0,12	0,047	-5,3
Mean		4892	37763	0,13	0,050	
% RSD		29,4	22,7	8,5	9,2	-0,5
STD2_A1	0,075	9962	51426	0,19	0,077	2,6
STD2_A2	0,075	9195	52768	0,17	0,069	-8,2
STD2_B1	0,075	7094	39928	0,18	0,070	-6,3
STD2_B2	0,075	7784	40122	0,19	0,077	2,8
Mean		8509	46061	0,18	0,073	
% RSD		15,3	15,2	5,6	5,9	-2,3
STD3_A1	0,100	9809	39302	0,25	0,100	0,2
STD3_A2	0,100	8913	34556	0,26	0,104	3,7
STD3_B1	0,100	10836	44117	0,25	0,099	-1,5
STD3_B2	0,100	11786	44526	0,26	0,106	6,5
Mean		10336	40625	0,25	0,102	
% RSD		12,1	11,5	3,4	3,5	2,2
STD4_A1	0,250	27091	43879	0,62	0,253	1,3
STD4_A2	0,250	26028	42809	0,61	0,249	-0,3
STD4_B1	0,250	35119	58634	0,60	0,246	-1,8
STD4_B2	0,250	40242	65763	0,61	0,251	0,4
Mean		32120	52771	0,61	0,250	
% RSD		21,1	21,4	1,3	1,3	-0,1
STD5_A1	0,500	47568	39080	1,22	0,503	0,6
STD5_A2	0,500	39198	33041	1,19	0,490	-2,0
STD5_B1	0,500	52559	43466	1,21	0,499	-0,1
STD5_B2	0,500	57394	46711	1,23	0,508	1,5
Mean		49180	40574	1,21	0,500	
% RSD		15,8	14,6	1,5	1,5	0,0
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1						
CTRL1_A2						
CTRL1_B1	0,075	1938	9844	0,20	0,078	4,4
CTRL1_B2						
CTRL1_C1						
CTRL1_C2						
Mean		1938	9844	0,20	0,078	
% RSD						4,4
CTRL2_A1	0,250	5920	8587	0,69	0,283	13,3
CTRL2_A2	0,250	5545	9103	0,61	0,250	-0,1
CTRL2_B1	0,250	5778	9577	0,60	0,247	-1,0
CTRL2_B2	0,250	6884	11121	0,62	0,254	1,6
CTRL2_C1	0,250	14425	26233	0,55	0,225	-9,9
CTRL2_C2	0,250	17804	26282	0,68	0,278	11,3
Mean		9393	15151	0,62	0,256	
% RSD		56,8	57,1	8,3	8,4	2,5
CTRL3_A1	0,500	18009	15091	1,19	0,493	-1,4
CTRL3_A2	0,500	18373	15139	1,21	0,501	0,3
CTRL3_B1	0,500	16184	11981	1,35	0,558	11,7
CTRL3_B2	0,500	14179	12806	1,11	0,457	-8,6
CTRL3_C1	0,500	9281	7275	1,28	0,527	5,4
CTRL3_C2	0,500	9261	7189	1,29	0,532	6,5
Mean		14215	11580	1,24	0,512	
% RSD		28,9	31,0	6,9	6,9	2,3

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στο πλάσμα 4^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΑΜΑ
STD1_A1	0,050	4355	38275	0,11	0,048	-3,3
STD1_A2						
STD1_B1	0,050	3364	29055	0,12	0,049	-1,8
STD1_B2	0,050	3870	34533	0,11	0,048	-4,7
Mean		3863	33954	0,11	0,048	
% RSD		12,8	13,7	1,6	1,5	-3,3
STD2_A1	0,075	8639	47147	0,18	0,076	0,8
STD2_A2	0,075	11110	58749	0,19	0,078	3,9
STD2_B1	0,075	7386	42156	0,18	0,072	-3,4
STD2_B2	0,075	6675	34661	0,19	0,079	5,7
Mean		8453	45678	0,19	0,076	
% RSD		23,1	22,1	4,1	3,9	1,7
STD3_A1	0,100	11469	47573	0,24	0,098	-1,7
STD3_A2	0,100	10900	45593	0,24	0,097	-2,5
STD3_B1	0,100	12403	48982	0,25	0,103	3,0
STD3_B2	0,100	12872	47784	0,27	0,109	9,4
Mean		11911	47483	0,25	0,102	
% RSD		7,5	3,0	5,6	5,4	2,0
STD4_A1	0,250	26824	40814	0,66	0,262	4,6
STD4_A2	0,250	23043	38166	0,60	0,241	-3,8
STD4_B1	0,250	54439	86472	0,63	0,251	0,3
STD4_B2	0,250	54185	91120	0,59	0,237	-5,2
Mean		39623	64143	0,62	0,247	
% RSD		43,0	44,5	4,5	4,5	-1,0
STD5_A1	0,500	57988	47812	1,21	0,480	-4,1
STD5_A2	0,500	56318	41361	1,36	0,538	7,6
STD5_B1	0,500	67258	53923	1,25	0,493	-1,4
STD5_B2	0,500	65755	52749	1,25	0,493	-1,4
Mean		61830	48961	1,27	0,501	
% RSD		8,9	11,7	5,1	5,1	0,2
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΑΜΑ
CTRL1_A1						
CTRL1_A2						
CTRL1_B1	0,075	2945	14235	0,21	0,085	13,2
CTRL1_B2	0,075	2308	14022	0,16	0,068	-9,0
CTRL1_C1						
CTRL1_C2						
Mean		2627	14129	0,19	0,077	
% RSD		17,1	1,1	16,1	15,3	2,1
CTRL2_A1	0,250	4751	8096	0,59	0,234	-6,4
CTRL2_A2	0,250	4634	6605	0,70	0,279	11,6
CTRL2_B1	0,250	6364	10042	0,63	0,252	0,9
CTRL2_B2	0,250	7119	10679	0,67	0,265	6,1
CTRL2_C1	0,250	15009	24305	0,62	0,246	-1,6
CTRL2_C2	0,250	19202	29566	0,65	0,259	3,4
Mean		9513	14882	0,64	0,256	
% RSD		64,1	64,5	6,2	6,1	2,3
CTRL3_A1	0,500	18755	16961	1,11	0,438	-12,5
CTRL3_A2	0,500	19065	15548	1,23	0,485	-3,0
CTRL3_B1	0,500	15969	12604	1,27	0,501	0,2
CTRL3_B2	0,500	15968	11280	1,42	0,559	11,8
CTRL3_C1	0,500	9011	7894	1,14	0,452	-9,7
CTRL3_C2	0,500	10027	7434	1,35	0,533	6,6
Mean		14799	11954	1,25	0,494	
% RSD		29,1	32,6	9,5	9,4	-1,1

Καμπύλη αναφοράς σαλμετερόλης στο πλάσμα 5^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,050	4025	37489	0,11	0,053	6,7
STD1_A2	0,050	2782	26706	0,10	0,052	4,3
STD1_B1						
STD1_B2	0,050	2973	27969	0,11	0,053	5,9
Mean		3260	30721	0,11	0,053	
% RSD		20,5	19,2	1,5	1,1	5,6
STD2_A1	0,075	5056	29198	0,17	0,078	3,3
STD2_A2						
STD2_B1	0,075	3499	21965	0,16	0,072	-3,4
STD2_B2	0,075	3998	21550	0,19	0,082	9,4
Mean		4184	24238	0,17	0,077	
% RSD		19,0	17,7	7,6	6,2	3,1
STD3_A1	0,100	5905	26429	0,22	0,096	-4,0
STD3_A2	0,100	5189	23771	0,22	0,094	-5,9
STD3_B1	0,100	8847	36553	0,24	0,103	2,8
STD3_B2	0,100	6845	30110	0,23	0,097	-2,6
Mean		6697	29216	0,23	0,098	
% RSD		23,7	19,0	4,5	3,8	-2,4
STD4_A1	0,250	18834	30990	0,61	0,237	-5,1
STD4_A2	0,250	19799	32909	0,60	0,235	-6,0
STD4_B1	0,250	21022	32623	0,64	0,251	0,2
STD4_B2	0,250	23032	34826	0,66	0,257	2,7
Mean		20672	32837	0,63	0,245	
% RSD		8,8	4,8	4,6	4,3	-2,1
STD5_A1	0,500	43799	33410	1,31	0,495	-0,9
STD5_A2	0,500	42312	32779	1,29	0,488	-2,4
STD5_B1	0,500	36839	26069	1,41	0,533	6,6
STD5_B2	0,500	32418	24844	1,30	0,493	-1,4
Mean		38842	29276	1,33	0,502	
% RSD		13,5	15,2	4,2	4,1	0,5
ΔΕΙΓΜΑ	C _{ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ} (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	C _{ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ} (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,075	2967	20259	0,15	0,068	-9,7
CTRL1_A2	0,075	4132	23175	0,18	0,079	5,9
CTRL1_B1	0,075	3504	24387	0,14	0,067	-11,1
CTRL1_B2						
CTRL1_C1	0,075	3128	20955	0,15	0,069	-8,4
CTRL1_C2	0,075	3056	20230	0,15	0,069	-7,5
Mean		3357	21801	0,154	0,070	
% RSD		14,3	8,6	9,1	7,3	-6,2
CTRL2_A1	0,250	14270	24586	0,58	0,227	-9,2
CTRL2_A2	0,250	15838	25869	0,61	0,239	-4,5
CTRL2_B1	0,250	15490	25088	0,62	0,241	-3,7
CTRL2_B2	0,250	13751	23004	0,60	0,233	-6,6
CTRL2_C1	0,250	15553	25323	0,61	0,240	-4,2
CTRL2_C2	0,250	14578	26784	0,54	0,214	-14,5
Mean		14913	25109	0,594	0,232	
% RSD		5,6	5,1	4,7	4,5	-7,1
CTRL3_A1	0,500	35547	30125	1,18	0,447	-10,5
CTRL3_A2	0,500	36991	31020	1,19	0,452	-9,6
CTRL3_B1	0,500	36254	28782	1,26	0,477	-4,7
CTRL3_B2	0,500	36804	29836	1,23	0,467	-6,6
CTRL3_C1	0,500	31991	24538	1,30	0,493	-1,4
CTRL3_C2	0,500	25898	21029	1,23	0,466	-6,7
Mean		33914	27555	1,233	0,467	
% RSD		12,8	14,2	3,7	3,5	-6,6

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στο πλάσμα 1^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,050	3546	17999	0,20	0,047	-5,3
STD1_A2	0,050	4319	22068	0,20	0,047	-6,2
STD1_B1	0,050	2161	11193	0,19	0,046	-8,0
STD1_B2						
Mean		3342	17087	0,20	0,047	
% RSD		32,7	32,2	1,0	1,5	-6,5
STD2_A1	0,075	3179	11572	0,27	0,074	-1,7
STD2_A2	0,075	4402	14911	0,30	0,081	7,6
STD2_B1	0,075	4408	14642	0,30	0,083	10,2
STD2_B2	0,075	3752	13630	0,28	0,074	-1,4
Mean		3935	13689	0,29	0,078	
% RSD		15,0	11,1	4,7	5,9	3,7
STD3_A1	0,100	5240	14603	0,36	0,102	2,3
STD3_A2	0,100	6105	16018	0,38	0,110	9,9
STD3_B1	0,100	5667	17097	0,33	0,093	-7,0
STD3_B2	0,100	5368	16449	0,33	0,091	-8,7
Mean		5595	16042	0,35	0,099	
% RSD		6,9	6,6	7,3	8,7	-0,9
STD4_A1	0,250	10179	13898	0,73	0,229	-8,3
STD4_A2	0,250	11240	13001	0,86	0,274	9,6
STD4_B1	0,250	13508	16451	0,82	0,259	3,8
STD4_B2	0,250	12477	15874	0,79	0,247	-1,0
Mean		11851	14806	0,80	0,253	
% RSD		12,2	11,0	7,0	7,5	1,0
STD5_A1	0,500	16122	10681	1,51	0,493	-1,4
STD5_A2	0,500	16793	10194	1,65	0,540	8,0
STD5_B1	0,500	21116	14132	1,49	0,488	-2,4
STD5_B2	0,500	22642	15592	1,45	0,474	-5,2
Mean		19168	12650	1,53	0,499	
% RSD		16,7	20,8	5,5	5,8	-0,2
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΘΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,075	4454	16192	0,28	0,074	-1,5
CTRL1_A2	0,075	4296	15381	0,28	0,075	0,4
CTRL1_B1	0,075	5284	19004	0,28	0,075	-0,2
CTRL1_B2	0,075	4683	16250	0,29	0,078	4,4
CTRL1_C1	0,075	6694	24402	0,27	0,074	-1,9
CTRL1_C2	0,075	6209	24072	0,26	0,068	-9,3
Mean		5270	19217	0,28	0,074	
% RSD		18,7	21,2	3,6	4,6	-1,3
CTRL2_A1	0,250	12984	16737	0,78	0,244	-2,4
CTRL2_A2	0,250	11902	17124	0,70	0,217	-13,4
CTRL2_B1	0,250	17021	19001	0,90	0,285	13,9
CTRL2_B2	0,250	15530	20103	0,77	0,243	-2,8
CTRL2_C1	0,250	13847	17914	0,77	0,243	-2,8
CTRL2_C2	0,250	13985	20300	0,69	0,214	-14,2
Mean		14212	18530	0,77	0,241	
% RSD		12,8	8,1	9,8	10,6	-3,6
CTRL3_A1	0,500	28301	19764	1,43	0,467	-6,6
CTRL3_A2	0,500	29808	19233	1,55	0,507	1,4
CTRL3_B1	0,500	22514	15435	1,46	0,476	-4,8
CTRL3_B2	0,500	23710	15646	1,52	0,495	-0,9
CTRL3_C1	0,500	34400	22117	1,56	0,509	1,8
CTRL3_C2	0,500	33344	21785	1,53	0,500	0,1
Mean		28679	18997	1,51	0,492	
% RSD		17,0	15,3	3,4	3,5	-1,5

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στο πλάσμα 2^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,050	3071	16740	0,18	0,051	2,4
STD1_A2	0,050	2735	14592	0,19	0,053	5,4
STD1_B1						
STD1_B2	0,050	1993	10968	0,18	0,051	1,1
Mean		2903	15666	0,19	0,052	3,9
% RSD		19,0	18,6	1,6	2,1	
STD2_A1	0,075	2906	12456	0,23	0,070	-7,1
STD2_A2	0,075	3519	13564	0,26	0,079	5,7
STD2_B1	0,075	2697	10681	0,25	0,077	2,4
STD2_B2	0,075	3308	13208	0,25	0,076	1,3
Mean		3107	12477	0,25	0,075	0,6
% RSD		12,0	10,3	4,5	5,4	
STD3_A1	0,100	3983	13154	0,30	0,095	-4,6
STD3_A2	0,100	4413	13484	0,33	0,104	4,4
STD3_B1	0,100	4415	13930	0,32	0,101	0,6
STD3_B2	0,100	3919	13035	0,30	0,095	-5,4
Mean		4182	13401	0,31	0,099	-1,3
% RSD		6,4	3,0	4,0	4,7	
STD4_A1	0,250	9301	12318	0,76	0,263	5,1
STD4_A2	0,250	8195	11689	0,70	0,243	-2,9
STD4_B1	0,250	10004	13600	0,74	0,256	2,2
STD4_B2	0,250	9934	13465	0,74	0,256	2,5
Mean		9359	12768	0,73	0,254	1,7
% RSD		8,9	7,2	3,1	3,3	
STD5_A1	0,500	13553	9833	1,38	0,493	-1,3
STD5_A2	0,500	13531	9632	1,40	0,503	0,6
STD5_B1	0,500	16351	11366	1,44	0,516	3,1
STD5_B2	0,500	17783	13238	1,34	0,480	-3,9
Mean		15305	11017	1,39	0,498	-0,4
% RSD		13,8	15,2	2,9	3,0	
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,075	3984	17172	0,23	0,069	-7,8
CTRL1_A2	0,075	4309	17829	0,24	0,073	-3,0
CTRL1_B1	0,075	4692	18785	0,25	0,076	1,0
CTRL1_B2	0,075	4341	18947	0,23	0,068	-9,2
CTRL1_C1	0,075	5272	20490	0,26	0,079	4,7
CTRL1_C2	0,075	5481	21704	0,25	0,077	2,4
Mean		4680	19155	0,24	0,074	-2,0
% RSD		12,6	8,8	4,7	5,8	
CTRL2_A1	0,250	12089	17369	0,70	0,241	-3,6
CTRL2_A2	0,250	11652	17381	0,67	0,231	-7,4
CTRL2_B1	0,250	13587	19569	0,69	0,240	-3,9
CTRL2_B2	0,250	12847	19509	0,66	0,227	-9,2
CTRL2_C1	0,250	12639	16143	0,78	0,273	9,2
CTRL2_C2	0,250	11991	16161	0,74	0,258	3,2
Mean		12467	17689	0,71	0,245	-2,0
% RSD		5,6	8,7	6,6	7,1	
CTRL3_A1	0,500	24763	16719	1,48	0,531	6,3
CTRL3_A2	0,500	25325	16982	1,49	0,535	7,0
CTRL3_B1	0,500	20532	14148	1,45	0,520	4,1
CTRL3_B2	0,500	20684	13858	1,49	0,536	7,1
CTRL3_C1	0,500	26353	18134	1,45	0,521	4,2
CTRL3_C2	0,500	27577	18955	1,45	0,522	4,3
Mean		24205	16466	1,47	0,528	5,5
% RSD		12,2	12,6	1,3	1,4	

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στο πλάσμα 3^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,050	1985	12809	0,15	0,050	0,1
STD1_A2	0,050	1646	10234	0,16	0,052	4,0
STD1_B1						
STD1_B2	0,050	1839	11971	0,15	0,050	-0,8
Mean		1815	11521	0,16	0,051	2,1
% RSD		9,4	11,4	2,4	2,5	
STD2_A1	0,075	2903	12404	0,23	0,076	1,8
STD2_A2	0,075	2773	11915	0,23	0,076	1,2
STD2_B1	0,075	2746	12041	0,23	0,074	-0,9
STD2_B2	0,075	2996	12953	0,23	0,075	0,6
Mean		2854	12328	0,23	0,076	0,7
% RSD		4,1	3,8	1,1	1,1	
STD3_A1	0,100	3982	12830	0,31	0,102	1,7
STD3_A2	0,100	3812	12000	0,32	0,104	4,1
STD3_B1	0,100	3330	10489	0,32	0,104	4,1
STD3_B2	0,100	3519	11603	0,30	0,099	-0,7
Mean		3661	11730	0,31	0,102	2,3
% RSD		8,0	8,3	2,2	2,2	
STD4_A1	0,250	9698	12257	0,79	0,261	4,6
STD4_A2	0,250	9334	12575	0,74	0,245	-1,9
STD4_B1	0,250	6236	8542	0,73	0,241	-3,6
STD4_B2	0,250	6280	8324	0,75	0,249	-0,3
Mean		7887	10424	0,75	0,249	-0,3
% RSD		23,9	22,1	3,5	3,5	
STD5_A1	0,500	11544	7651	1,51	0,500	0,0
STD5_A2	0,500	11281	7540	1,50	0,496	-0,9
STD5_B1	0,500	12100	7923	1,53	0,506	1,2
STD5_B2	0,500	17443	11582	1,51	0,499	-0,2
Mean		13092	8674	1,51	0,500	0,0
% RSD		22,3	22,4	0,9	0,9	
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,075	2770	11468	0,24	0,079	5,1
CTRL1_A2	0,075	3244	14287	0,23	0,074	-1,3
CTRL1_B1	0,075	4886	19449	0,25	0,082	9,4
CTRL1_B2	0,075	5452	22532	0,24	0,079	5,3
CTRL1_C1	0,075	5243	24486	0,21	0,070	-7,0
CTRL1_C2	0,075	4101	17557	0,23	0,076	1,6
Mean		4283	18296	0,23	0,077	2,2
% RSD		25,7	26,9	5,6	5,7	
CTRL2_A1	0,250	11048	15852	0,70	0,230	-8,0
CTRL2_A2	0,250	13276	18105	0,73	0,242	-3,1
CTRL2_B1	0,250	14612	19180	0,76	0,252	0,7
CTRL2_B2	0,250	11086	15012	0,74	0,244	-2,4
CTRL2_C1	0,250	7703	10271	0,75	0,248	-0,9
CTRL2_C2	0,250	9093	11075	0,82	0,271	8,5
Mean		11136	14916	0,75	0,248	-0,9
% RSD		22,9	24,3	5,5	5,5	
CTRL3_A1	0,500	20533	15121	1,36	0,450	-10,1
CTRL3_A2	0,500	21618	15215	1,42	0,471	-5,9
CTRL3_B1	0,500	24182	17161	1,41	0,467	-6,7
CTRL3_B2	0,500	25754	16978	1,52	0,502	0,5
CTRL3_C1	0,500	25259	16665	1,52	0,502	0,4
CTRL3_C2	0,500	23099	15914	1,45	0,481	-3,8
Mean		23407	16176	1,45	0,479	-4,3
% RSD		8,8	5,5	4,3	4,4	

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στο πλάσμα 4^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1	0,050	1844	13145	0,14	0,044	-11,9
STD1_A2	0,050	1371	9342	0,15	0,047	-6,8
STD1_B1	0,050	1947	12560	0,16	0,050	-0,3
STD1_B2	0,050	2134	13179	0,16	0,053	5,0
Mean		1824	12056	0,15	0,048	
% RSD		17,8	15,2	6,3	7,7	-3,5
STD2_A1	0,075	2756	12083	0,23	0,078	4,4
STD2_A2	0,075	2236	10179	0,22	0,075	0,0
STD2_B1	0,075	2751	12573	0,22	0,075	-0,4
STD2_B2	0,075	2650	12626	0,21	0,071	-5,0
Mean		2598	11865	0,22	0,075	
% RSD		9,5	9,7	3,4	3,9	-0,2
STD3_A1	0,100	3367	11673	0,29	0,102	1,8
STD3_A2	0,100	3412	12166	0,28	0,099	-1,3
STD3_B1	0,100	3430	11267	0,30	0,108	8,1
STD3_B2	0,100	3654	12466	0,29	0,104	3,7
Mean		3466	11893	0,29	0,103	
% RSD		3,7	4,5	3,4	3,8	3,1
STD4_A1	0,250	6828	10694	0,64	0,238	-4,7
STD4_A2	0,250	8029	11551	0,70	0,260	4,2
STD4_B1	0,250	5084	7724	0,66	0,246	-1,6
STD4_B2	0,250	4989	7484	0,67	0,249	-0,3
Mean		6232	9363	0,66	0,249	
% RSD		23,5	22,0	3,5	3,7	-0,6
STD5_A1	0,500	10170	7354	1,38	0,529	5,7
STD5_A2	0,500	9703	7802	1,24	0,474	-5,1
STD5_B1	0,500	8599	6686	1,29	0,491	-1,8
STD5_B2	0,500	10692	8044	1,33	0,508	1,5
Mean		9791	7472	1,31	0,500	
% RSD		9,1	8,0	4,6	4,6	0,1
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΩΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,075	3064	13579	0,23	0,077	3,2
CTRL1_A2	0,075	3679	15637	0,24	0,081	8,2
CTRL1_B1	0,075	3937	20405	0,19	0,065	-13,8
CTRL1_B2	0,075	2919	14029	0,21	0,071	-6,0
CTRL1_C1	0,075	3079	15711	0,20	0,066	-12,3
CTRL1_C2	0,075	2721	13704	0,20	0,067	-10,9
Mean		3233	15511	0,21	0,071	
% RSD		14,6	16,6	8,3	9,5	-5,3
CTRL2_A1	0,250	10454	14321	0,73	0,274	9,6
CTRL2_A2	0,250	11474	15953	0,72	0,270	7,9
CTRL2_B1	0,250	11474	18019	0,64	0,238	-4,9
CTRL2_B2	0,250	13725	21771	0,63	0,235	-5,9
CTRL2_C1	0,250	7937	12112	0,66	0,245	-2,0
CTRL2_C2	0,250	7953	11217	0,71	0,266	6,3
Mean		10503	15566	0,68	0,255	
% RSD		21,4	25,2	6,5	6,8	1,8
CTRL3_A1	0,500	19447	15893	1,22	0,466	-6,7
CTRL3_A2	0,500	20854	17460	1,19	0,455	-9,0
CTRL3_B1	0,500	22156	17545	1,26	0,482	-3,6
CTRL3_B2	0,500	18978	15269	1,24	0,474	-5,2
CTRL3_C1	0,500	18467	14351	1,29	0,491	-1,8
CTRL3_C2	0,500	23003	16719	1,38	0,526	5,2
Mean		20484	16206	1,26	0,482	
% RSD		8,9	7,8	5,0	5,1	-3,5

Καμπύλη αναφοράς φλουτικαζόνης στο πλάσμα 5^{ης} εργαστηριακής ημέρας

ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
STD1_A1						
STD1_A2	0,050	2660	17572	0,15	0,052	3,5
STD1_B1	0,050	3242	21757	0,15	0,051	1,7
STD1_B2	0,050	3425	22382	0,15	0,052	4,8
Mean		3109	20570	0,15	0,052	
% RSD		12,8	12,7	1,3	1,5	3,4
STD2_A1	0,075	3287	18074	0,18	0,064	-14,9
STD2_A2	0,075	2911	14719	0,20	0,070	-6,5
STD2_B1	0,075	4350	19551	0,22	0,080	6,5
STD2_B2	0,075	3841	17595	0,22	0,078	4,3
Mean		3597	17485	0,21	0,073	
% RSD		17,5	11,6	9,2	10,2	-2,7
STD3_A1	0,100	5985	21482	0,28	0,102	2,0
STD3_A2						
STD3_B1	0,100	5020	19100	0,26	0,096	-4,2
STD3_B2	0,100	5101	17869	0,29	0,105	4,7
Mean		5368	19484	0,28	0,101	
% RSD		10,0	9,4	4,2	4,5	0,8
STD4_A1	0,250	10859	17517	0,62	0,237	-5,3
STD4_A2	0,250	9883	15743	0,63	0,240	-4,0
STD4_B1	0,250	11988	17221	0,70	0,267	6,8
STD4_B2	0,250	11259	17062	0,66	0,253	1,0
Mean		10997	16886	0,65	0,249	
% RSD		8,0	4,6	5,3	5,5	-0,4
STD5_A1	0,500	16513	12243	1,35	0,525	4,9
STD5_A2	0,500	15222	11893	1,28	0,497	-0,5
STD5_B1	0,500	15500	12654	1,22	0,476	-4,9
STD5_B2	0,500	21305	16436	1,30	0,504	0,8
Mean		17135	13307	1,29	0,500	
% RSD		16,5	15,9	4,0	4,0	0,1
ΔΕΙΓΜΑ	ΘΩΕΡΗΤΙΚΗ (ng/mL)	AREA	AREA ISTD	AREA RATIO	ΣΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ (ng/mL)	% ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ
CTRL1_A1	0,075	5759	27216	0,21	0,076	0,7
CTRL1_A2	0,075	6260	28232	0,22	0,080	6,1
CTRL1_B1	0,075	7057	30851	0,23	0,082	9,8
CTRL1_B2	0,075	3334	16149	0,21	0,074	-2,0
CTRL1_C1	0,075	6803	30666	0,22	0,080	6,1
CTRL1_C2	0,075	7964	37880	0,21	0,075	0,0
Mean		6196	28499	0,22	0,078	
% RSD		25,6	24,9	4,0	4,4	3,5
CTRL2_A1	0,250	21890	30524	0,72	0,275	10,1
CTRL2_A2	0,250	16936	25764	0,66	0,252	0,6
CTRL2_B1	0,250	11661	18020	0,65	0,248	-1,0
CTRL2_B2	0,250	11771	18579	0,63	0,242	-3,1
CTRL2_C1	0,250	10289	15150	0,68	0,260	4,1
CTRL2_C2	0,250	15079	22992	0,66	0,251	0,4
Mean		14604	21838	0,67	0,255	
% RSD		29,7	26,1	4,4	4,6	1,9
CTRL3_A1	0,500	37344	29148	1,28	0,498	-0,4
CTRL3_A2	0,500	34007	27546	1,23	0,480	-4,1
CTRL3_B1	0,500	14001	10543	1,33	0,516	3,3
CTRL3_B2	0,500	26422	19696	1,34	0,522	4,4
CTRL3_C1	0,500	23966	19137	1,25	0,487	-2,7
CTRL3_C2	0,500	22050	16406	1,34	0,523	4,6
Mean		26298	20413	1,30	0,504	
% RSD		32,1	34,1	3,7	3,7	0,8

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ



Παναγιώτης Σακελλαρίου

Βιολόγος, M.Sc., Υποψήφιος Διδάκτωρ

Δεμρδεσίου 145, Νέα Ιωνία, 14233, Αθήνα, Ελλάδα,
(0030)-2102774260, (0030)-6978630017

panagiotissakellariou90@gmail.com

Ημερομηνία και Τόπος Γέννησης: 07/07/1990, Μαρούσι, Αττική, Ελλάδα
Εθνικότητα: Ελληνική

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

6/2016-σήμερα

Υποψήφιος Διδάκτωρ Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), Ελλάδα.

Ερευνητική Διδακτορική Διατριβή: “Συγκριτική μελέτη μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης αυτόλογης μετάγγισης αίματος και διέγερσης ερυθροποίησης με εντοπισμό βιοδεικτών σε βιολογικά δείγματα για τον έλεγχο ντόπινγκ αθλητών”, Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ, Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.), Ελλάδα.

Επιβλέπουσα: Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας.

Εξωτερικοί Επιβλέποντες: Ιωάννης Αγγελής & Μαρία Τσίβου, Διευθυντές Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ.

1/2014-7/2015

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική»: Τμήματα Βιολογίας, Χημείας και Νοσηλευτικής (Διατμηματικό), Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), Ελλάδα (Βαθμός: 8,7 Άριστα).

Ερευνητική Διπλωματική Εργασία (ετήσια): “Ποσοτικός προσδιορισμός σαλβουταμόλης και εφεδρινών σε ούρα αθλητών με απευθείας ένεση ούρων για τον έλεγχο ντόπινγκ με χρήση LC-QTOF-MS”, Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ, Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.), Ελλάδα (Βαθμός: 10 Άριστα).

Επιβλέπουσα: Εύη Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Ανάλυσης.

Εξωτερικός Επιβλέπων: Μανώλης Λυρής, Διευθυντής Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ.

9/2009-7/2013

Πτυχίο Βιολογίας: Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), Ελλάδα (Βαθμός: 7,12 Λίαν Καλώς).

Ερευνητική Διπλωματική Εργασία (ετήσια): “Χαρακτηρισμός της βιολογικής δράσης της core/core+1 πρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C (HCV)”, Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα (Βαθμός: 10 Άριστα).

Επιβλέπουσα: Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών.

Εξωτερική Επιβλέπουσα: Πηνελόπη Μαυρομαρά, Διευθύντρια Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας.

9/2005-6/2008

3^ο Ενιαίο Λύκειο Νέας Ιωνίας, Αθήνα, Ελλάδα (Βαθμός: 18,9 Άριστα).

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 3/2019-σήμερα** Εθελοντική εργασία στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας υπό τη διεύθυνση του Δρ. Ιωάννη Αγγελή. Υπεύθυνος για τις εργαστηριακές διαδικασίες και την εκτίμηση αποτελεσμάτων για την ανίχνευση ερυθροποιητίνης με IEF και SDS-PAGE σε δείγματα ούρων, χοριακής γοναδοτροπίνης με ανοσολογικό αναλυτή και ELISA σε δείγματα ούρων και αυξητικής ορμόνης με χημειοφωταύγεια σε δείγματα αίματος.
- 5/2017-σήμερα** Εθελοντική εργασία στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας υπό τη διεύθυνση των Δρ. Ιωάννη Αγγελή και Δρ. Μαρίας Τσίβου. Υπεύθυνος για τη λειτουργία του αιματολογικού αναλυτή, την εκτίμηση αποτελεσμάτων και τη συμμετοχή στο αντίστοιχο πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου ποιότητας του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) για το Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή (Athlete Biological Passport, ABP).
- 7/2016-12/2019** Ιδιωτικό συμφωνητικό ανάθεσης έργου με το Πανεπιστήμιο Λευκωσίας της Κύπρου και τον Δρ. Μιχαήλ Πέτρου, στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) ερευνητικού προγράμματος “Μελέτη φαρμακοκινητικής της σαλμετερόλης, χορηγούμενης δια εισπνοής, μόνης ή σε συνδυασμό με φλουτικαζόνη και τυποποίηση πολυμορφισμών των CYP3A4 και P-gp” (2012), σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας (Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών, Ο.Α.Κ.Α.) και τους Διευθυντές Δρ. Ιωάννη Αγγελή και Δρ. Μαρία Τσίβου. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι υπό δημοσίευση.
- 9/2015-4/2016** Οκτάμηνη σύμβαση εθελοντικής εργασίας με το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας (Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών, Ο.Α.Κ.Α.) υπό τη διεύθυνση των Δρ. Μανώλη Λυρή και Δρ. Μαρίας Τσίβου, στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) διεθνούς ερευνητικού προγράμματος “Ανάπτυξη και εναρμόνιση άμεσων ποσοτικών μεθόδων ανάλυσης ούρων για ουσίες ορίου” (2007), σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Βελγίου (Πανεπιστήμιο Γάνδης). Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν πρόκειται να δημοσιευθούν.
- 9/2014-9/2016** Εθελοντική εργασία στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ της Αθήνας (Ολυμπιακό Αθλητικό Κέντρο Αθηνών, Ο.Α.Κ.Α.) υπό τη διεύθυνση των Δρ. Μανώλη Λυρή και Δρ. Μαρίας Τσίβου, παράλληλα με τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Συμμετοχή στην παρασκευαστική προετοιμασία δειγμάτων ούρων για ανάλυση σε συστήματα LC-MS και GC-MS, στην ανάλυση των δειγμάτων των αθλητών και την εκτίμηση των αποτελεσμάτων με χρήση LC-QTOF-MS/MS.
- 9/2013-11/2013** Τρίμηνη σύμβαση εθελοντικής εργασίας με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ και το Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας υπό τη διεύθυνση της Δρ. Πηνελόπης Μαυρομαρά. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δημοσιεύθηκαν στο Journal of Virology (βλ. δημοσιεύσεις παρακάτω).

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 6/2015** Διάλεξη: “Εφαρμογή της τεχνικής LC/QTOF-MS στο Αντι-ντόπινγκ”, στα πλαίσια του προπτυχιακού μαθήματος “Αναλυτική Χημεία”, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), Ελλάδα (μετά από πρόσκληση της Καθηγήτριας Εύης Λιανίδου, συντονίστριας του μαθήματος).

ΤΕΧΝΙΚΗ/ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ

- ✓ ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε ούρα και αίμα (προδιαγραφές WADA & πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025:2005)
- ✓ συμμετοχή σε εξωτερικούς ελέγχους ποιότητας (proficiency tests) μεταξύ των Εργαστηρίων Ελέγχου Ντόπινγκ παγκοσμίως
- ✓ επικύρωση λειτουργίας, συντήρηση, λειτουργία και γνώση λογισμικού αιματολογικού αναλυτή Sysmex
- ✓ υγροχρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένη με απλή ή δίδυμη φασματομετρία μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών και αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης (UHPLC-QTOF-MS/MS) - γνώση λογισμικού Masshunter (Agilent Technologies)
- ✓ ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με ισοηλεκτρική εστίαση (IEF)
- ✓ ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)
- ✓ ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (transfer)
- ✓ ανοσοσύτρωμα πρωτεϊνών (Western blot)
- ✓ εμφάνιση ανοσοδραστικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμο κιτ
- ✓ χρήση αυτόματου συστήματος ψηφιακής απεικόνισης πηκτωμάτων και ανοσοσυτρωμάτων πρωτεϊνών LAS 4000
- ✓ ποσοτικοποίηση ερυθροποιητίνης από ψηφιακές εικόνες πηκτωμάτων και ανοσοσυτρωμάτων με χρήση λογισμικού GASepo
- ✓ συμπύκνωση ούρων με χρήση φυγοκεντρικού φίλτρου για ανίχνευση ερυθροποιητίνης (EPO)
- ✓ ανίχνευση ισομορφών ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH) σε ορό αίματος με χρήση ανοσολογικής δοκιμής χημειοφωταύγειας σε λουμιμόμετρο με εμπορικά διαθέσιμο κιτ
- ✓ ανίχνευση ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) και ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) με ανοσολογική δοκιμή σε αυτόματο ανοσολογικό-ορμονολογικό αναλυτή Immulite 1000 (Siemens)
- ✓ δοκιμασία ενζυμο-συζευγμένης ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για ανίχνευση ερυθροποιητίνης (EPO) και ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) με εμπορικά διαθέσιμα κιτ και χρήση του αυτόματου συστήματος ενζυμικής ανοσοδοκίμασας BEST 2000 (DSX)
- ✓ παρασκευαστική προετοιμασία δειγμάτων ούρων για ανάλυση σε συστήματα LC-MS και GC-MS
- ✓ ποσοτικοποίηση RNA με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)
- ✓ καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών (απόψυξη, διαίρεση, λύση, συλλογή, κατάψυξη και μικροσκόπηση κυττάρων)
- ✓ μόλυνση καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών με τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) (infection)
- ✓ εισαγωγή νουκλεϊκών οξέων σε καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)
- ✓ εισαγωγή νουκλεϊκών οξέων σε καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών με επιμόλυνση με λιπόσωμα (transfection)
- ✓ κλωνοποίηση γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς [πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αποφωσφορυλίωση DNA (αντίδραση CIAP), αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA (ligation)]
- ✓ *in vitro* μεταγραφή με χρήση DNA πολυμεράσης
- ✓ ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης, εκχύλιση και καθαρισμός με εμπορικά διαθέσιμο κιτ
- ✓ καλλιέργειες βακτηρίων
- ✓ μετασχηματισμός (transformation) βακτηρίων με θερμικό σοκ
- ✓ προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC) σε λουμιμόμετρο με εμπορικά διαθέσιμο κιτ
- ✓ απομόνωση ολικού RNA από καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών με εμπορικά διαθέσιμο κιτ
- ✓ απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια με την μέθοδο του βρασμού ή με εμπορικά διαθέσιμο κιτ
- ✓ καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων με κατεργασία με φαινόλη – χλωροφόρμιο
- ✓ ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford
- ✓ προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων σε φασματοφωτόμετρο τύπου Nanodrop

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. **Sakellariou, P.**, Kiouisi, P., Fragkaki, A.G., Lyris, E., Petrou, M., Georgakopoulos, C., Angelis, Y.S. Alternative Markers for Methyltestosterone Misuse in Human Urine. *Drug Test Anal.* 2020. doi: 10.1002/dta.2887.
2. **Sakellariou, P.**, Angelis, Y.S., 2020. Current methods of direct and indirect blood doping detection. *Pharmakeftiki Journal.* 2020. (accepted under publishing)
3. Fragkaki AG, **Sakellariou P**, Kiouisi P, Kioukia-Fougia N, Tsiou M, Petrou M, Angelis Y. Human in vivo metabolism study of LGD-4033. *Drug Testing and Analysis.* **2018** Nov;10(11-12):1635-1645. doi: 10.1002/dta.2512.
4. Ioly Kotta-Loizou, Ioannis Karakasiliotis, Niki Vassilaki, **Panagiotis Sakellariou**, Ralf Bartenschlager and Penelope Mavromara. Expression of the Novel Hepatitis C Virus Core+1/ARF Protein in the Context of JFH1-Based Replicons. *Journal of Virology.* **2015** May;89(9):5164-70. doi: 10.1128/JVI.02351-14.
5. Niki Vassilaki , Efseveia Frakolaki, Katerina I. Kalliampakou, **Panagiotis Sakellariou**, Ioly Kotta-Loizou, Ralf Bartenschlager, Penelope Mavromara. Evidence for a novel IRES-like element embedded in the N-terminal highly structured core coding region of the Hepatitis C virus genome and its role in directing translation initiation of the core+1 ORF. *Molecular Immunology.* **2020.** (under reviewing)
6. **Panagiotis Sakellariou**, Michael Petrouc, Emmanouil Lyris, Maria Tsiou, Argyro Fragkaki, Polyxeni Kiouisi, Yiannis S. Angelis, Constantinos Pistos. Simultaneous determination of salmeterol, α -hydroxysalmeterol and fluticasone propionate in human urine and plasma for doping control using UHPLC-QTOF-MS. **2020.** (under submission)

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

1. Fragkaki AG, **Sakellariou P**, Kiouisi P, Kioukia-Fougia N, Tsiou M, Petrou M, Angelis YS. Human in vivo metabolism study of LGD-4033. Manfred Donike Workshop, 36th Cologne Workshop on Dope Analysis. Cologne, Germany. 22-27 April **2018.** (βραβείο καλύτερης αναρτημένης δημοσίευσης)
2. Ιωάννης Καρακασιλιώτης, Ιόλη Κόττα-Λοΐζου, Νίκη Βασιλάκη, **Παναγιώτης Σακελλαρίου**, Σαββίνα Μουσταφά, Ευσεβία Φρακολάκη, Κατερίνα Κασσέλα, Ralf Bartenschlager, Πηνελόπη Μαυρομαρά. Έκφραση της εναλλακτικής πρωτεΐνης core+1/ARF του ιού της ηπατίτιδας C κατά την αντιγραφή του ιού. 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας. Αθήνα, Ελλάδα. 27-28 Φεβρουαρίου **2015.** Αναρτημένη παρουσίαση.
3. Ioannis Karakasiliotis, Ioly Kotta-Loizou, Niki Vassilaki, **Panagiotis Sakellariou**, Savvina Moustafa, Efseveia Frakolaki, Katerina Kassela, Ralf Bartenschlager, Penelope Mavromara. Expression of the unique HCV core+1/ARF protein in the context of JFH1-based replicons. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2014). Banff, Canada. 7-11 September **2014.** Poster presentation P3.70.
4. Vassilaki Niki, Kotta-Loizou Ioly, **Sakellariou Panagiotis**, Frakolaki Efseveia, Bartenschlager Ralf and Mavromara Penelope. An IRES-like element identified within the HCV core-coding region mediates internal translation initiation of the core+1/Short protein in the HCV replicon. 64th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. Athens, Greece. 6-8 December **2013.** Oral presentation O34 - speaker Vassilaki N.
5. Vassilaki Niki, Kotta-Loizou Ioly, **Sakellariou Panagiotis**, Bartenschlager Ralf and Mavromara Penelope. Two isoforms of HCV core+1/ARFP protein are expressed in the context of the HCV replicon system through alternative translation mechanisms. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2013). Melbourne, Australia. 6-10 October **2013.** Poster presentation P-077.

6. Niki Vassilaki, Ioly Kotta-Loizou, **Panagiotis Sakellariou**, Ralf Bartenschlager, Penelope Mavromara. Characterization of the translational mechanism that controls the synthesis of the short form of HCV core+1/ARFP protein. 5th European Congress of Virology (ECV2013). Lyon, France. 11-14 September **2013**. Poster presentation REF 194.

ΤΗΛΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ/e-LEARNING (μέσω της ιστοσελίδας τηλεκαίδευσης Coursera)

- 3/2016-4/2016** “Ντόπινγκ: Αθλήματα, Οργανισμοί και Επιστήμες”, Πανεπιστήμιο Λωζάνης, Ελβετία (Βαθμός: 100.0%).
- 10/2015-12/2015** “Οι Ολυμπιακοί Αγώνες και τα Μέσα Ενημέρωσης”, Αυτόνομο Πανεπιστήμιο Βαρκελώνης, Ισπανία (Βαθμός: 99.0% Άριστα).
- 10/2015-11/2015** “Εισαγωγή στην Επιστήμη του Καρκίνου”, Πανεπιστήμιο Οχάιο, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Βαθμός: 100.0% Άριστα).
- 7/2015-8/2015** “Εισαγωγή στην Εγκληματολογία”, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Νανγιάνγκ, Σιγκαπούρη (Βαθμός: 96.7% Άριστα).
- 7/2013-8/2013** “Εργοφυσιολογία: Κατανοώντας τον αθλητή μέσα του”, Πανεπιστήμιο Μελβούρνης, Αυστραλία (Βαθμός: 73.2%).

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ - ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Symposium on Mass Spectrometry and Health, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, 18-19 November 2014.
- Agilent in Pharma: Improving Compliance & Productivity, Athens, Greece, 7 October 2014.
- INSPiRE INTERNATIONAL CONFERENCE «Tumor Biomarkers: From Discovery to Clinical Applications» (TB2014), Anavyssos, Greece, 14-16 June 2014.
- 64^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ2013), Αθήνα, 6-8 Δεκεμβρίου 2013.
- 2^ο Συνέδριο Αθλητικής Επιστήμης «Άσκηση & Υγεία», Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 19-21 Απριλίου 2013.
- 2^ο Συνέδριο Βιοχημείας και Φυσιολογίας της Άσκησης, Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Φυσιολογίας της Άσκησης (ΕΕΒΦΑ2012), Αθήνα, 12-13 Οκτωβρίου 2012.
- 62^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ2011), Αθήνα, 9-11 Δεκεμβρίου 2011.

ΛΟΙΠΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ξένες γλώσσες: Αγγλικά (επίπεδο B2): Certificate of Competency in English, University of Michigan
First Certificate in English, University of Cambridge

Γνώσεις Η/Υ: Στατιστική επεξεργασία πειραματικών αποτελεσμάτων με ANOVA και Student’s t-test

ECDL Progress Certificate

Ενδιαφέροντα: ενασχόληση με τον κλασικό αθλητισμό (στίβος), εθελοντισμός σε αθλητικές διοργανώσεις

Alternative Markers for Methyltestosterone Misuse in Human Urine

P. Sakellariou^{a,b+}, P. Kiouisi^{a+}, A.G. Fragkaki^a, E. Lyris^c, M. Petrou^d, C. Georgakopoulos^e, Y.S. Angelis^{a*}

^a Doping Control Laboratory of Athens, Institute of Biosciences & Applications, National Center for Scientific Research “Demokritos”, Neratziotissis & Amaryssias Artemidos Str, 15123, Athens, Greece

^b Faculty of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, Zografou, 15771 Athens, Greece

^c Novartis Technical Operations, Biotechnology & Aseptics, Sandoz GmbH, Schaftebau site, Biochemiestrasse 10, Bau 531, 6336 Langkampfen, Austria, Langkampfen, AT

^d Cyprus Anti-Doping Authority, Makarion Athletic Center Avenue, Engomi, Nicosia, CY 2400, Cyprus

^e AntiDoping Lab Qatar, P.O. Box 27775, Doha, Qatar

⁺ The two authors were contributed equally to this manuscript

** Address for correspondence:*

Y.S. Angelis, PhD

Tel: +30 210 6853074

Fax: +30 210 6834567

E-mail: i.angelis@bio.demokritos.gr

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/dta.2887

Abstract

Methylnortestosterone is a progestin and synthetic androgenic anabolic steroid, prohibited by WADA. Methylnortestosterone misuse is commonly detected by monitoring the parent compound and its main metabolites, 17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol (M1) and 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol (M2), in the glucuronide fraction. In the current study, a direct detection of methylnortestosterone sulfo-conjugated metabolites after ethyl acetate extraction and analysis by LC/Q/TOF-MS in negative ionization mode was performed, detecting two main sulfate metabolites (S1, S2). For the characterization of metabolites, samples from the excretion study, were additionally analyzed by GC-MS, after solvolysis and per TMS derivatization. RT and MS data collected, were compared with RT and MS data from metabolites of 17 α -methyl-5 α/β -estrane-3 α/β , 17 α -diols structures with prefixed stereochemistry at 3 and 5 positions, synthesized through Grignard reaction from 19-noretiocholanolone, 19-norandrosterone and 19-norepiandrosterone. Confirmed sulfate metabolites were S1, 17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol 3 α sulfate (detected up to 72 h) and S2, 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol 3 α sulfate (detected up to 192 h).

Furthermore, applying targeted analysis based on RT and MS data of the synthesized metabolites two additional metabolites M3, 17 β -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 α -diol and M4, 17 β -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 α -diol were detected in the glucuronide fraction and one more metabolite (S3) 17 β -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 α -diol was detected in the sulfate fraction in lower abundance until the end of the excretion study (192h). Interestingly, S2 could also be detected after the direct analysis of non-hydrolyzed steroid by GC-MS/MS as artifact, following normal ProcIV anabolic steroid procedure and using diethylether as extraction solvent.

Keywords: Methylnortestosterone, sulfate metabolites, glucuronide metabolites, doping analysis, LC/Q/TOFMS, GC-MS/MS

1. Introduction

Synthetic anabolic androgenic steroids (AASs) are analogues of the principal male sexhormone testosterone that have been designed to promote muscle growth and to be used therapeutically to treat conditions resulting from steroid-hormone deficiency and diseases that result in loss of lean muscle mass^{1,2,3}. Because of their muscle promoting properties and their ability to increase strength and athletic performance AASs is still the more frequently prohibited group of substances reported as Adverse Analytical Findings (AAFs)⁴ in sports by World Anti-Doping Agency (WADA)-accredited Laboratories⁵. Despite their ban by International Olympic Committee (IOC) since 1976 and WADA and the accumulative knowledge on their elimination, AASs are still targets of intense research by WADA-accredited Laboratories in order to propose more suitable markers of misuse⁵.

Methylnortestosterone (17 α -MeNT, methylestrenolone, normethandrolone) is a progestin⁶ and it is in medical use in combination with an estrogen in the treatment of amenorrhea and menopausal symptoms in women. Methylnortestosterone is also an anabolic androgenic steroid included in WADA's Prohibited List under the S1 category⁷. Its metabolism related to doping control has been described in the literature and two main metabolites have been presented 17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol (M1) and 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol (M2) along with the unchanged parent compound^{8,9}. The excretion of these metabolites has been confirmed independently by Chundela et al¹⁰ describing two additional metabolites: a hydroxylated and dehydroxylated one. Based on these studies the monitoring of methylnortestosterone misuse in sports is based on the detection of the parent compound and its main metabolites (M1,M2) in the free and glucuronide fraction through gas chromatography-(tandem) mass spectrometry (GC-MS(/MS)). The main methylnortestosterone metabolic pathways in human urine are summarized in Fig.1. Investigation of methylnortestosterone detection has also been presented in horse urine and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis^{11,12,13}.

As in doping control there is a constant interest to improve the detection of AASs, through metabolites not necessarily being the most abundant but also detectable for longest period of time (long-term metabolites) many metabolic studies have been proceeded recently for numerous AASs. Among them, studies concerning methyltestosterone¹⁴, mesterolone^{15,16},

methandienone¹⁷, stanozolol^{18,19}, oxandrolone²⁰, oral turinabol^{21,22}, oxymetholone²³, desoxymethyltestosterone²⁴, clostebol^{25,26}, drostanolone²⁷ and methylstenbolone²⁸ have resulted in new, more potent metabolites. LC-MS(/MS) direct detection of intact phase II metabolites^{29,30} has widely been applied revealing in metabolites that last in urine for longer periods of time with numerous applications including stanozolol^{18,19}, boldione³¹, boldenone³², methandienone³³, methenolone³⁴ and mesterolone³⁵. More recently the direct detection of intact sulfate-conjugated steroids by GC-MS(/MS) has been reported³⁶ offering an alternative powerful tool for the detection of sulfo-conjugated metabolites in doping control applying a rather simple sample preparation procedure.

Our continuous interest on the metabolism of AASs in the sulfate fraction as well as the structural similarities that methylnortestosterone share with methyltestosterone, a steroid with important metabolites in the sulfate fraction that improve the retrospectivity of its detection¹⁴, prompt us to revisit methylnortestosterone metabolism focusing on the sulfate fraction. To the best of our knowledge this is the first time that sulfo-conjugated metabolites of methylnortestosterone are reported. This study was focused on metabolites that could be excreted for a longer time in order to improve methylnortestosterone misuse detection as well as to metabolites reported for the first time. Furthermore, as reference materials were not commercially available, particular attention was focused on metabolites' structure characterization.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Mefruside was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methyl-testosterone was obtained from Remek, Pharmaceutical Laboratories (Athens, Greece). 19-norandrosterone (19-NA), 19-noretiocholanolone (19-NE), 19-norepiandrosterone (19-NEA), methylnortestosterone were purchased from National Measurement Institute (NMI, Canberra, Australia). Stock solutions of the reference substances were prepared in methanol and stored at -20 °C. Diethylether, ethyl acetate and methanol were of analytical grade and obtained from Labscan (Dublin, Ireland). β -Glucuronidase from *Escherichia coli* K12 and β -Glucuronidase/Arylsulfatase from *Helix Pomatia*, were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), potassium dihydrogen

phosphate (KH_2PO_4), disodium carbonate (Na_2CO_3), sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) and sodium sulfate (Na_2SO_4) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium Hydroxide (NaOH) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and sulphuric acid (H_2SO_4 , 96 %) from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile (ACN) for mobile phase preparation was of LC-MS grade and purchased from Riedel-de Haen (Seelze, Germany). Acetic acid and formic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and ammonium formate from Acros Organics (Geel, Belgium). Milli-Q water was obtained by a Milli-Q purifying system (Millipore, Billerica, MA, USA). Ammonium iodide (NH_4I) and propanethiol (2-PrSH) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) was purchased from Pierce Biotechnology (Rockford, USA). Pyridine sulfur trioxide and methylmagnesium bromide were purchased by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2 Drug administration studies

Methylnortestosterone was administered orally (10 mg, dissolved in ethanol/water 30/70 v/v) to a healthy male volunteer (Caucasian, 47 years, 70 kg and 180 cm tall) who declared not to have used any nutritional supplements or medication at least 4 weeks prior to this study. Urine samples were collected prior (0 h) and post administration according to time periods up to 192 h. All samples were stored frozen at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. The administration study was approved by the Bioethics Committee of the National Center for Scientific Research “Demokritos”.

2.3. Sample preparation

2.3.1. Detection of methylnortestosterone potential sulfate metabolites by LC/TOFMS and LC/Q/TOFMS

Mefruside (50 μL from a solution of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to 5 mL urine samples as an internal standard (ISTD). Urine pH was adjusted to 9.5, using $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1, w/w) solid buffer. The potential sulfate metabolites were extracted with 5 mL ethyl acetate according to the procedure that has been reported previously³⁵. Samples were centrifuged and the organic layer was evaporated to dryness under nitrogen at $60\text{ }^\circ\text{C}$. Sulfate conjugates were reconstituted in 100 μL mobile phase of LC system, Solvent A / Solvent B (80/20, v/v). 5 μL of the solution was then injected directly into liquid chromatography/time of flight-mass

spectrometry (LC/TOF-MS) system in order to detect potential sulfate metabolites. The presence of the sulfate group in potential methyltestosterone sulfate metabolites, was confirmed in spotted urine samples, extracted as described above, analyzed by liquid chromatography/quadrupole/time of flight-mass spectrometry (LC/Q/TOFMS) in targeted MS/MS negative mode by monitoring the product ions at m/z 96.9619 and/or at m/z 79.9550.

2.3.2. Identification of methyltestosterone sulfate metabolites

For metabolite characterization, a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) fractionation of urine samples was performed. Sample preparation, for the extraction of methyltestosterone sulfate metabolites, was applied to two replicates of 5 mL of a post administration urine sample and to one replicate of 5 mL of a prior administration urine sample. The organic phases of the two replicates were combined, evaporated to dryness and reconstituted at 110 μ L of ACN/H₂O (60/40, v/v). An aliquot of 100 μ L was then injected in HPLC. Thirty fractions, of one minute duration were collected and after the addition of ISTD (mefruside), were evaporated and reconstituted with 100 μ L of a mixture of solvent A:solvent B (80:20, v/v). An injection volume of 5 μ L was analyzed by LC/Q/TOFMS in order to associate certain fractions with certain metabolites identified by LC/Q/TOFMS. Fractions containing the potential sulfate metabolites were transferred into clean test tubes, evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40 °C and subjected to solvolysis in order to release the corresponding phase I metabolite. Solvolysis procedure was based on a previously described protocol ¹⁴. In brief, 4 mL of ethyl acetate/methanol/sulphuric acid (80:20:0.06, v/v/v) were added and samples were incubated at 55 °C for 2 h. After incubation, samples were neutralized with 60 μ L NaOH solution (1M) and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residues were reconstituted in 1 mL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.0) and 250 μ L of K₂CO₃ solution 5 % were added. Deconjugated steroids were extracted by 5 mL of TBME. After centrifugation of the organic layer, samples were evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 60 °C. For GC-MS analysis, the dry extract was derivatized for trimethylsilyl (TMS) derivatives as follows: 100 μ l of a mixture of MSTFA/NH₄I/2-PrSH (1000:4:3, v/w/v) were added and samples incubated at 80 °C for 30 min. The samples after cooling, were transferred to vials and 2 μ L of the solution was then injected directly into GC-MS.

2.3.3. Synthesis of Methylnortestosterone free metabolites

25 μL of the steroid compounds' solutions 19-NA, 19-NE and 19-NEA 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were transferred to different test tubes and were evaporated to dryness at 60 $^{\circ}\text{C}$ under nitrogen stream. The steroids were re-dissolved in 200 μL of diethylether. Test tubes were placed in an ice bath and 500 μL of methylmagnesium bromide solution (3M) were added. The tubes were then warmed up to room temperature and remained under rotation overnight. The reaction mixture was cooled in an ice bath and reaction was quenched by drop wise addition of 1 ml of NaOH to form a white emulsion. 1.5 ml of acetic acid (1M) was then added to acidify the reaction mixture and turn the reaction mixture to clear solution. The resulted steroids were extracted twice with 5 ml of diethylether and the solvent was evaporated to dryness at 60 $^{\circ}\text{C}$ under nitrogen stream. The reaction mixture was derivatized using 100 μl of a mixture of MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}/2\text{-PrSH}$ (1000:4:3 v/w/v) and incubation at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min without any further purification. The samples, after cooling were transferred to vials and 2 μL of the solution was then injected directly into GC-MS.

2.3.4. Synthesis of S2, 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol 3 α sulfate

Crude reaction mixture from reaction of 25 μL of 19-NE solution 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with methylmagnesium bromide solution as above was re-dissolved in 50 μL of dioxane. 200 μL of dry DMF containing 100 mg of sulfur trioxide-pyridine complex was added to the test tube. The tube was rotated at room temperature overnight. After that, 2 mL of water was added to quench the reaction. The sulfated steroids were extracted with 5 ml ethyl acetate and were evaporated to dryness under nitrogen at 60 $^{\circ}\text{C}$. The crude reaction mixture was derivatized using 100 μl of a mixture of MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}/2\text{-PrSH}$ (1000:4:3, v/w/v) and incubation at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The samples after cooling were transferred to vials and 2 μL of the solution was then injected directly into GC-MS.

2.3.5. Detection and identification of methylnortestosterone metabolites (glucuronide and sulfate) by GC-MS/MS

For the extraction of glucuronide steroids methyltestosterone (50 μL from a solution of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to 5 mL urine samples as ISTD. pH was adjusted to 7.0 using phosphate buffer 1 M and urine samples were incubated for 1.5 h at 55 $^{\circ}\text{C}$, after addition of 100 μL β -glucuronidase from *E. Coli*. Following hydrolysis, urine pH was adjusted to 9.5 with $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1, w/w) solid buffer and glucuronide-hydrolyzed steroids were

extracted with 5 mL diethylether. Samples were centrifuged and then the organic layer was transferred to the tubes and evaporated to dryness under nitrogen at 60 °C. Per TMS derivatives were prepared by adding 100 µL MSTFA/NH₄I/2-PrSH (1000:4:3, v/w/v) to the dry residue. The mixture was incubated at 80 °C for 30 min and 2 µL of the solution was then injected directly into GC-MS/MS (*Series A*). For the extraction of sulfate steroids extraction with 5 mL ethyl acetate was applied to the remaining urine samples (aqua layer after the extraction with diethylether). The organic layer was evaporated to dryness under nitrogen at 60 °C. Then, methyltestosterone (50 µL from a solution of 5 µg/mL) and 1.5 ml acetate buffer pH 5.2 were added to test tubes. Hydrolysis of sulfate steroids was then applied after addition of 100 µL β-glucuronidase/arylsulfatase from *H. Pomatia* and incubation at 50 °C for 3 h. Following hydrolysis, urine pH was adjusted to 9.5 with NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1, w/w) solid buffer and sulfate-hydrolyzed steroids were extracted with 5 mL diethylether. Samples were centrifuged and then the organic layer was transferred to the tubes and evaporated to dryness under nitrogen at 60 °C. Per TMS derivatives were prepared by adding 100 µL MSTFA/NH₄I/2-PrSH (1000:4:3, v/w/v) to the dry residue. The mixture was incubated at 80 °C for 30 min and 2 µL of the solution was then injected directly into GC-MS/MS (*Series B*).

2.4 Instrumentation

2.4.1. LC-HRMS(/MS)

Chromatographic analysis was carried out on an Agilent 1200 Series rapid-resolution LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a Zorbax Eclipse Plus C18 column (100 x 2.1 mm i.d., 1.8 mm particle size; Agilent Technologies). The system consisted of a vacuum degasser, a high-pressure binary pump, an autosampler with a cooled sample tray and a column oven. The mobile phase consisted of 5 mM ammonium formate in 0.01 % formic acid (solvent A) and a mixture of acetonitrile/water (90:10 v/v) containing 5 mM ammonium formate and 0.01 % formic acid (solvent B). A gradient elution program was employed at a constant flow rate of 0.3 mL/min with solvent B increasing from 10 % to 80 % in 9 min and then within 1 min to 100 %, where it was held for 3 min before returning to 10 % within 0.5 min. The analysis run time was 13.5 min and the post-run equilibrium time was 3.5 min. The injection volume was 5 µL. The mass spectrometer was an orthogonal acceleration quadrupole time-of-flight mass spectrometer (6520 Accurate-Mass QTOF LC/MS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an orthogonal

electrospray ionization (ESI) source, a temperature stabilized analogue-to-digital converter (ADC) operated at 2 GHz (extended dynamic range mode) and a multichannel plate operated at 700 V. Ionization was performed in negative mode for sulfates' detection and nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. Source parameters were fixed as follows for the detection of potential sulfate metabolites: Gas temperature, 330 °C; drying gas flow rate, 10 L/min; fragmentor, 140 V; skimmer, 65 V; Oct1 RF Vpp, 750 V; Capillary voltage, 3500 V. Mass calibration was performed daily before starting the analysis set by using a diluted reference mixture of 10 compounds, providing $[M-H]^-$ ions in the mass range of m/z 301.9982–2833.8731, provided by the manufacturer (Agilent Technologies). Reference mass correction was used during the analysis, in order to achieve better mass accuracy, by introducing one reference compound (hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine at m/z 966.0007 (Agilent Technologies) simultaneously with the samples. The reference compound was introduced continuously into the ESI source from a second orthogonal nebulizer. For the confirmation of methyltestosterone sulfate metabolites, an optimization of MS parameters was performed in order to achieve the maximum signal for product ion with m/z 96.9619 (corresponding to the anion $[HSO_4]^-$). Consequently, source parameters were modified as follows: fragmentor, 240V; skimmer, 100V; Capillary voltage, 4500V; Collision Energy (CE), 55 eV.

2.4.2. HPLC

Fraction collection of the sulfate metabolites was performed on an HPLC, HP 1090 (Agilent Technologies, Germany) with a Merck analytical column (LiChrospher 100RP, 125 mm × 4 mm i.d., 5 μm particle size) and an automatic injection system. The injection volume was 100 μL, the flow rate was set to 1 mL/min and the oven temperature at 40 °C. The mobile phase was a mixture of solvent A, H₂O:ACN (90:10, v/v) and solvent B, ACN, starting at a proportion of 10% solvent B. A gradient elution program was used, increasing from the initial proportion to 25% solvent B in 20 min, and then increased to 100% solvent B in 25 min and held for 5 min. Finally, solvent B was returning in 30 min at 5%. The fractions collection was performed on a Waters Fraction Collector II (Manchester, UK). Thirty fractions of one minute duration were collected.

2.4.3. GC-MS/MS

Methylnortestosterone metabolites structural identification, was performed on a Nexis GC 2030 GC system combined with a triple quadrupole mass selective detector Simadzu (Simadzu Corporation, Kyoto, Japan) GCMS-TQ8040NX and equipped with SGE BP X5 (30 m length, 0.25 mm ID , 0.1 μ m film thickness). Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.45 mL /min. 2 μ L of sample was injected in split mode of 10:1. The injection port and the interface temperatures were set at 280 $^{\circ}$ C. Initial oven temperature was 160 $^{\circ}$ C, ramped at 10 $^{\circ}$ C /min to 200 $^{\circ}$ C, then ramped at 2 $^{\circ}$ C /min to 220 $^{\circ}$ C, at 6 $^{\circ}$ C /min to 263 $^{\circ}$ C and finally at 50 $^{\circ}$ C to 310 $^{\circ}$ C (held for 1.6 min). Argon was used as collision gas at a pressure of 4 bar. The MS was programmed in full scan mode (scan range 40-800) or multiple reaction monitoring (MRM) mode.

3. Results and Discussion

3.1. Direct detection of methylnortestosterone sulfate metabolites by LC-MS/MS

Molecular formulas of potential methylnortestosterone sulfate metabolites were theoretically estimated, through the systematic application of metabolic schemes reported for AASs including reduction, oxidation, hydroxylation and their combinations³⁷. This strategy resulted in eighteen different molecular formulas that correspond to numerous isomers of the possible metabolites.

Samples collected prior and post methylnortestosterone administration, were analyzed in both negative and positive ionization mode by LC/Q/TOF-MS in full scan mode. Mass window for the ion extraction of all methylnortestosterone potential sulfate metabolites was set at 20 ppm. Mefruside was used as ISTD in both negative and positive ionization modes (m/z 381.0351 and m/z 383.049, respectively).

No signal was observed in positive ionization mode. Three potential sulfate metabolites were detected in negative mode two peaks with retention time (RT) 6.62 and 6.8 min respectively of m/z [M-H]⁻ 371.1898, encoded as S1 and S2 for the scope of this work and a third peak with RT 5.65 of m/z 387.1847.

The potential methylnortestosterone metabolites were analyzed using LC/Q/TOF-MS in targeted MS/MS mode, monitoring the fragments with m/z 96.9619 (corresponding to the anion $[\text{HSO}_4]^-$) and 79.9550 (corresponding to the anion $[\text{SO}_3]^-$) from the product ion spectrum of each $[\text{M}-\text{H}]^-$. Both fragments were present in product ion spectrum for the three potential sulfate metabolites indicating the presence of sulfate conjugate³⁶. No further structural information was revealed through the study of the product ion mass spectra of the tested metabolites because of the lack of any further diagnostic ions.

The S1 and S2 sulfate methylnortestosterone metabolites (m/z 371.1898,) could be detected for up to 77 and 192 h respectively while the third (m/z 387.1847), for 44 h approximately. As a result, S2, metabolite was considered significant with regards to their abundance and long-term detectability for this study.

3.2. Identification of methylnortestosterone metabolites by GC-MS/MS

For the identification of methylnortestosterone sulfate metabolites, they were isolated by HPLC fractionation and the collected fractions were analyzed by LC/TOF-MS in negative mode. Solvolysis was applied to the respective fractions in order to release the corresponding phase I metabolite. Afterwards, per TMS derivatization was conducted and the extracts were analyzed by GC-MS in full scan mode.

GC-MS/MS analysis of the fraction containing the deconjugated S1 and S2 metabolites showed two peaks, one with RT 13.8 min and a second one with RT at 15.18 min with internal standard methyltestosterone at 18.9 min. Mass spectra of S1 and S2 deconjugated metabolites were identical to those of the main gluco-conjugated metabolites of methylnortestosterone M1 and M2 (Fig.2), already presented^{8,9,10} the literature. These findings were surprising and in contrary with the sulfate metabolites presented for the structural related compound methyltestosterone¹⁴, where the epimeric 17β -methyl-5 α -androstane-3 α , 17 α -diol was proposed as main sulfate metabolite. In order to investigate further this discrepancy synthesis of several metabolites with predefined structures in 3 and 5 position of the estrane backbone was conducted.

Micro scale synthesis of methylnortestosterone metabolites through Grignard reaction of methylmagnesium bromide with 19-NA, 19-NE and 19-NEA was performed. The reaction

was proceeded³⁸ with high yield and the selectivity for the 17 α -methyl structure were in all cases higher than 95 %, where the rest was the steroid with 17 β methyl structure. These metabolites were analyzed by GC-MS/MS in full scan and by GC-MS/MS in the MRM mode. Full scan mass spectra of the representative 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol is presented in Fig3 while RT and optimised CE for the analytes are depicted on Table1. Methylnortestosterone metabolite isomers were well separated under our chromatographic system and the results presented in Table 1 confirm that the structure of the metabolites S1 and S2 excreted in the sulfate fraction are 17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol and 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol respectively.

Further targeted analysis in the free and glucuronide fraction (*series A*) after hydrolysis based on the retention times and mass spectra data obtained after the synthesis of the metabolites (see Table 1), showed two additional metabolites M3 and M4 that could be detected until the end of the excretion time (192 h) in much lower signals along with M1 and M2 already reported as main methylnortestosterone metabolites. Metabolites M3 and M4 are reported for the first time. Parent compound was detectable for a short time window (44 h) in the glucuronide fraction. Interestingly, we obtained the presence of three peaks (RTs) with mass spectra compatible with dehydroxylated metabolite referred initially by Chundela et al¹⁰. Prompt from the recent work of Polet et al³⁶ we assumed that these peaks may attribute to the direct detection of intact main sulfate metabolite S2. To prove this, the sulfate S2 metabolite was synthesized and analyzed in GC-MS/MS after per TMS derivatization (Fig 4), resulting in three peaks with identical retention times and mass spectra with those obtained from excretion urine samples.

To the best of our knowledge this is the first time that detection of intact sulfate metabolite is reported after extraction with diethylether. To sight more light into this observation recovery experiments of spiked artificial urine samples with androsterone sulfate as pilot compound were performed according to the Table 2 using different mixtures of diethylether/ethylacetate as extraction solvent. We confirm this way that substantial recovery of sulfate metabolites can be obtained in typical screening of anabolic steroids by GC-MS. This opens the possibility of more comprehensive screening for anabolic steroids. Monitoring of intact S2 sulfate metabolite by GC-MS/MS in excretion urine samples, revealed its detection until almost the end of the excretion study (168 h, 144 h and 72 h for peak 1, 2 and 3 respectively).

GC-MS/MS analysis of sulfate fraction (*series B*), obtained after free and gluco-conjugated fraction extraction and then isolation of glucuronides (*series A*), with ethylacetate and hydrolysis with *H. Pomatia* hydrolysis resulted in three metabolites namely S1, 17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol 3a sulfate, S2 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol 3a sulfate and S3 (S2-Epimer), 17 β -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 α -diol 3a sulfate. S1 was detected for 72 h while S2 and S3 for up to 192h. Interestingly, S3 was not detectable since the beginning of the excretion but it appears in urine samples after the third sample (20 h). Despite the possibility of the direct detection of intact S2 metabolite (*series A*), its detection after hydrolysis (*series B*) gave much higher signals. The splitting of the main peak found after hydrolysis to three different peaks when analyzed intact may be the reason for this. Detection times for all the identified metabolites are presented in Fig 5.

4. Conclusions

The methyltestosterone metabolism in human urine was studied following single dose administration with focus to metabolites that could prolong its detection in sport drug test. Glucuronide metabolites M2, M3, M4 and sulfate metabolites S2 and S3, were detected until the end of the excretion study (192 h) while M1 and S1 were detected for 72 h. The two glucuronide metabolites M3 and M4 and three sulfate metabolites S1, S2, S3 are presented for the first time and complement our knowledge on the metabolism of methyltestosterone. Based on the experimental results, the detection of these novel sulfate and glucuronide metabolites along with the already known M2 show possible capabilities to prolong detection window of methyltestosterone misuse. As reference materials were not available, micro-synthesis of the presented metabolites and comparison of RT and mass spectra with those from excretion samples was performed. Regarding confirmation analysis, the combined hydrolysis of gluco-conjugated and sulfo-conjugated fractions with β -glucuronidase/arylsulfatase from *H. Pomatia* shall be considered as an option.

Acknowledgements

The authors also thank Mrs. Stella Loui and Mrs. Fotini Chlapana for their technical assistance.

This work was partially supported by research Grant received from the World Anti-Doping Agency, WADA (reference no. 11A13CG) which is gratefully acknowledged.

This research work was also supported by the Hellenic Foundation for Research and Innovation (HFRI) and the General Secretariat for Research and Technology (GSRT), under the HFRI PhD Fellowship grant (GA. no. 14544).



References

- ¹ Reynolds JEF. Martindale-the Extra Pharmacopoeia. 33rd edition. London, UK: Pharmaceutical Press; 2002.
- ² Schanzer W, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal. Chim. Acta.* 1993;275:23–48.
- ³ Schanzer W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clin. Chem.* 1996;42:1001–1020.
- ⁴ World Anti-Doping Agency (WADA), 2020 Statistics. <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/anti-doping-statistics> (accessed 20/04/2020).
- ⁵ Van Eenoo P, Delbeke FT. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control-New steroids and new insights. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006;101(4-5):161–178. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.06.024.
- ⁶ <https://www.drugs.com/international/normethandrone.html>
- ⁷ World Anti-Doping Agency (WADA), The 2020 Prohibited List. International Standard. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list_0.pdf (accessed 02/05/2020).
- ⁸ Parr MK, Opfermann G, Schanzer W. Detection of new 17-alkylated anabolic steroids on WADA 2006 list. In: *Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of Manfred Donike Workshop on Dope Analysis*. Köln, Sportverlag Strauss, 2006.

-
- ⁹ Parr MK, Fußholler G, Gütschow M, Hess C, Schänzer W. GC-MS(/MS) investigations on long-term metabolites of 17-methyl steroids. In: *Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of Manfred Donike Workshop on Dope Analysis*. Köln, Sportverlag Strauss, 2010.
- ¹⁰ Chundela Z, Große J. Metabolites of methyltestosterone, In: *Recent Advances in Doping Analysis: Proceedings of Manfred Donike Workshop on Dope Analysis*. Köln, Sportverlag Strauss 2013.
- ¹¹ Yu NH, Ho ENM, Leung DKK, Wan TSM. Screening of anabolic steroids in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;37(5):1031-1038.
- ¹² Guan F, Uboh CE, Soma LR, Luo Y, Rudy J, Tobin T. Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2005;829(1-2):56-68.
- ¹³ Guan F, Soma LR, Luo Y, Uboh CE, Peterman S. Collision-induced dissociation pathways of anabolic steroids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2006;17(4):477-489.
- ¹⁴ Gómez C, Pozo OJ, Marcos J, Segura J, Ventura R. Alternative long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. *Steroids*. 2013;78(1):44-52. <https://doi:10.1016/j.steroids.2012.10.008>.
- ¹⁵ Polet M, Van Gansbeke W, Geldof L, Deventer K, Van Eenoo P. Identification and characterization of novel long term metabolites of oxymesterone and mesterolone in human urine by application of SRM GC-CI-MS/MS. *Drug Test. Anal*. 2017;9(11-12):1673-1684. doi:10.1002/dta.2183.
- ¹⁶ Lu J, Alvarez MF, Yang S, He G, Xu Y, Aguilera R. New potential biomarkers for mesterolone misuse in human urine by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass.Spectrom*. 2015;50:153.
- ¹⁷ Schänzer W, Geyer H, Fussoller G, et al. Mass spectrometric identification and characterization of a new long-term metabolite of methandienone in human urine. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2006;20:2252.
- ¹⁸ Schänzer W, Guddat S, Thomas A, Opfermann G, Geyer H, Thevis M. Expanding analytical possibilities concerning the detection of stanozolol misuse by means of high

resolution/high accuracy mass spectrometric detection of stanozolol glucuronides in human sports drug testing. *Drug Test. Anal.* 2013;5:810.

¹⁹ Tudela E, Deventer K, Van Eenoo P. Sensitive detection of 3'-hydroxy-stanozolol glucuronide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2013;1292:195.

²⁰ Guddat S, Holler G, Bueck S, et al. Synthesis, characterization, and detection of new oxandrolone metabolites as long-term markers in sports drug testing. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013;405:8285.

²¹ Sobolevsky T, Rodchenkov G. Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochrolomethyltestosterone metabolites in human urine. *J Steroid Biochem.* 2012;128:121.

²² Liu J, Chen L, Joseph JF, et al. Combined chemical and biotechnological production of 20 β OH-NorDHCMT, a long-term metabolite of Oral-Turinabol (DHCMT). *J. Inorg. Biochem.* 2018;183:165–171. doi:10.1016/j.jinorgbio.2018.02.02.

²³ Sobolevsky T, Rodchenkov G. Mass spectrometric description of novel oxymetholone and desoxymethyltestosterone metabolites identified in human urine and their importance for doping control. *Drug Test. Anal.* 2012;4:682.

²⁴ Gauthier J, Poirier D, Ayotte C. Characterization of desoxymethyltestosterone main urinary metabolites produced from cultures of human fresh hepatocytes. *Steroids.* 2012;77:635.

²⁵ Lu J, Fernández-Álvarez M, Yang S, He G, Xu Y, & Aguilera R. New clostebol metabolites in human urine by liquid chromatography time-of-flight tandem mass spectrometry and their application for doping control. *J. Mass Spectrom.* 2015;50(1):191–197. doi:10.1002/jms.3517.

²⁶ Balcells G, Pozo OJ, Garrosta L, et al. Detection and characterization of clostebol sulfate metabolites in Caucasian population. *J. Chrom. B.* 2016;1022:54–63. doi:10.1016/j.jchromb.2016.03.02.

²⁷ Liu Y, Lu J, Yang S, Zhang Q, & Xu Y. New drostanolone metabolites in human urine by liquid chromatography time-of-flight tandem mass spectrometry and their application for doping control. *Steroids.* 2016;108:61–67. doi:10.1016/j.steroids.2016.01.013.

²⁸ Piper T, Fusshöller G, Schänzer W, Lagojda A, Kuehne D, & Thevis M. Studies on the in vivo metabolism of Methylstenbolone and detection of novel long term metabolites for doping control analysis. *Drug Testing and Analysis.* 2019. doi:10.1002/dta.2736

-
- ²⁹ Parr MK, Schänzer W. Detection of the misuse of steroids in doping control. *J. Steroid Biochem.* 2010;121:528.
- ³⁰ Tseng YL, Sun CY, Kuo FH. Detection and quantification of glucuro- and sulfoconjugated metabolites in human urine following oral administration of xenobiotic 19-norsteroids. *Steroids.* 2006;71:817.
- ³¹ Gómez C, Pozo OJ, Fabregat A., et al. Detection and characterization of urinary metabolites of boldione by LC-MS/MS. Part I: Phase I metabolites excreted free, as glucuronide and sulfate conjugates, and released after alkaline treatment of the urine. *Drug Test. Anal.* 2012;4:775.
- ³² Gómez C, Pozo OJ, Geyer H, et al. New potentials markers for the detection of boldenone misuse. *J. Steroid Biochem.* 2012;132:239.
- ³³ Gómez C, Pozo OJ, Garrostas L, Segura J, Ventura R. A new sulfate metabolite as a long-term marker of methandienone misuse. *Steroids.* 2013;78:1245.
- ³⁴ Fragkaki AG, Angelis YS, Kiouisi P, Georgakopoulos C and Lyris E. Comparison of sulfoconjugated and glucoconjugated urinary metabolites for detection of methenolone misuse in doping control by LC-HRMS, GC/MS and GC-HRMS. *J. Mass Spectrom.* 2015;50:740.
- ³⁵ Kiouisi P, Angelis YS, Fragkaki AG, et al. Markers of mesterolone abuse in sulfate fraction for doping control in human urine. *J. Mass Spectrom.* 2015;50:1409–1419. doi.org/10.1002/jms.3715.
- ³⁶ Polet M, Van Gansbeke W, Albertsdóttir AD, Coppieters G, Deventer K, & Van Eenoo P. Gas chromatography mass spectrometry analysis of non-hydrolyzed sulfated steroids by degradation product formation. *Drug Test. Anal.* 2019. doi:10.1002/dta.2606.
- ³⁷ Fragkaki AG, Angelis YS, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M, Georgakopoulos C. Schemes of metabolic patterns of anabolic androgenic steroids for the estimation of metabolites of designer steroids in human urine. *J. Steroid Biochem.* 2009;115:44.
- ³⁸ Fieser LF and Fieser M. *Steroids.* New York, N.Y: Reinhold Publishing Cort; 1959:p467.

Table 1: RT, MRMs and CE for the selected analytes.

Grignard reaction	Compound	RT	MRM	CE
19-norandrosterone	17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol	13.81		
19-norandrosterone	17 β -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 α -diol	11.38	421.30→331.25	10
19-noretiocholanolone	17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol	15.18	421.30→241.20	15
19-noretiocholanolone	17 β -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 α -diol	11.53	421.30→199.15	25
19-norepiandrosterone	17 α -methyl-5 α -estrane-3 β , 17 β -diol	15.57		
19-norepiandrosterone	17 β -methyl-5 α -estrane-3 β , 17 α -diol	13.66		
19-noretiocholanolone	17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol-3 α sulfate	9.14/9.52/9.71	256.30→241.20	10
			256.30→227.15	10
			256.30→214.20	10
			256.30→199.15	15
na	methylnortestosterone	17.17	432.30→287.25	20
			432.30→300.30	15
			432.30→285.20	15

Table 2: Recovery of androsterone sulfate during extraction with diethylether/ethyl acetate mixture.

Sample	Diethylether/Ethylacetate (ratio)	Recovery (%)
STD1	100/0	39.5
STD2	75/25	89.2
STD3	50/50	92.3
STD4	25/75	89.5
STD5	0/100	98.2

Accepted Article

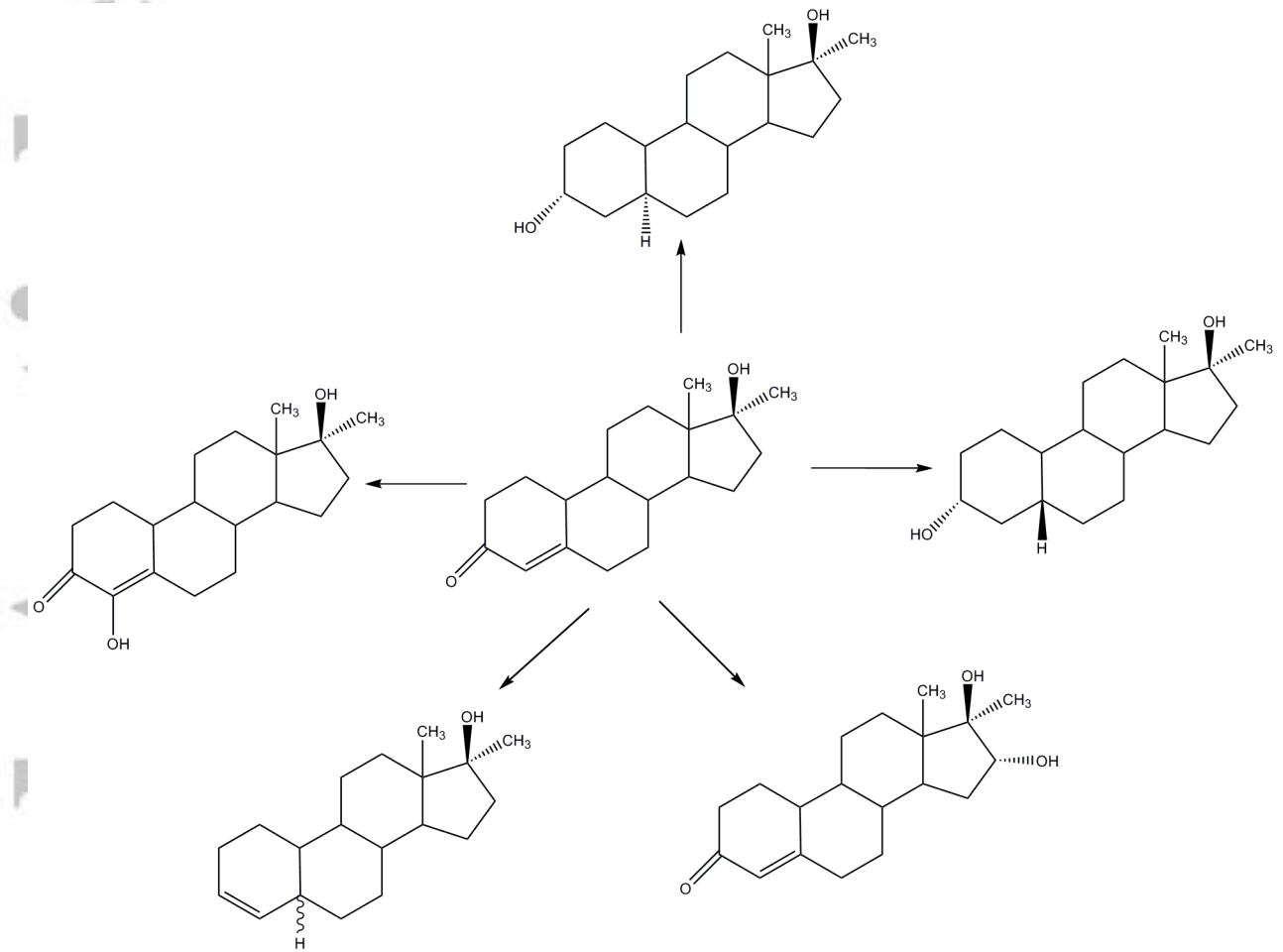


Fig.1: Reported metabolites in the glucuronide fraction for methyltestosterone.

Accepted

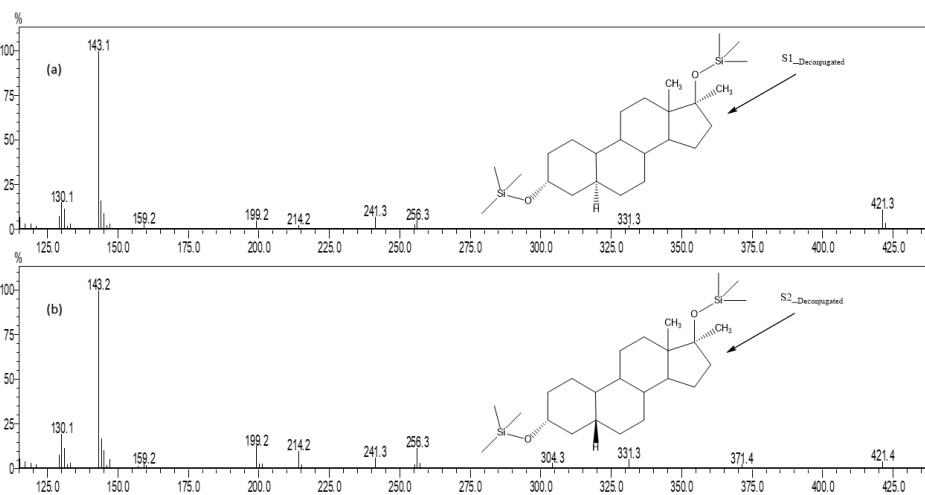


Fig.2: Mass spectra of TMS derivative of a) Deconjugated S1: 17 α -methyl-5 α -estrane-3 α , 17 β -diol and b) Deconjugated S2: 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol by GC-MS.

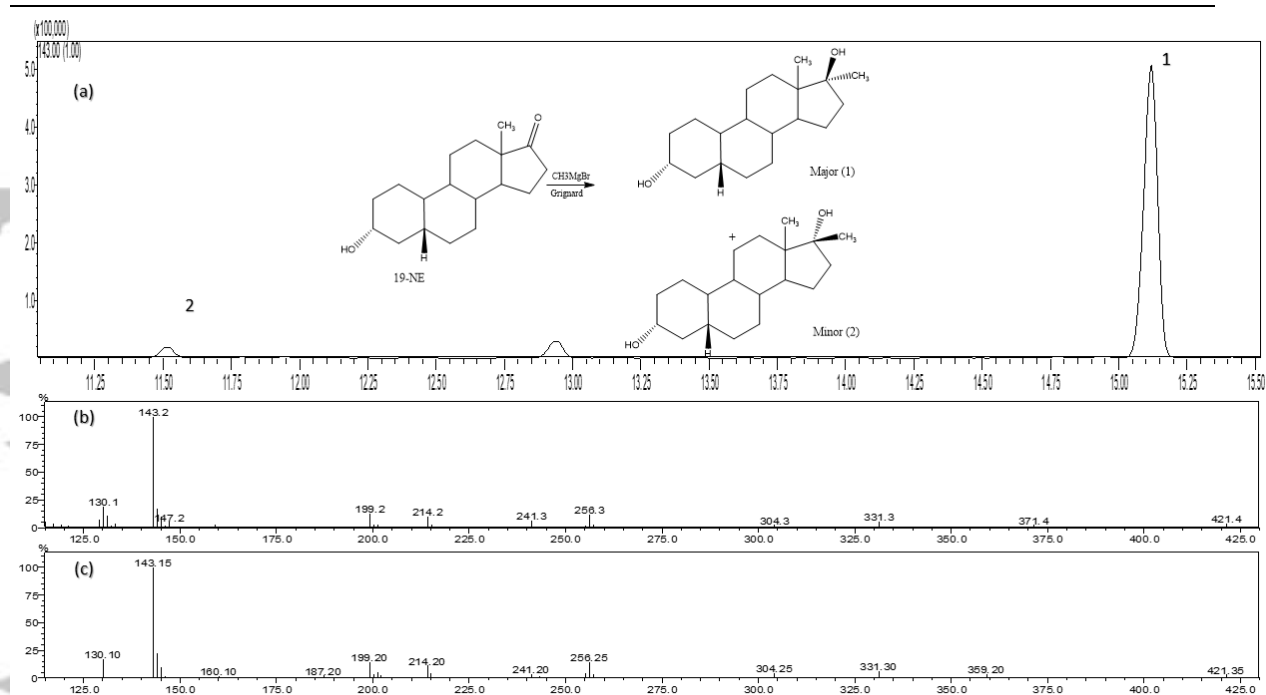


Fig.3: a) Extracted Ion Chromatogram (EIC) of per-TMS derivative of 17 β -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 α -diol and 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 α -diol synthesized through Grignard reactions from 19-NE, b) Electron Ionization (EI) mass spectrum of per-TMS derivative of 17 α -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol (peak 1), c) Electron Ionization (EI) mass spectrum of per-TMS derivative of 17 β -methyl-5 β -estrane-3 α , 17 β -diol (peak 2).

Accepted

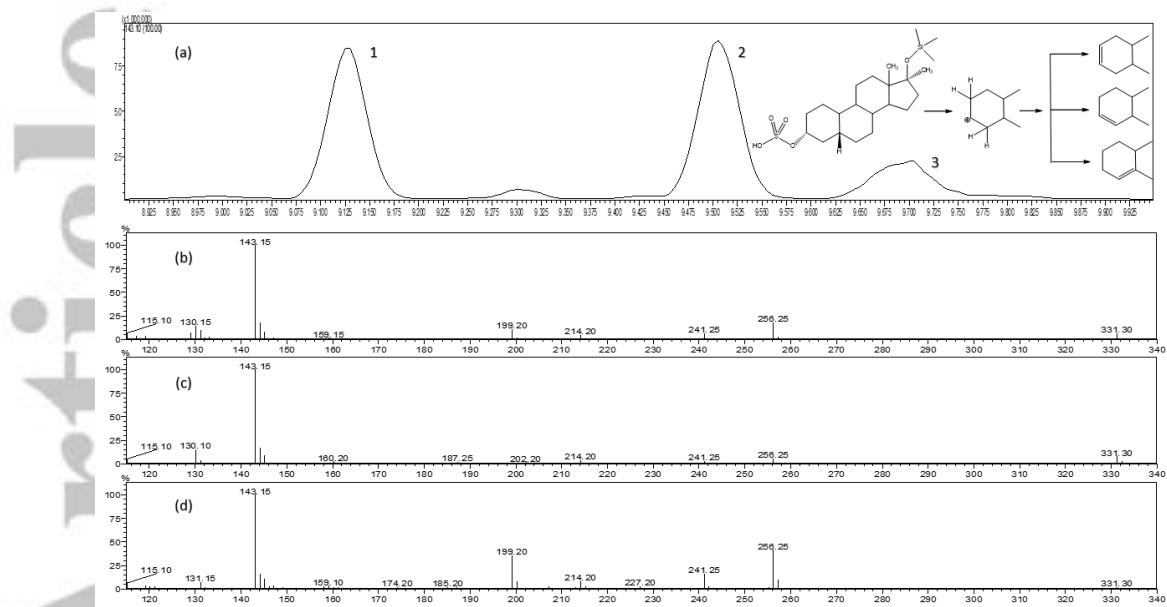


Fig.4: a) Extracted Ion Chromatogram (EIC) of TMS derivative of S2 intact metabolite artifacts (3 peaks), b) Electron Ionization (EI) mass spectrum of TMS derivative of S2 intact metabolite in peak 1, c) peak 2, d) and peak 3.

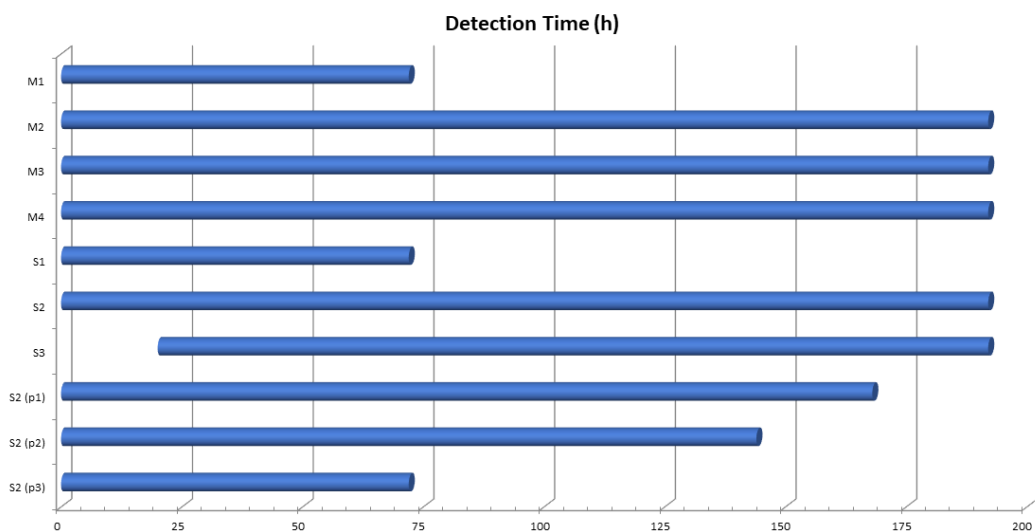
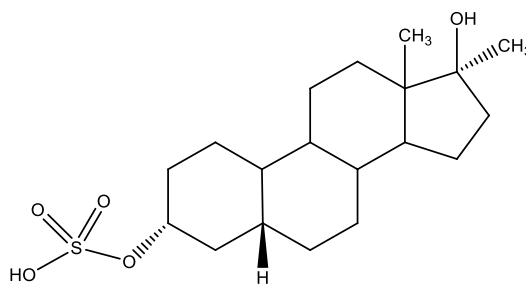


Fig.5: Detection times of the different metabolites of methylnoretestosterone obtained in the glucuronides and sulfate fraction after GC-MS/MS analysis. S2 (p1), S2 (p2) and S2 (p3) represent the S2 intact metabolite artifact as detected by GM-MS/MS in peak 1, peak 2 and peak 3, respectively.

Accepted

Detection and characterization of methylnoretestosterone metabolites in sulfate and glucuronide fractions for doping control purposes.



**Novel Long-Term
Markers for
Methylnortestoste
rone Misuse in
Human Urine**

P. Sakellariou, P. Kiouisi,
A.G. Fragkaki, E. Lyris,
M. Petrou, C.
Georgakopoulos, Y.S.
Angelis*

Accepted Article

HUMAN *IN-VIVO* METABOLISM STUDY OF LGD-4033

A.G. Fragkaki^a, P. Sakellariou^{a,b}, P. Kiouisi^a, N. Kioukia-Fougia^a, M. Tsivou^a, M. Petrou^c,
Y.S. Angelis^{a*}

^a Doping Control Laboratory of Athens, Olympic Athletic Center of Athens “Spyros Louis”,
37 Kifisias Avenue, 15123, Maroussi, Greece

^b Faculty of Biology, School of Science, National and Kapodistrian University of Athens,
Panepistimioupolis, Zografou, 15771 Athens, Greece

^c Cyprus Anti-Doping Authority, Makarion Athletic Centre Avenue, Engomi, Nicosia, CY
2400, Cyprus

** Address for correspondence:*

Y.S. Angelis, PhD

Tel: +30 210 6853074

Fax: +30 210 6834567

E-mail: oaka@ath.forthnet.gr

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/dta.2512

Abstract

Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) is an emerging class of therapeutics targeted to cachexia, sarcopenia and hypogonadism treatment. LGD-4033 is a SARM which has been included in the Prohibited List annually released by the World Anti-Doping Agency (WADA). The aim of the present work was the investigation of the metabolism of LGD-4033 in a human excretion study after administration of an LGD-4033 supplement, the determination of the metabolites' excretion profiles with special interest in the determination of its long-term metabolites, and the comparison of the excretion time of the phase-I and phase-II metabolites. The results were also compared to those derived from previous LGD-4033 studies concerning both *in vitro* and *in vivo* experiments.

Supplement containing LGD-4033 was administered to one human male volunteer and urine samples were collected up to almost 21 days. Analysis of the hydrolyzed (with β -glucuronidase) as well as of the non-hydrolyzed samples was performed using Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) in negative ionization mode and revealed that, in both cases, the two isomers of the dihydroxylated metabolite (M5) are preferred target metabolites. The gluco-conjugated parent LGD-4033 and its gluco-conjugated metabolites M1 and M2 can be also considered as useful target analytes in non-hydrolyzed samples. The study also presents two trihydroxylated metabolites which are identified for the first time in human urine; one of them was recently reported in LGD-4033 metabolism study in horse urine and plasma.

Keywords

LGD-4033, SARM, Selective Androgen Receptor Modulator, Human Doping, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

1. Introduction

Anabolic agents are performance-enhancing agents which are advertised and distributed by suppliers through web-sites to a substantial extent. Among them, Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) is an emerging class of therapeutics targeted to cachexia, sarcopenia and hypogonadism ~~and can be also used as muscle-wasting disorders~~ or at the treatment of stress urinary incontinence, osteoporosis, breast cancer and Duchenne muscular dystrophy [1]. Since their initial scientific reports in 1998 [2,3], SARMs with diverse chemical scaffolds and pharmacological profiles have been discovered to facilitate tissue-selective activation of the androgen receptor (AR). The AR is a member of the steroid receptor family of ligand-activated transcription factors which is crucial for organogenesis, physiology and pathology of many tissues [4] and are activated by wide-ranging ligands, such as natural hormones, peptides, synthetic molecules or growth hormones [5,6,7]. The ability of SARMs to differentially promote muscle and bone growth and strength, to inhibit the growth of breast cancer and to shrink the prostate in animals and humans is an issue based on many parameters, such as differences in AR conformation, AR and steroid metabolizing enzyme expression between tissues, coactivator and corepressor recruitment [8,9,10,11,12].

In the last two decades, the efforts of scientists have been focused on the discovery and biological characterization of novel tissue-specific SARMs to promote the beneficial effects of androgens with greatly reduced undesirable side effects. Towards this direction, numerous studies with SARMs of different pharmacophore structure have been reported, e.g.

- SARMs with arylpropionamide core structure, such as S-1 [13,14], S-4 (andarine) [15,16,17], S-9 [13,18], S-22 [15,19],
- SARMs with phenyl-oxadiazole core structure, such as RAD140 [15],
- SARMs with quinolinone core structure, such as LGD-2226 [15,20], LGD-2941 [15], LGD-3303 [15],
- SARMs with tetrahydroquinolinone core structure, such as S-40503 [15], S-101479 [21], S-49288 [22],
- SARMs with indole core structure, such as RAD35010 [15], Ly2452473 [21],
- SARMs with steroidal core structure, such as MK-0773 [15,23], CI-4-AS-1, TMF-4AS-1, YK-11, S-42 [15].

Despite the evidenced preclinical and clinical studies [15,21,24], no SARM has yet received full clinical approval. However, the enormous muscle- and bone-anabolic properties of SARMs give rise to the potential for misuse in sports as has been already recognized by the

World Anti-Doping Agency (WADA) which included SARMs in the annually released Prohibited List of Substances since 2008 (class S1.2, *other anabolic agents*) [25]. Statistical data shows show the increasing trend for detection and reporting adverse analytical findings (AAFs) of SARMs by the WADA-accredited laboratories. Indicatively, in 2016 and 2017, 39 and 65 occurrences of SARMs were reported which correspond to almost 10% and 18%, respectively, of the total AAFs in the S1.2 drug class [26,27]. Positive cases of SARMs have been reported in both human athletes [28,29] and horses [30,31].

Due to their considerable variety of chemical core structure and the exhibition of substantially different physicochemical properties, the generation of data for SARMs related to the substances' ionization and dissociation under commonly utilized analytical conditions in the doping control laboratories, is crucial to routine sports drug testing. Therefore, drug candidates were subjected to electrospray ionization (ESI)-high resolution mass spectrometry (HRMS) and electron ionization (EI)-HRMS to reveal structure information supporting test method developments and metabolism studies. The proposal of dissociation and fragmentation pathways through elemental compositions of the observed ions in MS and tandem MS (MS/MS) measurements was feasible using quadrupole/orbitrap-based mass analyzers. Gas chromatography (GC-) and liquid chromatography-HRMS (LC-HRMS) are the most widely used techniques in studies related to SARMs structure determination and metabolism studies [32,33,34].

LGD-4033 (also referred as VK5211, Ligandrol or Anabolicum) (4-((R)-2-((R)-2,2,2-trifluoro-1-hydroxyethyl) pyrrolidin-1-yl)-2-trifluoro-methyl) benzonitrile) is a SARM with a pyrrolidinyl-benzonitrile core structure [33]. A study in healthy young men [35], proved that LGD-4033 is safe, well-tolerated, has favorable pharmacokinetic profile with a prolonged elimination half-life (24-36 hours) as well as it shows lean body mass increase. Longer randomized trials should evaluate its efficacy in improving physical function and health benefits. ~~in select populations~~. While its use is non-officially approved and not yet manufactured by a pharmaceutical company, many websites make LGD-4033 widely available [36,37,38] and studies have reported its detection in black market products [34,39,40]. Metabolism study of LGD-4033 in human urine has been reported [41] as well as in a doping control sample from a human athlete [42]. The *in vitro* (in human) liver microsomes metabolites [34,40] as well as by electrochemical conversion/ microbial degradation metabolites of LGD-4033 have been also described [34]. Furthermore, the

metabolites of LGD-4033 in horse urine and plasma and the suggestion of suitable analytical targets for equine doping control were also reported [43] (Fig. 1).

The aim of the present work was the investigation of the metabolism of LGD-4033 in a human excretion study, the determination of the metabolites' excretion profiles with special interest in its long-term excreted metabolites and the comparison of the excretion time of the phase-I and phase-II metabolites. The results were also compared to those derived from the previous studies referred above concerning both human and equine urine. The analytical findings were based on the use of LC-HRMS(/MS) and GC-MS.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Mefruside and imipramine were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methyl-testosterone was obtained from Remek, Pharmaceutical Laboratories (Athens, Greece). Codeine was purchased from Lipomed AG (Arlesheim, Switzerland). LGD-4033 as a standard solution (1000 µg/mL) was provided by the World Association of Anti-Doping Scientists (WAADS) during an inter-laboratory test and stored at -20 °C. Working solutions of 100 µg/mL and 5 µg/mL were then prepared by proper dilution of the standard solution in methanol and also stored at -20 °C. Diethyl ether, tert-butyl methyl ether (TBME) and ethyl acetate were of analytical grade and obtained from Labscan (Dublin, Ireland). β-Glucuronidase from *E. coli* was obtained from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), disodium carbonate (Na₂CO₃), sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) and sodium sulphate (Na₂SO₄) (all analytical grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile (ACN, LC gradient grade) was purchased from Riedel-de Haen (Seelze, Germany). Acetic acid and formic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and ammonium formate from Acros Organics. Milli-Q water was obtained by a Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA, USA). Ammonium iodide (NH₄I) and dithioerythritol (DTE) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) was purchased from Chemische Fabrik Karl Bücher GmbH (Waldstetten, Germany).

2.2 Supplement administration and sample collection

Urine samples were obtained after the administration of Ligandrol[®] the supplement Ligandrol (purchased from the Neobolics company) to one healthy, human male volunteer (Caucasian, 48 years old, 60 kg): one capsule × 10 mg of LGD-4033. The urine samples were collected before (0 h) and after administration up to 494h (almost 21 days). The exact time intervals (h) were as follows: 0, 2, 4, 4.5, 8, 10.5, 12, 15, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 135, 145.5, 156.5, 168, 180, 193, 204, 216, 228, 240, 252, 264, 279, 288, 300, 312, 324, 337, 349, 361, 373, 385, 397, 409, 420.5, 432, 445, 457, 468.5, 481, 494. All collected samples were kept frozen at -20 °C until analysis. The study was approved by the National Bioethics Committee of Cyprus (*Decision number: EEBK 21.1.01.03/ 21.04.2017*).

2.3 Supplement preparation

The content of 5 capsules of Ligandrol[®] (Neobolics, Montreal, Canada) was weighted and homogenized prior to further analysis. A representative homogenized portion of 50 mg of this mixture was transferred to four different tubes and 200 µL of codeine solution (100 µg/mL) was added to each of them as internal standard 1 (ISTD1). The pH was adjusted to 9.5 by adding 2.5 mL of buffer solution NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1 v/v). Then the samples were extracted with 2.5 mL of diethylether by shaking for 10 minutes. After centrifugation (2000 rpm, 10 min), the organic layer was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 50 °C. The dry extracts were reconstituted with 200 µL of ACN and aliquots of 5 µL were analyzed by LC-HRMS.

2.4 Dilute-and-inject of human urine samples

Imipramine (10 µL from solution 20 µg/µL as ISTD2) was added to 25 µL of the excretion study urine samples. Then 125 µL of ACN solvent was added and aliquots of 5 µL were analyzed by LC-HRMS.

2.5 Hydrolysis of human urines with β-glucuronidase

Positive control samples of LGD-4033 were prepared by adding working solutions of LGD-4033 (either of 5 µg/mL or 100 µg/mL) to 7.5 mL of blank urine in order to achieve concentrations of 5, 10, 40, 80 and 133 ng/mL. A mixture of methyl-testosterone and mefruside (100 µL from solution 7.5 µg/mL and 15 µg/mL, respectively, ISTD3) was added to 7.5 mL of the positive and negative control samples as well as to the excretion study urine samples. The pH was adjusted to 7.0 by adding 1 mL sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7). Enzymatic hydrolysis was performed by adding 50 µL of β-glucuronidase from *E.coli* and incubating the mixture at 50 °C for 1.5 h. After the samples reached room temperature, 1.4 g NaHCO₃:Na₂CO₃ (10:1 w/w) was added. Sodium sulphate (3 g) was added to promote salting out and the samples were extracted with 7.5 mL of diethyl ether by shaking for 20 min. After centrifugation (2000 rpm, 10 min), the organic layer was separated to two portions:

- Portion A was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 50 °C. The dry extract was derivatized by adding 100 µL of a mixture of MSTFA/NH₄I/DTE (1000:2:6, v/w/v), incubated at 80 °C for 30 min and aliquots of 2 µL were analyzed by GC-MS.
- Portion B was also evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 50 °C after 50 µL of CH₃COOH was added. Then 100 µL of a mixture of solvent A:solvent B (80:20 v/v, see Section 2.6.1) was added and aliquots of 5 µL were analyzed by LC-HRMS.

2.6 Analysis

2.6.1 LC-HRMS(MS)

An Agilent 1200 Series rapid-resolution LC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used for the chromatographic separation. The system consisted of a vacuum degasser, a high-pressure binary pump, an autosampler with a cooled sample tray and a column oven. Chromatographic separation was performed at 35 °C using a Zorbax Eclipse Plus C18 column (100 × 2.1mm id, 1.8 µm particle size; Agilent Technologies). The mobile phase consisted of 5 mM ammonium formate in 0.01 % formic acid (solvent A) and a mixture of acetonitrile/water (90:10 v/v) containing 5 mM ammonium formate and 0.01% formic acid (solvent B). A gradient elution program was employed at a constant flow rate of 0.3 mL/min with solvent B increasing from 10% to 80% in 9 min, and then within 1 min to 100%, where it was held for 3 min before returning to 10% within 0.5 min. The analysis run

time was 13.5 min and the post-run equilibrium time was 3.5 min. The injection volume was 5 μL .

The mass spectrometer was an orthogonal acceleration quadrupole time-of-flight mass spectrometer (6520 Accurate-Mass QTOF LC/MS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an orthogonal electrospray ionization (ESI) source, a temperature stabilized analogue-to-digital converter (ADC) operated at 2 GHz (extended dynamic range mode) and a multichannel plate operated at 700 V. Ionization was performed in negative and in positive ionization modes and nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. Mass calibration was performed daily before starting the analysis set by using a diluted reference mixture, providing $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions in the mass range of m/z 112.9856–2833.8731 as well as $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions in the mass range of m/z 118.0863–2721.8948 (Product No. G1969-85000; Agilent Technologies). Reference mass correction was used during the analysis, in order to achieve better mass accuracy, by introducing one reference compound (hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine at m/z 966.0007 (in negative ionization mode) and at m/z 922.0097 (in positive ionization mode) (Agilent Technologies) simultaneously with the samples. The reference compound was introduced continuously into the ESI source from a second orthogonal nebulizer. The spectral parameters covered the mass range m/z 70–1100. The source parameters were: gas temperature 330 $^{\circ}\text{C}$, drying gas 10 L/min, nebulizer 40 psig, Vcap 3500 V, fragmentor 140 V, skimmer 65 V and Oct1 RF 750 V. The remaining TOFMS parameters (transfer optic and ion focus voltages, quadrupole lens, TOF and detector voltages) were automatically optimized by the instrument auto-tuning procedure. The whole LC-MS(/MS) system was controlled by the Agilent MassHunter Workstation software (version B.02,01). For the detection of LGD-4033 and its metabolites, the methods in targeted MSMS mode were operated at the following parameters: fragmentor 140 V, skimmer 65 V and Vcap 3500 V, CE 25–40 eV.

2.6.2 GC-MS

An Agilent 6890N GC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) combined with an Agilent 5973 quadrupole mass selective detector (MSD) and equipped with an Agilent Ultra 1 bonded and cross-linked 5% diphenyl, 95% dimethyl siloxan capillary column (17 m \times 0.200 mm i.d., 0.11 μm film thickness) was used. GC was operating at constant flow of helium with a flow rate of 1.1 mL/min. 2 μL of sample was injected in split mode of 15:1. The injection port and the interface temperatures were set at 250 $^{\circ}\text{C}$ and 310 $^{\circ}\text{C}$, respectively.

The initial oven temperature was 180 °C followed by a rate of 3 °C/min to 235 °C, then ramped at 30 °C/min to 310 °C, held for 3.15 min. The analysis was carried out in full scan mode scanning the range m/z 40-600 and/or in the Selected Ion Monitoring (SIM) mode. Perfluorotributylamine (PFTBA) mass-spectrometric grade (Agilent Technologies) was used as tuning standard.

3. Results and discussion

All urine samples, pre- and post-administration, were analysed by GC-MS for estimating the effect on steroid profile parameters according to the requirements of the respective WADA technical document (TD2016EAAS) [44]. No influence on any of these parameters was observed in the post-administration samples compared to those in the urine samples before the administration of the LGD-4033 supplement.

Furthermore, all samples, from supplement preparation as well as from the human excretion study, were analyzed using LC-HRMS(MS) both in positive and negative ionization mode. As the analytes showed more intense (or one and only) signals in negative ionization mode, the results presented below are referred to this LC-HRMS(MS) mode.

3.1 Identification of parent LGD-4033 in the supplement

The LC-HRMS analysis of the supplement extracts in negative ionization mode showed the presence of the parent compound LGD-4033 at m/z 337.0771, as well as its formate adduct at m/z 383.0829. A second peak was estimated at almost 8% of the major LGD-4033 peak as depicted in Fig. 2 and is assigned as the LGD-4033 epimer. The formate adducts were measured as more intensive signals due to ion-yield are observed. It must be also noted that these adducts are formed during ionization and were not extracted from the supplement.

3.2 Phase I metabolism in human excretion study urine samples

3.2.1 Identification of parent LGD-4033

The extracted ion chromatograms of the parent LGD-4033 in negative ionization mode and its formate adduct in the human excretion urines after hydrolysis of the samples also showed the presence of two peaks with identical mass spectra upon fragmentation. While this additional peak may be derived from the epimerization of the parent compound as stated by Cox et al. [42], it may be also the result of the elimination of the LGD-4033 epimer found in the supplement. Interestingly, in the present study, the second peak progressively predominated as elimination time was passing. The parent compound was excreted after 3.5 days, with a maximum in its elimination profile at the first 4.5 hours corresponding to a concentration of 1.7 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, its formate adduct was still detected at an almost two-fold detection time at 6.5 days (Figs. 3-4). It must be noted that in this last sample of its elimination, the right peak at 10.7 min of the formate adduct (LGD-4033 epimer) was higher than the left peak at 10.4 min. Their mass spectra data is are presented in Table 1.

3.2.2 Identification of metabolites of LGD-4033

The extracted ion chromatogram for the hydroxylated metabolites with one double bond M1 at m/z **351.0568**, revealed three peaks; two of them were closely eluted with detection time from 4-9 days and identical mass spectra upon fragmentation (Table 1). It is noticeable that the retention time for the metabolite M1-A at 7.9 min is quite similar to the retention time for the two closely eluted dihydroxylated metabolites at m/z 369.0679, a fact that could be related to the statement of Cox et al [42] that such metabolites may be the result of an in-source fragmentation and concomitant loss of H_2O by the dihydroxylated metabolites, or are true metabolites as reported by Geldof et al [40].

When their formate adduct with m/z **397.0623** was acquired, no peak was observed at 7.9 min for M1-A while the M1-B at 8.4 min is the only peak detected in the first samples of the excretion study. The peak of the formate adduct of M1-C metabolite was increased progressively as the elimination time was passing with detection time up to 13 days (Fig. 4).

The extracted ion chromatogram for the monohydroxylated metabolite M2 at m/z **353.0730** revealed the presence of closely eluted peaks metabolites; the most prominent at 9.2 min and three minor ones. Their elimination time was almost 4 days. The detection of M2 was slightly improved when the ion of its formate adduct was acquired (m/z **399.0779**); the prominent peak was then one of the previously minor ones at 8.3 min with elimination time up to 5 days.

The extracted ion chromatogram for the metabolite M3 at m/z **355.0887**, containing a single hydroxylation on the pyrrolidine ring followed by cleavage of the ring, showed not only one main peak (as reported by Cox et al [42]) with retention time 8.1 min, but also two minor ones. The elimination time of the major peak-metabolite was almost 5 days (Fig. 4). The detection profile of these peaks was not considerably improved acquiring the ion of their formate adduct with m/z **401.0942**. Its product ions upon fragmentation are shown in Table 1.

The full scan acquisition of m/z **367.0886** for metabolite M4 (with a hydroxylation and methylation of LGD-4033) which is predicted from in vitro studies [34,40], was also performed. A low signal was shown with very short detection time of 12 hours (Fig. 4). as showed the extracted ion chromatogram. Its elimination profile was not improved acquiring the ion at m/z **413.0936** of the formate adduct. The product ion spectrum of this metabolite was not possible to obtain by LC-HRMS/MS analysis.

The extracted ion chromatogram of the dihydroxylated metabolite M5 at m/z **369.0674** revealed the presence of two very closely eluted peaks metabolites at 7.8 and 8.0 min with identical mass spectra. The main product ion was at m/z 237 after losing water and HCF_3 and subsequently losing CO_2 . The presence of the ions at m/z 185 and 170 confirm suggest that the hydroxylation has occurred on the pyrrolidine moiety and that the aromatic ring was unchanged (Table 1).

The elimination time of these M5 metabolites showed that the first isomer at 7.8 min is detected for up to 10 days while the second isomer at 8.0 min is excreted even up to 21 days. Their formate adducts do not contribute to any optimization of their elimination profile as they are detectable only for almost the first 4 days.

The extracted ion chromatogram for the trihydroxylated metabolites M6 at m/z **385.0629** revealed the presence of two main (out of three detected) peaks metabolites at 7.1 and 7.6 min which remain detectable for up to 7 days; the second of these two peaks was the prominent one. The metabolite M6-A at 7.1 min is reported for the first time in human urine. Its product ion at m/z 269 was observed after losing water and HCF_3 and subsequently losing CO leading to the ion at m/z 241. The main product ion at m/z 227 of the isomer M6-B at 7.6 min was formed by the loss of a $\text{C}_4\text{H}_5\text{F}_3\text{O}_3$ moiety and has been reported in a horse urine

excretion study by Hansson et al. [43]. However, this is also the first time to be reported in a human excretion study for LGD-4033 and for this reason its elimination profile (along with that of metabolite M6-A) is shown in Fig. 5. Their product ion mass spectra are depicted in Fig.6. Additionally, the presence of the ions at m/z 170 and 185 in both of them suggest that the three hydroxylations have occurred on the pyrrolidine moiety.

3.3 Phase II metabolism in human excretion study urine samples - Dilute-and-inject analysis

Phase II metabolism was also studied in the dilute-and-inject preparation of the human excretion study samples, revealing that parent LGD-4033 as well as the metabolites M1 and M3 were excreted as glucuronated conjugates almost for up to 2.5 days (Fig. 4). M2 was detected as gluco-conjugated in a smaller extent of almost 1.5 days. The extracted ion chromatograms of the glucuronated parent LGD-4033 and M3 showed the main product ions of their unconjugated analogues (Table 1).

It must be noted that in the dilute-and-inject analysis of the human excretion study urine samples, no free LGD-4033 parent compound was detected as it was excreted exclusively as gluco-conjugated. This observation could be explained by the fact that the less polar character of an analyte, the more is excreted as a gluco-conjugate. When the polar character of the analytes was increased through the introduction of one hydroxyl group, as in the case of metabolites M1-M3, their elimination was observed both in the free and gluco-conjugated form. The introduction of more hydroxyl groups, as in the case of metabolites M5 and M6, led to their excretion only in their unconjugated form. Metabolites M5-A/B showed the longest detection time in the dilute-and-inject analysis as was also observed as well as in the hydrolyzed urine samples.

4. Conclusion

The excretion profile of the LGD-4033, after administration of a capsule of supplement containing this SARM, was investigated in the hydrolyzed with *E.coli* β -glucuronidase human excretion study urines as well as after their dilute-and-inject analysis in order to improve its detection by doping control laboratories. LC-HRMS in negative ionization mode is preferred for screening of all analytes. The *in vivo* data support that derived from the *in*

in vitro studies as the observed metabolic modifications of LGD-4033 were hydroxylation alone or combined with keto-formation, or after cleavage of the pyrrolidine ring as well as dihydroxylation and hydroxylation combined with methylation. Two trihydroxylated metabolites are identified for the first time in human urine; one of them has been also reported in LGD-4033 metabolism study in horse urine and plasma. The two isomers of metabolite M5 are the preferred target metabolites in both hydrolyzed and non-hydrolyzed human urine as they can be detected for even longer than 21 days and up to 6 days, respectively. In LC-HRMS dilute-and-inject methods, the detection of the gluco-conjugated parent LGD-4033 and its gluco-conjugated metabolites M1 and M2 could be also considered as useful target analytes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the award of the present study for scientific excellence in Sport Doping Analysis, by Agilent Technologies, during the 36th Manfred Donike Workshop (Cologne/Germany, April 2018). The support offered by the Olympic Athletic Center of Athens “Spyros Louis”, Greece and the Cyprus Anti-Doping Authority is also notably acknowledged.

Table 1. Detected metabolites in the human LGD-4033 excretion study after hydrolysis of the samples as well as after dilute-and-shoot analysis (Phase II metabolism), by LC/HRMS(MS) in negative ionization mode.

Compound (Elemental composition (exp.))	Ion species	Precursor Ion, m/z (error, (ppm))	Product Ion		RT (min)	Phase I transformation	Phase II metabolism (glucuronidation)			
			m/z (error, (ppm))	Elemental composition (exp.)			Precursor Ion, m/z (error, (ppm))	Product Ion		RT (min)
								m/z	error (ppm)	
LGD-4033 ($C_{14}H_{11}F_6N_2O$)	[M-H] ⁻	337.0775 (3.9)	267.0759 (3.0) 239.0449 (11.6) 211.0485 (-0.95) 185.0325 (-3.8) 170.0209 (-8.2)	$C_{13}H_{10}F_3N_2O$ $C_{11}H_6F_3N_2O$ $C_{10}H_6F_3N_2$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	10.4 / 10.7*	Parent compound	513.1096 ($C_{20}H_{20}F_6N_2O$ 7)	267.0761 239.0465 211.0442 185.0381 170.0210	3.3 7.2 -5.1 3.9 -7.8	6.9
	[M+HCOO] ⁻	383.0830 (2.1)	267.0793 (2.2) 239.0486 (12.2) 185.0291 (-5.5) 170.0246 (1.2)	$C_{13}H_{10}F_3N_2O$ $C_{11}H_6F_3N_2O$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	10.4 / 10.7*					
M1-A / M1-B / M1-C ($C_{14}H_{10}F_6N_2O_2$)	[M-H] ⁻	351.0568 (2.5)	281.0536 (3.7) 263.0407 (-2.3) 253.0221 (-13.1) 237.0664 (-7.0) 185.0329 (13.6) 170.0218 (-22.1)	$C_{13}H_{10}F_3N_2O_2$ $C_{13}H_6F_3N_2O$ $C_{11}H_4F_3N_2O_2$ $C_{12}H_8F_3N_2$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	7.9 / 8.4 / 8.8	Hydroxylation and double bond	527.0889 ($C_{20}H_{18}F_6N_2O$ 7)			5.8

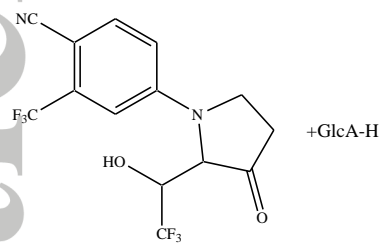
	[M+HCOO] ⁻	397.0623 (1.8)	281.0564 (4.2) 263.0446 (4.2) 253.0231 (2.8) 237.0665 (-6.0) 185.0319 (9.4) 170.0221 (11.1)	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ N ₂ O ₂ C ₁₃ H ₆ F ₃ N ₂ O C ₁₁ H ₄ F ₃ N ₂ O ₂ C ₁₂ H ₈ F ₃ N ₂ C ₈ H ₄ F ₃ N ₂ C ₈ H ₃ F ₃ N	- / 8.4 / 8.8					
M2 (C ₁₄ H ₁₂ F ₆ N ₂ O ₂)	[M-H] ⁻	353.0730 (-1.4)	283.0763 (3.0) 239.0435 (2.7) 227.0493 (-1.3) 185.0335 (1.6) 170.0226 (-12.9)	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ N ₂ O ₂ C ₁₂ H ₁₀ F ₃ N ₂ C ₁₀ H ₆ F ₃ N ₂ O C ₈ H ₄ F ₃ N ₂ C ₈ H ₃ F ₃ N	9.2	Hydroxylation	529.1045 (C ₂₀ H ₂₀ F ₆ N ₂ O ₇)			5.9
	[M+HCOO] ⁻	399.0779 (1.7)	239.0429 (1.5) 227.0428 (-9.4) 185.0332 (2.6) 170.0181 (-10.1)	C ₁₂ H ₁₀ F ₃ N ₂ C ₁₀ H ₆ F ₃ N ₂ O C ₈ H ₄ F ₃ N ₂ C ₈ H ₃ F ₃ N	8.3					

M3 ($C_{14}H_{14}F_6N_2O_2$)	[M-H] ⁻	355.0878 (-1.9)	285.0902 (-9.4) 257.0944 (-10.4) 239.0826 (2.4) 237.0691 (-11.4) 226.0388 (12.4) 199.0525 (-18.9) 185.0370 (-17.3) 170.0257 (2.0)	$C_{13}H_{12}F_3N_2O_2$ $C_{12}H_{12}F_3N_2O$ $C_{12}H_{10}F_3N_2$ $C_{12}H_8F_3N_2$ $C_{10}H_5F_3N_2O$ $C_9H_6F_3N_2$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	8.1	Hydroxylation and cleavage of the pyrrolidine ring	531.1199 ($C_{20}H_{22}F_6N_2O_7$)	285.0906 226.0375 185.0340 170.0225	(-7.5) (-8.1) (2.8) (-11.3)	6.3
M4 ($C_{15}H_{14}F_6N_2O_2$)	[M-H] ⁻	367.0884 (2.5)	<i>not identified</i>		5.6	Hydroxylation and methylation	ND			
M5-A / M5-B ($C_{14}H_{12}F_6N_2O_3$)	[M-H] ⁻	369.0674 (2.7)	351.0581 (-2.1) 299.0678 (-4.5) 281.0571 (2.8) 263.0470 (3.7) 255.0765 (-1.9) 237.0672 (-4.2) 185.0354 (2.4) 170.0246 (-3.8)	$C_{14}H_9F_6N_2O_2$ $C_{13}H_{10}F_3N_2O_3$ $C_{13}H_8F_3N_2O_3$ $C_{13}H_6F_3N_2O$ $C_{12}H_{10}F_3N_2O$ $C_{12}H_8F_3N_2$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	7.8 / 8.0	Dihydroxylation	ND			

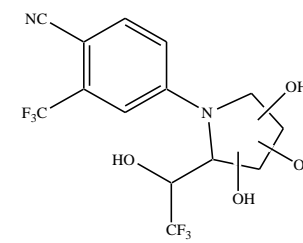
M6-A ($C_{14}H_{12}F_6N_2O_4$)	[M-H] ⁻	385.0625 (-0.9)	297.0535 (-1.5) 269.0573 (2.8) 241.0573 (-3.4) 185.0319 (-3.5) 170.0200 (-4.2)	$C_{11}H_7F_6N_2O$ $C_{12}H_8F_3N_2O_2$ $C_{11}H_8F_3N_2O$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	7.1	Trihydroxylation	ND			
M6-B ($C_{14}H_{12}F_6N_2O_4$)		385.0625 (-1.6)	251.0412 (-3.05) 227.0445 (-3.5) 225.0655 (2.2) 185.0315 (-3.4) 170.0210 (-2.9)	$C_{12}H_6F_3N_2O$ $C_{10}H_6F_3N_2O$ $C_8H_{10}F_3NO_3$ $C_8H_4F_3N_2$ $C_8H_3F_3N$	7.6					

*: the epimer detected

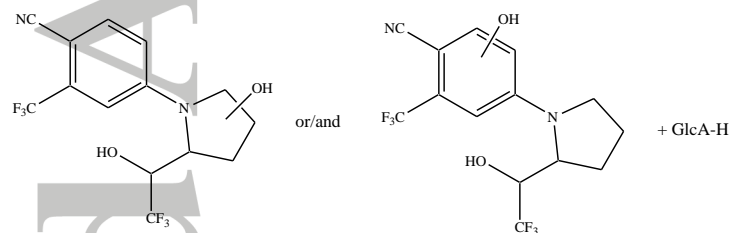
ND: not detected



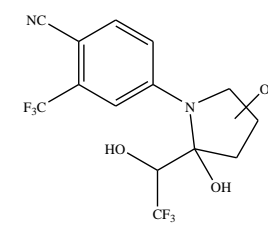
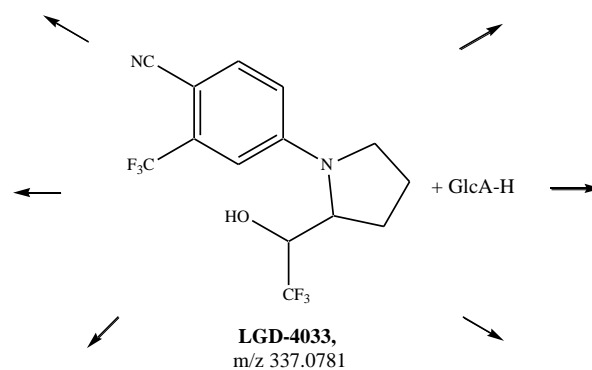
M1, m/z 351.0574



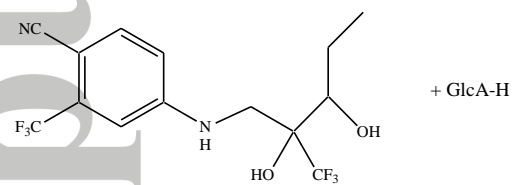
M6, m/z 385.0629



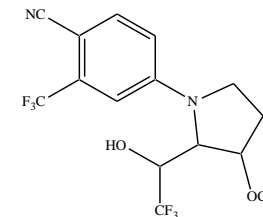
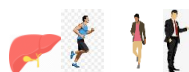
M2, m/z 353.0730



M5, m/z 369.0674



M3, m/z 355.0887









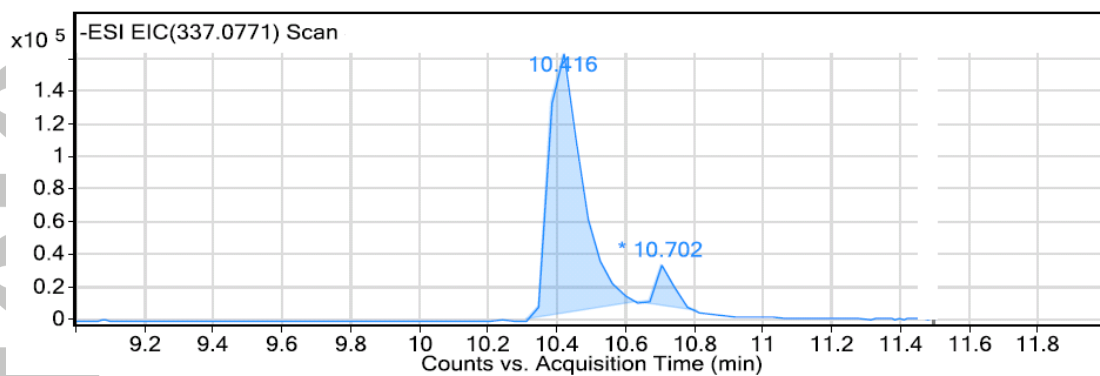
M4, m/z 367.0886



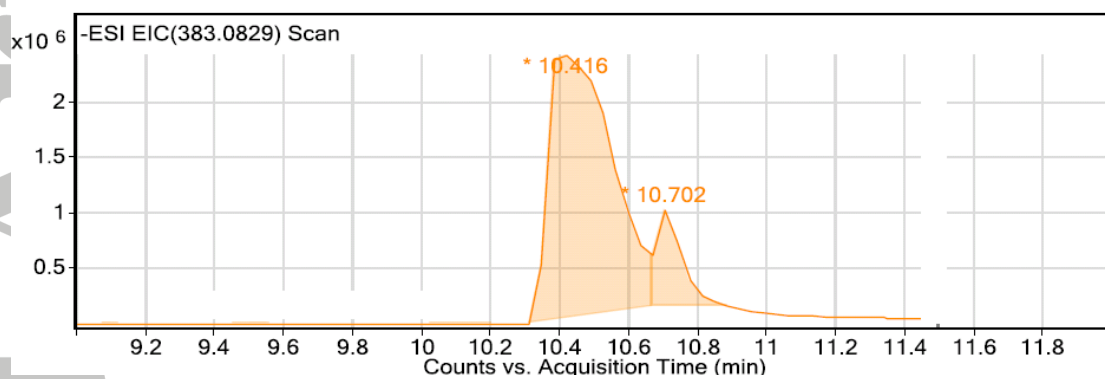
Figure 1. Structures of LGD-4033 and its metabolites (+ GlcA-H, if gluco-conjugated) in the present human excretion study and previous ones (*ions are monitored using LC-HRMS in negative ionization mode*).

Image explanation

-  : according to electrochemically derived metabolites [34].
-  : according to study in human liver microsomes [40].
-  : according to study in human urine sample [41].
-  : according to study in athlete urine samples [42].
-  : according to excretion study in horse urine [43].
-  : according to the present excretion study in human urine.



(a)



(b)

Figure 2. Extracted ion chromatogram of parent LGD-4033 in supplement; (a) monitoring the ion m/z 337.0771 and (b) its formate adduct at m/z 383.0829, both in LC-HRMS negative ionization mode.

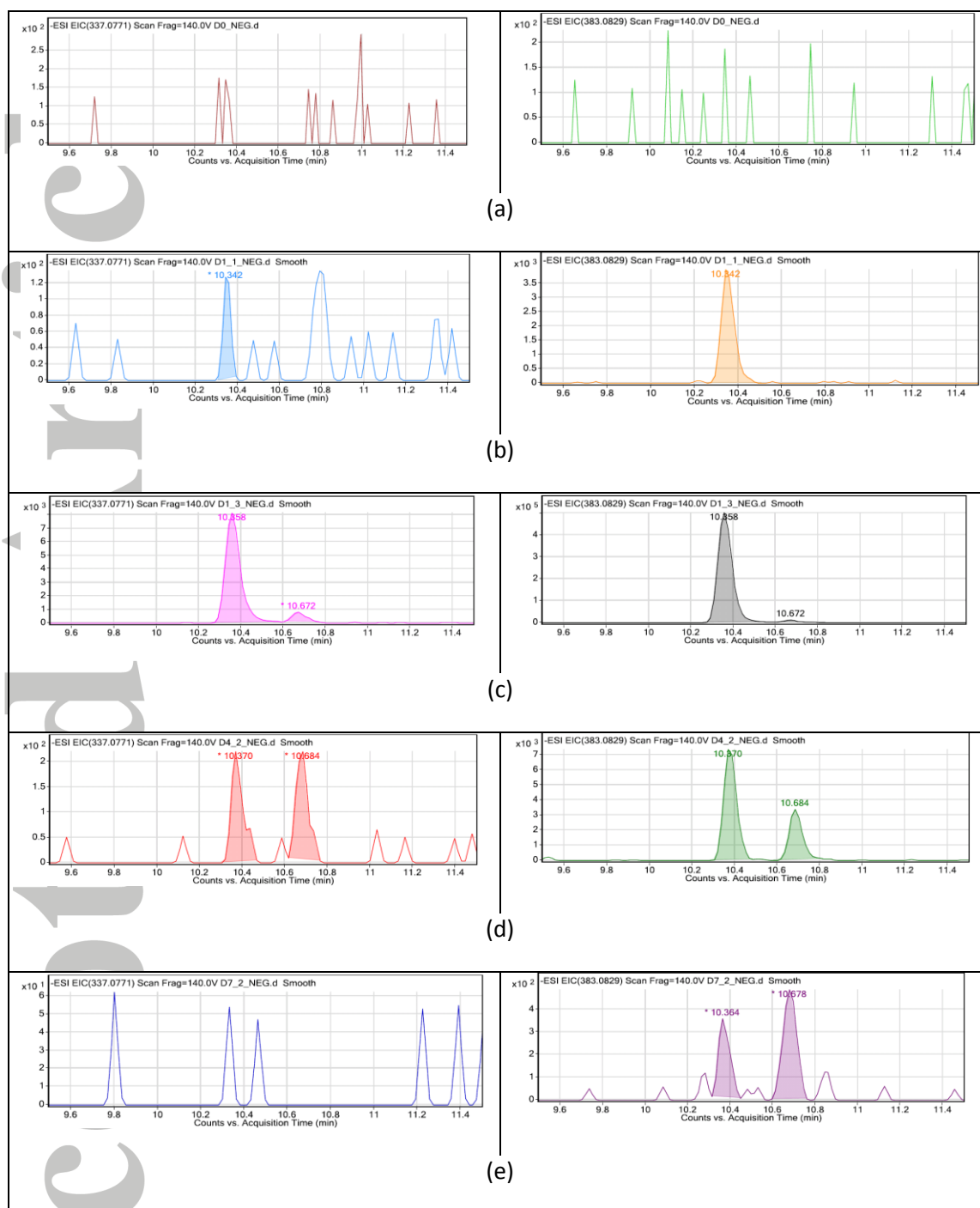


Figure 3. Extracted ion chromatogram of parent LGD-4033 at m/z 337.0771 (left column) and its formate adduct at m/z 383.0829 (right column) by LC-HRMS negative ionization mode, in urine samples of the excretion study at (a) $t=0$ (blank urine), (b) $t=2h$, (c) $t=4.5h$, (d) $t=3.5$ days and (e) $t=6.5$ days.

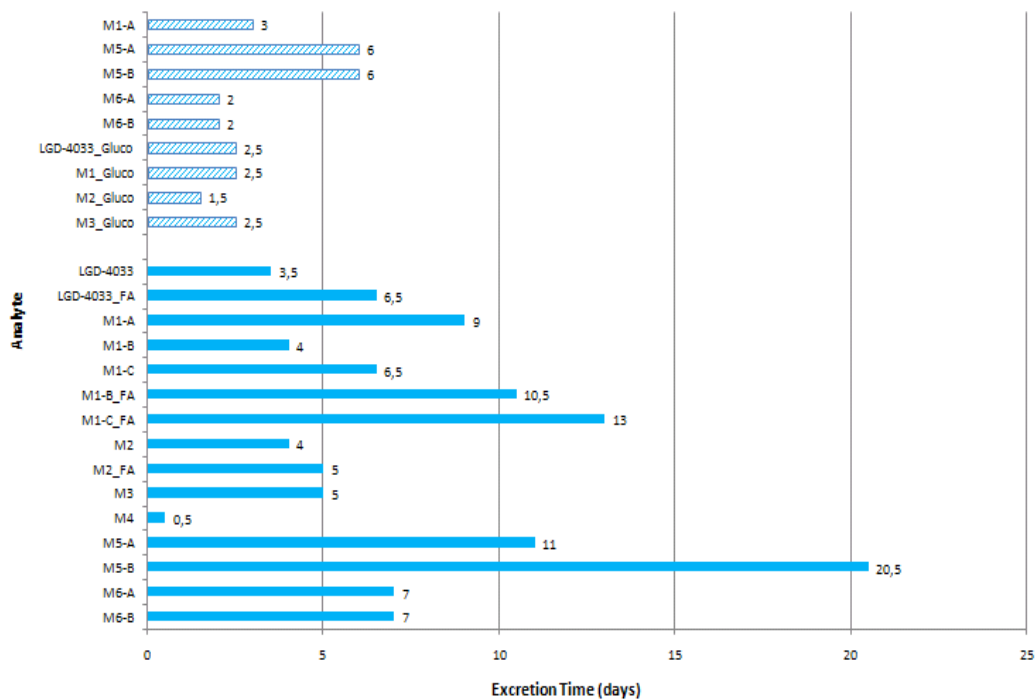


Figure 4. Excretion time (days) of LGD-4033 analytes in hydrolyzed human excretion study samples (solid filled bars) and after their dilute-and-shoot analysis (pattern filled bars) by LC-HRMS in negative ionization mode (*Gluco-*: gluco-conjugated metabolite, *FA*: formate adduct). Metabolites are coded as in Table 1.

Accepted

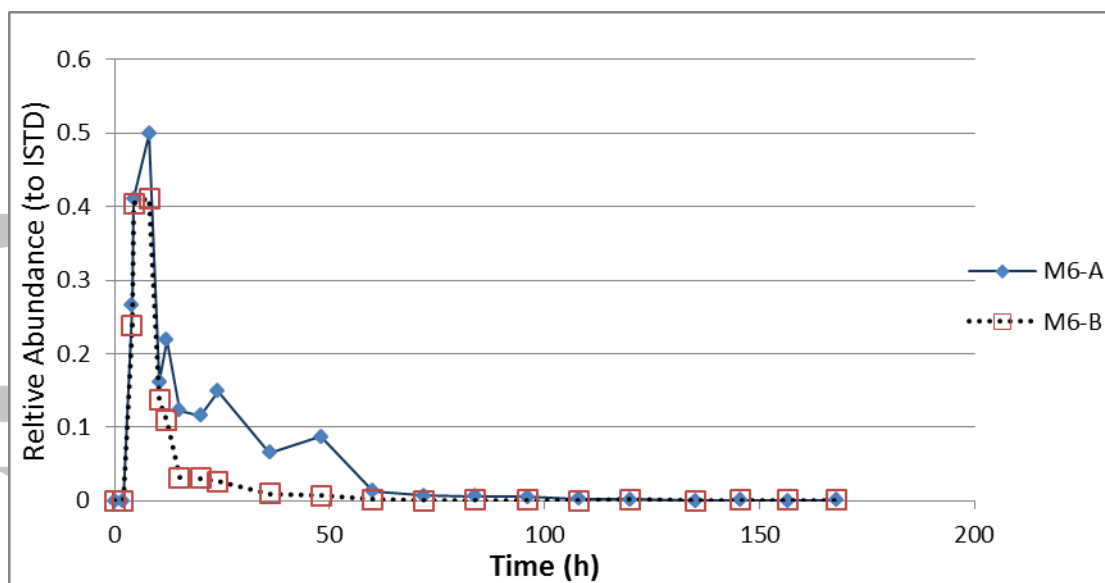


Figure 5. Relative abundance to ISTD (mefruside) for the trihydroxylated metabolites M6-A and M6-B of LGD-4033 in the human excretion study urines after hydrolysis during the first 168 hours (7 days).

Accepted

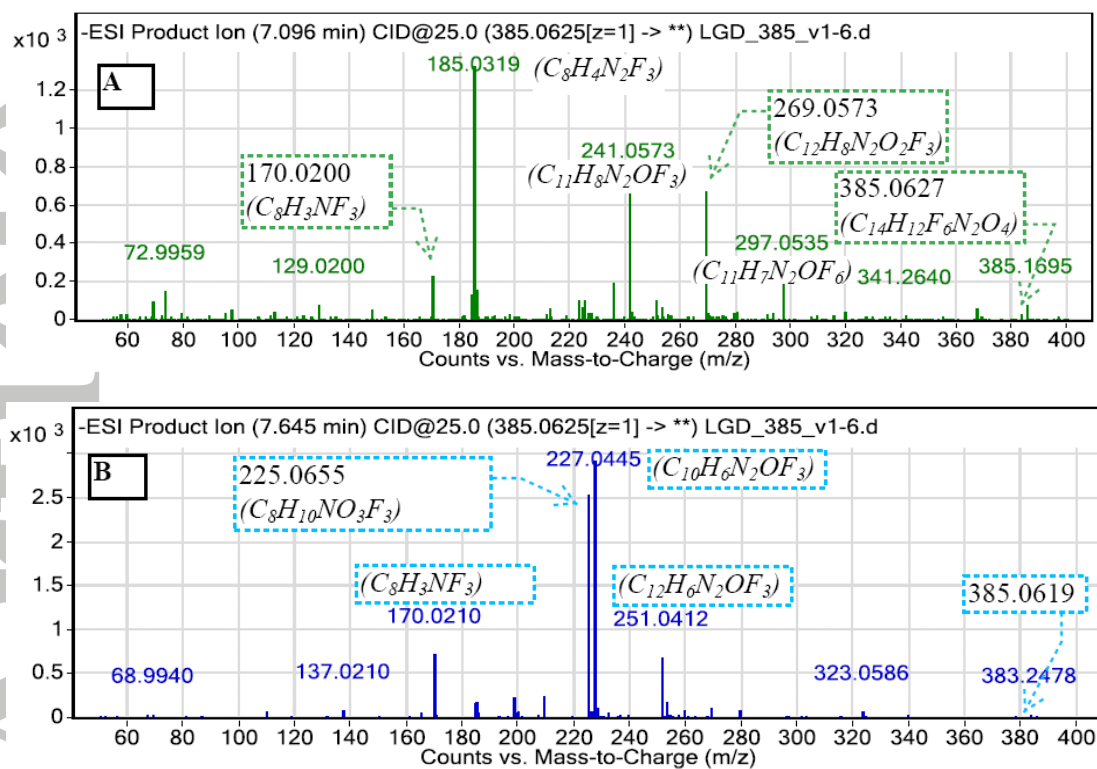


Figure 6. ESI-product ion mass spectra of the two trihydroxylated metabolites M6-A (A) and M6-B (B) of LGD-4033.

References

- [1]. R. Narayanan, C.C. Coss, J.T. Dalton. Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Molec. Cell. Endocrinology* **2018**, *465*, 134.
- [2]. J.T. Dalton, A. Makherjee, Z. Zhu, L. Kirkovsky, D.D. Miller. Discovery of nonsteroidal androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *244*, 1.
- [3]. J.P. Edwards, S.J. West, C.L. Pooley, K.B. Marschke, L.J. Farmer, T.K. Jones. New steroidal androgen receptor modulators based on 4-(trifluoromethyl)-2(1H)-pyrrolidino[3,2-g]quinolinone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 745.
- [4]. M.J. Tsai, B.W. O'Malley. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 451.
- [5]. R.F. Power, O.M. Conneely, B.W. O'Malley. New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 318.
- [6]. L.V. Nazareth, N.L. Weigel. Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19900.
- [7]. A.G. Fragkaki, Y.S. Angelis, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, G. Kokotos, C. Georgakopoulos. Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids* **2009**, *74*, 172.
- [8]. C.L. Smith, B.W. O'Malley. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective androgen receptor modulator. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 45.
- [9]. W. Gao, J.D. Kearbey, V.A. Nair, K. Chung, A.F. Parlow, D.D. Miller, J.D. Dalton. Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5 α -reductase inhibitor finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. *Endocrinology* **2004**, *145*, 5420.
- [10]. D. Kasmin, T. Prytkova, C.E. Cook, R. Wolfinger, T.M. Chu, D. Beratan, J.D. Norris, C.Y. Chang, D.P. McDonnell. Linking ligand-induced alterations in androgen receptor structure to differential gene expression: a first step in the rational design of selective androgen receptor modulators. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 1201.
- [11]. W. Gao, J.T. Dalton. Ockham's razor and selective androgen receptor modulators (SARMs): are we overlooking the role of 5 α -reductase? *Mol. Interv.* **2007**, *7*, 10.
- [12]. J.T. Dalton. The long and winding road for selective androgen receptor modulators. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **2017**, *83*, 2131.
- [13]. J. Kim, D. Wu, D.J. Hwang, D.D. Miller, J.T. Dalton. The para substituent of S-3-(phenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-N-(4-nitro-3-trifluoromethyl-phenyl)-propionamides is a

major structural determinant of in vivo disposition and activity of selective androgen modulators. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 230.

[14]. M. Thevis, M. Kamber, W. Schänzer. Screening of metabolically stable aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators for doping control purposes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 870.

[15]. X. Zhang, Z. Sui. Deciphering the selective androgen receptor modulators paradigm, *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 191.

[16]. E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, N. Baume. SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: a case report. *Forensic Sci. Int.* **2011**, *213*, 104.

[17]. B. Starcevic, B.D. Ahrens, A.W. Butch. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample. *Drug Test. Anal.* **2013**, *53*, 77.

[18]. C.A. Marhefka, W. Gao, K. Chung, J. Kim, Y. He, D. Yin, C. Bohl, J.T. Dalton, D.D. Miller. Design, synthesis and biological characterization of metabolically stable selective androgen receptor modulators. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 993.

[19]. M. Thevis, A. Thomas, I. Moller, H. Geyer, J.T. Dalton, W. Schänzer. Mass spectrometric characterization of urinary metabolites of the selective androgen receptor modulator S-22 to identify potential targets for routine doping controls. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2187.

[20]. M. Thevis, M. Kohler, J. Maurer, N. Schlorer, M. Kamber, W. Schänzer. Screening for 2-quinolinone-derived selective androgen receptor agonists in doping control analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3477.

[21] J.T. Dalton, R.P. Taylor, M.L. Mohler, M.S. Steiner. Selective androgen receptor modulators for the prevention and treatment of muscle wasting associated with cancer. *Curr. Opin. Support Palliat. Care* **2013**, *7*, 345.

[22]. K. Furuya, N. Yamamoto, Y. Ohyabu, T. Morikyu, H. Ishige, M. Albers, Y. Endo. Mechanism of the tissue-specific action of the selective androgen receptor modulator S-101479. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 442.

[23]. A. Lagojda, D. Kuehne, O. Krug, A. Thomas, T. Wigger, U. Karst, W. Schänzer, M. Thevis. Identification of selected in vitro-generated phase-I-metabolites of the steroidal selective androgen receptor modulator MK-0773 for doping control purposes. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2016**, *22*, 49.

[24]. S.M. Choi, B.M. Lee. Comparative safety evaluation of selective androgen receptor modulators and anabolic androgenic steroids. *Exp. Opin. Drug Saf.* **2015**, *14*, 1773.

[25]. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code, The 2018 Prohibited List, https://www.wada-ama.org/sites/default/files/prohibited_list_2018_en.pdf (accessed 28/2/2018).

[26]. World Anti-Doping Agency, 2016 Anti-Doping Testing Figures, https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016_anti-doping_testing_figures.pdf (accessed 28/2/2018).

[27]. World Anti-Doping Agency, 2017 Anti-Doping Testing Figures, https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017_anti-doping_testing_figures_en_0.pdf (accessed 24/7/2018).

[28]. E. Grata, L. Perrenoud, M. Saugy, N. Baume. SARM-S4 and metabolites detection in sports drug testing: a case report. *Forensic Sci. Int.* **2011**, 213, 104.

[29]. B. Starcevic, B.D. Ahrens, A.W. Butch. Detection of the selective androgen receptor modulator S-4 (Andarine) in a doping control sample. *Drug. Test. Anal.* **2013**, 5, 377.

[30]. A. Hansson, H. Knych, S. Stanley, M. Thevis, U. Bondesson, M. Hedeland. Characterization of equine urinary metabolites of selective androgen receptor modulators (SARMs) S1, S4 and S22 for doping control purposes. *Drug Test. Anal.* **2015**, 7, 673.

[31]. A.T. Cawley, C. Smart, C. Greer, M. Liu Lau, J. Keledjian. Detection of the selective androgen receptor modulator andarine (S-4) in a routine equine blood doping control sample. *Drug Test. Anal.* **2016**, 8, 257.

[32]. M. Thevis, D.A. Volmer. Mass spectrometric studies on selective androgen receptor modulators (SARMs) using electron ionization and electrospray ionization/collision-induced dissociation. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2018**, 24, 145.

[33]. M. Thevis, W. Schänzer. Detection of SARMs in doping control analysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, 464, 34.

[34]. M. Thevis, A. Lagojda, D. Kuehne, A. Thomas, J. Dib, A. Hansson, M. Hedeland, U. Bondesson, T. Wigger, U. Karst, W. Schänzer. Characterization of a non-approved selective androgen receptor modulator drug candidate sold via the Internet and identification of in vitro generated phase-I metabolites for human sports drug testing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, 29, 991.

[35]. S. Basaria, L. Collins, E.L. Dillon, K. Orwoll, T.W. Storer, R. Miciak, J. Ulloor, A. Zhang, R. Eder, H. Zientek, G. Gordon, S. Kazmi, M. Sheffield-Moore, S. Bhasin. The safety, pharmacokinetics, and effects of LGD-4033, a novel nonsteroidal oral, selective androgen receptor modulator, in healthy young men. *J. Gerontol. A Biol. Sci.* **2013**, 68, 87.

[36]. <http://www.sarmstore1.com/lgd-4033/>, (accessed 28/2/2018).

[37]. <https://www.steroid.com/Anabolicum.php>, (accessed 28/2/2018).

[38]. https://www.ebay.com/sch/i.html?_nkw=sarm+lgd+4033&ul_noapp=true, (accessed 28/2/2018).

[39]. O. Krug, A. Thomas, K. Walpurgis, T. Piper, G. Sigmund, W. Schänzer, T. Laussmann, M. Thevis. Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010-2013. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2014**, *70*, 1303.

[40]. L. Geldof, O.J. Pozo, L. Lootens, W. Morthier, P. Van Eenoo, K. Deventer. In vitro metabolism study of a black market product containing SARM LGD-4033. *Drug Test. Anal.* **2016**, doi/10.1002/dta.1930.

[41]. T. Sobolevsky, M. Dikunets, G. Dudko, G. Rodchenkov. Metabolism study of the selective androgen receptor modulator LGD-4033, (Eds: W. Schänzer, M. Thevis, H. Geyer, U. Mareck). *Recent Adv. Doping Anal, Sport & Strauss*, Cologne, **2015**, pp. 75-79.

[42]. H.D. Cox, D. Eichner. Detection of LGD-4033 and its metabolites in athlete urine samples. *Drug Test. Anal.* **2017**, *9*, 127.

[43]. A. Hansson, H. Knych, S. Stanley, E. Berntson, L. Jackson, U. Bondesson, M. Thevis, M. Hedeland. Equine in vivo-derived metabolites of the SARM LGD-4033 and comparison with human and fungal metabolites. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1074-1075*, 91.

[44]. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code, Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting, <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-td2016eaas-eaas-measurement-and-reporting-en.pdf> (accessed 9/8/2018).