

Warszawa, 10.06.2019 r.

**Identyfikacja nowych potencjalnych środków dopingujących w sporcie
oraz udoskonalenie techniki LC-MS/MS**

w rutynowej analizie antydopingowej i toksykologicznej

mgr Krzysztof Grucza

Promotorzy: Prof. dr hab. n. farm. Mirosław Szutowski

Dr hab. n. chem. Dorota Kwiatkowska

STRESZCZENIE

Doping w sporcie jest często obserwowanym zjawiskiem wśród sportowców różnych dyscyplin oraz bez wątpienia można uznać za największą szkodę współczesnego sportu. Kluczową rolę w eliminowaniu sportowców, stosujących substancje dopingujące, odgrywają laboratoria antydopingowe. Bezsprzecznym jest fakt, że istotą walki ze zjawiskiem dopingowania w sporcie jest udoskonalanie aktualnych metod analitycznych, a także identyfikacja nowych substancji dopingujących w sporcie oraz nowych metabolitów tych substancji, które znajdują się aktualnie „Liście Substancji i Metod Zabronionych WADA”

Część eksperymentalna pracy doktorskiej została wykonana z wykorzystaniem systemu ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas, UPLC-MS/MS Xevo TQ-S firmy Waters, będącego na wyposażeniu Polskiego Laboratorium Antydopingowego w Warszawie. Fundamentalnym celem niniejszej pracy doktorskiej było podjęcie próby identyfikacji nowych związków, które można by uznać za dopingujące oraz nowych metabolitów substancji, których stosowanie jest aktualnie zabronione. W celu realizacji powyższego zadania, kluczowym było opracowanie szybkiej metody wykrywania substancji dopingujących w moczu, znajdujących się na liście zabronionej WADA, wymagającej małej objętości materiału do badania (0,2 ml) oraz wdrożenie jej do rutynowych analiz antydopingowych w Polskim Laboratorium Antydopingowym w Warszawie.

Z wykorzystaniem opracowanego podejścia analitycznego, będącego podstawowym „narzędziem” w niniejszej pracy doktorskiej, zidentyfikowano nowy metabolit substancji zabronionej (higenaminy) – siarczan higenaminy. Jego monitorowanie w przesiewowych analizach antydopingowych okazało się kluczowe w wielu przypadkach, które nie wykazały obecności substancji macierzystej a obecny był jedynie metabolit. Po zastosowaniu procedury potwierdzeniowej, obejmującej hydrolizę kwasową oraz ekstrakcję, zidentyfikowano higenaminę a jej szacowane stężenie było powyżej limitu raportowania (10 ng/ml).

Dodatkowo, opracowano metodę wykrywania higenaminy w produktach specjalnego przeznaczenia żywieniowego dla sportowców (odżywkach), dla celów postępowań dyscyplinarnych, tzw. procesów wyjaśniających, toczących się przed Panelem Dyscyplinarnym przy Polskiej Agencji Antydopingowej. Istotnymi jej elementami było: szybkie przygotowanie próbek do analizy instrumentalnej (tzw. metoda „Dilute and Shoot”), ograniczenie narażenia osób na szkodliwe czynniki oraz redukcja kosztów. W ramach pięciu postępowań dyscyplinarnych, higenamina została zidentyfikowana w trzech przypadkach, przy braku wymienienia jej jako składnik danego produktu. Sytuacja ta podkreśla problem zafalszowania tego typów produktów substancjami dopingującymi.

Kluczowym osiągnięciem było również zbadanie profilu wydalania bemitilu, substancji znajdującej się w Programie Monitorującym WADA oraz identyfikacji metabolitu – glukuronidu bemitilu. Monitorowanie metabolitu okazało się również kluczowe,

podobnie jak w przypadku siarczanu higenaminy. Ponadto, wyniki uzyskane dla profilu wydalania z organizmu, wprowadziły element do dyskusji nad limitem raportowania bemitilu, który został ustalony przez WADA na poziomie od 20 ng/ml, ponieważ jedynie w dwóch próbkach szacowane stężenie bemitilu było powyżej tego ustalonego stężenia.

Z kolei, pracę przeglądową dotyczącą stosowania glutationu i jego prekursorów w kontekście możliwości poprawy osiągnięć sportowych, można uznać jako element w poszukiwaniu potencjalnych związków dopingujących. Jednakże, z uwagi na złożoność tego tematu oraz dyskusje dotyczące samej istoty związku, zintensyfikowane badania powinny być kontynuowane w tym zakresie oraz poddane wielopłaszczyznowej analizie, we współpracy z biochemikami, fizjologami a także z toksykologami.