



Dr inż. Dorota Kwiatkowska

Instytut Sportu – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Badań Antydopingowych

ul. Trylogii 2/16

01-982 Warszawa

ZAŁĄCZNIK II

AUTOREFERAT

Uniwersytet Warszawski

Wydział Chemii

Warszawa 2016

Spis treści

1. Dane personalne	3
2. Informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego.....	5
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego.....	5
4.2 Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego	5
4.3 Omówienie celu naukowego przedłożonych publikacji oraz najważniejszych wyników	10
4.4 Podsumowanie.....	27
Bibliografia.....	30

1. Dane personalne

Imię i nazwisko: **Dorota Kwiatkowska** (z d. Wojkowska)

2. Informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych

2007	Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych Warszawa, ul. Konopacka 4 Diagnosta laboratoryjny
2004	Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii Warszawa, ul. Kozielska 4 Doktor nauk biologicznych Rozprawa doktorska: „Profil steroidowy sportowców polskich” Promotor: Prof. dr hab. R. Grucza doktorat <u>wyróżniony</u> przez Radę Naukową Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
1997 - 1998	Uniwersytet Warszawski - Wydział Chemii studia podyplomowe - chromatografia i spektrometria mas
1989 - 1995	Politechnika Warszawska - Wydział Chemiczny kierunek: Technologia i Charakteryzacja Ciała Stałego Warszawa, ul. Noakowskiego 3 Praca magisterska: „Badania nad metodami oznaczania galu” Promotor: Prof. dr hab. K. Kasiura

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

od 2012 (IV)	Instytut Sportu (od XI 2015 Instytut Sportu – Państwowy Instytut Badawczy) - Zakład Badań Antydopingowych - funkcja (oprócz kierownika Zakładu): członek kierownictwa technicznego Zakładu
od 2006 (I)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych - stanowisko: adiunkt
od 2003 (VI)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych - funkcja: kierownik Zakładu
od 2002 (XII)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych - funkcja: p.o. kierownik Zakładu
1998 – 2002 (IX – XII)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych - funkcja: zastępca kierownika Zakładu
1996 – 2003 (IV – X)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych - funkcja: kierownik ds. jakości Zakładu
1996 (IV)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych - stanowisko: asystent
1995 (IX)	Instytut Sportu - Zakład Badań Antydopingowych Warszawa, ul. Trylogii 2/16 - stanowisko: specjalista inżynieryjno-techniczny

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Techniki analityczne w badaniach antydopingowych, dobór, interpretacja wyników, poszukiwanie nowych rozwiązań

4.2 Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

L.p.	Autor/autorzy, tytuł, wydawca lub czasopismo, data wydania, tom, strony.	IF	Liczba cytowań (03.06.2016) Web of Science/Scopus / Google Scholar
H1	Gronowska A. , Kwiatkowska D. , Pokrywka A. , Koterak M. , Turek-Lepa E. , Szutowski M.: <i>The alteration of the urinary steroid profile under the stress</i> . Biology of Sport, 2010, 27: 3-9.	IF ₍₂₀₁₀₎ = 0,15	4/4/4

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego wynikającego z problematyki, zaplanowaniu badań z ochotnikami, wykonywaniu badań z wykorzystaniem układu GC-MS, formułowaniu wniosków, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H2	Thevis M., Sigmund G., Gougoulidis V., Beuck S., Schlörer N., Thomas A., Kwiatkowska D. , Pokrywka A., Schänzer W.: <i>Screening for benfluorex and its major urinary metabolites in routine doping controls</i> . Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2011, 401: 543-551.	IF ₍₂₀₁₁₎ = 3,778	5/7/9
----	---	---------------------------------	-------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym (Institute of Biochemistry – Center for Preventive Doping Research, German

Sport University Cologne, Niemcy) i współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Praca ta powstała w ramach projektu Manfred Donike Institute (MDI): Development of a method for the detection of Benfluorex and its major urinary metabolites for implementation into routine doping control procedures:

- Niemcy - Institute of Biochemistry, Laboratory for Doping Analysis, German Sports University Cologne,
- Polska - Zakład Badań Antydopingowych, Instytut Sportu, Warszawa,

gdzie byłam koordynatorem i wykonawcą po stronie polskiej.

H3	Thomas A., Höppner S., Geyer H., Schänzer W., Petrou M., Kwiatkowska D. , Pokrywka A., Thevis M.: <i>Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry</i> . Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2011, 401: 507-516.	IF ₍₂₀₁₁₎ = 3,778	36/36/50
----	--	---------------------------------	----------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym (Institute of Biochemistry – Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Niemcy), współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Praca ta powstała w ramach projektu: Manfred Donike Institute (MDI): Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry:

- Niemcy - Institute of Biochemistry, Laboratory for Doping Analysis, German Sports University Cologne,
- Polska - Zakład Badań Antydopingowych, Instytut Sportu, Warszawa,

gdzie byłam koordynatorem i wykonawcą po stronie polskiej.

H4	Parr M.K., Opfermann G., Geyer H., Westphal F., Sönnichsen F.D., Zapp J., Kwiatkowska D. , Schänzer W.: <i>Seized designer supplement named "1-Androsterone": Identification as 3β-hydroxy-5α-androst-1-en-17-one and its urinary elimination</i> . Steroids, 2011 May, 76(6): 540-547.	IF ₍₂₀₁₁₎ = 2,829	17/17/21
----	---	---------------------------------	----------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na uzyskaniu zgody Komisji Etyki Badań Naukowych, współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym (Institute of Biochemistry –

Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Niemcy), interpretacji wyników badań, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

H5	Beuck S., Sigmund G., Koch A., Schänzer W., Pokrywka A., Kwiatkowska D. , Thevis M.: <i>Identification and characterization of urinary prenylamine metabolites by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> . Drug Testing and Analysis, 2012, 4: 701-716.	IF ₍₂₀₁₂₎ = 3,167	2/2/2
----	---	---------------------------------	-------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym (Institute of Biochemistry – Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Niemcy), współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

Praca ta powstała w ramach projektu Manfred Donike Institute (MDI): Analysis of Prenylamine in Human Control Samples:

- Niemcy - Institute of Biochemistry, Laboratory for Doping Analysis, German Sports University Cologne,
- Polska - Zakład Badań Antydopingowych, Instytut Sportu, Warszawa,

gdzie byłam koordynatorem i wykonawcą po stronie polskiej.

H6	Cholbiński P., Wicka M., Kowalczyk K., Jarek A. , Kaliszewski P., Pokrywka A., Bulska E., Kwiatkowska D. : <i>Detection of β-methylphenethylamine, a novel doping substance, by means of UPLC/MS/MS</i> . Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2014, 406: 3681-3688.	IF ₍₂₀₁₄₎ = 3,436	6/6/7
----	---	---------------------------------	-------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego wynikającego z problematyki ze szczególnym naciskiem na zagadnienia legislacyjne, wspólnej identyfikacji związku, interpretacji pierwszych wyników badań z wykorzystaniem układu LC-MS, formułowaniu wniosków, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

H7	Thevis M., Sigmund G., Thomas A., Vogel M., Walpurgis K., Kwiatkowska D. , Geyer H., Schänzer W.: <i>Isotope-dilution mass spectrometric quantification of the prodrug lisdexamfetamine in human urine in doping control analysis</i> . Rapid Communications in	IF ₍₂₀₁₄₎ = 2,253	2/2/3
----	--	---------------------------------	-------

	Mass Spectrometry, 2014, 28: 781-786.		
--	---------------------------------------	--	--

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał współpracy z zagranicznym ośrodkiem naukowym (Institute of Biochemistry – Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne, Niemcy), na syntezie związku razem z tym ośrodkiem, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 15%.

H8	Bulska E., Gorczyca D., Zalewska I., Pokrywka A., Kwiatkowska D. : <i>Analytical approach for the determination of steroid profile of humans by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry aimed at distinguishing between endogenous and exogenous steroids</i> . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015 Mar 15, 106: 159-166.	IF (2014/2015) = 2,979	3/1/3
----	---	------------------------------	-------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (Nr N N404 061939), sformułowaniu problemu badawczego wynikającego z problematyki, interpretacji wyników badań z wykorzystaniem układu GC-C/IRMS, formułowaniu wniosków, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%

Praca ta powstała w ramach grantu MNiSW N N404 061939 : Wpływ etanolu jako czynnika modyfikującego profil steroidowy ludzi, gdzie byłam kierownikiem projektu. Była też efektem współpracy w ramach projektu Manfred Donike Institute (MDI): Harmonization of steroid-profiling:

- Niemcy - Institute of Biochemistry Laboratory for Doping Analysis German Sports University Cologne,
- Polska - Zakład Badań Antydopingowych, Instytut Sportu, Warszawa,

gdzie byłam koordynatorem i wykonawcą po stronie polskiej.

H9	Jarek A., Kowalczyk K., Chołbiński P., Chajewska K., Turek-Lepa E., Pokrywka A., Bulska E., Kwiatkowska D. : <i>Analytical procedure for steroid profiling valid for Athlete Biological Passport</i> . Chemical Papers, 2015, 69: 254-261.	IF (2014/2015) = 1,468	o/o/o
----	---	------------------------------	-------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy (Nr N N404 061939), sformułowaniu problemu badawczego wynikającego z problematyki, interpretacji wyników badań z wykorzystaniem układu GC-MS, formułowaniu wniosków, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na

40%.

Praca ta powstała w ramach grantu MNiSW N N404 061939 : Wpływ etanolu jako czynnika modyfikującego profil steroidowy ludzi, gdzie byłam kierownikiem kierownik projektu

H10	Kwiatkowska D. , Wójtowicz M., Jarek A., Goebel C., Chajewska K., Turek-Lepa E., Pokrywka A., Kazlauskas R.: <i>N,N-dimethyl-2-phenylpropan-1-amine – new designer agent found in athlete urine and nutritional supplement</i> . Drug Testing and Analysis, 2015 Apr, 7(4):331-335.	IF (2014/2015) = 2,506	4/4/7
-----	--	------------------------------	-------

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu problemu badawczego wynikającego z problematyki, współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi (National Measurement Institute, Australian Sports Drug Testing Laboratory, Australia; BDG Synthesis Ltd, Nowa Zelandia), wspólnej identyfikacji związku, interpretacji wyników badań z wykorzystaniem układu GC-MS, formułowaniu wniosków, współtworzeniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H1-H10	Sumaryczny dla wybranych publikacji	IF =	79/79/106
		26,344	

W wymienionych wyżej opracowaniach byłam autorem koncepcji badań lub nadawałam ich kierunek. Kierowałam przeprowadzaniem eksperymentów, począwszy od uzyskania zgód Komisji Etyki Badań Naukowych, przez dobór ochotników i nadzór nad całą częścią eksperymentalną wykonywaną z zastosowaniem sprzętu dostępnego w Zakładzie Badań Antydopingowych - której część wykonywałam sama - a kończąc na interpretacji wyników i formułowaniu wniosków. Kopie prac naukowych stanowiących jednotematyczny cykl publikacji zamieszczone są w Załączniku VI, a oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji znajdują się w Załączniku VII.

Ogólne informacje o publikacjach [H1 – H10] przedstawia poniższe zestawienie:

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) zgodnie z rokiem opublikowania	26,344
Sumaryczny 5-letni współczynnik oddziaływania (IF5)	25,62
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	274
Ilość cytowań (Web of Science/Scopus/Google Scholar)	79/79/106
Średnia wartość współczynnika oddziaływań (IF)	2,63
Średnia wartość 5-letniego współczynnika oddziaływań (IF5)	2,56
Średnia liczba punktów MNiSW	2,74
Średnia ilość cytowań (Web of Science/Scopus/Google Scholar)	7,9/7,9/10,6

4.3 Omówienie celu naukowego przedłożonych publikacji oraz najważniejszych wyników

Od momentu wejścia w życie *Ustawy o kulturze fizycznej z dnia 3 czerwca 1984 r.*, w Polsce oficjalnie zabronione jest stosowanie w sporcie środków farmakologicznych i innych substancji dopingowych. Sytuację tę potwierdzały i potwierdzają kolejne akty prawne: *Ustawa o kulturze fizycznej z roku 1996*, *Ustawa o sporcie kwalifikowanym z roku 2003*, wreszcie – *Ustawa o sporcie z 25 czerwca 2010 r., z późn. zm.* Ponadto Polska podpisała i ratyfikowała Międzynarodową Konwencję Organizacji Narodów Zjednoczonych do Spraw Oświaty, Nauki i Kultury (UNESCO) o Zwalczaniu Doping w Sporcie (Dz.U. z dnia 8 sierpnia 2007 r., nr 142, poz. 999) i Konwencję Antydopingową Rady Europy (Dz.U. 2001, nr 15, poz. 149). Obie konwencje przewidują wdrożenie i przestrzeganie przez sygnatariuszy *Światowego Kodeksu Antydopingowego*, opublikowanego przez Światową Agencję Antydopingową (WADA) [1].

Kluczowym elementem tego systemu są laboratoria antydopingowe. W związku z tym we wrześniu 1987 roku w Instytucie Sportu w Warszawie utworzono Laboratorium Kontroli Doping, które następnie w 1995 roku zostało przekształcone w Zakład Badań Antydopingowych (ZBA).

Doping definiuje się jako naruszenie jednej lub większej ilości zasad określonych w artykułach 2.1 -2.10 wspomnianego wyżej *Światowego Kodeksu Antydopingowego* [2]. Zasada *fair play*, będąca ważnym elementem rywalizacji sportowej, oznacza między innymi zakaz stosowania niedozwolonych substancji wspomagających wydolność organizmu. Walka z tym procederem trwa od wieków. Pierwsze zapiski na ten temat mówią, że próby eliminowania nieuczciwej rywalizacji miały miejsce już w Tebach w VI wieku p.n.e. - osoby startujące w igrzyskach nie mogły mianowicie pić alkoholu, musiały być poddane kontroli oddechu przez kapłana. Można więc powiedzieć, że pierwszym detektorem czującym na środek dopingujący był nos.

Za jednego z pionierów nowożytnych badań antydopingowych uznaje się Polaka - warszawskiego farmaceutę Alfonsa Bukowskiego, który w roku 1910 wykonał pierwsze badania antydopingowe. Zbadał on ślinę koni biorących udział w wyścigach i wykazał stosowanie alkaloidów. Niestety, nie jest znana technika, jaką się wtedy posłużył [3].

Od początku minionego stulecia miał miejsce gwałtowny rozwój technik analitycznych - postępował on przez cały XX wiek i trwa do dzisiaj. Wiele badaczy z tej dziedziny zostało uhonorowanych za swe odkrycia Nagrodą Nobla.

W roku 1903 Michaił S. Cwiet wynalazł chromatografię, w roku 1911 Joseph J. Thompson – pierwszy spektrometr mas, a w roku 1919 Francis W. Aston – pierwszy spektrometr

ogniskujący według szybkości. W latach pięćdziesiątych XX wieku Anthony T. James i Archer J. P. Martin zastosowali do rozdziału chromatografię gazową i cieczową. W roku 1953 W. Paul i H. Steinwedel zbudowali analizator kwadrułowy i pułapkę jonową. Pięć lat później, w roku 1958 R. Gohlke i F. McLafferty połączyli chromatograf gazowy ze spektrometrem mas, by następnie w latach sześćdziesiątych mógł się pojawić układ chromatograf cieczowy ze spektrometrem mas. W roku 1975 do badań rutynowych wprowadzono kolumny kapilarne, które są wykorzystywane do dnia dzisiejszego.

W tym samym okresie postępował rozwój innych technik analitycznych. A. Tiselius stworzył elektorforezę, aby w roku 1937 mógł odbyć się po raz pierwszy rozdzielanie białek. Rozwijały się też inne techniki rozdzielania i identyfikacji substancji. Rozwój, o którym tu mowa, był i jest nadal pilnie obserwowany przez środowisko antydopingowe, które zarówno wykorzystuje nowe rozwiązania, jak i je wymusza, prowadząc szeroko zakrojone badania naukowe.

Rozwój technik antydopingowych związany jest ściśle z wymaganiami, jakie są stawiane laboratoriom antydopingowym. Tylko laboratoria posiadające akredytację Światowej Agencji Antydopingowej (WADA – World Antidoping Agency) mogą badać próbki pobrane od sportowców. Obecnie na świecie istnieją 34 takie ośrodki i jednym z nich jest laboratorium w Warszawie, którego jestem kierownikiem [4]. Nasze laboratorium oprócz posiadania akredytacji WADA, ma też akredytację Stowarzyszenia Oficjalnych Chemików Wyścigów Konnych (AORC – Association of Official Racing Chemists), czyli może badać próbki pobrane od zwierząt startujących w zawodach. Zarówno WADA, jak i Międzynarodowa Federacja Jeździecka (International Federation for Equestrian Sports, Fédération Équestre Internationale – FEI) posiadają listy substancji i metod zabronionych, które są co roku aktualizowane [5,6].

Konieczność wykrywania coraz to nowszych substancji dopingujących i metod zabronionych oraz stawianie przez WADA coraz większych wymagań stały się motorem napędowym rozwoju technik analitycznych wprowadzanych do badań antydopingowych. Od roku 1972 - kiedy to profesor Manfred Donike po raz pierwszy zastosował chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas w badaniach antydopingowych podczas igrzysk olimpijskich w Monachium - układ GC-MS jest jednym z podstawowych układów analitycznych wykorzystywanych w laboratoriach antydopingowych. Kolejny etap stanowiło uzupełnienie o tandemowy spektrometr mas (MS/MS) i spektrometr mas wysokiej rozdzielczości (HRMS) oraz wprowadzenie chromatografów cieczowych sprzężonych ze spektrometrami, najpierw w układzie chromatografu cieczowego z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS), a potem ultrasprawnej chromatografii cieczowej połączonej z tandemowym spektrometrem mas (UHPLC-MS/MS).

Dzisiejsze laboratoria antydopingowe muszą jednak wykorzystywać wiele innych technik instrumentalnych, takich jak chromatografia gazowa połączona z izotopowym spektrometrem mas (GC-C/IRMS), chromatografia cieczowa z detektorem czasu przelotu (LC-Q-TOF), elektroforeza, chemiluminometria, fluorymetria, kolorymetria, immunochemia, luminometria, cytometria przepływowa, impedancja, kumulacyjne zliczanie impulsów elektrycznych. Stosowanie tak wielu technik jest związane z różnorodnym charakterem substancji i metod zabronionych w sporcie. Jak już wspomniałam wyżej, *Lista Substancji i Metod Zabronionych (Lista Zabroniona)* jest co roku aktualizowana przez WADA i publikowana wraz z *Dokumentami Technicznymi WADA* i *Przewodnikami WADA*, w których zawarte są wytyczne dotyczące zalecanych technik analitycznych oraz minimalnych wymaganych wartości granicznej wykrywalności dla substancji dopingujących (MRPL) [5,7-17].

Jak wspomniałam wyżej, wdrażanie nowych technik do pracy w laboratorium antydopingowym jest ściśle związane ze zmianami na *Liście Zabronionej* i wymaganiami WADA. W roku 1967 Międzynarodowy Komitet Olimpijski (MKOl) powołał Komisję Medyczną do organizowania i nadzoru walki z dopingiem. Komisja opublikowała wówczas pierwszą listę substancji zabronionych przez MKOl, zawierającą jedynie stymulanty i narkotyki. W kolejnych latach lista ta ulegała znacznemu poszerzeniu. W tym czasie do badań wykorzystywano przede wszystkim chromatografy gazowe, a od roku 1972 chromatografy gazowe sprzężone ze spektrometrami mas. Od roku 2004, kiedy to Światowa Agencja Antydopingowa (WADA) przejęła od Komisji Medycznej MKOl rolę głównego koordynatora nad światowym systemem antydopingowym, WADA jest odpowiedzialna za przygotowanie i publikowanie *Listy Zabronionej*. WADA obniżając limity detekcji [15] wymogła na laboratoriach wprowadzenie detektorów MS/MS i HRMS połączonych z chromatografami gazowymi, a wprowadzając w roku 2004 na *Listę* glukokortykosteroidy i dwie substancje steroidowe gestrinon i tetrahydrogestrinon (THG), zmusiła laboratoria do wykonywania badań w układach chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas [18]. Dodając kolejne grupy substancji wymusiła wprowadzenie takich metod, jak:

- metoda elektroforez dla badania obecności erytropoetyny,
- metoda czasowo-rozdzielcza analizy immunofluorometrycznej i metoda immunoluminometryczna dla oceny stężenia hormonu luteinizującego,
- metoda kolorymetryczna dla badania obecności hydroksyetyloskrobii,
- metoda immunoluminometryczna i metoda czasowo-rozdzielcza analizy immunofluorometrycznej dla badania obecności choriogonadotropiny,

- metoda immunoluminometryczna i metoda radioimmunologiczna dla badania obecności somatropiny,
- metoda cytometrii przepływowej dla wykrywania obecności różnych antygenowo krwinek czerwonych,
- metoda fluorescencyjnej cytometrii przepływowej, metoda impedancyjna, metoda kumulacyjnego zliczania impulsów elektrycznych dla oznaczania parametrów hematologicznych.

Lista Zabroniona jest corocznie aktualizowana, czyli dochodzą nowe grupy związków i metody, a ponadto posiada charakter otwarty [19]. Zawiera ona - oprócz przykładów konkretnych substancji w grupie środków anabolicznych: – steroidów anaboliczno-androgennych (S.1.1), hormonów peptydowych, czynników wzrostu, substancji pokrewnych i mimetyków (S.2), diuretyków i środków maskujących (S.5), stymulantów: stymulantów określonych (S.6.b) - uwagę: „(...) i inne substancje o podobnej strukturze chemicznej lub podobnym działaniu biologicznym”. W skład *Listy Zabronionej* wchodzi też grupa substancji niezatwierdzonych (S.o): „każda substancja farmakologiczna, której nie ujęto w dalszych sekcjach listy, a dla której żadna rządowa jednostka opieki zdrowotnej nie wydała pozwolenia na dopuszczenie do obrotu jako produktu leczniczego stosowanego u ludzi (np. leki będące w fazie badań przedklinicznych lub klinicznych, jak również leki, które zostały wyrejestrowane, zmodyfikowane narkotyki, leki weterynaryjne)”. Dodatkowo niektóre grupy opatrzone są uwagą, że „(...) grupa nie ogranicza się wyłącznie do wymienionych związków (...)”. Takie zapisy stawiają duże wyzwania przed laboratoriami, zmuszając je do poszukiwania nowych rozwiązań.

Oprócz technik i metod dających możliwość wykrywania i oznaczania wielu związków jednocześnie, konieczne jest rozróżnianie związków o pochodzeniu endogennym od egzogennym, takich jak substancje steroidowe, np. testosteron – technika GC-C/IRMS [9], erytropoetyna – elektroforeza [12], hormon wzrostu – immunoluminometria, radioimmunologia [13,17]. Konieczne jest też opracowywanie nowych modeli interpretacji wyników, poszukiwanie nowych metabolitów znanych związków, np. w celu wydłużenia okien detekcji (możliwość wykrycia ksenobiotyku w dłuższym czasie od momentu przyjęcia) oraz identyfikacji nowych związków, które powstają m.in. na bazie już istniejących. Dlatego też laboratoria, pracując zespołowo, cały czas modyfikują swoje metody. Stąd moja rola jako koordynatora tych prac ze strony polskiej. Z drugiej strony WADA – dążąc do wypracowania jak najlepszych praktyk i ujednolicania stosowanych metod - zmusza laboratoria do współpracy i wymiany doświadczeń. Stąd obecnie tak ważne są osobiste kontakty między nimi, w tym również rola osoby kierującej laboratorium antydopingowym [20].

Wymienione powyżej prace stanowią tylko część moich działań prowadzonych w warszawskim laboratorium w celu jak najskuteczniejszej walki z patologią, jaką jest doping. Wyniki badań wykorzystuję zarówno w pracy rutynowej związanej z analizą próbek antydopingowych ludzi i zwierząt, jak i w badaniach toksykologicznych prowadzonych na rzecz instytucji rządowych oraz sądów.

Jak wspomniano wyżej praca laboratorium - oprócz wdrażania nowoczesnych technik do badań, najnowszych rozwiązań technologicznych - polega też na modernizacji metod przesiewowych do wykrywania substancji zabronionych, na opracowywaniu nowych metod wykrywania dopingu, identyfikacji nowych substancji, które potencjalnie mogą być wykorzystywane w celach dopingowych, wydłużeniu czasów detekcji dla związków uznanych za dopingujące poprzez monitorowanie większej ilości metabolitów, badaniu metabolizmu związków, poszukiwaniu czynników mogących mieć wpływ na zmiany zachodzące w organizmie człowieka, a co za tym idzie poszukiwaniu nowych, bardziej wiarygodnych modeli interpretacji wyników badań. Wszystkie prace, w których brałam udział, miały na celu takie właśnie działania, a wyniki tych prac prezentowałam na wielu konferencjach i osobiście informowałam inne laboratoria o powstających zagrożeniach, dzięki czemu mogły one z kolei wprowadzić nowe rozwiązania do swoich prac rutynowych.

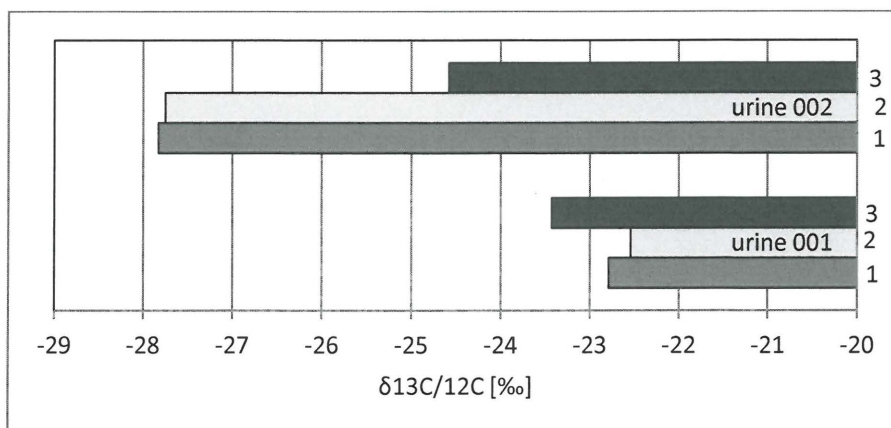
Światowa Agencja Antydopingowa, a co za tym idzie laboratoria antydopingowe poszukują pośrednich dowodów stosowania substancji i metod zabronionych. Przykładem tego jest wprowadzenie przez WADA *Paszportu biologicznego* zawodnika [21]. Paszport biologiczny zawodnika jest systemem stworzonym do oceny długofalowej markerów biologicznych u sportowców. Oparty jest on na modelu statystycznym, tzw. model adaptacyjny, pozwalającym na wyliczenie zakresów ilościowych analizowanych markerów, przekroczeń, które wskazują na stosowanie substancji lub metod dopingujących. Obecnie na świecie funkcjonują dwa moduły paszportu biologicznego - hematologiczny i steroidowy. Jest też rozważane wprowadzenie 3 modułu peptydowego.

Niestety, ocena takiego paszportu nie jest prosta. Trzeba brać pod uwagę różne czynniki mogące mieć wpływ na poszczególne markery. Jednym z nich jest stres, co zostało udowodnione przez mój zespół w publikacji [H1]. Badaniu poddano grupę zdrowych ochotników, od których pobierano próbki moczu w warunkach dużego stresu 30 minut przed ważnym dużym egzaminem i jeden miesiąc po zdarzeniu, w momencie relaksu. Oznaczaliśmy stężenia dla hormonów endogennych, takich jak: 11beta-OH-androsteron, 11beta-OH-etiocholanolon, androsteron, etiocholanolon, 5beta-androstan-3beta,17beta-diol, 5alfa-androstan-3alfa,17beta-diol, 5beta-androstan-3alfa,17beta-diol, 5alfa-androstan-3beta,

¹⁷beta-diol, testosteron, epitestosteron, dihydrotestosteron, dehydroepiandrosteron i na tej podstawie obliczaliśmy wartości wskaźników testosteronu do epitestosteronu oraz androsteronu do etiocholanolonu. Poziom stresu określaliśmy na podstawie badania ankietowego – subiektywnego odczucia. Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku kobiet zmianie ulegało stężenie testosteronu i epitestosteronu. Zmiany te nie powodowały wahań wskaźnika testosteronu do epitestosteronu. W przypadku mężczyzn obserwowaliśmy zaś spadek wartości tego wskaźnika. Wyniki pracy zainteresowały WADA i inne laboratoria do tego stopnia, że przy ocenie zmian profilu w module steroidowym paszportu rozważany jest wpływ stresu startowego na wahania parametrów. Praca ta była ostatnio przytaczana na spotkaniu WADA dla ekspertów oceniających moduł steroidowy, którego też byłam uczestnikiem, *Steroid Passport Management Meeting* (Lozanna 2016).

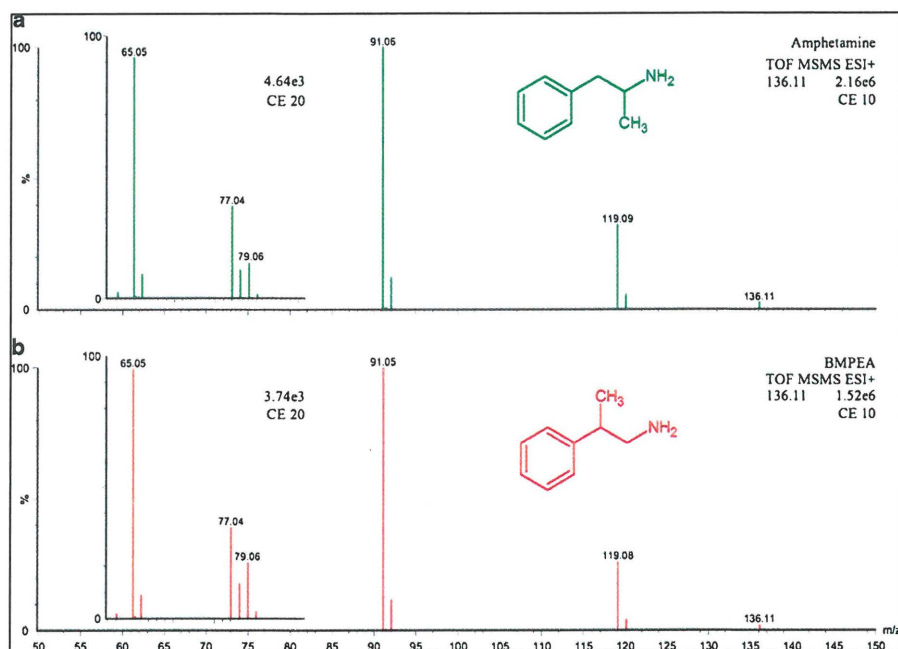
W celu tworzenia paszportu zawodnika trzeba dysponować wiarygodnymi, powtarzalnymi i zwalidowanymi metodami do oznaczania wszystkich parametrów branych pod uwagę we wspomnianym wyżej modelu adaptacyjnym. Stąd konieczność stosowania takiej metody, aby wyniki z jednego laboratorium mogły być odtworzone w drugim. Przykład takiej procedury pokazał mój zespół w publikacji [H9]. Wykazaliśmy w niej jak ważny jest dobór materiałów odniesienia dla oznaczeń ilościowych w takiej procedurze. Wskazaliśmy też na wielką wagę badań międzylaboratoryjnych w sytuacji, gdy wyniki z jednego laboratorium zostają umieszczone w paszporcie biologicznym, w którym następnie wpisywane są kolejne wyniki ustalone przez inne laboratoria.

Każdy pojedynczy wynik jest oceniany indywidualnie i w połączeniu ze wszystkimi wskaźnikami dla profilu. Jeżeli są zauważalne jakieś zmiany, konieczne jest wdrożenie działań mających na celu wyjaśnienie sytuacji [9,10]. Jednym z takich rozwiązań jest tzw. badanie IRMS. Do tego badania wykorzystuje się układ chromatograf gazowy połączony z komorą spalania i izotopowym spektrometrem mas i obserwuje się wartości wskaźnika izotopów ¹³C/¹²C. Jednak, aby wykonać takie badanie, próbka musi być najpierw właściwie przygotowana. W pracy [H8] badałam zastosowanie różnych sposobów przygotowania próbki poprzez stosowanie różnych wypełnień przy ekstrakcji ciecz–ciało stałe, enzymów i różnych rozpuszczalników przy ekstrakcji ciecz–ciecz. Dzięki opracowaniu tego protokołu powstała możliwość otrzymywania powtarzalnych wyników badań dla steroidów anaboliczno-androgennych, dla których ważne jest określenie, czy źródło ma pochodzenie endo- czy egzogenne (ryc. 1).



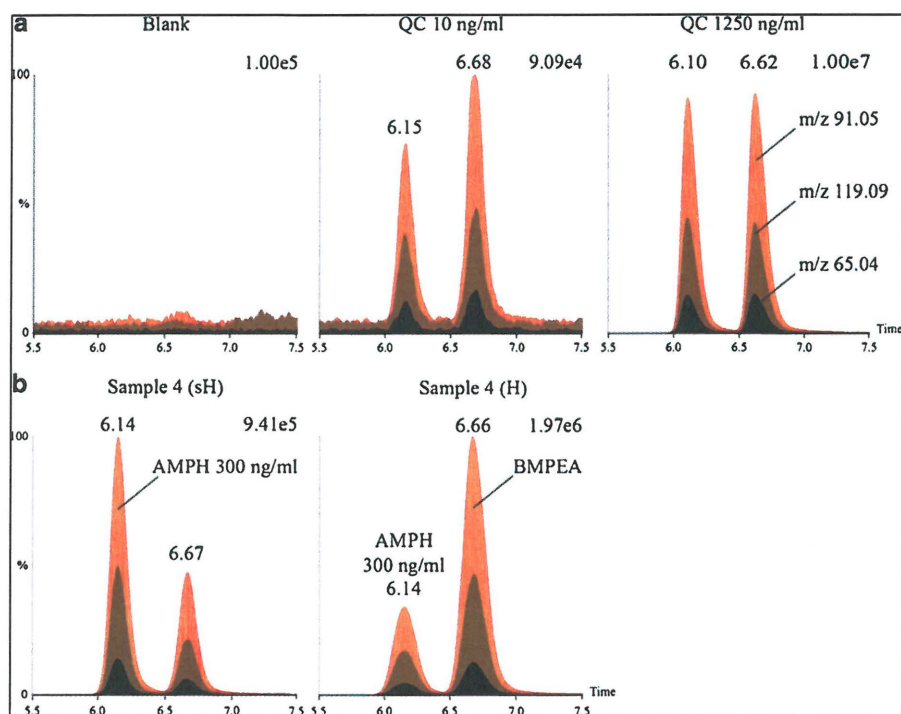
Ryc. 1. Wartości dla $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ [‰] dla wybranych związków (steroidów) w dwóch przykładowych próbkach; mocz 001 (negative finding – próbka z endogennymi steroidami), mocz 002 (próbka z egzogennymi steroidami) 1 -Androsterone, 2 -Etiocholanolone, 3 -11-OHAndrosterone –ERC.

Innym dużym wyzwaniem dla analityka w analizach antydopingowych jest badanie wpływu substancji nieznanej i następnie interpretacja wyników. Przykłady takich związków omówiłam w publikacji [H6] i [H10]. Obydwie prace dotyczą modyfikacji fenyloetyloaminy, czyli substancji, którą można na tyle łatwo zmieniać, że znalazła się obecnie w kręgu zainteresowań czarnego rynku. W pierwszej z prac pokazałam substancję, która jest izomerem amfetaminy - beta-metylofenyloetyloaminą (BMPEA). Na podstawie naszych doświadczeń można wysunąć wniosek, że wiele laboratoriów toksykologicznych nie rozróżnia tych dwóch izomerów, a jest to istotne dla interpretacji wyników, patrząc, czy wykryta substancja jest środkiem odurzającym lub substancją psychotropową albo prekursorem służącym do produkowania tego rodzaju substancji w świetle obowiązujących unormowań *Ustawy z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii*. W przedstawionej publikacji kierowany przeze mnie zespół zaprezentował różne sposoby przygotowania próbki: metodę bezpośredniego nastrzyku próbki, metodę z zastosowaniem ekstrakcji, metodę z zastosowaniem hydrolizy. Badania prowadziliśmy w układach LC-TOF (ryc. 2) i LC-MS/MS (ryc.3).



Ryc. 2. Spektra TOF dla jonu m/z 136,11 dla amfetaminy (a) i BMPEA (b).

Wykazaliśmy, że istnieje łatwa i szybka metoda rozdzielenia tych dwóch związków (ryc. 3).

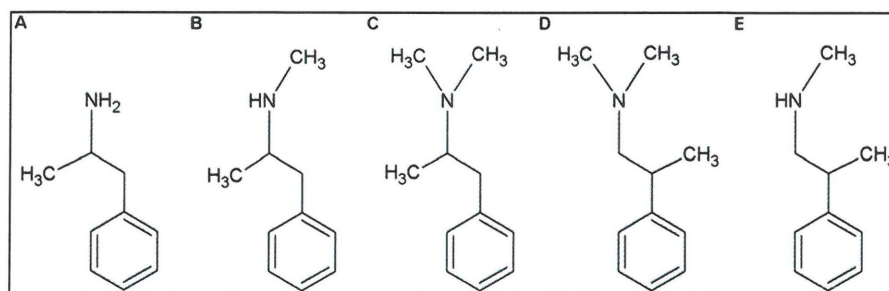


Ryc. 3. Możliwości metody dla rozróżniania związków o różnych wartościach stężeń (a) oraz chromatogramy dla próbek rzeczywistych przygotowanych z hydrolizą w normalnym czasie (H) i ze skróconym czasem hydrolizy (sH) dla pochodnych sprzężonych (b).

W trakcie całego procesu interpretacji otrzymanych wyników badań niezmiernie ważny był pierwszy jego etap. Tak jak wspomniałam wyżej, wiele laboratoriów nie rozróżnia tych dwóch izomerów, a jest to istotne zarówno ze względów legislacyjnych, jak

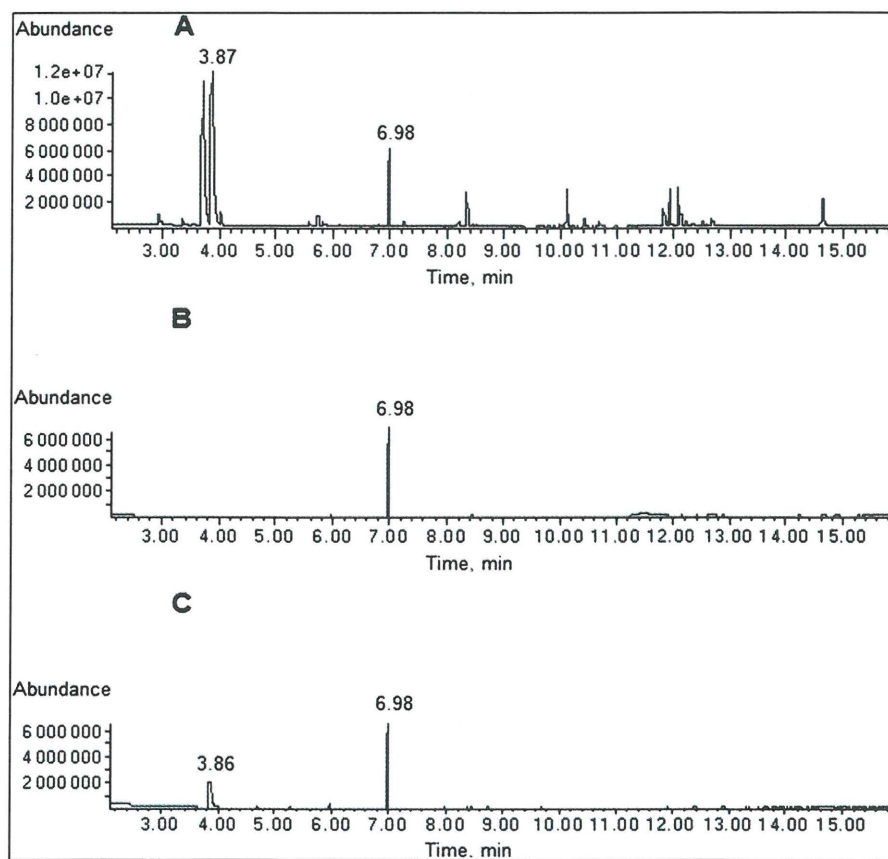
i zdrowotnych. Ten etap był wykonywany pod moim nadzorem i w stałym kontakcie z WADA oraz organem upoważnionym w Polsce do pobierania próbek, którym jest Komisja do Zwalczenia Dopingu w Sporcie. W etapie dochodzenia sprawdzono odżywki, które stosowali zawodnicy, co ukierunkowało nasze badania. Obecnie w wielu krajach podejmowane są próby wyeliminowania z rynku odżywek zawierających ten związek, gdyż przez wielu toksykologów uważany jest za bardziej niebezpieczny niż amfetamina [22-24].

W publikacji [H10] pokazałam nowy związek, najbardziej zbliżony w budowie do fenprometaminy (ryc. 4).



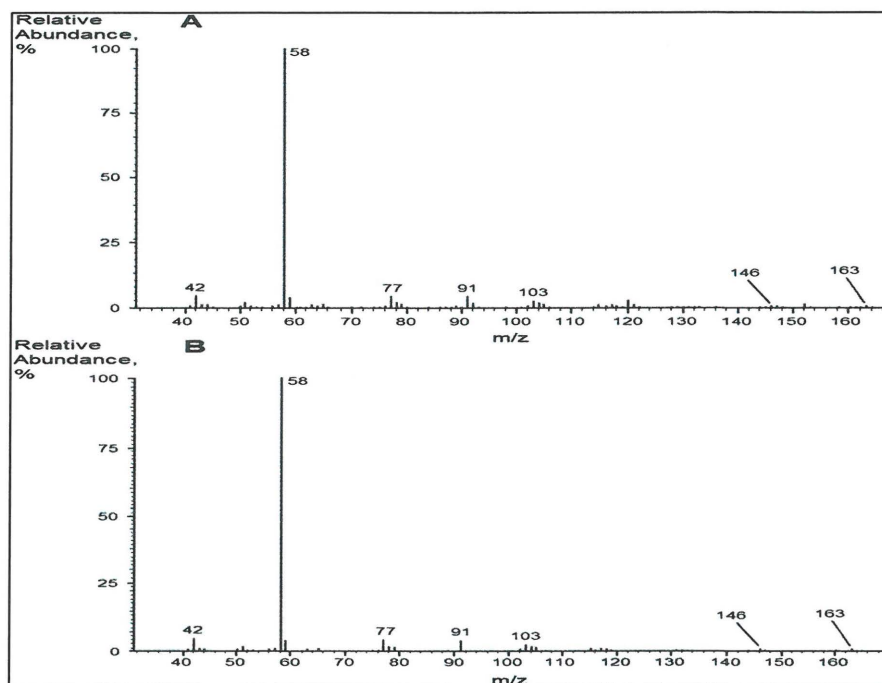
Ryc. 4. Struktura chemiczna amfetaminy (A) i jej analogów: metyloamfetaminy (B), dimetyloamfetaminy (C), N,N-dimetylo-2-fenylopropano-1-aminy (D) i fenprometaminy (E).

Analizy wykonywaliśmy w układzie GC-MS, gdzie pierwszy raz znaleziono nieznany pik zidentyfikowany później jako N,N-dimetylo-2-fenylopropano-1-aminy (NN-DMPPA). Uzyskane w tych badaniach wyniki pokazuje ryc. 5.



Ryc. 5. TIC dla badanej próbki moczu (A), próbki moczu nie zawierającej pochodnym fenyloetyloaminy (blank urine) (B) i blank urine z dodanym standardem NN-DMPPA (C). Czas retencji dla NN-DMPPA wynosił 3,87 i 3,86 min, difenyloaminy (ISTD) - 6,98.

Identyfikacja substancji nastąpiła po przyjęciu założenia, jaka może być jego struktura i następnie po zsyntetyzowaniu związku. Cały ten proces był wykonywany przez mój zespół. Wyniki dla nieznanego piku w badanej próbce i dla zsyntetyzowanego standardu przedstawia ryc. 6.



Ryc. 6. Spektre dla związku zidentyfikowanego jako NN-DMPPA w próbce moczu (A) i dla NN-DMPPA w próbce kontrolnej (B).

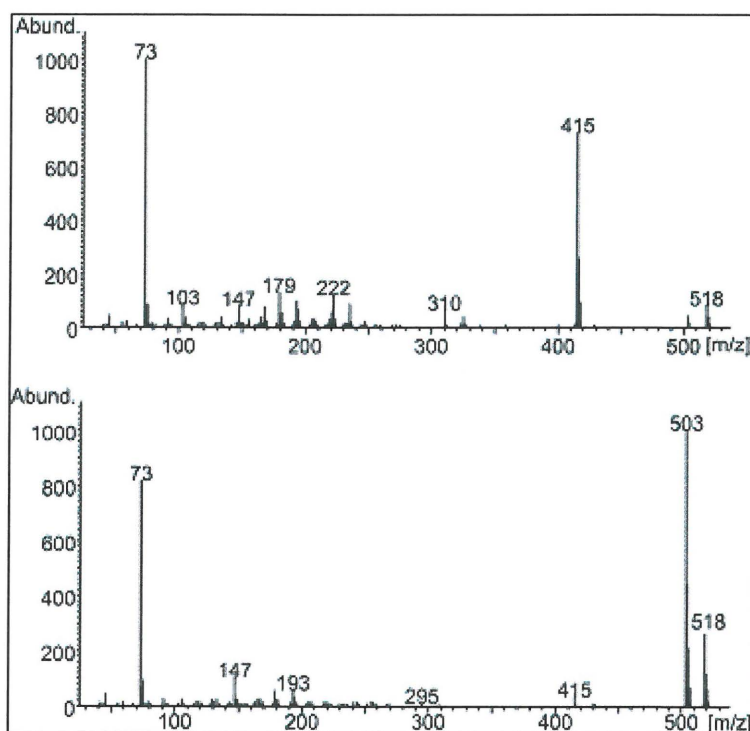
W przypadku identyfikacji współpracowałam z antydopingowym laboratorium z Australii (National Measurement Institute, Australian Sports Drug Testing Laboratory), które nawiązało kontakt z laboratorium w Nowej Zelandii (BDG Synthesis Ltd). Zweryfikowałam też, jakie odżywki były stosowane przez danego zawodnika i wspólnie z kolegami z Australii wytypowaliśmy podejrzany preparat.

Przedstawiony w publikacjach [H6] i [H10] sposób postępowania z nieznaną substancją pozwala na rozróżnianie związków w sposób prosty i powtarzalny. Nie byłby on jednak możliwy, jak już wspomniałam wcześniej, gdyby nie współpraca wielu ośrodków badawczych z całego świata. Dzięki tym badaniom oba te związki zostały włączone do badań rutynowych w laboratoriach antydopingowych. Jest to bardzo istotne ze względu na stosunkowo łatwy dostęp do tych związków, występują one m.in. w suplementach diety [25].

W suplementach diety - oprócz wspomnianych powyżej substancji zaliczanych przez WADA do grupy stymulantów, tak jak amfetamina - występują czasem substancje steroidowe mogące mieć wpływ na profil steroidowy[25]. Jedną z takich substancji pokazuje publikacja [H4] – zidentyfikowana została ona przez nas jako 3-beta-hydroksy-5-alfa-androst-1-en-17-on (1-Androsteron). W trakcie badań - prowadzonych za zgodą Komisji Etyki Badań Naukowych Instytutu Sportu - sprawdzaliśmy zmiany głównych metabolitów testosteronu. W celu identyfikacji wykonaliśmy analizy zarówno NMR, jak i GC-MS. Było to bardzo istotne,

gdyż posiadano znikome informacje dotyczące metabolizmu tej substancji. Próbki moczu od ochotnika przygotowywano zgodnie z ogólnie przyjętą procedurą dla środków anabolicznych dla układów GC-MS.

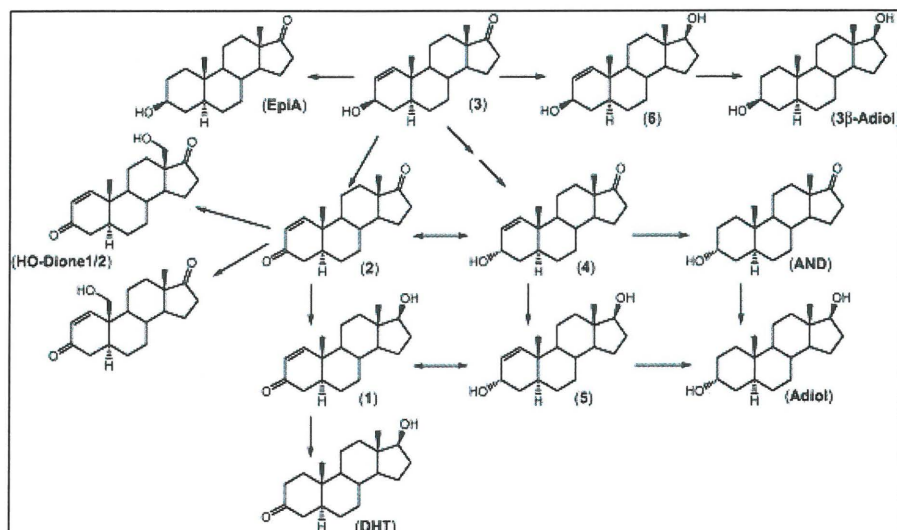
Zidentyfikowany związek występujący w suplementach diety można nazwać prohormonem, gdyż wywołuje zmiany w profilu steroidowym na początku cyklu metabolicznego dla testosteronu. Największe zmiany obserwowaliśmy w wartości współczynnika androsteronu do etiocholanolonu (A/Etio), 5 α -/5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (5 α A-diol/5 β A-diol) i stężeniu dihydrotestosteronu (DHT). Dodatkowo w zebranych próbkach moczu występowały piki zidentyfikowane jako metabolity 3- β -hydroksy-5- α -androst-1-en-17-on (ryc. 7).



Ryc. 7. Spektrum mas dla hydroksylowanych metabolitów w formie tris-TMS: ryc. górna:

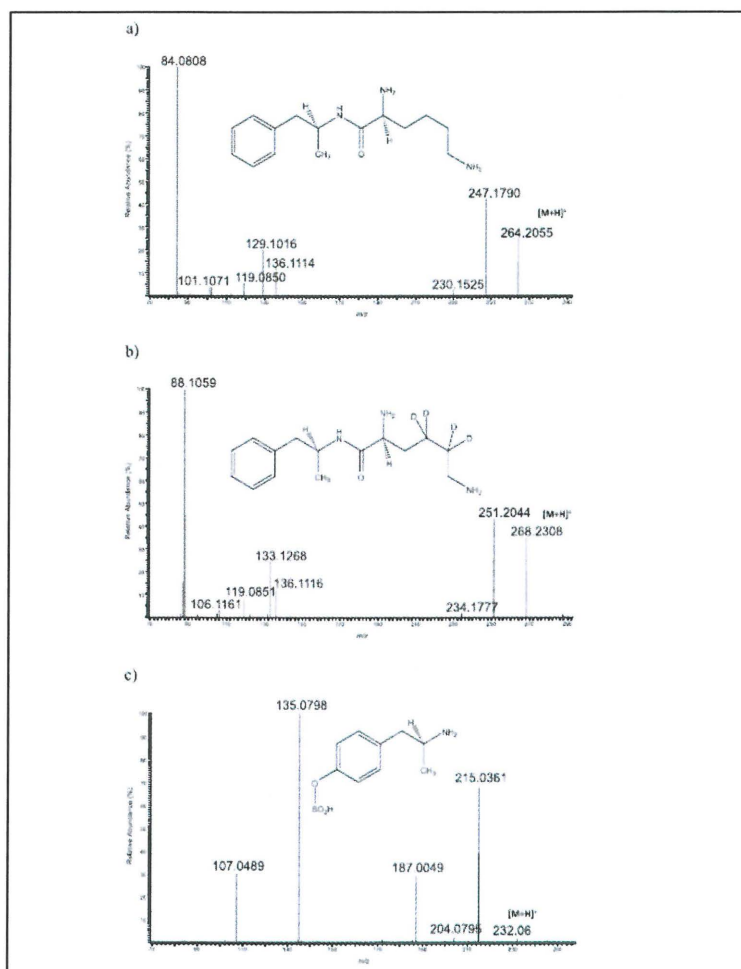
HO-Dione1 ($M^+ = 518$, $RRT = 1,14$), ryc. dolna HO-Dione2 ($M^+ = 518$, $RRT = 1,26$).

W wyniku przeprowadzonych badań zaproponowano drogę metabolizmu dla 3- β -hydroksy-5- α -androst-1-en-17-onu (ryc. 8).



Ryc. 8 Propozycja drogi metabolizmu dla 3-β-hydroksy-5-α-androst-1-en-17-on.

Innym wyzwaniem dla analityków są substancje stosowane w leczeniu określonych chorób lekami znajdującymi się na *Liście Zabronionej* [27-29]. Przykładem takiej choroby jest zespół nadpobudliwości psychoruchowej z zaburzeniami koncentracji uwagi [ADHD], dla której istnieją protokoły leczenia z wykorzystaniem amfetaminy oraz metylofenidatu i ostatnio lisdeksamfetaminy, nowej substancji psychoaktywnej tzw. proleku, czyli leku o przedłużonym działaniu. Podjęte przez nas badania prezentowane w pracy [H7] miały umożliwić odróżnianie przyjmowania lisdeksamfetaminy od amfetaminy. Założyliśmy, że metabolizm tej substancji będzie podobny do metabolizmu amfetaminy, czyli obok amfetaminy powstanie siarczan hydroksyamfetaminy. W badaniach nad tą substancją wykorzystywaliśmy układy GC-MS i LC-MS/MS. W celu lepszej identyfikacji posługiwaliśmy się komercyjnymi standardami i standardem zsyntetyzowanym specjalnie dla tego badania 2H₄-lisdeksamfetamine. Współpraca międzylaboratoryjna była tu konieczna m.in. ze względu na umocowania prawne i pozwolenia, jakimi dysponuje laboratorium z Niemiec (Institute of Biochemistry – Center for Preventive Doping Research, German Sport University Cologne) oraz laboratorium warszawskie, a dotyczącymi unormowań dla substancji zaliczanych do środków odurzających lub substancji psychotropowych albo prekursorów służących do produkowania tego rodzaju substancji. Dane identyfikacyjne pokazano na ryc. 9.



Ryc. 9. Spektre dla cząsteczek protonowanych $[M+H]^+$: (a) m/z 264 dla lisdeksamfetaminy, (b) m/z 268 dla 2H4-lisdeksamfetaminy i (c) m/z 232 dla 4-siarczanu hydroksyamfetaminy, energia kolizyjna 30 eV.

Uzyskane dane pokazały, że nie jest łatwo rozróżnić, jaka substancja została przyjęta przez daną osobę, gdyż sam związek wyjściowy jest eliminowany bardzo szybko i w bardzo małym stężeniu. Konieczne są więc dalsze badania i może inne rozwiązania technologiczne.

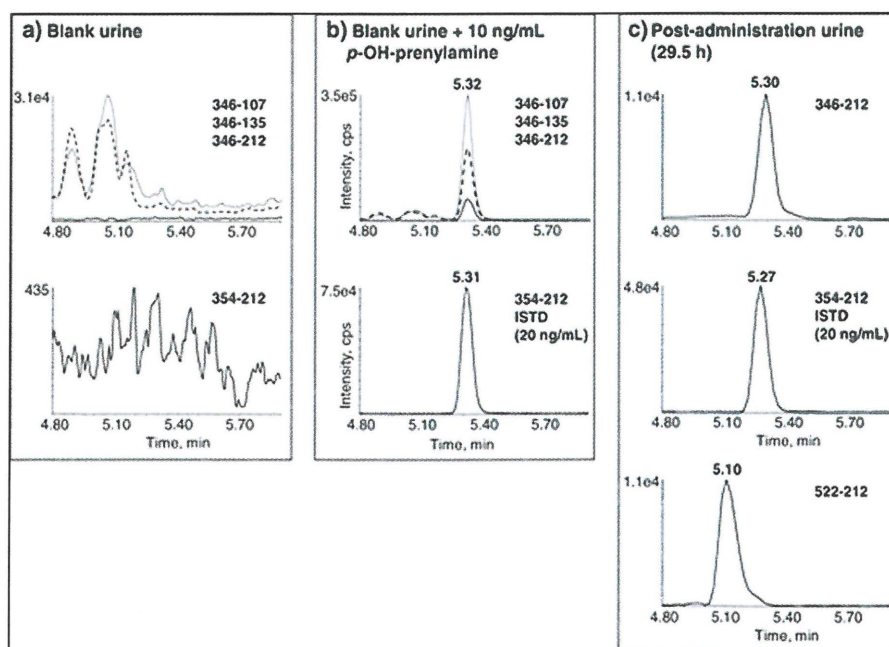
Jak przedstawiłam powyżej informacje dotyczące metabolizmu związków są bardzo istotne zarówno przy doborze sposobu przygotowania próbki, wyborze układu analitycznego, jak i interpretacji wyników. Praca [H2] pokazuje drogę poszukiwania najlepszej metody dla potwierdzenia stosowania benfluoreksu, stymulantu według WADA, w leczeniu stosowanego w celu zahamowania łaknienia. W pracy tej porównano, jakie możliwości dają układy GC-MS i LC-MS/MS w analizach przesiewowych i potwierdzających dla tego związku. Udowodniliśmy, że dla analiz przesiewowych układ GC-MS jest wystarczający, gdyż daje możliwość wykrycia dwóch metabolitów benfluoreksu: hydroksyetylonorfenfluramina (M1) i norfenfluramina (M3). Wykazaliśmy, że dla pełniejszego udowodnienia stosowania

benfluoreksu lepiej korzystać z układu LC-MS/MS, gdyż daje on możliwość wykrycia czterech metabolitów:

- hydroksyetylonorfenfluraminy (M1),
- karboksymetylnorfenfluraminy (M2),
- norfenfluraminy (M3) i
- metabolitu M1 połączonego z kwasem glukuronowym (M4).

Dodatkowo zastosowanie układu LC-MS/MS daje możliwość upewnienia się, że substancją przyjętą był benfluoreks, gdyż metabolity M1, M2 i M4 są charakterystyczne dla tego związku, podczas gdy metabolit M3 może pochodzić od innych substancji, np. fenfluraminy.

W pracy [H5] przedstawiłam metabolizm innej substancji - prenylaminy, substancji mającej zastosowanie w chorobie niedokrwiennej serca, a według klasyfikacji WADA należącej do grupy stymulantów. Metabolizm prenylaminy był badany od wielu lat [30-32], jednak dopiero dostęp do tak zaawansowanych technik, jakie obecnie posiadają laboratoria antydopingowe, pozwala na głębsze poznanie tego zagadnienia. Przy właściwej interpretacji wyników trzeba brać pod uwagę, że może występować duża różnorodność w wydalaniu metabolitów z uwagi na duże zmienności międzyosobnicze. Dlatego tak ważne jest poznawanie kolejnych metabolitów. W badaniach przedstawionych przez nasze zespoły w publikacji [H5] zastosowano układ LC-MS/MS. Badano obie fazy metabolizmu. Opracowano protokół, który może być wykorzystywany zarówno w badaniach antydopingowych, jak i toksykologicznych. Wybrano najbardziej charakterystyczne metabolity, takie jak: p-hydroksyprenylamina (M1) i glukuronid p-hydroksyprenylamina (M1-gluc.), które przedstawiono na ryc. 10.



Ryc. 10. Metoda dla analiz przesiewowych: (a) MRM dla p-hydroksyprenylaminy (M1) i standardu wewnętrznego (ISTD) d8-M1 w próbce moczu nie zawierającej badanych związków; (b) próbka moczu z dodanym M1 w stężeniu 10 ng/mL i ISTD w stężeniu 20 ng/mL; (c) MRM dla próbki moczu po przyjęciu leku (29,5 h po) z transmisją 522-212 dla metabolitu M1-glukuronid.

W pracy [H3] przedstawiliśmy metodę oznaczania tzw. małych peptydów, peptydów uwalniających hormon wzrostu (growth hormone releasing peptides – GHRP). Są to substancje, które po podaniu doustnym zwiększają produkcję endogennego hormonu wzrostu (GH). Badaniom poddano substancje takie, jak: GHRP-1, GHRP-2, GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, alexamorelin, ipamorelin i hexarelin.

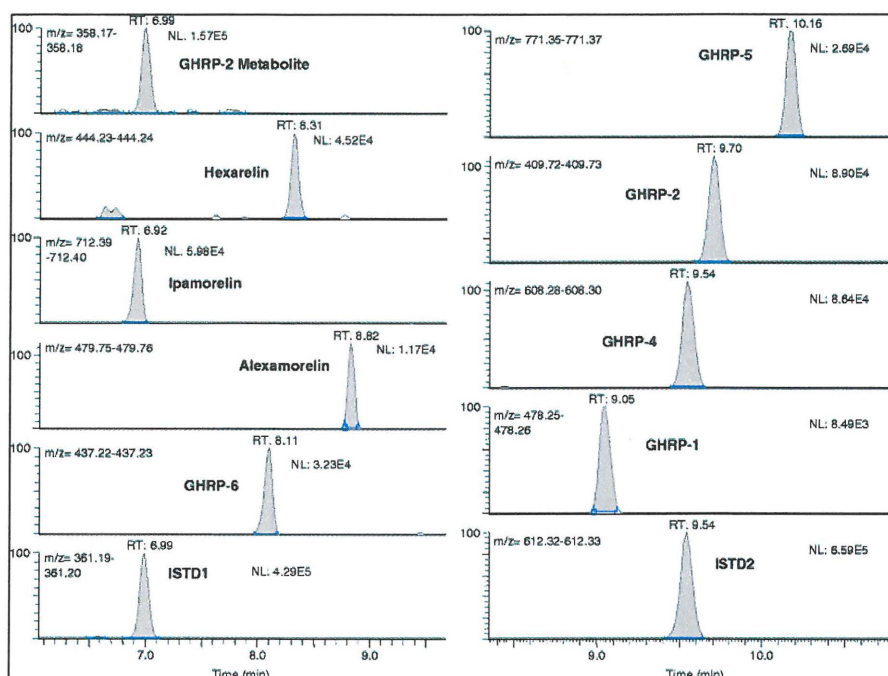
Tabela 1. Charakterystyka peptydów uwalniających hormon wzrostu: sekwencja aminokwasów, masy monoizotopowe, skład pierwiastkowy i dominujący stan naładowania

Nazwa	Sekwencja aminokwasów	Masy monoizotopowe [Da]	Skład pierwiastkowy	Dominujący stan naładowania ESI
1	2	3	4	5
GHRP-2	(d-Ala)-(d-β-Nal)-Ala-Trp-(d-Phe)-Lys-NH ₂	817.427	C ₄₅ H ₅₅ N ₉ O ₆	2+

1	2	3	4	5
GHRP-1	Ala-His-(<i>d</i> -β-Nal)- Ala-Trp-(<i>d</i> -Phe)- Lys-NH ₂	954.486	C ₅₁ H ₆₂ N ₁₂ O ₇	2+
GHRP-6	His-(<i>d</i> -Trp)-Ala- Trp-(<i>d</i> -Phe)- Lys- NH ₂	872.444	C ₄₆ H ₅₆ N ₁₂ O ₆	2+
GHRP-5	Tyr-(<i>d</i> -Trp)-Ala- Trp-(<i>d</i> -Phe)-NH ₂	770.354	C ₄₃ H ₄₆ N ₈ O ₆	1+
GHRP-4	(<i>d</i> -Trp)-Ala-Trp-(<i>d</i> - Phe)-NH ₂	607.29.2	C ₃₄ H ₃₇ N ₇ O ₄	1+
Alexamorelin	Ala-His-(<i>d</i> -Mrp)- Ala-Trp-(<i>d</i> -Phe)- Lys-NH ₂	957.497	C ₅₀ H ₆₃ O ₇ N ₁₃	2+
Hexarelin	His-(<i>d</i> -Mrp)-Ala- Trp-(<i>d</i> -Phe)-Lys- NH ₂	886.460	C ₄₇ H ₅₈ N ₁₂ O ₆	2+
Ipamorelin	Aib-His-(<i>d</i> -2-Nal)- (<i>d</i> -Phe)- Lys-NH ₂	711.385	C ₃₈ H ₄₉ N ₉ O ₅	1+/2+
GHRP-2 metabolite	(<i>d</i> -Ala)-(<i>d</i> -β-Nal)- Ala-NH ₂	357.168	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₄	1+
ISTD1	(<i>d</i> -d ₃ Ala)-(<i>d</i> -β- Nal)-Ala-NH ₂	360.187	C ₁₉ H ₂₀ ^[2] H ₃ N ₃ O ₄	1+
ISTD2	(<i>d</i> -Trp)-d ₄ Ala-Trp- (<i>d</i> -Phe)-NH ₂	611.315	C ₃₄ H ₃₃ ^[2] H ₄ N ₇ O ₄	1+

Nal - naphthylalanine, Mrp - 2-methyltryptophane, Aib - aminoisobutyric acid

Prowadzone badania miały, oprócz opracowania metody identyfikacji, sprawdzić metabolizm tych peptydów.



Ryc. 11. Wyselekcjonowane chromatogramy (0,01 Da) dla próbki moczu z dodanymi standardami (0,5 ng/mL) GHRP-1, GHRP-2, GHRP-2 - metabolit, GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, alexamorelin, ipamorelin, hexarelin, ISTD 1, ISTD 2.

W efekcie wykonanych badań udało się opracować metodę wykrywania 8 peptydów, w tym metabolitu dla GHRP-2 (ryc. 11). Nasza metoda dała podstawę do wprowadzenia procedury wykrywania GHRP w próbkach moczu w badaniach rutynowych. Jest ona w tej chwili dalej modyfikowana i rozwijana przez antydopingowe laboratoria na całym świecie [33,34].

4.4 Podsumowanie

Jak już wspomniałam wyżej z pracą w laboratorium antydopingowym jestem związana od ukończenia studiów na Politechnice Warszawskiej. Pierwsze moje prace były związane z wykorzystaniem układów GC-MS, GC-NPD oraz LC-DAD. Dalsze podejmowane przeze mnie badania były ściśle związane rozwojem technik i metod analitycznych, które wprowadzaliśmy do naszego laboratorium, oraz z interpretacją wyników badań czy to zajmując się identyfikacją związków, poszukiwaniem nowych metabolitów, czy też analizowaniem czynników mogących mieć wpływ na zmiany biologicznych markerów.

Obecnie w laboratorium przeze mnie kierowanym wykonywane są badania naukowe, dzięki którym mamy nadzieję skuteczniej walczyć z dopingiem oraz mieć swój wkład w badania toksykologiczne. Rozwój metod i poszerzanie zakresu badań jest stałym elementem mojej pracy w laboratorium.

Od roku 2014 współpracuję z ośrodkami naukowymi z Holandii (RIKILT, Wageningen) i Niemiec (Freie Universität, Berlin), pod kątem zbadania, czy istnieje możliwość rozróżnienia drogi podania klenbuterolu do organizmu człowieka. Jest to istotne z uwagi na pojawiające się problemy związane z zanieczyszczeniem mięsa właśnie tym środkiem i późniejszymi problemami dla zawodników, którzy spożyją takie skażone mięso.

Badania te były realizowane w ramach grantu WADA. Prowadzono je w aspekcie znalezienia sposobu rozróżnienia, czy klenbuterol został podany w formie preparatu farmaceutycznego, czy poprzez spożycie skażonego mięsa. Oprócz przyjrzenia się samej cząsteczce klenbuterolu (jego izomerom) dodatkowo podjęto próby identyfikacji potencjalnych markerów występujących w moczu, które pozwoliłyby jednoznacznie określić, czy klenbuterol został przyjęty w formie leku, czy skażonego mięsa. W drugiej części projektu podjęto próbę stworzenia modelu decyzyjnego, który mógłby zostać zastosowany do określenia pochodzenia klenbuterolu w przypadku wykrycia obecności leku podczas analizy antydopingowej.

Na podstawie zebranych przez nasze ośrodki wyników badań można stwierdzić, że istnieje możliwość odróżnienia drogi podania substancji, jaką jest klenbuterol. Zaproponowaliśmy modele interpretacji wyników antydopingowych, które zostaną przedstawione WADA. Jeśli WADA je zaakceptuje, to przedstawione modele zostaną wprowadzone we wszystkich laboratoriach antydopingowych. Zaproponowany model zostanie wprowadzony do pracy rutynowej w laboratorium przeze mnie kierowanym.

Kolejnym krokiem w badaniach nad skażonym mięsem będzie sięgnięcie do innych produktów zwierzęcych. Wspólnie z partnerami z Berlina i ośrodkiem w Dreźnie (Uniwersytet Drezdeński) złożyłam do WADA wniosek grantowy na takie badanie. Jest on obecnie w trakcie rozpatrywania.

Inne prace badawcze prowadzone w tej chwili w laboratorium związane są z zanieczyszczeniami odżywek i suplementów diety. Tak jak pokazałam wyżej oraz w publikacjach wykazanych w Załączniku III, problem ten jest wciąż aktualny i trzeba go stale monitorować. Właśnie w związku z tym prowadzony jest projekt badawczy wspólnie z ośrodkiem naukowym z Francji (Groupe de RMN Biomédicale Laboratoire SPCMIB (UMR CNRS 5068) Université Paul Sabatier, Toulouse).

Budzącym zainteresowania problemem rozwijanym w naszym ośrodku są badania związane z kłomifenem. Jest to związek, z którym spotykamy się - ku zaskoczeniu nas wszystkich - bardzo często w stosunku do reszty świata. Dlatego w celu uzyskania materiałów referencyjnych i próbek moczu po badaniach wydzielniczych nawiązaliśmy współpracę z ośrodkiem naukowym z Niemiec (Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology and University Tuebingen). Projekt obejmuje badania metabolizmu kłomifenu

i opracowanie metody analitycznej pozwalającej na wykrycie jego stosowania przez znacznie dłuższy czas niż metody obecnie wykorzystywane.

Kolejnym zagadnieniem, które pozostaje w kręgu naszych zainteresowań jest badanie wpływu podawania doustnego peptydu uwalniającego hormon wzrostu (GH) Hexarelin na stężenie hormonów efektorowych hGH - IGF1 i PIIINP w surowicy i współczynnika GH-2000 oraz określenie profilu wydalania Hexarelin w moczu po podaniu doustnym. Jest to kontynuacja badań przedstawionych m.in. w publikacji [H3], dzięki nim chcemy określić efektywności działania Hexareliny jako środka stymulującego uwalnianie GH oraz określić, w jakim stopniu test antydopingowy stosowany do wykrywania zastosowania Somatotropiny oparty na pomiarze biomarkerów IGF-1 i PIIINP będzie skuteczny w wykrywaniu zastosowania Hexarelin. Dodatkowo planujemy określenie profilu wydalania Hexarelin w moczu po podaniu doustnym.

Innymi badaniami, które są prowadzone w laboratorium, to próby rozróżnienia substancji z grupy katynonów i kanabinomimetyków. Obie te grupy pozostają w obszarze zainteresowań zarówno świata antydopingowego, jak i rządów walczących ze środkami zastępczymi, tzw. dopalaczami. Badania te są prowadzone przez nasz zespół od kilku lat, a z wyników tych badań w ostatnim czasie coraz częściej korzysta m.in. prokuratura w celu identyfikacji danych substancji.

Mój obecny dorobek naukowy obejmuje:

- 25 publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JRC);
- 28 publikacji w innych recenzowanych czasopismach zagranicznych lub czasopismach o zasięgu co najmniej krajowym;
- 37 rozdziałów w monografii lub podręczniku akademickim;
- 50 streszczeń i komunikatów zjazdowych;
- 1 opracowanie danych do strony internetowej i materiałów edukacyjnych w ramach projektu europejskiego;
- udział w 12 projektach badawczych;
- udział w 7 tematach naukowych realizowanych w Instytucie Sportu;
- 97 referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych.

Informacja o obecnych osiągnięciach naukowych została zaprezentowana w poniższym zestawieniu (przygotowane na podstawie baz danych: Web of Science Core Collection, Journal Citation Reports i listy czasopism MNiSW) stan na 03.06.2016.

Całkowita ilość publikacji	53
Publikacje w czasopismach z bazy JRC	25
Pozostałe publikacje	28
Rozdziały w książkach i monografiach	37
Całkowita wartość współczynnika oddziaływania (IF)	44,732
Wartość 5-letniego współczynnika oddziaływania (IF5)	49,99
Liczba punktów MNiSW	600
Średnia wartość współczynnika oddziaływania (czasopisma w JCR)	1,789
Średnia wartość 5-letniego współczynnika oddziaływania (czasopisma w JCR)	2,00
Średnia wartość punktów MNiSW (wszystkie publikacje)	11,11

Zestawienie danych bibliometrycznych (ilość publikacji, liczba cytowani, indeks Hirscha) w różnych bazach naukowych, tj. Web of Science Core Collection, Scopus, Google Scholar. (stan na 03.06.2016)

Wyszczególnienie	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Indeks Hirscha (h-index)	5	6	7
Liczba publikacji	23	24	52
Liczba cytowań	109	116	163
Średnia ilość cytowań	4,74	4,83	3,13

Bibliografia

- [H1] Gronowska A. , Kwiatkowska D. , Pokrywka A. , Koterak M. , Turek-Lepa E. , Szutowski M.: The alteration of the urinary steroid profile under the stress. *Biology of Sport*, 2010, 27: 3-9.
- [H2] Thevis M., Sigmund G., Gougoulidis V., Beuck S., Schlörer N., Thomas A., Kwiatkowska D., Pokrywka A., Schänzer W.: Screening for benfluorex and its major urinary metabolites in routine doping controls. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401, 543-551.
- [H3] Thomas A., Höppner S., Geyer H., Schänzer W., Petrou M., Kwiatkowska D., Pokrywka A., Thevis M.: Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401, 507-516.
- [H4] Parr M.K., Opfermann G., Geyer H., Westphal F., Sönnichsen F.D., Zapp J., Kwiatkowska D., Schänzer W.: Seized Designer Supplement named "1-Androsterone": Identification as 3 β -Hydroxy-5 α -androst-1-en-17-one and its Urinary Elimination. *Steroids*, 2011 May, 76(6):540-7.

- [H5] Beuck S., Sigmund G., Koch A., Schänzer W., Pokrywka A., Kwiatkowska D., Thevis M.: Identification and characterization of urinary prenylamine metabolites by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 2012, 4, 701-716.
- [H6] Chołbiński P., Wicka M., Kowalczyk K., Jarek A., Kaliszewski P., Pokrywka A., Bulska E., Kwiatkowska D.: Detection of β -methylphenethylamine, a novel doping substance, by means of UPLC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406: 3681-3688.
- [H7] Thevis M., Sigmund G., Thomas A., Vogel M., Walpurgis K., Kwiatkowska D., Geyer H., Schänzer W.: Isotope-dilution mass spectrometric quantification of the prodrug lisdexamfetamine in human urine in doping control analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, 28: 781-786.
- [H8] Bulska E., Gorczyca D., Zalewska I., Pokrywka A., Kwiatkowska D.: Analytical approach for the determination of steroid profile of humans by gas chromatography isotope ratio mass spectrometry aimed at distinguishing between endogenous and exogenous steroids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015 Mar 15, 106: 159-66.
- [H9] Jarek A., Kowalczyk K., Chołbiński P., Chajewska K., Turek-Lepa E., Pokrywka A., Bulska E., Kwiatkowska D.: Analytical procedure for steroid profiling valid for Athlete Biological Passport. *Chemical Papers* 2015, 69: 254-261.
- [H10] Kwiatkowska D., Wójtowicz M., Jarek A., Goebel C., Chajewska K., Turek-Lepa E., Pokrywka A., Kazlauskas R.: N,N-dimethyl-2-phenylpropan-1-amine – new designer agent found in athlete urine and nutritional supplement. *Drug Testing and Analysis* 2015 Apr, 7(4): 331-5.
1. Rynkowski M. red.: Antydoping w Polsce. Komisja do Zwalczania Dopingu w Sporcie. Warszawa 2014.
 2. Kodeks Antydopingowy. 2015 World Antidoping Code. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-world-anti-doping-code.pdf> [01.05.2016].
 3. Pokrywka A., Gorczyca D., Jarek A., Kwiatkowska D.: In memory of Alfonsi Bukowski on the centenary of anti-doping research. *Drug Testing and Analysis*. 2010, 2: 538-541.
 4. WADA. Laboratories. Dostępne na: <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories> [01.05.2016].
 5. WADA. Prohibited List 2016. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2016-prohibited-list-en.pdf> [01.05.2016].
 6. FEI. Prohibited List 2016. Dostępne na: <http://www.fei.org/fei/cleansport/ad-h/prohibited-list> [01.05.2016].
 7. WADA. Technical Document TD2015BAR Blood Analytical Requirements for the Athlete Biological Passport Ver. 1.0 January 2015. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_abp_operating_guidelines_2014_v5_o_en.pdf [01.05.2016].
 8. WADA Technical Document TD2014DL Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold Substances Ver. 1.0 September 2014. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014DL-v1-Decision-Limits-for-the-Quantification-of-Threshold-Substances-EN.pdf> [01.05.2016].
 9. WADA Technical Document TD2016IRMS Detection of synthetic forms of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids by GC-C-IRMS Ver. 1.0 January 2016. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-td2016irms-detection_synthetic_forms_eaas_by_irms-en.pdf [01.05.2016].
 10. WADA Technical Document – TD2016EAAS Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting Ver. 1.0 January 2016. Dostępne na:

- <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-td2016eas-eas-measurement-and-reporting-en.pdf> [01.05.2016].
11. WADA Technical Document TD2015NA Harmonization of Analysis and Reporting of 19-Norsteroids Related to Nandrolone Ver. 1.0 September 2015. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_td2015na_harmonization_analysis_reporting_19-norsteroids_en.pdf [01.05.2016].
 12. WADA Technical Document TD2014EPO Harmonization of Analysis and Reporting of Erythropoiesis Stimulating Agents (ESAs) by Electrophoretic Techniques. Ver. 1.0 September 2014. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014EPO-v1-Harmonization-of-Analysis-and-Reporting-of-ESAs-by-Electrophoretic-Techniques-EN.pdf> [01.05.2016].
 13. WADA Technical Document TD2015GH Human Growth Hormone (hGH) isoform differential immunoassays for doping control analyses Ver. 1.0 September 2015. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_td2015gh_hgh_isoform_diff_immunoassays_en.pdf [01.05.2016].
 14. WADA Technical Document TD2015IDCR Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes Ver. 1.0 September 2015. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_td2015idcr_minimum_criteria_chromato-mass_spectro_conf_en.pdf [01.05.2016].
 15. WADA Technical Document – TD2015MRPL Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances Ver. 1.0 September 2015. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada_td2015mrpl_minimum_required_perf_levels_en.pdf [01.05.2016].
 16. World Anti-Doping Program: Guidelines for Reporting & Management of Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) and Luteinizing Hormone (LH) Findings in male athletes. Ver. 2.0 July 2015. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-guidelines-hcg-lh-findings-v2.0-2015-en.pdf> [01.05.2016].
 17. World Anti-Doping Program: Guidelines - Human Growth Hormone (hGH) Biomarkers Test. Ver. 1.0 July 2015. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-guidelines-for-hgh-biomarkers-test-v2.0-2016-en.pdf> [01.05.2016].
 18. WADA. Prohibited List 2004. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Prohibited_List_2004_EN.pdf [01.05.2016].
 19. Kwiatkowska D., Pokrywka A.: Lista zakazanych substancji i metod (Lista zabroniona). Zapobieganie i zwalczanie dopingu w sporcie. Towarzystwo Lekarskie Warszawskie, Warszawa 2006, 25-42.
 20. Międzynarodowy Standard dla Laboratoriów (International Standard for Laboratories) Ver. 8.0 January 2015. Dostępne na: <https://www.wada-ama.org/en/resources/laboratories/international-standard-for-laboratories-isl> [01.05.2016].
 21. The World Anti-Doping Code: Athlete Biological Passport Operating Guidelines and Compilation of Required Elements Ver. 5.0 October 2014. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-abp-operating-guidelines-v5.0-en.pdf> [01.05.2016].
 22. Cohen P. A., Travis J. C., Venhuis B. J.: Amethamphetamine analog (N,α-diethylphenylethylamine) identified in a mainstream dietary supplement. Drug Testing and Analysis, 2013. DOI: 10.1002/dta.1578.
 23. Uralets V., App M., Rana S., Morgan S., Ross W.: Designer phenethylamines routinely found in human urine: 2-ethylamino-1-phenylbutane and 2-amino-1-phenylbutane. Journal of Analytical Toxicology, 2014, 38, 106.
 24. Cohen P. A., Bloszies C., Yee C., Gerona R.: An amphetamine isomer whose efficacy and safety in humans has never been studied, β-methylphenylethylamine (BMPEA), is

- found in multiple dietary supplements. *Drug Testing and Analysis* 2015. DOI 10.1002/dta.1793.
25. Pawar R. S., Grundel E., Fardin-Kia A. R., Rader J. I.: Determination of selected biogenic amines in *Acacia rigidula* plant materials and dietary supplements using LC-MS/MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 88, 457.
 26. Parr M.K., Pokrywka A., Kwiatkowska D., Schänzer W.: Ingestion of designer supplements produced positive doping cases unexpected by the athletes. *Biology of Sport*, 2011, 28, 153-157.
 27. The World Anti-Doping Code: Guideline for TUE enquiries by accredited laboratories Ver. 1.0 2009. Dostępne na: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Guideline_TUE_Enquiries_2009_EN.pdf [01.05.2016]
 28. The World Anti-Doping Code: Medical Information to Support the Decisions of TUE (Therapeutic Use Exemptions) Committees - also called TUE Physician Guidelines - on Asthma. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-medical-info-asthma-5.1-en.pdf> [01.05.2016]
 29. The World Anti-Doping Code: Medical Information to Support the Decisions of TUE (Therapeutic Use Exemptions) Committees - also called TUE Physician Guidelines - on Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Children and Adults. Dostępne na: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-MI-ADHD-5.0.pdf> [01.05.2016]
 30. Beckett A.H., Shenoy E.V., Brookes L.G.: Determination of N-(2-benzoyloxyethyl)-norfenfluramine (JP 992) and its metabolites in urine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1971, 23:950
 31. Beckett A.H., Shenoy E.V., Brookes L.G.: The absorption, metabolism and elimination of (plus minus)-N-(2-benzoyloxyethyl) norfenfluramine (JP992) in man. *J Pharm Pharmacol*, 1972, 24:281
 32. Orsiere T., Chauvet M., Dell'Amico M., Lafont H., Bourdeaux M.: In vitro influence of benfluorex and its main metabolites on rat liver microsomal membrane properties. *Chemico-Biological Interactions*, 1995, 97:297
 33. Semenistaya E., Zvereva I., Thomas A., Thevis M., Krotov G., Rodchenkov G.: Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin. *Drug Testing and Analysis*, 2015 Oct,7(10):919-25. doi: 10.1002/dta.1787. Epub 2015 Apr 13.
 34. Holt R.I., Böhning W., Guha N., Bartlett C., Cowan D.A., Giraud S., Bassett E.E., Sönksen P.H., Böhning D.: The development of decision limits for the GH-2000 detection methodology using additional insulin-like growth factor-I and amino-terminal pro-peptide of type III collagen assays. *Drug Testing and Analysis*, 2015 Sep,7(9):745-55. doi: 10.1002/dta.1772. Epub 2015 Jan 21.

