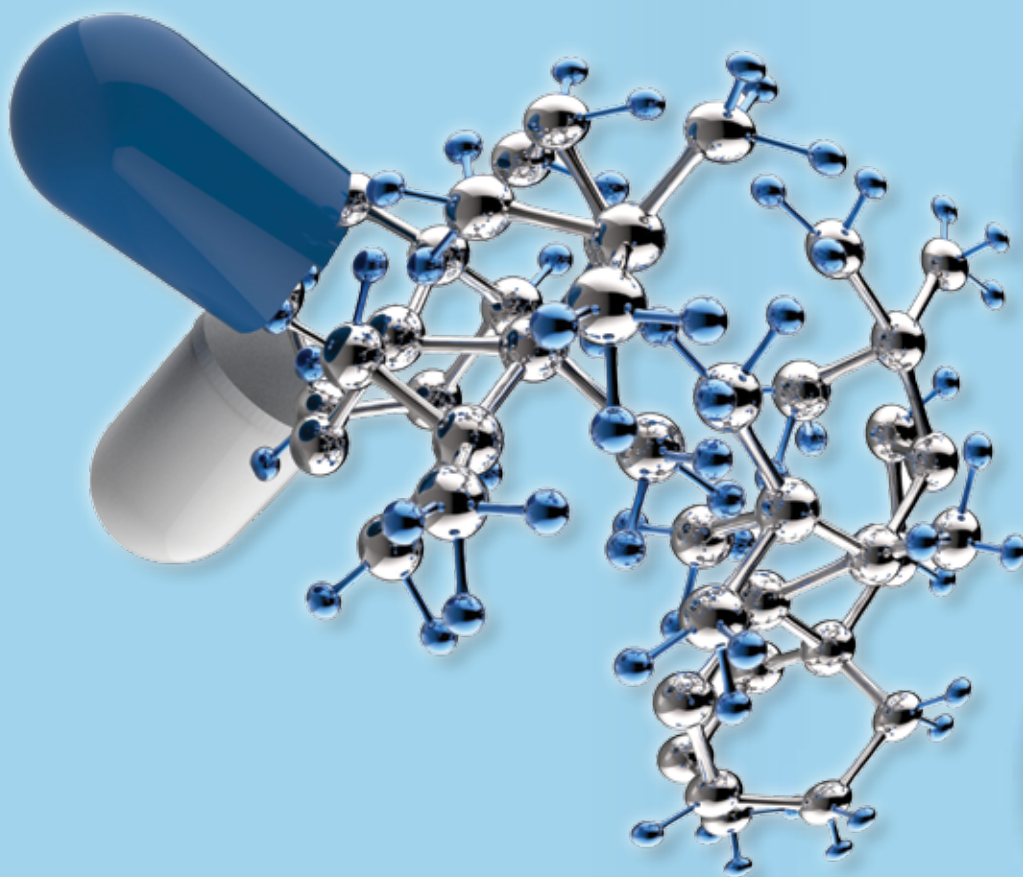


ISSN 1105-4999



ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS



ΤΟΜΟΣ 32 • ΤΕΥΧΟΣ III
VOLUME ISSUE

ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2020
JULY - SEPTEMBER



ZiTA MEDICAL MANAGEMENT

*Έχουμε τη τεχνογνωσία και την εξειδίκευση στον χώρο της Υγείας...
Το αξιοποιούμε για να κάνουμε τους στόχους σας πραγματικότητα!*

Η ZITA Medical Management είναι εταιρεία που ανήκει στην **ZITA Group** και δραστηριοποιείται στο χώρο της παροχής εξειδικευμένων υπηρεσιών management και marketing, σε επιστημονικές εταιρείες, ομίλους και επαγγελματίες, κυρίως από τον χώρο της υγείας. Ηλεκτρονική επικοινωνία, digital marketing, έντυπες και ηλεκτρονικές εκδόσεις και χορηγίες, είναι μερικές από τις βασικές υπηρεσίες, που τα έμπειρα στελέχη μας και η εμπειρία των 36 χρόνων εγγυώνται την **αποτελεσματικότητα στην ελληνική και διεθνή αγορά.**

- Σχεδιασμός, ανάπτυξη, διαχείριση ιστοσελίδων
- Αναβάθμιση & Hosting του ήδη υπάρχοντος Website
- Δημιουργία η αναβάθμιση των ήδη υπαρχόντων Social Media
- Έντυπες & Ηλεκτρονικές Εκδόσεις
- Ειδικά τροποποιημένο λογισμικό για τη δημιουργία επιστημονικού ηλεκτρονικού περιοδικού
- Καθορισμός στρατηγικής Online Προώθησης (Digital Strategy)
- Προσδιορισμός στόχου (targeting)
- Διαχείριση λογαριασμών και δράσεων προβολής



Επικοινωνήστε μαζί μας για ένα ενημερωτικό ραντεβού... θα σας κοστίσει τίποτα

www.zita-group.com/zita-medical-management/

Γεράσιμος Κουλουμπής

Ομήρου 29, Πέτα Σαρωνικού, 190 01, Τηλ: +30 22994 40962,

E-mail: g.kouloumpis@zita-management.com

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΟΣ 32, ΤΕΥΧΟΣ ΙΙΙ,
ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2020

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

A. Τσαντίλη

Ομοτ. Καθηγήτρια, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)
tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ

Γ.Α. Καρίκας

Ομότιμος καθηγητής, Πανεπιστήμιο
Δυτικής Αττικής, karikasg@uniwa.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος

Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Β. Δημόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

N. Κόλμαν

Galenica SA

X. Κοντογιώργης,

Επ. Καθηγητής, Δ.Π.Θ.

Π. Κουρουνάκης

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

Π. Μαχαίρας

Ομοτ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Σ. Νικολαρόπουλος

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή

Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS
VOLUME 32, ISSUE III,
JULY - SEPTEMBER 2020

EDITOR

A. Tsantili

Emeritus Professor, National and Kapodistrian
University of Athens (NKUA)
tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR

G.A. Karikas

Emeritus professor, University of West Attica,
Greece, karikasg@uniwa.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos

Professor, NKUA

V.J. Demopoulos

Professor, University of Thessaloniki, AUTH

N. Kolman

Galenica SA

Ch. Kontogiorgis

Assistant Professor, D.U.Th.

P. Kourounakis

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki, AUTH

P. Macheras

Emeritus Professor, NKUA

S. Nikolaropoulos

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas

Associate Professor, University of Patras

I. Panderi

Professor, NKUA

D. Rekkas

Associate Professor, NKUA

Οδηγίες προς συγγραφείς/Authors guidelines: <https://www.hsmc.gr/author-guidelines/>

E-mail για υποβολή εργασιών:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς
επισκεφτείτε την διεύθυνση: www.hsmc.gr

E-mail for manuscript submission:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition
and instructions to authors
please visit www.hsmc.gr

Τα άρθρα που δημοσιεύονται
στην «Φαρμακευτική» καταχωρούνται
στα Chemicals Abstracts, EMBASE,
SCOPUS και EBSCO

Articles published in "Pharmakeftiki"
are indexed in Chemical Abstracts,
EMBASE, SCOPUS and EBSCO

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

Σύγχρονες μέθοδοι άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης ντόπινγκ αίματος

Παναγιώτης Σακελλαρίου, Ιωάννης Σ. Αγγελής **111-132**

Preparation and evaluation of magnetite nanoparticles and novel magnetic dosage form for topical application

Vedernykova Iryna, Levitin Yevgen, Klimenko Lina, Karabut Larysa **133-140**

Youden's test of the chromatographic determination of bisoprolol in dosage forms

Liliya Logoyda, Larysa Kravchuk, Andriy Sverstiuk, Sofiia Maslii, Lyudmyla Vons, Yuriy Soroka, Roman Ciciura, Olha Poliak, Nadiya Zarivna **141-147**

Influence of Nelumbo Nucifera Extracts on Exploratory and Despair Behavior of Rats

Natalya A. Lomteva, Elena I. Kondratenko, Saule K. Kasimova, Marina V. Mazhitova, Ludmila A. Yakovenkova **148-156**

Εκδηλώσεις **157**

Current methods of direct and indirect blood doping detection

Panagiotis Sakellariou, Yiannis S. Angelisa **111-132**

Preparation and evaluation of magnetite nanoparticles and novel magnetic dosage form for topical application

Vedernykova Iryna, Levitin Yevgen, Klimenko Lina, Karabut Larysa **133-140**

Youden's test of the chromatographic determination of bisoprolol in dosage forms

Liliya Logoyda, Larysa Kravchuk, Andriy Sverstiuk, Sofiia Maslii, Lyudmyla Vons, Yuriy Soroka, Roman Ciciura, Olha Poliak, Nadiya Zarivna **141-147**

Influence of Nelumbo Nucifera Extracts on Exploratory and Despair Behavior of Rats

Natalya A. Lomteva, Elena I. Kondratenko, Saule K. Kasimova, Marina V. Mazhitova, Ludmila A. Yakovenkova **148-156**

Meetings **157**

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑΣ
& ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY JOINT EDITION OF
THE HELLENIC SOCIETY OF
MEDICINAL CHEMISTRY &
THE HELLENIC PHARMACEUTICAL SOCIETY



ZITA MEDICAL MANAGEMENT, Ομήρου 29Α, Πέτα Σαρωνικού, Ελλάδα
Τηλ.: + 30 22994 40962, Fax: 22990 66029, E-mail: g.kouloumpis@zitamanagement.com



Σύγχρονες μέθοδοι άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης ντόπινγκ αίματος

Παναγιώτης Σακελλαρίου^{αβ}, Ιωάννης Σ. Αγγελής^α

^αΕργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ Αθήνας, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών "Δημόκριτος", Νερατζιωτίσσης και Αμαρυσίας Αρτέμιδος, 15123 Μαρούσι, Ελλάδα
^βΤμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, 15784 Αθήνα, Ελλάδα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:
Ντόπινγκ αίματος,
ερυθροποιητίνη,
μετάγγιση αίματος,
βιοδείκτες

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρά την απαγόρευση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόπινγκ, το ντόπινγκ αίματος, κυρίως με τη χρήση παραγόντων διέγερσης της ερυθροποίησης και τη μετάγγιση αίματος, χρησιμοποιείται από αθλητές που θέλουν να αποκτήσουν αθέμιτο πλεονέκτημα, αυξάνοντας την αερόβια ικανότητά τους, μέσω αύξησης της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων. Μέθοδοι άμεσης ανίχνευσης, που βασίζονται σε τεχνικές ηλεκτροφόρησης, ανοσοπροσδιορισμού και χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών, μπορούν να ανιχνεύσουν ανασυνδυασμένες ερυθροποιητίνες και άλλους παράγοντες διέγερσης της ερυθροποίησης, ενώ η ομόλογη μετάγγιση αίματος μπορεί να ανιχνευτεί με κυτταρομετρία ροής. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμη μέθοδος άμεσης ανίχνευσης της αυτόλογης μετάγγισης αίματος. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δυσκολία εντοπισμού νέων συνεχώς αναδυόμενων απαγορευμένων ουσιών, καθώς και τη χρήση πολλών διαφορετικών ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών σε μικροδόσεις, οδήγησε την επιστήμη του αντι-ντόπινγκ στην ανάπτυξη μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης. Η έμμεση ανίχνευση του ντόπινγκ αίματος βασίζεται στη μεγαλύτερη διάρκεια που έχει η επίδραση της χρήσης μιας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου στον οργανισμό, σε σχέση με το χρόνο παραμονής της ή έκθεσής του σε αυτήν. Το Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή, ως στρατηγική για την έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ αίματος μέσω της διαχρονικής παρακολούθησης των επιπέδων των αιματολογικών παραμέτρων 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. Η έρευνα στρέφεται στη χρήση νέων έμμεσων βιοδεικτών ντόπινγκ αίματος, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το προφίλ σιδήρου, που παρακολουθεί τα επίπεδα των πρωτεϊνών της ομοιόστασης σιδήρου, και τον έλεγχο μεταβολών σε κυτταρικό, μοριακό ή γενετικό επίπεδο, που οφείλονται σε ντόπινγκ αίματος. Ο συνδυασμός του Βιολογικού Διαβατηρίου Αθλητή με άλλους έμμεσους βιοδείκτες εκτιμάται ότι θα ενισχύσει την αποτελεσματικότητα των ελέγχων ντόπινγκ αίματος.

* ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:

Παναγιώτης Σακελλαρίου
panagiotissakellariou90
@gmail.com

Ιωάννης Σ. Αγγελής
i.angelis@bio.demokritos.gr
Οι συγγραφείς συνεισέφεραν
ισοδύναμα στην συγγραφή
του άρθρου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανάμεσα στα μεγάλα και σοβαρά προβλήματα που έχει να αντιμετωπίσει ο σύγχρονος αθλητισμός, το φαινόμενο του ντόπινγκ κατέχει κεντρική θέση. Το ντόπινγκ συνίσταται κυρίως στην προσπάθεια απόκτησης άδικου πλεονεκτήματος, έναντι των υπόλοιπων συναγωνιζόμενων αθλητών, με χρήση φαρμακευτικών ουσιών και απαγορευμένων μεθόδων. Αρκετοί αθλητές υποκύπτουν στον πειρασμό της χρήσης τέτοιων πρακτικών με στόχο την νίκη και τελικά την απόκτηση υλικών απολαβών και φήμης, με αποτέλεσμα τη στρέβλωση του ευ αγωνιζέσθαι, την αλλοίωση αποτελεσμάτων και την απαξίωση του αθλητικού ιδεώδους. Η ταύτιση του αθλητισμού και ειδικά του πρωταθλητισμού με το ντόπινγκ στην συνείδηση του κόσμου και κυρίως των νέων παιδιών αποτελεί καταστροφική συνέπεια και αληθινή βόμβα στα θεμέλια του αθλητισμού. Με την ανάπτυξη νέων ευαίσθητων και αποτελεσματικών μεθόδων ελέγχου του ντόπινγκ, που βασίζονται σε καινοτόμες αναλυτικές τεχνολογίες, η πρακτική αυτών που θέλουν να ξεγελάσουν το σύστημα κατευθύνεται σε νέες ευφάνταστες μεθόδους απόκτησης αθέμιτου πλεονεκτήματος. Το ντόπινγκ αίματος είναι μια τέτοια μάστιγα, παρά τις σοβαρές επιπτώσεις που μπορεί να έχει στην υγεία.¹

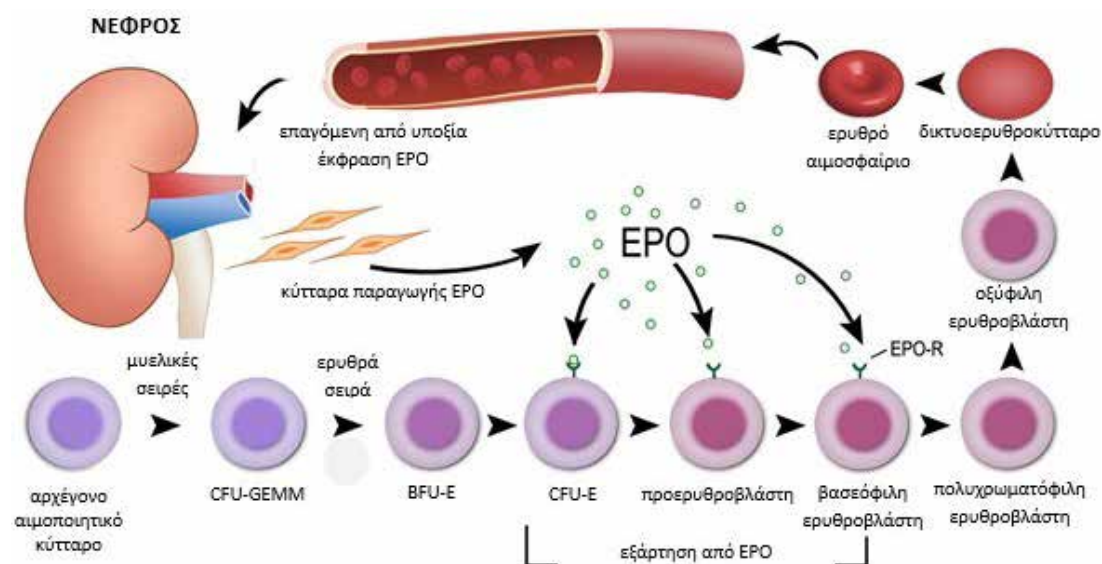
Η αύξηση της ποσότητας της αιμοσφαιρίνης στο αίμα είναι ο μόνος τρόπος για να ενισχυθεί η αερόβια ικανότητα ενός αθλητή. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσω της αιμοσφαιρίνης μεταφέρουν το οξυγόνο από τους πνεύμονες στους μύες, επομένως η υψηλότερη συγκέντρωσή τους στο αίμα αυξάνει τη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου και βελτιώνει την αερόβια ικανότητα.² Ήδη από τους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικού το 1968, παρατηρήθηκε ότι οι αθλητές από περιοχές με μεγαλύτερο υψόμετρο κέρδισαν τους περισσότερους αγώνες αντοχής. Οι αθλητές προσπαθούν να ενισχύσουν την αερόβια ικανότητά τους, είτε με φυσικό τρόπο υποξίας που προκαλείται από παρατεταμένη προπόνηση σε υψόμετρο, είτε χρησιμοποιώντας αθέμιτους τρόπους.³

Το 1972 μια σειρά πειραμάτων, στα οποία υγιή

άτομα υποβλήθηκαν σε αφαίρεση και επανέγχυση του αίματός τους, πριν από την ελεγχόμενη άσκηση, απέδειξαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης λόγω της μετάγγισης βελτιστοποιεί τη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου και συνεπώς την αερόβια ικανότητα.⁴ Έτσι, η μετάγγιση αίματος αποτέλεσε μια τακτική αθέμιτης ενίσχυσης της αθλητικής απόδοσης. Για τον λόγο αυτό, το ντόπινγκ με μετάγγιση αίματος απαγορεύτηκε στον αθλητισμό από την Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ) το 1986.⁵ Ένα χρόνο νωρίτερα, το 1985, έγινε εφικτή η κλωνοποίηση του γονιδίου της ερυθροποιητίνης (erythropoietin, EPO), όποτε σύντομα συντέθηκε και η πρώτη ανθρώπινη ανασυνδυασμένη ερυθροποιητίνη (Recombinant Human Erythropoietin, rHuEPO). Οι rHuEPOs χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η αναιμία, επειδή επάγουν τη διαδικασία της ερυθροποίησης για την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, αποτελώντας στόχο των αθλητών, που τις χρησιμοποιούν για να αυξήσουν την αερόβια ικανότητά τους. Το 1990 η ΔΟΕ απαγόρευσε και τη χρήση rHuEPOs, παρότι δεν ήταν ακόμη διαθέσιμες μέθοδοι για την ανίχνευσή τους.⁶

Η ίδρυση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) το 1999 συνέβαλε στην οργάνωση ενός βέλτιστου προγράμματος για την καταπολέμηση του ντόπινγκ και την εναρμόνιση της λειτουργίας των εργαστηρίων ελέγχου ντόπινγκ. 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.⁷ Συμπληρωματικά, με βάση τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών (List of Prohibited Substances) του WADA, το ντόπινγκ αίματος περιλαμβάνει οποιαδήποτε προσπάθεια χειρισμού του αίματος και των συστατικών του, όπως η χρήση rHuEPO και παραγόντων διέγερσης ερυθροποίησης (Erythropoiesis Stimulating Agents, ESAs), συνθετικών φορέων οξυγόνου και μεταγγίσεων αίματος ή παραγώγων του.^{7,8}

Παρά την απαγόρευση του από τον WADA, το ντό-



Εικόνα 1. Στάδια της εξαρτώμενης από οξύγονο και ρυθμιζόμενης από ερυθροποιητίνη διαδικασίας ερυθροποίησης, CFU-GEMM: μονάδα σχηματισμού αποικιών κοκκιοκυττάρων-ερυθρών-μονοκυττάρων-μεγακαροκυττάρων, BFU-E: μονάδα έκρηξης σχηματισμού ερυθράς σειράς, CFU-E: μονάδα σχηματισμού αποικιών ερυθράς σειράς (τροποποιημένη φωτογραφία).^[79]

πινγκ αίματος επιλέγεται συχνά από αθλητές που θέλουν να αποκτήσουν αθέμιτο πλεονέκτημα και αποτελεί ταυτόχρονα ένα σημαντικό πεδίο έρευνας για την επιστήμη του αντι-ντόπινγκ. Ιστορικά η άμεση ανίχνευση rHuEPOs με τη χρήση ηλεκτροφορητικών τεχνικών αποτέλεσε σημαντικό βήμα, οδηγώντας σε εκατοντάδες θετικά δείγματα σε παγκόσμιο επίπεδο διαχρονικά.⁶ Η άμεση ανίχνευση ομόλογης μετάγγισης αίματος έγινε στη συνέχεια εφικτή με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής.⁹ Αν και ιδιαίτερα σημαντική, η άμεση ανίχνευση ντόπινγκ αίματος, έγινε σύντομα κατανοητό ότι δεν επαρκεί για την ανίχνευση όλων των περιπτώσεων, όπως η αυτόλογη μετάγγιση αίματος, οδηγώντας σε διαφορετικές προσεγγίσεις. Η εφαρμογή του Βιολογικού Διαβατηρίου Αθλητή (Athlete Biological Passport, ABP) με την παρακολούθηση αιματολογικών παραμέτρων σε ατομικό επίπεδο, άνοιξε τον δρόμο για την έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ αίματος. Η βασική ιδέα του ABP βασίζεται στο ότι οι μεταβολές σε φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού, που μπορεί να επιφέρει η χρήση μιας απαγορευμένης ουσίας ή

μεθόδου, συσχετίζονται με τον εντοπισμό των κατάλληλων έμμεσων βιοδεικτών. Έτσι, η παρακολούθηση της διακύμανσης αυτών των βιοδεικτών σε ατομικό επίπεδο και σε βάθος χρόνου, μπορεί να αποκαλύψει τη χρήση απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων ανεξάρτητα από την ουσία ή τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.¹⁰

Η παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζει τις σημαντικότερες εξελίξεις της τελευταίας δεκαετίας στις τεχνικές άμεσης και έμμεσης ανίχνευσής του ντόπινγκ αίματος και επισημαίνει τη σημαντικότητα της χρήσης των βιοδεικτών για τον έλεγχο ντόπινγκ. Επίσης, παρατίθενται συνοπτικά σχετικά στοιχεία φυσιολογίας για την καλύτερη κατανόηση του θέματος.

2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.1 Ερυθροποίηση

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν ένα μέσο χρόνο επιβίωσης 120 ημέρες και ως τελικώς διαφορο-

ποιημένα κύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν. Η συνεχής αναπλήρωσή τους γίνεται μέσω μιας διαδικασίας παραγωγής ώριμων ερυθροκυττάρων στον μυελό των οστών, η οποία ονομάζεται ερυθροποίηση και επάγεται από την EPO, την ορμόνη που παράγεται από τους νεφρούς και δρα στο μυελό των οστών διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών ερυθροκυττάρων.¹¹ Το σύνολο των κυττάρων, από το πρώτο δεσμευμένο προς την ερυθροποίηση πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο μέχρι τα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν την ερυθρά σειρά, της οποίας τα βασικά χαρακτηριστικά ωρίμανσης είναι η μείωση του μεγέθους του κυττάρου, η αύξηση της οξυφιλίας του πρωτοπλάσματος, η μείωση της σύνθεσης DNA και RNA, καθώς και η αύξηση της ποσότητας της αιμοσφαιρίνης.^{12,13}

Τα μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα της ερυθράς σειράς ονομάζονται βλάστες και με συνεχείς διαφοροποιήσεις καταλήγουν στο εκπυρηνωμένο άωρο ερυθροκύτταρο, που ονομάζεται δικτυοερυθροκύτταρο, το οποίο, αφού παραμένει για 1-2 ημέρες στο μυελό, αποδίδεται στην κυκλοφορία. Πρόκειται για κύτταρο μεγαλύτερο από το ώριμο ερυθροκύτταρο και με 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 1**).^{12,13}

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν το τελικό παράγωγο των ερυθροβλαστών του μυελού και χαρακτηρίζονται από την έλλειψη πυρήνα και οργανιδίων, το σχήμα αμφίκιουλου δίσκου, την πλαστικότητα της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, και το κόκκινο χρώμα λόγω της πλήρωσής τους με αιμοσφαιρίνη. Κάθε ερυθροκύτταρο περιέχει 30pg αιμοσφαιρίνης, το μόριο της οποίας αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ανά δύο όμοιες, που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς και αναδιπλώνονται με αυστηρά καθορισμένη δομή. Σε κάθε μια αναδιπλωμένη αλυσίδα υπάρχει προσαρτημένο ένα μόριο αίμης με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο του.^{11,13} Έτσι, το οξυγόνο δεσμεύεται ταχύ-

τατα στην αιμοσφαιρίνη, κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στους πνεύμονες, και αποδεσμεύεται στους ιστούς, όπου η συγκέντρωση οξυγόνου είναι χαμηλή. Η ζωή των ερυθροκυττάρων ολοκληρώνεται με τη φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα κύτταρα του σπληνός.^{4,11}

Η ρύθμιση της ερυθροποίησης γίνεται με ειδικά εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια σήματα με βάση τις ανάγκες του οργανισμού σε οξυγόνο. Ο κύριος αισθητήρας της τάσης του οξυγόνου βρίσκεται στα περιωληνιακά κύτταρα του νεφρού. Πρόκειται για μια μεταλλοπρωτεΐνη που περιέχει αίμη με ένα άτομο σιδήρου και σε καταστάσεις υποξίας ρυθμίζει 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 EPO σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και αποτελείται από δύο υπομονάδες, HIF-1α και HIF-1β. Παρουσία οξυγόνου, ο HIF-1α αποικοδομείται πρωτεολυτικά με την συμβολή της προλυλ-υδροξυλάσης του HIF-1. Σε συνθήκες υποξίας αυτή η εξαρτώμενη από οξυγόνο προλυλ-υδροξυλάση αναστέλλεται και η αποικοδόμηση του HIF-1α σταματάει. Έτσι, ο HIF-1α εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται με τον HIF-1β σχηματίζοντας ένα σταθερό διμερές, το οποίο προάγει τη μεταγραφή του γονιδίου της EPO. Επισημαίνεται, ότι ο HIF-1 επιδρά και εμμέσως στην οξυγόνωση των ιστών, καθώς αποτελεί σημαντικό αγγειογενετικό παράγοντα.^{4,13}

Η επίδραση της EPO στα κύτταρα της ερυθράς σειράς αρχίζει με τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα της (erythropoietin receptor, EPO-R), ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνειά τους. Η σύνδεση ενός μορίου EPO με το εξωμεμβρικό άκρο του διμερούς υποδοχέα της, επιφέρει ενεργοποίηση του ενδομεμβρικού άκρου του μέσω φωσφορυλίωσης, και μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος επάγεται η έκφραση γονιδίων πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης στον πυρήνα. Παράλληλα, η σύνδεση της EPO με τον EPO-R προάγει την φωσφορυλίωση αρνητικών ρυθμιστών, μέσω των οποίων σε δεύτερο χρόνο το σύστημα θα επανέλθει σε ηρεμία. Τα δικτυοερυθροκύτταρα και τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν φέρουν υποδοχείς ερυθροποιητίνης.¹³

2.2. Τύποι ντόπινγκ αίματος

Σύμφωνα με τον WADA, η χρήση συνθετικών φορέων οξυγόνου, οι μεταγγίσεις αίματος και η χρήση rHuEPOs και ESAs είναι οι τρεις βασικοί τύποι ντόπινγκ αίματος, το οποίο απαγορεύεται τόσο εντός αγώνα, όσο και εκτός αγώνα.⁷ Οι μέθοδοι για την ανίχνευσή του περνούν από τον βασικό περιορισμό των βιολογικών δειγμάτων τα οποία συλλέγονται για έλεγχο ντόπινγκ που είναι τα ούρα και το αίμα (ολικό, πλάσμα ή ορός), αν και τα τελευταία χρόνια έχουν κάνει την εμφάνισή τους και άλλα εναλλακτικά βιολογικά υποστρώματα, όπως οι αποξηραμένες κηλίδες αίματος (Dried Blood Spots, DBS) ή ούρων (Dried Urine Spots, DUS), το σάλιο και οι τρίχες.¹⁴

Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, όταν δεν περιβάλλεται δηλαδή στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων, μπορεί να προκαλέσει έντονη αγγειοσυστολή, ακόμη και να γίνει τοξική για τους νεφρούς και τον εγκέφαλο.⁴ Οι συνθετικοί φορείς οξυγόνου είναι καθαρισμένες πρωτεΐνες ή χημικές ουσίες που αποτελούν υποκατάστατα αίματος (τεχνητό αίμα), καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί της αιμοσφαιρίνης για τη μηχανική μεταφορά οξυγόνου, μια ιδιότητα που εκμεταλλεύονται οι αθλητές για σκοπούς ντόπινγκ αίματος. Χωρίζονται σε δύο γενικές κατηγορίες, τους φορείς οξυγόνου με βάση την αιμοσφαιρίνη (Hemoglobin-Based Oxygen Carriers, HBOCs) και τους υπερφθοριοάνθρακες (Perfluorocarbons, PFCs).⁷ Οι HBOCs είναι ουσιαστικά τα προϊόντα τροποποίησης της αιμοσφαιρίνης ανθρώπου ή βοοειδών έπειτα από ανασυνδυασμό ή πολυμερισμό, που μπορούν να συνδεθούν και να μεταφέρουν το οξυγόνο παρόμοια με την φυσική αιμοσφαιρίνη, αποφεύγοντας όμως τις τοξικές παρενέργειες.^{4,15} Από την άλλη οι PFCs δεν έχουν ικανότητα σύνδεσης με το οξυγόνο, όπως η φυσική αιμοσφαιρίνη, αλλά πρόκειται για καθαρά χημικές μη πολικές ενώσεις, οι οποίες χορηγούνται σε μορφή γαλακτώματος που μπορεί να δράσει σαν διαλύτης και μεταφορέας οξυγόνου.¹⁶ Οι συνθετικοί φορείς οξυγόνου χρησιμοποιούνται στην ιατρική σε περιπτώσεις έκτακτης ανάγκης, όταν δεν υπάρχει διαθέσιμο ανθρώπινο αίμα, ή όταν δεν υπάρχει αρκετός χρόνος για τον έλεγχο συμβατότητας και

πιθανής μόλυνσης στο δωρισθέν αίμα.⁷

Η μετάγγιση αίματος ή παραγώγων του είναι η δεύτερη κατηγορία ντόπινγκ αίματος και μπορεί να είναι αυτόλογη ή ομόλογη. Στην αυτόλογη μετάγγιση το αίμα λαμβάνεται από το δότη και του μεταγγίζεται ξανά, 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, δηλαδή ο δότης και ο δέκτης είναι διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους.⁷ Κατά την τυπική διαδικασία της μετάγγισης ο δότης δίνει μια ποσότητα αίματος, το οποίο φυγοκεντρείται, τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθιζάνουν και αποθηκεύονται σε κατάλληλες συνθήκες. Λίγες μέρες πριν τον αγώνα συνήθως τα ερυθρά αιμοσφαίρια εκχέονται στο δέκτη, αυξάνοντας άμεσα την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου.²

Η ενδογενής ανθρώπινη ερυθροποιητίνη (human erythropoietin, HuEPO) είναι η κύρια ορμόνη που επιδρά στη διαδικασία της ερυθροποίησης. Η χρήση διάφορων rHuEPOs κατέχει κυρίαρχη θέση ανάμεσα στις παράνομες πρακτικές που χρησιμοποιούν οι αθλητές για να αποκτήσουν αθέμιτο πλεονέκτημα και συμπεριλαμβάνονται στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του WADA μαζί με όλους τους γνωστούς ESAs, καθώς και με άγνωστες ουσίες που έχουν παρόμοια χημική δομή ή βιολογική λειτουργία.⁸ Οι rHuEPOs έχουν τον ίδιο αριθμό αμινοξέων με την HuEPO και παράγονται με χρήση καλλιεργικών κυτταρικών σειρών, όπως ωοθηκικών κυττάρων κινέζικου χάμστερ (Chinese Hamster Ovary, CHO) ή νεφρικών κυττάρων μικρού χάμστερ (Baby Hamster Kidney, BHK).⁶ Το μόριο της HuEPO περιέχει τρεις N-συνδεδεμένες και μια O-συνδεδεμένη ολιγοσακχαριτικές πλευρικές αλυσίδες (N-γλυκάνες και O-γλυκάνη). Η N-γλυκοζυλίωση ρυθμίζει τη συγγένεια της EPO με τον EPO-R, καθώς και το χρόνο ημιζωής της στον ορό. Επειδή οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις εξαρτώνται από τα ένζυμα των κυττάρων στα οποία πραγματοποιείται η σύνθεση της EPO, η χρήση διαφόρων κυτταρικών σειρών έχει ως αποτέλεσμα διαφορές στην γλυκοζυλίωση της πρωτεΐνης. Παρά τη διαφορετική γλυκοζυλίωση οι rHuEPOs διατηρούν παρόμοια δομή και δράση με την HuEPO, δρώντας ως αγωνιστές

του EPO-R.^{6,17} Ανάλογα με τη σύνθεση και τη φύση του προτύπου γλυκοζυλίωσης, οι εμπορικά παραγόμενες εποετίνες ακολουθούνται από ένα ελληνικό γράμμα (α, β, δ, ω, κ), ενώ διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία υποδεικνύονται με τη χρήση ενός τυχαίου προθέματος (π.χ. δαρμποεποετίνη-α).^{6,17,18}

Οι πρώτης γενιάς rHuEPOs (εποετίνη α, εποετίνη β), εκφράστηκαν σε CHO κύτταρα και εγκρίθηκαν το 1989 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία αναιμικών ασθενών. Η δεύτερης γενιάς rHuEPO, δαρμπεποετίνη α (darbepoetin α, dEPO) είναι γνωστή κι ως NESP (novel erythropoiesis-stimulating protein) και εγκρίθηκε το 2011 από τον FDA (εμπορική ονομασία Aranesp[®]), αν και η χρήση της για σκοπούς ντόπινγκ ήταν γνωστή νωρίτερα. Η τρίτης γενιάς rHuEPO είναι ένας συνεχής ενεργοποιητής του EPO-R (continuous erythropoietin receptor activator, CERA) εμφανίστηκε στην αγορά το 2007 (εμπορική ονομασία Mircera[®]) και εκφράστηκε σε CHO κυτταρική σειρά που παρήγαγε εποετίνη-β συνδεδεμένη με πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethylene glycol, PEG).⁶

Δράση ESA με ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν και ανάλογα μόρια της ερυθροποιητίνης, όπως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σύντηξης της EPO με τη βαριά αλυσίδα περιοχή Fc των ανθρώπινων ανοσοσφαιρινών IgG (EPO-Fc), καθώς αποδείχθηκε ότι διεγείρουν την ερυθροποίηση μετά από χορήγηση σε κλινική μελέτη φάσης I.^{8,19} Ακόμη, ένα ισχυρό μιμητικό πεπτίδιο της EPO (erythropoietin mimetic peptide, EMP), με την ονομασία reginesatide (εμπορική ονομασία Hematide) απαγορεύτηκε από τον WADA το 2009, ενώ το 2012 εγκρίθηκε για τη θεραπεία αναιμικών ασθενών. Παρότι η δομή του διαφέρει από αυτή της EPO, μπορεί να διεγείρει τον διμερισμό του EPO-R και ενεργοποιεί παρόμοιες ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης που προκαλούν ερυθροποίηση, έχοντας μάλιστα παρατεταμένο χρόνο ημιζωής.^{6,8,17}

Απαγορευμένη είναι και η χρήση παραγόντων ενεργοποίησης του HIF. Πρόκειται για δραστικές ουσίες [π.χ. Daprodustat (GSK1278863), Molidustat (BAY85-3934), Roxadustat (FG-4592), Vadadustat (AKB-6548)], οι οποίες αναστέλλουν την προλυλ-υδροξυλάση του HIF-1 και βρίσκονται σε κλινικές δο-

κιμές φάσης ΙΙΙ για τη θεραπεία της αναιμίας και της χρόνιας νεφρικής νόσου.^{8,17} Πρόσφατα απαγορεύτηκε και η χρήση του ξένου ως παράγοντα ενεργοποίησης της σύνθεσης HIF-1α, καθώς και το κοβάλτιο, επειδή τα ιόντα κοβαλτίου (Co²⁺) συνδέονται με τον HIF-1α, εμποδίζοντας την αποικοδόμηση του. Ο ρόλος του κοβαλτίου διαχωρίζεται εντελώς από το ρόλο της κοβαλαμίνης (βιταμίνη B12) που δεν έχει αποδεδειγμένη επίδραση στην βελτίωση της αθλητικής απόδοσης.^{8,17,20}

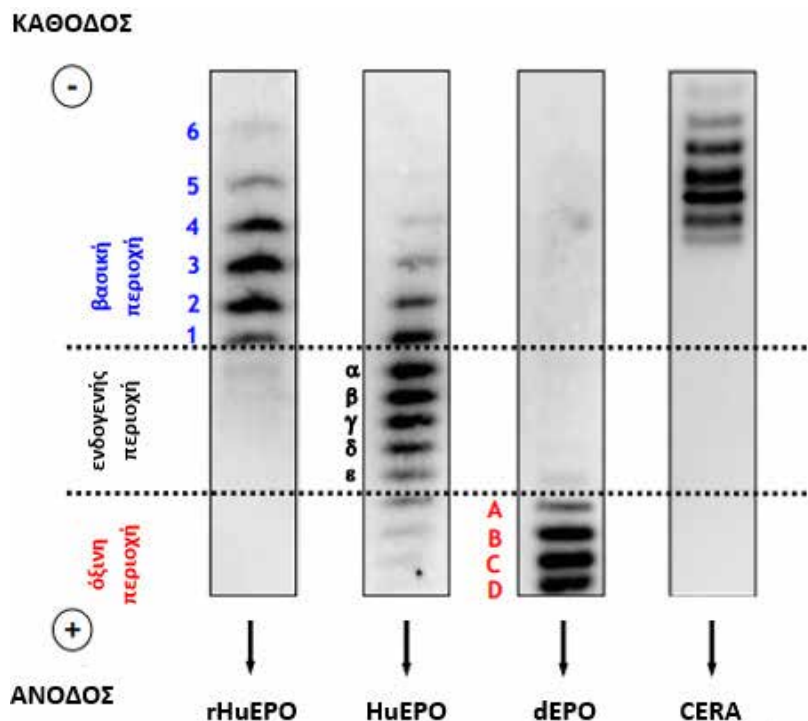
Ακόμη, στον Κατάλογο συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες σύντηξης αποτελούμενες από το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα της ακτιβίνης τύπου ΙΙΑ (activin type II receptor, ActRII) και τη σταθερή περιοχή Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1, που είναι γνωστοί και ως παγίδες ακτιβίνης.^{8,17} Ο ActRII ανήκει στην υπογένεια των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα των όγκων-β (tumor growth factor-β, TGF-β) που συμμετέχουν μεταξύ άλλων στην αρνητική ρύθμιση της ερυθροποίησης. Οι παγίδες ακτιβίνης συνδέονται με τους συνδέτες του ActRII και τους παγιδεύουν, αναστέλλοντας την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος TGF-β και την αρνητική ρύθμιση της παραγωγής EPO. Έτσι, οι παγίδες ακτιβίνης επάγουν την παραγωγή EPO χωρίς να συνδεθούν στον EPO-R. Πρόκειται για δραστικές ουσίες, όπως το Luspatercept (ACE-536) και το Sotatercept (ACE-011), που βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της αναιμίας.^{8,21-23}

Απαγορευμένοι αλλά λιγότερο μελετημένοι είναι και οι αναστολείς μεταγραφικού παράγοντα GATA (π.χ. ο K-11706), ο οποίος καταστέλλει τη διαδικασία της ερυθροποίησης,^{8,17} καθώς και κάποια μη ερυθροποιητικά μόρια παράγωγα της EPO, με νευροπροστατευτικές ιδιότητες χρήσιμες στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως η ασιάλο-ερυθροποιητίνη (AsialoEPO) και η καρβαμυλωμένη ερυθροποιητίνη (Carbamylated Erythropoietin, CEPO).^{8,24}

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

3.1 HBOCs και PFCs

Στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Αθήνας το 2004



Εικόνα 2. Πρότυπα κατανομής με IEF των πρώτης (rHuEPO), δεύτερης (dEPO) και τρίτης (CERA) γενιάς ανασυνδυασμένων ερυθροποιητινών, συγκριτικά με τη HuEPO, έπειτα από εμφάνιση με χημειοφωταύγεια.^[31]

χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά μια μέθοδος για την ανίχνευση των HBOCs, οι οποίοι έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την ενδογενή αιμοσφαιρίνη. Η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτροφόρηση ως διαδικασία διαχωρισμού τους και στην αποκλεισμού μεγέθους-υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Size Exclusion Chromatography-High Performance Liquid Chromatography, SEC-HPLC).²⁵ Επίσης, έχουν προταθεί μέθοδοι για την ανίχνευση PFCs με χρήση αεροχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, 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.^{14,26,27}

3.2 Μετάγγιση αίματος

Το 2004 παρουσιάστηκε για πρώτη φορά μέθοδος για την ανίχνευση της ομόλογης μετάγγισης αίματος με κυτταρομετρία ροής, η οποία μπορεί με τη χρήση αντιγόνων έναντι δώδεκα ερυθροκυτταρικών αντιγόνων να ανιχνεύσει τις μικρές διαφορές που υπάρχουν στα αντιγόνα επιφανείας των ερυθροκυττάρων μεταξύ του δότη και του δέκτη.^{2,9} Επιπροσθέτως, έχει προταθεί μέθοδος για την ανίχνευση της ομόλογης μετάγγισης αίματος με ανάλυση δειγμάτων αίματος χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time-Polymerase Chain Reaction, real time-PCR). Η μέθοδος αυτή, που επιτρέπει την ενίσχυση και ανίχνευση του DNA του δότη μέσα στο δείγμα του δέκτη, έχει επικυρωθεί αλλά δεν εφαρμόζεται ακόμη σε επίπεδο ρουτίνας από τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ.²⁸ Μέχρι σή-

μερα δεν υπάρχει καμία μέθοδος για την άμεση ανίχνευση της αυτόλογης μετάγγισης αίματος.²

3.3 rHuEPOs και άλλοι ESAs

3.3.1 Τεχνικές ηλεκτροφόρησης

Η ανάπτυξη μεθόδου άμεσης ανίχνευσης rHuEPOs άργησε σχεδόν μια δεκαετία από την έναρξη της κατάχρησής τους, καθώς η ομοιότητα τους με την HuEPO είναι τέτοια που δεν ήταν εφικτός ο διαχωρισμός τους.⁶ Η ισοηλεκτρική εστίαση (isoelectric focusing, IEF) είναι η τεχνική με την οποία έγινε εφικτός ο διαχωρισμός τους. Οι μεταξύ τους διαφορές στη γλυκοζυλίωση καταλήγουν σε διαφορετικό τελικό καθαρό φορτίο του εκάστοτε πρωτεϊνικού μορίου σε ένα ορισμένο pH. Η IEF εκμεταλλεύεται τις διαφορές αυτές, κάνοντας δυνατή την ανίχνευση rHuEPO στα ούρα σε συγκεντρώσεις επιπέδων ng/ml, καθώς οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) τους.^{29,30} Οι πρώτης γενιάς rHuEPOs είναι λιγότερο όξινες από την HuEPO, συνεπώς το συνολικό τους φορτίο είναι λιγότερο αρνητικό και μετακινούνται σε μια πιο βασική περιοχή του ηλεκτωμάτος της IEF (**Εικόνα 2**).^{30,31} Η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι χαμηλή και απαιτούνται έως τρεις δόσεις την εβδομάδα για την επίτευξη θεραπευτικών αποτελεσμάτων, με το χρόνο ημιζωής τους στον ορό να είναι περίπου 8 ώρες.² Η εποετίνη δ, η οποία είναι η μόνη που εκφράστηκε σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά, έχει παρόμοιο προφίλ κατανομής με την HuEPO και δεν μπορεί να ανιχνευθεί με IEF.³² Η dEPO έχει μεγαλύτερη γλυκοζυλίωση με την προσθήκη δύο επιπλέον N-γλυκανών, επομένως έχει περισσότερο αρνητικό φορτίο από την HuEPO, άρα μετακινείται σε ακόμη πιο όξινη περιοχή του ηλεκτωμάτος της IEF (**Εικόνα 2**).^{6,30,31} Οι διαφορές στη γλυκοζυλίωση αύξησαν τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, μείωσαν τη συγγένεια προς τον EPO-R και αύξησαν το χρόνο ημιζωής στο τριπλάσιο, περίπου 24 ώρες. Λόγω του μεγαλύτερου χρόνου ημιζωής, μειώθηκε η απαραίτητη δόσολογία σε εβδομαδιαία ή και μηνιαία βάση και αυξήθηκε το χρονικό παράθυρο ανίχνευσης της σε 7 ημέρες.^{17,30} Επίσης, η CERA λόγω της πεγκυλίωσης

εμφανίζει χαμηλότερη συγγένεια για τον EPO-R, ενώ μετακινείται στην πιο βασική περιοχή της IEF (**Εικόνα 2**).^{6,31} Επιπλέον, λόγω μεγέθους εμποδίζεται η σπειραματική διήθησή της από τους νεφρούς και η έκκρισή της στα ούρα. Επομένως, η ανίχνευσή της με IEF γίνεται σε δείγματα ορού έπειτα από ένα απαραίτητο στάδιο ανοσοκαθαρισμού.⁶ Η εξαιρετική σταθερότητα της CERA στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα ένα χρόνο ημιζωής 70-122 ώρες, που μειώνει τη χορήγηση της σε μία φορά το μήνα ή λιγότερο.¹⁷ Λόγω του ευρύτερου παραθύρου ανίχνευσης, η δεύτερης και τρίτης γενιάς rHuEPOs είναι λιγότερο πιθανό να προτιμηθούν από τους αθλητές για σκοπούς ντόπινγκ.

Έχει διαπιστωθεί ότι τα μοριακά βάρη των rHuEPOs είναι μεγαλύτερα από το μοριακό βάρος της HuEPO λόγω της διαφορετικής γλυκοζυλίωσης. Επομένως, η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου με δωδεκυλ 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 πρωτεϊνών σε ούρα και αίμα. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των ούρων και του αίματος σε πρωτεΐνες, τα δείγματα πρέπει αρχικά να υποστούν ανοσοκαθαρισμό με κάποια τεχνική ανοσοσυγγένειας.^{33,34} Τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί πολλά μοντέλα ανοσοκαθαρισμού με χρήση αντισωμάτων ή μαγνητικών νανοσφαιριδίων.³⁵ Η πεγκυλιωμένη δομή της CERA συνδέεται με το SDS, εμποδίζοντας τον διαχωρισμό και κάνοντας πιο δύσκολη την ανίχνευσή της με SDS-PAGE. Για τον λόγο αυτό προτάθηκε η αντικατάσταση του SDS με σαρκοσύλιο (N-Lauroylsarcosine/sarcosyl, SAR), οδηγώντας στην επίτευξη καλύτερου διαχωρισμού της με SAR-PAGE ηλεκτροφόρηση, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση των υπόλοιπων rHuEPOs,^{6,36} ενώ η ανίχνευσή τους με αυτή την τεχνική μπορεί να γίνει και σε DBS.^[8-81] Όλες οι rHuEPOs, που κινούνται αργότερα λόγω του μεγαλύτερου τους μοριακού βάρους, εμφανίζονται σε ζώνες πάνω από την αντίστοιχη ζώνη της HuEPO, έπειτα από ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.^{30,34}

Οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης μπορούν να χρησι-

μποποιηθούν 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.^{37,38} Η ανίχνευσή του peginesatide είναι δυνατή σε δείγματα πλάσματος και ορού με SDS-PAGE.³⁹ Πρόσφατα, προτάθηκε και η ανίχνευση των παγίδων ακτιβίνης σε ορό με SAR-PAGE.⁴⁰

Ερευνητικές δοκιμές έδειξαν ότι ο ανοσοκαθαρισμός δειγμάτων πλάσματος και ορού με ένα συνδυασμό ανοσομαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη και βιοτινυλιωμένου πολυκλωνικού αντι-EPO αντισώματος 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 τον συνολικό χρόνο της αναλυτικής διαδικασίας.⁴¹

Οι ηλεκτροφορητικές τεχνικές, εκτός του ότι είναι αρκετά χρονοβόρες για αναλύσεις ρουτίνας, είναι κι αρκετά πολύπλοκες σε επίπεδο εκτίμησης αποτελέσματος. Έτσι, ο WADA εξέδωσε κριτήρια για την εναρμόνιση των εργαστηρίων σχετικά με την ταυτοποίηση των rHuEPOs έπειτα από την εμφάνιση με χημειοφωτάγεια των ηλεκτροφορητικών προφίλ κατανομής τους.³¹ Τα εργαστήρια χρησιμοποιούν υπολογιστικά προγράμματα με αλγόριθμους ταξινόμησης βασισμένους στα κριτήρια αυτά, όπως το πρόγραμμα GASEPO, για να διασφαλιστεί η αντικειμενικότητα των αποτελεσμάτων.³⁰

3.3.2 Τεχνικές ανοσοπροσδιορισμού

Ερευνητές στη Σουηδία, ανέπτυξαν ένα νέο γρήγορο τεστ για την ανίχνευση rHuEPOs σε δείγματα ούρων και αίματος έπειτα από ανοσοκαθαρισμό, γνωστό ως ανοσοδοκιμασία ισομορφής υποβοηθούμενης από μεμβράνη (Membrane-Assisted Isoform Immunoassay, MAIIA). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει το χρωματογραφικό διαχωρισμό των γλυκοζυλι-

μένων ισομορφών της EPO με συγκολλητίνη σπόρου σίτου (wheat germ agglutinin, WGA) και έναν ευαίσθητο πλευρικής ροής ανοσοπροσδιορισμό.⁴² Και σε αυτή την περίπτωση ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές της γλυκοζυλίωσης, οι οποίες ευθύνονται για τον διαφορετικό βαθμό αντιστρεπτής πρόσδεσης με την WGA. Οι πρώτης γενιάς rHuEPOs αλληλεπιδρούν περισσότερο με την WGA από την HuEPO, η dEPO έχει ακόμη μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης, λόγω των περισσότερων υδατανθράκων, ενώ η CERA έχει χαμηλότερη συγγένεια κι από την HuEPO.^{6,42} Μετά τη σύνδεσή τους εκλύονται σε διαφορετικό χρόνο, ανάλογο με το βαθμό σύνδεσής τους, με χρήση διαλυμάτων N-ακετυλογλυκοζαμίνης και ανιχνεύονται με τον πλευρικής ροής ανοσοπροσδιορισμό, με το οπτικό σήμα της ανίχνευσης να είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της κάθε ερυθροποιητίνης.^{42,43} Η μέθοδος παρουσιάζει πολύ καλή ευαισθησία, ειδικά για δείγματα πλάσματος με μεγάλο παράθυρο ανίχνευσης 72-96 ώρες, όμως, η αντικειμενικότητα στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων είναι ακόμη πιο δύσκολη σε σχέση με τις ηλεκτροφορητικές τεχνικές.^{36,43,44}

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων που βασίζονται στη δοκιμασία ενζυμο-συζευγμένης ανοσοπροσρόφησης (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.^{17,39,45}

3.3.3 Τεχνικές χρωματογραφίας

Η χρήση της υγροχρωματογραφίας συζευγμένης με διδυμη φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, 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.⁴⁶⁻⁵⁰ Εξίσου αποτελεσματική φαίνεται να είναι η χρήση LC-MS/MS για την ανίχνευση peginesatide σε ούρα, ορό ή DBS.^{39,51,52} Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί μέθοδοι LC-MS/MS για την ανίχνευση Luspatercept και Sotatercept με παράθυρα ανίχνευσης στο αίμα τουλάχιστον 96 ώρες.^{22,40,45}

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 συγκεκριμένες επιπέδων ng/ml, καθώς και την ανίχνευση EPO-Fc σε ορό.^{36,53} Τέλος, το αέριο ξένον μπορεί να ανιχνευθεί σε ούρα με χρήση GC-MS με παράθυρο ανίχνευσης 48 ώρες.⁵⁴

3.4 Μειονεκτήματα μεθόδων άμεσης ανίχνευσης

Η συμβολή των μεθόδων άμεσης ανίχνευσης ντόπινγκ αίματος 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 άμεσης ανίχνευσης της αυτόλογης μετάγγισης αίματος. Την απουσία αυτή την γνωρίζουν καλά οι αθλητές που επιθυμούν να καταφύγουν σε πρακτικές ντόπινγκ και αποδεδειγμένα προτιμούν τη χορήγηση του δικού τους αίματος ή των παραγώγων του.²

Μια άλλη τακτική που επιλέγεται συχνά από τους αθλητές είναι η χρήση ESAs σε δόσεις μικρότερες των θεραπευτικών, μικραίνοντας περισσότερο το παράθυρο ανίχνευσης και απαιτώντας μεθόδους με χαμηλότερη αναλυτική ευαισθησία για την ανίχνευση μικρότερων συγκεντρώσεων. Παρά το μικρό χρονικό παράθυρο ανίχνευσης, ο αθλητής εξακολουθεί να έχει ακόμη την θετική επίδραση της

δραστικής ουσίας στην απόδοση του, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις η απαγορευμένη ουσία αποβάλλεται γρήγορα από τον οργανισμό, αλλά η επίδρασή της διαρκεί για αρκετές ημέρες, ακόμη και εβδομάδες, ενώ μπορεί να διατηρηθεί με συνεχόμενη χορήγηση ακόμη και πολύ χαμηλών δόσεων.^{4,6,17} Ακόμη, έχει παρατηρηθεί στα πλαίσια ντόπινγκ η χρήση από αθλητές μειγμάτων με διαφορετικές rHuEPOs σε μικροδόσεις, για να επηρεάζουν τις χαρακτηριστικές εικόνες του προφίλ κατανομής που δίνει με IEF κάθε πρωτεΐνη.³⁰

Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλο περισσότεροι νέοι ESAs εμφανίζονται και κυκλοφορούν στην μαύρη αγορά, η χρονική υστέρηση που υπάρχει μεταξύ της στιγμής εμφάνισης μιας νέας ουσίας ντόπινγκ και της στιγμής εμφάνισης μιας επίσημης αναλυτικής μεθόδου για την άμεση ανίχνευσή της, μεγαλώνει ακόμη περισσότερο.³⁰ Αν και η άμεση ταυτοποίηση ESAs με LC-MS/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, που δεν είναι διαθέσιμα για όλες τις περιπτώσεις.^{6,30}

4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΜΜΕΣΗΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Η απουσία μεθόδου άμεσης ανίχνευσης αυτόλογης μετάγγισης αίματος, η συνεχής εμφάνιση νέων ESAs, το μικρό παράθυρο ανίχνευσης τους και η χορήγηση τους σε μικροδόσεις οδήγησαν την επιστήμη του αντι-ντόπινγκ στην ανάπτυξη νέων μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης με χρήση βιοδεικτών. 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, αντανakλούν σε μεταβολές της φυσιολογικής λειτουργίας του συστήματος. Η επίδραση της χρήσης μιας απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου και οι μεταβολές που μπορεί να επιφέρει 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.^{55,56} Η σημαντικότητα των βιοδεικτών καταδεικνύεται από τις περιπτώσεις ύπαρξης θετικών δειγμάτων αθλητών, τα οποία έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα έπειτα από την ανάλυση με κλασικές μεθόδους ελέγχου ντόπινγκ.⁴⁶ Εξάλλου, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ του WADA, ως ντόπινγκ μεταξύ άλλων ορίζεται η παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών ή βιοδεικτών της σε δείγμα αθλητή.⁵⁷

4.1 Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή

Ο έλεγχος της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη θέτοντας συγκεκριμένα ανώτατα όρια απαγόρευσης βάση πληθυσμιακής κατανομής, ήταν η πρώτη προσέγγιση που υιοθέτησαν κάποιες αθλητικές ομοσπονδίες σαν στρατηγική για τον εντοπισμό ντόπινγκ αίματος. Είναι γνωστό ότι, η χορήγηση ESAs αυξάνει τις τιμές κάποιων αιματολογικών παραμέτρων, ενώ η μετάγγιση αίματος και η διακοπή χορήγησης ESAs οδηγεί στη μείωσή τους. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η απόσυρση και επανέγχυση αίματος προκαλούν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις σε αρκετούς δείκτες της ερυθροποίησης, αφήνοντας ένα χαρακτηριστικό βιολογικό αποτύπωμα στον αθλητή.^{2,10,58}

Η υιοθέτηση ανώτατων τιμών βάση πληθυσμιακής κατανομής για κάποιες αιματολογικές μεταβλητές αποδείχθηκε πως δεν ήταν η βέλτιστη λύση καθώς υπάρχουν και περιπτώσεις μη ντοπαρισμένων αθλητών που έχουν εκ φύσεως υψηλές τιμές αιμοσφαιρίνης και αιματοκρίτη.⁵⁵ Γενικότερα η υιοθέτηση πληθυσμιακών κριτηρίων για οποιαδήποτε ενδογενή παράμετρο μειονεκτεί λόγω της μεγάλης βιολογικής μεταβλητότητας σε απόλυτες τιμές, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να μην επιτρέπουν μια σαφή διαφοροποίηση μεταξύ των φυσικά αυξημένων τιμών μιας ενδογενούς παραμέτρου και ενός αδικήματος ντόπινγκ. Παρόλο που τα πληθυσμιακά κριτήρια αναφοράς αποδείχθηκαν ισχυρά εργαλεία για πολλά χρόνια ή υιοθέτηση μεμονωμένων ορίων για κάθε αθλητή θεωρούνται πολύ πιο αξιόπιστη λύση επειδή μπορούν να

ενσωματώσουν πολλές διαφορετικές πτυχές στην επίδραση των αιματολογικών παραμέτρων, όπως φαινότυποι, μεταβολικές διαταραχές διαμονή σε υψόμετρο κ.λπ..

Με βάση την υπόθεση ότι οι τιμές των αιματολογικών παραμέτρων είναι σταθερές για κάθε συγκεκριμένο υποκείμενο, προτάθηκε τη δεκαετία του 2000 ο όρος Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή (Athlete Biological Passport, ABP), όπου καταγράφονται μεμονωμένα εύρη αναφοράς του αιματολογικού προφίλ ενός αθλητή για πλήθος αιματολογικών παραμέτρων οι οποίες μετρούνται σε βάθος χρόνου και που ανώμαλες τιμές μπορεί να ενεργοποιούν είτε επιπλέον ελέγχους είτε κατηγορίες διάπραξης ντόπινγκ αίματος.^{55,56} Το 2009, ο WADA καθιέρωσε το ABP ως βασικό εργαλείο στο συστηματικό έλεγχο ντόπινγκ σε δείγματα αίματος, καθώς αποδεικνύει ότι ένας αθλητής παραποιεί παρανόμως τις φυσιολογικές αιματολογικές παραμέτρους του.^{2,5} Το ABP αποτέλεσε τεράστια καινοτομία στον έλεγχο ντόπινγκ, διότι για πρώτη φορά καθιερώνεται η απαγγελία κατηγοριών ντόπινγκ, χωρίς την άμεση ανίχνευση μιας συγκεκριμένης απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου.^{2,30,55}

Το ABP αποτελείται από δύο ενότητες, τη στεροειδή και την αιματολογική. Η παρούσα ανασκόπηση επικεντρώνεται στην αιματολογική ενότητα, η οποία 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.⁵⁹ Για το λόγο αυτό, συλλέγονται διαχρονικά πληροφορίες για συγκεκριμένες αιματολογικές παραμέτρους, έπειτα από ανάλυση δειγμάτων ολικού αίματος σε αιματολογικό αναλυτή.^{2,59} Το μοντέλο του αιματολογικού αναλυτή θα πρέπει να είναι το ίδιο για όλα τα εργαστήρια, ώστε να υπάρχει συγκρισιμότητα μεταξύ των διαχρονικών μετρήσεων. Οι παράμετροι αυτές είναι, ο αιματοκρίτης (haematocrit, HCT), η αιμοσφαιρίνη (haemoglobin, HGB), ο αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (red blood cells count, RBC), το εύρος κατανομής ερυθρών αιμοσφαιρίων – τυπική απόκλιση (red blood cell distribution width - standard

deviation, RDW-SD), ο μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (mean corpuscular volume, MCV), η μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (mean corpuscular haemoglobin, MCH), η μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (mean corpuscular haemoglobin concentration, MCHC), ο αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων (reticulocytes count, RET#), το ποσοστό δικτυοερυθροκυττάρων (reticulocytes percentage, RET%), το κλάσμα ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων (immature reticulocyte fraction, IRF), ο αριθμός αιμοπεταλίων (platelets count, PLT) και ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (white blood cells count, WBC). Επιπλέον, συναρτήσει των παραπάνω παραμέτρων υπολογίζονται οι πολυπαραμετρικοί δείκτες OFF-score και ABPS (abnormal blood profile score). 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.⁵⁹

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 αιματολογικό προφίλ για κάθε αθλητή.⁵⁶ 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.^{2,56}

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί 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 δείκτης για την αυτόλογη μετάγγιση αίματος. Η επιταχυνόμενη ερυθροποίηση που προκύπτει από τη χρήση rHuEPO μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή δικτυοερυθροκυττάρων χωρίς σίδηρο (μειωμένη MCH δικτυοερυθροκυττάρων, MCH_r) ακόμη

κι 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.^[2] Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την πιθανή προσθήκη στο ABP των αιματολογικών παραμέτρων RET_{hb} και η MCH_r .

Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί η καλύτερη ευαισθησία και αποτελεσματικότητα του ABP σε σχέση με τις μεθόδους ηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση εποετινών, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την έμμεση ανίχνευση rHuEPOs νέας γενιάς. Μία μόνο δόση CERA έχει σημαντική επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους λόγω του μακρού χρόνου ημιζωής της στο αίμα.^[60,61] Το ABP συμπληρωματικά με τις μεθόδους άμεσης ανίχνευσης έχει αποδειχτεί ένα σημαντικό εργαλείο για τον εντοπισμό του ντόπινγκ αίματος, κι αυτό αποδεικνύεται από τη συνεχώς αυξανόμενη χρήση του σε ελέγχους ντόπινγκ στο πέρασμα των χρόνων.⁶²

Η εφαρμογή αποτελεσματικότερων ελέγχων ντόπινγκ μέσω της χρήσης του ABP οδήγησε τους αθλητές που θέλουν να αυξήσουν αθέμιτα την αερόβια ικανότητά τους να ψάξουν νέους τρόπους για να ξεγελάσουν τον επίσημο έλεγχο. Έτσι, πιθανολογείται η χρήση μικροδόσεων ESAs από αθλητές, με στόχο να αποφύγουν τις μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα των αιματολογικών παραμέτρων και ταυτόχρονα να μειώσουν το παράθυρο άμεσης ανίχνευσης τους. Αυτές οι μικροδόσεις αν και αποτυπώνονται στις παραμέτρους του ABP, δημιουργούν μικρές αποκλίσεις στο αιματολογικό προφίλ, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν εύκολα και σε άλλες παραμέτρους που επηρεάζουν τις αιματολογικές μεταβλητές αλλά δεν σχετίζονται με ντόπινγκ, όπως έκθεση σε υψόμετρο, θερμική καταπόνηση, ασθένεια, χρήση επιτρεπόμενων συμπληρωμάτων διατροφής κ.α.^{55,56} Για παράδειγμα, χαμηλές δόσεις rHuEPO δεν αυξάνουν τον RET# σε έντονο βαθμό, και είναι άγνωστο αν αυτή η μικρή τους αύξηση μπορεί και να καλύψει την μείωση τους μετά από μετάγγιση, ενώ πρόσφατα υπήρξε περίπτωση ανίχνευσης σταθεροποιητή HIF (Roxadustat) σε δείγμα ούρου αθλητή με χρήση LC-MS/MS, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές αλλοιώσεις στο ABP.

[6,55,46] Είναι λοιπόν φανερό ότι το ABP χρειάζεται να ενισχυθεί. Η έρευνα κατευθύνεται στην ανάπτυξη νέων βιοδεικτών έμμεσης ανίχνευσης που θα συμπληρώσουν το ABP αυξάνοντας την ευαισθησία του σημαντικού αυτού εργαλείου. Μια σύγχρονη προσέγγιση προς αυτήν την κατεύθυνση που έχει τραβήξει αρκετά το ερευνητικό ενδιαφέρον αν και δεν έχει ακόμα υιοθετηθεί επίσημα είναι η ταυτόχρονη μελέτη του προφίλ του σιδήρου.

4.2 Προφίλ σιδήρου

Ο σίδηρος κατέχει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και στην ερυθροποίηση, καθώς το οξυγόνο δεσμεύεται και αποδεσμεύεται μεταξύ του σιδήρου της αίμης και της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που την περιβάλλει.¹⁰ Η ομοιοστάση του σιδήρου προϋποθέτει ισορροπία ανάμεσα στην απορρόφηση και αποβολή του. Αυτή η αυστηρή ρύθμιση του μεταβολισμού του σιδήρου απαιτεί τη συμμετοχή πολλών πρωτεϊνών.⁶³ Η HuEPO εκτός από ρυθμιστής της παραγωγής ερυθροκυττάρων είναι και ρυθμιστής του μεταβολισμού του σιδήρου, ως εκ τούτου η χορήγηση ESAs και η μετάγγιση αίματος επηρεάζουν την ομοιοστάση του σιδήρου και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτήν. Επιπλέον, είναι γνωστή τακτική μαζί με τη χορήγηση κάποιου ESAs ή τη μετάγγιση αίματος να χορηγείται και συμπληρωματικός σίδηρος, διότι έχει αποδειχθεί ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση, ενώ μεταβάλλει πιο έντονα και τις παραμέτρους του ABP.¹⁷ 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 επιπέδων και ρύθμισης σιδήρου (ironomics), αντίστοιχα με την παρακολούθηση των αιματολογικών παραμέτρων, για τον καθορισμό ενός προφίλ σιδήρου για κάθε αθλητή.^{3,56}

Το προφίλ του σιδήρου ενός αθλητή εμφανίζει συγκεκριμένες μεταβολές έπειτα από ντόπινγκ αίματος (**Εικόνα 3**).⁵⁶ Πιο συγκεκριμένα, μετά από τη χορήγηση rHuEPO ενεργοποιείται η διαδικασία της ερυθροποίησης στον μυελό των οστών που απαιτεί τη συμμετοχή σιδήρου, κάτι που συμβαίνει και με την απόσυρση αίματος για αυτόλογη μετάγγιση,

ενώ κατά την επανέγχυση του αίματος στον οργανισμό δεν απαιτείται η παραγωγή νέων ερυθροκυττάρων λόγω επάρκειας από τα μεταγγισμένα και η ερυθροποίηση σταματά. Έτσι, η ποσότητα σιδήρου στο αίμα μειώνεται με την ενεργοποίηση της ερυθροποίησης, καθώς περισσότερος σίδηρος καταναλώνεται, ενώ τα επίπεδα του αυξάνουν όταν η ερυθροποίηση παύει.^{56,64}

Η τρανσφερίνη, που είναι η κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς σιδήρου στη κυκλοφορία και στους ιστούς, ακολουθεί τα ίδια πρότυπα μεταβολής με τον σίδηρο. Ο σίδηρος που απαιτείται για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης λαμβάνεται από ερυθροβλάστες, συνδεδεμένος με την τρανσφερίνη, μέσω του υποδοχέα της τρανσφερίνης. Η μέτρηση διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (soluble transferring receptor, sTfR) είναι ανάλογη με τη συνολική μάζα της κυτταρικής έκφρασης του και κατά επέκταση ανάλογη με τα επίπεδα της τρανσφερίνης.^{13,56} Από την άλλη πλευρά, η φερριτίνη που είναι μια πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου συσχετίζεται αντιστρόφως με τα επίπεδα σιδήρου και τρανσφερίνης στο αίμα. Η συγκέντρωση της φερριτίνης στο πλάσμα έχει άμεση σχέση με τις αποθήκες σιδήρου στον οργανισμό, οπότε μειώνεται όσο ο σίδηρος συμμετέχει στην ερυθροποίηση και αυξάνεται σε περιπτώσεις υπερφόρτωσης σιδήρου.^{12,13}

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.^[64] Όταν ο μυελός έχει ανάγκη σίδηρο για την ερυθροποίηση, τότε η εψιδίνη παραμένει σε χαμηλά επίπεδα και η φερροπορτίνη, η οποία ελέγχει την ποσότητα του σιδήρου που θα περάσει στην κυκλοφορία, εξάγει προς την τρανσφερίνη την ποσότητα που χρειάζεται. Αντίθετα, όταν ο μυελός δεν χρειάζεται σίδηρο, τότε η εψιδίνη αυξάνεται, συνδέεται με τη φερροπορτίνη και οδηγεί σε πρωτεόλυση όλη την περίσσεια της, περιορίζοντας τη δράση της. Με τον τρόπο αυτό η τελική ποσότητα σιδήρου που εισέρχεται στον οργανισμό, τελικά ρυθμίζεται από την εψιδίνη.^{13,64} Μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της εψιδίνης μειώνονται και μετά από χορήγηση άλλων ESAs,

	ΣΙΔΗΡΟΣ	ΦΕΡΡΙΤΙΝΗ	sTfR	ΕΨΙΔΙΝΗ	ΦΕΡΡΟΠΟΡΙΤΙΝΗ	ΕΡΥΘΡΟΦΕΡΡΟΝΗ
ΧΟΡΗΓΗΣΗ dHbEPO	↘	↘	↗	↘	↗	↗
ΕΠΑΝΕΓΧΥΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	↗	↗	↘	↗	↘	↘
ΑΠΟΣΥΡΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	↘	↘	↗	↘	↗	↗

Εικόνα 3. Μεταβολές του προφίλ του σιδήρου έπειτα από μεθόδους ντόπινγκ αίματος.

όπως σταθεροποιητών HIF και Sotatercept.⁶⁵ Συνεπώς, η εψιδίνη μπορεί να είναι ένας νέος δυναμικός βιοδείκτης για την ανίχνευση ESAs. Συγκεκριμένα, η εψιδίνη-25 φαίνεται να είναι η ισομορφή εψιδίνης με τον πιο βιολογικά ενεργό ρόλο στην ομοιοστάση σιδήρου και έχει την υψηλότερη συγκέντρωση από τις άλλες ισομορφές στον ορό, αλλά απουσία κατάλληλων αντισωμάτων που θα δεσμεύουν μόνο αυτή την ισομορφή προτιμάται η ανίχνευσή της με LC-MS/MS αντί για ELISA.⁶⁶ Η πρόσφατα ανακαλυφθείσα ερυθροφερρόνη έχει αναδειχθεί ως ένας ενδιαφέρων υποψήφιος βιοδείκτης ντόπινγκ αίματος, καθώς παράγεται από ερυθροβλάστες έπειτα από ενεργοποίηση της ερυθροποίησης και καταστέλλει την έκφραση της εψιδίνης.^{13,56} Σε μελέτες χορήγησης συνδυασμένων ερυθροποιητινών νέας γενιάς, τα επίπεδα ερυθροφερρόνης αυξήθηκαν σημαντικά από την τρίτη ημέρα της χορήγησης dEPO ή CERA, ενώ μειώθηκαν σε 7 ή 14 ημέρες αντίστοιχα μετά τη χορήγηση.⁶⁷

Επειδή όλες αυτές οι εμπλεκόμενες στο μεταβολισμό του σιδήρου πρωτεΐνες επιδεικνύουν υψηλή διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων, η ατομική διαχρονική παρακολούθηση 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.^{6,56} Για παράδειγμα, η φερριτίνη είναι μια πρωτεΐνη οξείας

φάσης, οπότε η συγκέντρωσή της αυξάνεται σε περιπτώσεις φλεγμονής. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με την 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.^{4,13} Οι διαφορές στο μεταβολισμό του σιδήρου μεταξύ ανδρών και γυναικών πρέπει επίσης να καθοριστούν καλά πριν από κάθε ενδεχόμενη εφαρμογή ενός βιολογικού διαβατηρίου σιδήρου.⁵⁶

4.3 Hbmass

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.² 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, δίνοντας τους την ευκαιρία αν θέλουν να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα του ελέγχου.^{56,68}

4.4 miRNAs

Τα miRNAs ή microRNAs είναι μικρά μη κωδικοποιη-

τικά 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 του 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 CERA.^{30,69} 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.⁵⁶

4.5 Μεταβολές πρωτεϊνών ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Η αποθήκευση των ερυθροκυττάρων 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.⁶⁸ Μέθοδοι πρωτεωμικής (proteomics), όπως η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και το ανοσοσύτρωμα πρωτεϊνών, σε συνδυασμό με LC-MS δίνουν τη δυνατότητα προσδιορισμού της παρουσίας αποθηκευμένων ερυθροκυττάρων στο αίμα με εντοπισμό πιθανών βιοδεικτών, όπως η περοξυρεδοξίνη 2 (peroxiredoxin 2), μια αντιοξειδωτική πρωτεΐνη που βρίσκεται κανονικά στο κυτταρόπλασμα του ερυθροκυττάρου, αλλά κατά την αποθήκευση μεταναστεύει στην μεμβράνη του.^{70,71} Ακόμη, μετά από ψύξη ολικού αίματος έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός μικροσωματιδίων ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC-microparticles), που μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αυτόλογης μετάγγισης με κυτταρομετρία ροής.⁷²

Πρόσφατα, προτάθηκε μια μέθοδος για τη μέτρηση των ανώριμων δικτυοερυθροκυττάρων και των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε DBS. Κυτταροειδικές πρωτεΐνες μετρούνται με LC-MS/MS έπειτα από πέψη των DBS με θρυψίνη. Η CD71 είναι η συνδεδεμένη 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 δικτυοκύτταρα, συμβάλλοντας στην σταθεροποίηση της μεμβράνης τους. Η συγκέντρωση των CD71 και Band3 σε DBS έχει δείχθει 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 εθελοντές. Μετά τη μετάγγιση, η μέση αναλογία CD71/Band3 στην ομάδα αίματος ήταν στατιστικά διαφορετική από την ομάδα ελέγχου. Περαιτέρω δοκιμές είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό της διαχρονικής σταθερότητας του λόγου CD71/Band3 και για την μελέτη της πιθανής μεταβολής του λόγω υψομέτρου, φλεγμονής, έντονης άσκησης ή/και χορήγησης μικροδόσεων ESAs.^{73,74}

4.6 Πλαστικοποιητές

Οι σάκοι που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση του αίματος και των ερυθροκυττάρων είναι κατασκευασμένοι από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), στο οποίο προστίθενται πλαστικοποιητές για να παρέχεται η κατάλληλη ευκαμψία. Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος πλαστικοποιητής 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 και των

μεταβολιτών τους, ως βιοδείκτες ντόπινγκ με μετάγγιση αίματος, για μικρό χρονικό διάστημα μετά τη μετάγγιση χρησιμοποιώντας LC-MS.⁶⁸ Στο ανθρώπινο σώμα, το DEHP υδρολύεται σε μονο(2-αιθυλ-5-οξοεξυλ) φθαλικό εστέρα [mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate, MEHP] και ακολούθως οξειδώνεται και γλυκουρονίζεται σε μονο(2-αιθυλ-5-υδροξυεξυλ) φθαλικό εστέρα [mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate, 5OH-MEHP], μόνο(5-οξοεξυλ) φθαλικό εστέρα [mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate, 5oxo-MEHP], μονο(2-αιθυλ-(5-καρβοκυπεντυλ) φθαλικό εστέρα, [mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate, 5cx-MEPP] και μονο(2-καρβοξυμεθυλεξυλ) 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 ώρες), 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 βρεθεί στα ούρα μετά από επαγγελματική ή διατροφική έκθεση.^{56,75,76}

4.7 Ανοσολογικοί βιοδείκτες

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.^{68,77,78}

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ντόπινγκ αίματος αποτελεί ένα αντικείμενο

έντονου προβληματισμού για τον καθαρό αθλητισμό. Οι μέθοδοι άμεσης ανίχνευσης δείχνουν να είναι επαρκείς κυρίως για την ανίχνευση rHuEPOs, και χρειάζονται βελτίωση για την ανίχνευση μικρότερων μορίων, ενώ δεν μπορούν να ανιχνεύσουν την αυτόλογη μετάγγιση αίματος, νέους ESAs και μικροδόσεις rHuEPOs. Στη λύση κάποιων από αυτών των προβλημάτων συνέβαλε η υιοθέτηση μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης με αρχή την εφαρμογή του ABP. 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.⁵⁵ Η επέκταση του ABP με περισσότερους έμμεσους βιοδείκτες θα ισχυροποιήσει ακόμη περισσότερο την αποτελεσματικότητά του.

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 το ABP στην προσπάθεια καταπολέμησης του ντόπινγκ.⁶ 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.^{6,56} 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.

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. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι βιοδείκτες σε

μεγάλο βαθμό είναι ανεξάρτητοι από την πρόοδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας, η οποία με ταχύτατους ρυθμούς προμηθευθεί 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 ανθρωπίνου 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.⁵⁵

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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).

Current methods of direct and indirect blood doping detection

Panagiotis Sakellariou^{a,b}, Yiannis S. Angelis^a

^a Doping Control Laboratory of Athens, Institute of Biosciences and Applications, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Neratziotissis and Amarissias Artemidos Str., 15123 Maroussi, Greece

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

KEYWORDS:
blood doping;
erythropoietin; blood
transfusion; biomarkers

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Despite being prohibited by the World Anti-Doping Agency, blood doping through Erythropoiesis Stimulating Agents (ESAs) misuse and blood transfusion, is used by athletes who want to gain an unfair advantage by increasing the red blood cells production and hence their aerobic capacity. Methods of direct detection, based on techniques like electrophoresis, immunoassays and chromatography combined with mass spectrometry, can be used to detect recombinant erythropoietins and other ESAs, while homologous blood transfusion is detected using flow cytometry. 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, as a strategy for the blood doping

*** CORRESPONDING AUTHORS:**

Panagiotis Sakellariou
panagiotissakellariou90@gmail.
com

Ioannis S. Angelis
i.angelis@bio.demokritos.gr

detection through the long-term monitoring of hematological parameters' levels of its individual athlete, is an important achievement. 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. Research is focused on the use of new blood doping indirect biomarkers, such as the monitoring of iron metabolism proteins level. Indirect biomarkers may also include the changes at cellular, molecular or genetic level due to blood doping. The combination of the Athlete Biological Passport with other indirect biomarkers is believed to enhance the effectiveness of blood doping tests.

REFERENCES

1. Oliveira C.D., Bairros A.V., Yonamine M. Blood Doping: Risks to Athletes' Health and Strategies for Detection. *Subst Use Misuse* 49 (9), 1168-1181, 2014.
2. Jelkmann W., Lundby, C. Blood doping and its detection. *Blood* 118(9), 2395-2404, 2011.
3. Shaskey D.J., Green G.A. Sports Haematology. *Sports Med.* 29, 27-38, 2000.
4. Atkinson T.S., Kahn M.J. Blood doping: Then and now. A narrative review of the history, science and efficacy of blood doping in elite sport. *Blood Rev.* 39, 100632, 2019.
5. Fitch KD. Blood doping at the Olympic Games. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 57, 1526-32, 2017.
6. Salamin O., Kuuranne T., Saugy M., Leuenberger N. Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 464, 75-87, 2017.
7. World Anti-Doping Agency (WADA) <https://www.wada-ama.org/en/questions-answers/blood-doping> (accessed 21 April 2020).
8. World Anti-Doping Agency (WADA). Prohibited List January 2020. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2020_english_prohibited_list_0.pdf (accessed 21 April 2020).
9. Nelson M., Popp H., Sharpe K., Ashenden M. Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica* 88, 1284-1295, 2003.
10. Sottas P.E., Robinson N., Saugy M. The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. *Handb. Exp. Pharmacol.* 195, 305-26, 2010.
11. Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος Μ. (2011) Φυσιολογία του ανθρώπου. Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού. 8η έκδοση. Εκδόσεις Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
12. Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας (ΕΕΚΧ-ΚΒ). 13^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο «ΘΕΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ», Κείμενα διαλέξεων, 2005.
13. Λουκόπουλος Δ., Πολίτου Μ. ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ. Κλινική Αιματολογία, Αιμόσταση, Μετάγγιση Αίματος. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα, 2015.
14. Thevis M., Geyer H., Tretzel L., Schänzer W. Sports drug testing using complementary matrices: Advantages and limitations. *J. Pharm.*

- Biomed. Anal.* 130,220-230, 2016.
15. Ashenden M.J., Schumacher Y.O., Sharpe K., Varlet-Marie E., Audran M. Effects of Hemopure on maximal oxygen uptake and endurance performance in healthy humans. *Int. J. Sports Med.* 28(5),381-5, 2007.
 16. Borriore P., Mastrone A., Salvo R.A., Spaccamiglio A., Grasso L., Angeli A. Oxygen delivery enhancers: past, present, and future. *J. Endocrinol. Invest.* 31(2),185-92, 2008.
 17. Jelkmann W. Erythropoietin. *Front. Horm. Res.*, 47,115-27, 2016.
 18. Okano M., Sato M., Kaneko E., Kageyama S. Doping control of biosimilar epoetin kappa and other recombinant erythropoietins after intravenous application. *Drug Test Anal.* 3(11-12),798-805, 2011.
 19. Dumont J.A., Bitonti A.J., Clark D. Evans S., Pickford M., Newman S.P. Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. *J. Aerosol Med.* 18(3), 294-303, 2005.
 20. Ebert B., Jelkmann W. Intolerability of cobalt salt as erythropoietic agent. *Drug Test Anal.* 6(3),185-9, 2014.
 21. Heuberger J.A.A.C., Cohen A.F. Review of WADA Prohibited Substances: Limited Evidence for Performance-Enhancing Effects. *Sports Med.* 49(4),525-539, 2019.
 22. Walpurgis K., Thomas A., Lange T., Reichel C., Geyer H., Thevis M. 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(11-12),1714-1721, 2018.
 23. Lange T., Walpurgis K., Thomas A., Geyer H., Thevis M. Development of two complementary LC-HRMS methods for analyzing sotatercept in dried blood spots for doping controls. *Bioanalysis* 11(10),923-940, 2019.
 24. 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. Nonhematopoietic Erythropoietin Derivatives Prevent Motoneuron Degeneration In Vitro and In Vivo. *Mol. Med.* 12(7-8), 153-160, 2006.
 25. Varlet-Marie E., Ashenden M., Lasne F., Sicart M.T., Marion B., de Ceaurriz J., Audran M. Detection of hemoglobin-based oxygen carriers in human serum for doping analysis: confirmation by size-exclusion HPLC. *Clin. Chem.* 50(4),723-31, 2004.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Manokhina I., Rupert J.L. A DNA-based method for detecting homologous blood doping. *Anal. Bioanal. Chem.* 405(30),:9693-701, 2013.
 29. Lasne F., de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405, 635, 2000.
 30. Pottgiesser T., Schumacher Y.O. Current strategies of blood doping detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 9625-39, 2013.
 31. World Anti-Doping Agency (WADA). WADA Technical Document – TD2014EPO. 2014. <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).
 32. Franz S.E. Erythropoiesis-stimulating agents: development, detection and dangers. *Drug Test Anal.* 1, 245-9, 2009.
 33. Kohler M., Ayotte C., Desharnais P., Flenker U., Ludke S., Thevis M., Volker-Schanzer E. and Schanzer W. Discrimination of recombinant

- and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int. J. Sports Med.* 29, 1-6, 2008.
34. Leuenberger N., Reichel C. Lasne F. Detection of erythropoiesis-stimulating agents in human anti-doping control: past, present and future. *Bioanalysis* 4, 1565-75, 2012.
 35. Citartan M., Gopinath S.C.B., Chen Y., Lakshmi priya T., Tang T.H. Monitoring recombinant human erythropoietin abuse among athletes. *Biosens. Bioelectron.* 63,86-98, 2015.
 36. Reichel C. SARCOSYL-PAGE: a new electrophoretic method for the separation and immunological detection of PEGylated proteins. *Methods Mol. Biol.* 869, 65-79, 2012.
 37. Reichel C., Thevis M. Detection of EPO-Fc fusion protein in human blood: screening and confirmation protocols for sports drug testing. *Drug Test Anal.* 4(11),818-29, 2012.
 38. Postnikov P., Krotov G., Mesonzhnik N., Efimova Y., Rodchenkov G. Fc-fragment removal allows the EPO-Fc fusion protein to be detected in blood samples by IEF PAGE. *Drug Test. Anal.* 7, 999, 2015.
 39. Leuenberger N., Saugy J., Mortensen R.B., Schatz P.J., Giraud S., Saugy M. Methods for detection and confirmation of Hematide™/peginesatide in anti-doping samples. *Forensic Sci. Int.* 213(1-3),15-9, 2011.
 40. Reichel C., Farmer L., Gmeiner G., Walpurgis K., Thevis M. Detection of Sotatercept (ACE-011) in human serum by SAR-PAGE and western single blotting. *Drug Test Anal.* 10, 927-937, 2018.
 41. Desharnais P., Naud J.F., Ayotte C. Immunomagnetic beads-based isolation of erythropoietins from urine and blood for sports anti-doping control. *Drug Test Anal.* 9,1744-1752, 2017.
 42. Franco Fraguas L., Carlsson J., Lonnberg M. Lectin affinity chromatography as a tool to differentiate endogenous and recombinant erythropoietins. *J. Chromatogr. A* 1212, 82-8, 2008.
 43. Dehnes Y., Shalina A., Myrvold L. 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, 2013.
 44. Ashenden M., Sharpe K., Garnham A., Gore C.J. Evaluation of the MAIIA dipstick test to detect recombinant human erythropoietin in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 67-68, 123-8, 2012.
 45. Reichel C., Gmeiner G., Thevis M. Antibody-based strategies for the detection of Luspatercept (ACE-536) in human serum. *Drug Test Anal.* 9, 1721-1730, 2017.
 46. Buisson C., Marchand A., Bailloux I., La-haussois A., Martin L., Molina A. Detection by LC-MS/MS of HIF stabilizer FG-4592 used as a new doping agent: Investigation on a positive case. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 121, 181, 2016.
 47. Hansson A., Thevis M., Cox H., Miller G., Eichner D., Bondesson U., Hedeland M. 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, 2017.
 48. 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. Implementation of the prolyl hydroxylase inhibitor Roxadustat (FG-4592) and its main metabolites into routine doping controls. *Drug Test Anal.* 9,1768-1778, 2017.
 49. Thevis M., Milosovich S., Licea-Perez H., Knecht D., Cavalier T., Schanzer W. Mass spectrometric characterization of a prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863, its bishydroxylated metabolite, and its implementation into routine doping controls. *Drug Test. Anal.* 8, 858, 2016.
 50. Dib J., Mongongu C., Buisson C., Molina A., Schänzer W., Thuss U., Thevis M. Mass spectrometric characterization of the hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizer drug candidate BAY 85-3934 (molidustat) and its glucuronidated metabolite BAY-348, and their imple-

- mentation into routine doping controls. *Drug Test Anal.* 9(1), 61-67, 2017.
51. Moller I., Thomas A., Geyer H., Schanzer W. and Thevis M. 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, 2012.
 52. Möller I., Thomas A., Delahaut P., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Mass spectrometric detection of peginesatide in human urine in doping control analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70, 512-7, 2012.
 53. Mesonzhnik N.V., Postnikov P.V., Appolonova S.A., Krotov G.I. Characterization and Detection of Erythropoietin Fc Fusion Proteins Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* 17, 689-697, 2018.
 54. Thevis M., Piper T., Geyer H., Schaefer M.S., Schneemann J., Kienbaum, P., Schänzer W. Urine analysis concerning xenon for doping control purposes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29(1), 61-6, 2015.
 55. Sottas P.E., Robinson N., Rabin O., Saugy M. The athlete biological passport. *Clin. Chem.* 57(7), 969-76, 2011.
 56. Salamin O., De Angelis S., Tissot J.D., Saugy M., Leuenberger N. Autologous Blood Transfusion in Sports: Emerging Biomarkers. *Transfus. Med. Rev.* 30(3), 109-15, 2016.
 57. World Anti-Doping Agency (WADA). 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).
 58. Parisotto R., Wu M., Ashenden M., Emslie K.R., Gore C.J., Howe C. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 86, 128-37, 2001.
 59. World Anti-Doping Agency (WADA). ISL-Athlete Biological Passport Operating Guidelines Version 7.1, 2019 https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v71.pdf (accessed 21 April 2020).
 60. Dehnes Y., Hemmersbach P. Effect of single doses of methoxypolyethylene glycolepoetin beta (CERA, Mircera) and epoetin delta (Dynepo) on isoelectric erythropoietin profiles and haematological parameters. *Drug Test Anal.* 3, 291-9, 2011.
 61. 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. Sensitivity and specificity of detection methods for erythropoietin doping in cyclists. *Drug Test Anal.* 11(9):1290-1301, 2019.
 62. World Anti-Doping Agency (WADA). 2018 ANTI-DOPING TESTING FIGURES, 2019. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf (accessed 21 April 2020).
 63. Κεφαλά-Αγοροπούλου Κ., Καρατζά-Ξιφιλίδου Ε. Νεώτερες απόψεις για το μεταβολισμό του σιδήρου. *Παιδιατρική Βορείου Ελλάδος*, 19:156-162, 2007.
 64. Waldvogel-Abramowski S., Waeber G., Gassner C., Buser A., Frey B.M., Favrat B., Tissot J.D. Physiology of iron metabolism. *Transfus. Med. Hemother.* 41(3), 213-21, 2014.
 65. Jelkmann W. The ESA scenario gets complex: from biosimilar epoetins to activin traps. *Nephrol. Dial. Transplant.* 30, 553-9, 2015.
 66. Abbas I.M., Hoffmann H., Montes-Bayón M., Weller M.G. Improved LC-MS/MS method for the quantification of hepcidin-25 in clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 410(16), 3835-3846, 2018.
 67. Honda H., Kobayashi Y., Onuma S., Shibagaki K., Yuza T., Hirao K., Yamamoto T., Tomosugi N., Shibata T. Associations among Erythroferone and Biomarkers of Erythropoiesis and Iron Metabolism, and Treatment with Long-Term Erythropoiesis-Stimulating Agents in Patients on Hemodialysis. *PLoS One.* 11, e0151601, 2016.
 68. Segura J., Monfort N., Ventura R. Detection methods for autologous blood doping. *Drug*

- Test Anal.* 4(11), 876-81, 2012.
69. Leuenberger N., Jan N., Pradervand S., Robinson N., Saugy M. Circulating microRNAs as long-term biomarkers for the detection of erythropoiesis-stimulating agent abuse. *Drug Test Anal.* 3, 771-6, 2011.
 70. Nikolovski Z., De La Torre C., Chiva C., Borràs E., Andreu D., Ventura R., Segura J. Alterations of the erythrocyte membrane proteome and cytoskeleton network during storage--a possible tool to identify autologous blood transfusion. *Drug Test Anal.* 4(11), 882-90, 2012.
 71. Marrocco C., Pallotta V., D'alessandro A., Alves G., Zolla L. Red blood cell populations and membrane levels of peroxiredoxin 2 as candidate biomarkers to reveal blood doping. *Blood Transfus.* 10 Suppl 2:s71-7, 2012.
 72. 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. Analysis of RBC-microparticles in stored whole blood bags - a promising marker to detect blood doping in sports? *Drug Test Anal.* 9,1794-1798, 2017.
 73. Cox H.D., Miller G.D., Lai A., Cushman D., Eichner D. Detection of autologous blood transfusions using a novel dried blood spot method. *Drug Test Anal.* 9,1713-1720, 2017.
 74. Thevis M., Kuuranne T., Geyer H. Annual banned-substance review: Analytical approaches in human sports drug testing. *Drug Test Anal.* 11(1), 8-26, 2019.
 75. Leuenberger N., Barras L., Nicoli R., Robinson N., Baume N., Lion N. Urinary di-(2- ethylhexyl) phthalate metabolites for detecting transfusion of autologous blood stored in plasticizer-free bags. *Transfusion* 56, 571-8, 2015.
 76. Segura J, Lundby C. Blood doping: potential of blood and urine sampling to detect autologous transfusion. *Br. J. Sports Med.* 48(10), 837-41, 2014.
 77. Pottgiesser T, Schumacher Y.O., Funke H., Rennert K., Baumstark M.W., Neunuebel K., Mosig S. Gene expression in the detection of autologous blood transfusion in sports-a pilot study. *Vox Sang.* 96(4), 333-6, 2009.
 78. Wood M.A., Goldman N., DePierri K., Somerville J., Riggs J.E. Erythropoietin increases macrophage-mediated T cell suppression. *Cell Immunol.* 306-307:17-24, 2016.
 79. Shin H.M., Wu C.J., Lin C.L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J. Formos. Med. Assoc.* 117, 955-63, 2018.



Preparation and evaluation of magnetite nanoparticles and novel magnetic dosage form for topical application

Iryna Vedernykova^{1*}, Yevgen Levitin¹, Lina Klimenko¹, Larysa Karabut²

¹*Department of Inorganic Chemistry, National University of Pharmacy, Ukraine
Pushkinskaya St. 53, Kharkov 61002, Ukraine*

²*Department of Laboratory Diagnostics, National University of Pharmacy, Ukraine
Pushkinskaya St. 53, Kharkov 61002, Ukraine*

KEYWORDS:

magnetite;
nanoparticles; magnetic
ointment

ABSTRACT

The particles of magnetite were prepared using a chemical condensation method. The crystalline structure, morphology and the magnetic properties of the ferrite particles were studied by means of X-ray diffraction (XRD) and vibrating sample magnetometer (VSM). By an appropriate combination of the magnetic ointment bases prepared using different amounts of magnetic nanoparticles (MNPs) and different type of bases it was possible to obtain a system with a good texture and magnetic properties. The water absorption capacity of polyethylene glycol (PEG) formulations was related to the MNPs concentration. Magnetic measurements of a formulation PEG 400/1900 with MNPs 30% have demonstrated the increase of magnetization as a result of reduction of temperature from 300 K to 77 K and the transition from superparamagnetic to ferromagnetic behavior of a formulation ($H_c = 100$ Oe). These results suggest a potential of the new magnetic ointment bases for the development of modified dosage form for topical application.

* CORRESPONDING AUTHOR:

Vedernykova Iryna, E-mail:
ivedernykova@gmail.com

1. Introduction

Magnetic nanotechnology is widely used in modern pharmaceutical science¹⁻⁵. Magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) are used as magnetic material of Magnetic Drug Delivery Systems⁶⁻¹¹.

Chronic tonsillitis is one of the most common otorhinolaryngological diseases. Treatments for tonsillitis focus on eliminating infection and inflammation associated with the condition. Chronic tonsillitis is corrected by tonsillectomy (surgical removal of the tonsils)¹².

The idea was to create the dosage form with the magnetite particles in the form of ointment. An ointment is a viscous semisolid preparation used topically on a variety of body surfaces. They compose of active ingredient and ointment base. Ointment bases are used as vehicles for medicated ointments. The magnetic ointment can be applied directly to the tonsils, then begin the influence of permanent magnetic field on the area of projection of the Palatine tonsils (anterolateral surface of the neck). Use of such a magnetic formulation with its applying and fixing via an external magnet on the tonsils will allow improving the efficacy of local treatment.

Topical therapy is desirable since, in addition to targeting the site of infection, it reduces the risk of systemic side effects thus the main aim of this study was to design novel magnetic topical dosage form for topical treatment of otorhinolaryngological infectious diseases such as tonsillitis. This investigation consisted of preparation and evaluation of magnetite nanoparticles (MNPs) and magnetic ointment bases using different amounts of MNPs and different type of bases to obtain a system with a good texture and magnetic properties. To our knowledge, no other reports exist of the preparation and evaluation of magnetic dosage form for topical treatment of otorhinolaryngological infectious diseases.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Iron (III) chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), iron (II) sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (25% w/w aqueous solu-

tion) and polyethylene glycols were purchased from E. Merck Ltd. (India). Lugol iodine was purchased from Instamed Labchem (India); sea buckthorn oil from X.S. Biotech Co., Ltd. (China) and oleic acid from Beijing ChemWorks (China). All chemicals were of analytical grade.

2.2 Synthesis of magnetite nanoparticles

Ultrafine particles of FeFe_2O_4 were prepared by co-precipitating aqueous solutions of iron (II) salt ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and iron (III) salt ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in an alkaline medium (25% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). 13.89 g (0.05 mol) of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 26.90 g (0.1 mol) of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were dissolved in 1 L of distilled water at heating (60-70°C). 25% aqueous ammonia solution was added drop-wise with continuous stirring until complete precipitation of the black ferrite was achieved (pH 9-11). After the system was cooled to room temperature, the precipitates were collected using magnetic separation and washed with distilled water until pH neutral, producing thus samples MNPs.

2.3 Preparation of ointment bases

Nine ointment bases of varying compositions (Table 1) were prepared by using different amounts of MNPs and different type of bases. The mixtures of PEG were prepared by melting together polyethylene glycol (PEG 400 and PEG 1500) on a hot plate/stirrer (at 70°C). The PEG 400/1500 ratios weight were 9/1 (forms I-V) and 4/1 (forms VI-VII), respectively. MNPs were added to this molten base while stirring. The entire mixture was stirred while cooling. The prepared ointment bases were put in ointment jars and were stored at room temperature pending the evaluation. The ingredients of the different formulations (I to IX) are listed in **Table 1**.

2.4 Particle characterization

The X-ray diffraction (XRD) patterns of the samples were recorded on a Siemens D500 X-ray powder diffractometer using copper radiation. Slow scans

Table 1: Compositions used in the study to prepare ointment bases

Ingredients	Formulations								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
MNPs	20	25	30	35	40	25	30	10	50
PEG 400	72	67.5	63.0	58.5	54.0	60.0	56	-	-
PEG 1500	8	7.5	7.0	6.5	6.0	15.0	14	-	-
Lugol iodine	-	-	-	-	-	-	-	90	-
Sea buckthorn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	47.5
Oleic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5

Table 2: Phase composition and characteristics of MNPs

Phase	Mass, %	Lattice parameters, (Å)	d, g/cm ³	Crystallite size and microstrain, nm/ %
	93.3(6)	a=8.3668(12)	5.28	16/0.14
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	6.2(2)	a=8.348(4)	4.89	9/0.13
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	0.4(2)	a=5.0280	5.27	27/-
		c=13.651		

of the selected diffraction peaks were carried out in the step mode (step size 0.03°, measurement time 75 s. The crystallite size of the nanocrystalline samples was measured from the X-ray line broadening using the Debye-Scherrer formula after accounting for instrumental broadening. Magnetization measurements were performed in a vibrating sample magnetometer (VSM) at 300 K and 77K using a superconducting magnet to produce fields up to 2 kOe.

2.5 Density measurement and rheological analysis of formulations

The density measurements of the formulations (I-IX) were carried out using a 50 ml pycnometer. For the hard samples, the pycnometer was filled with the melted sample. After 24 h storage at room temperature the mass was measured. Rheological analysis was performed on a rotary viscometer Rheotest

RV2 (VEB MLW Medingen, Germany). The rheological behavior was studied by continuous shear investigations, which were performed in order to evaluate the shear stress (Pa) as a function of shear rate (s^{-1}). The study was started with a shear rate of 1 s^{-1} up to a maximum of 500 s^{-1} and back to 1 s^{-1} , and the resulting shear stress was measured at temperature 34°C (thermostatic water bath was used).

2.6 Water absorption capacity of ointment bases

The water absorption capacity of ointment bases (PEG 400/1500 mixture 9/1; PEG 400/1500 mixture 9/1 with magnetite 25% (PEG/MNPs25), 30% (PEG/MNPs30) and 35% (PEG/MNPs35) at 37 °C were measured *in vitro* through cellulose membrane inserted in the Franz diffusion cell. Distilled water was used as the medium. An electronic balance (AND, Model GF400, accuracy ± 0.001 g Japan)

Table 3: The parameters of the composition and physical characteristics of the ointment bases

Ingredients	Formulations								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Mass part of MNPs, %	20	25	30	35	40	25	30	10	50
Volume part of MNPs, %	5.35	6.68	8.08	9.43	10.81	6.35	7.87	2.44	12.5
Density, g/cm ³	1.281	1.320	1.356	1.402	1.432	1.331	1.378	1.271	1.306
Saturation magnetization, emu/g	3.52	4.47	5.32	6.21	36.69	7.09	5.17	1.61	8.16

were used to measure weight of samples before and after immersion. In order to reduce error, all tests were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of as-synthesized MNPs

The formation of Fe₃O₄ was confirmed by XRD, and is shown in Figure 1. The pattern has well defined peaks from reflection planes (220), (311), (400), (422), (511) and (440), which were indexed in the Fd3m(227) space group corresponding to a spinel cubic structure of magnetite (JCPDS PDF card No. 19-629). The presence of maghemite (γ-Fe₂O₃) and hematite (α-Fe₂O₃), beside to the major magnetite phase, have been confirmed by X-ray diffraction analysis (**Table 2**).

The magnetic measurement confirms that the synthesized particles exhibit superparamagnetic properties at room temperature. The magnetization curve for the MNPs exhibits immeasurable values of coercivity field and remnant magnetization. The particles have high saturation magnetization values (67 emu/g), which is consistent with the value reported in the literature for a magnetite sample with the same sizes [13].

3.2 Evaluation of the properties of magnetic ointment bases

To develop a successful magnetic dosage form formulation for topical treatment of otorhinolaryngological infectious diseases such as tonsillitis, it is important to study the rheology, texture, and magnetic properties. The results of comparing of the properties of the proposed compositions (**Table 3**) showed that the optimum formulations are II – IV because they have the best structure and one of the highest magnetic properties, which allowing its manipulation with an external magnetic field. Other formulations were not accepted because they have liquefied structure like formulations I, VIII-IX or too dense structures like formulations V-VII.

The magnetic interactions between the dispersed MNPs make them agglomerate and settle down. The highly dense PEG mixture provides steric hindrance preventing nanoparticle from aggregation. Therefore, the formulations II – IV with the PEG mixture were selected for further study.

Regarding flow behavior all the formulations show very similar characteristics (**Figure 2**). The flow curves of the tested formulations revealed a non-Newtonian shear-thinning behavior, with yield value. The formulations with higher yield values showed higher values of viscosity and shear stress

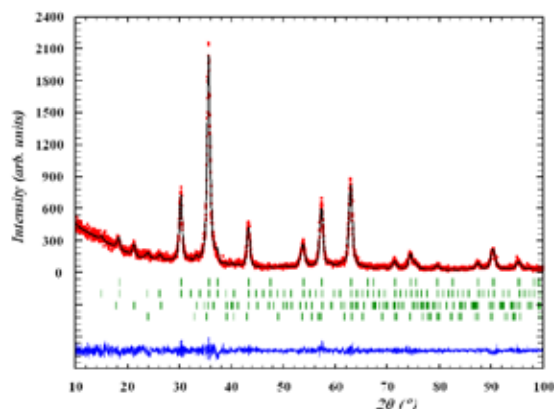


Figure 1. X-ray diffraction pattern of MNPs

than the other formulations. Thixotropy, a reversible variation of viscosity with time, was observed in all formulations, demonstrated by the presence of hysteresis area between ascending and descending curves of the rheograms. Regarding the hysteresis area, this was slightly greater in the case of formulations PEG/MNPs30 and PEG/MNPs35.

PEGs are hydrophilic materials and are extensively used in pharmacy. Solid PEGs in the mixture with liquid PEGs will lead to a white, pasty ointment with good solubility in water, good dissolving properties and suitable for many active substances¹⁴⁻¹⁶. It is well known that, the type of the base used in formulating of a topical medication markedly affects the permeability of drug. Numerous actives can be dissolved in PEGs resulting in a good bioavailability¹⁷⁻²¹. Polyethylene glycol (PEG) and PEG derivatives are the most effective and widely used polymer for improving nanomaterial stability²²⁻²⁶.

3.3 Water absorption capacity of ointment bases

All samples exhibit significant osmotic activity to distilled water (**Figure 3**). Incorporation of MNPs into the PEG mixture will decrease the water absorption activity of the formulations. As the content of active PEG decreases the activity of the samples naturally decreases.

The presence of a negative charge of Fe-O- groups

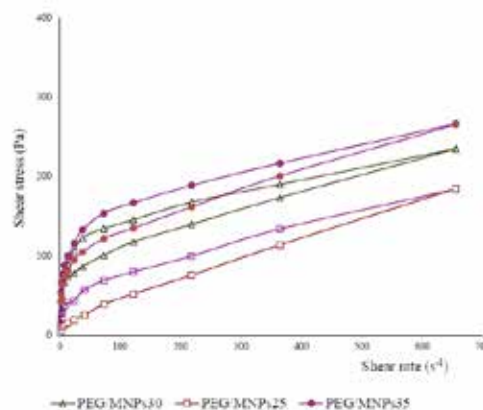


Figure 2. Rheogram for the ointment bases PEG 400/1500 mixture 9/1 with magnetite 25% (PEG/MNPs25), 30% (PEG/MNPs30) and 35% (PEG/MNPs35)

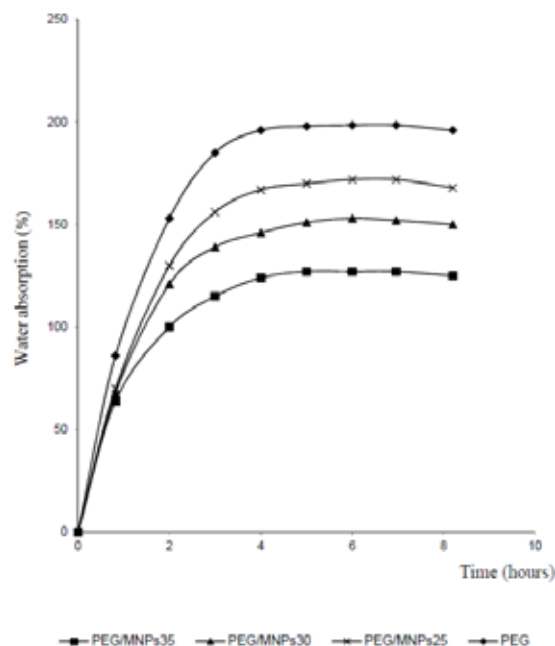


Figure 3. The water absorption activity of PEG 400/1500 mixture 9/1(PEG); the ointment bases PEG 400/1500 mixture 9/1 with magnetite 25% (PEG/MNPs25), 30% (PEG/MNPs30) and 35% (PEG/MNPs35)

on the surface of MNPs causes the disordering of intermolecular forces of colloidal solution. The effect of external magnetic field on absorption venues can

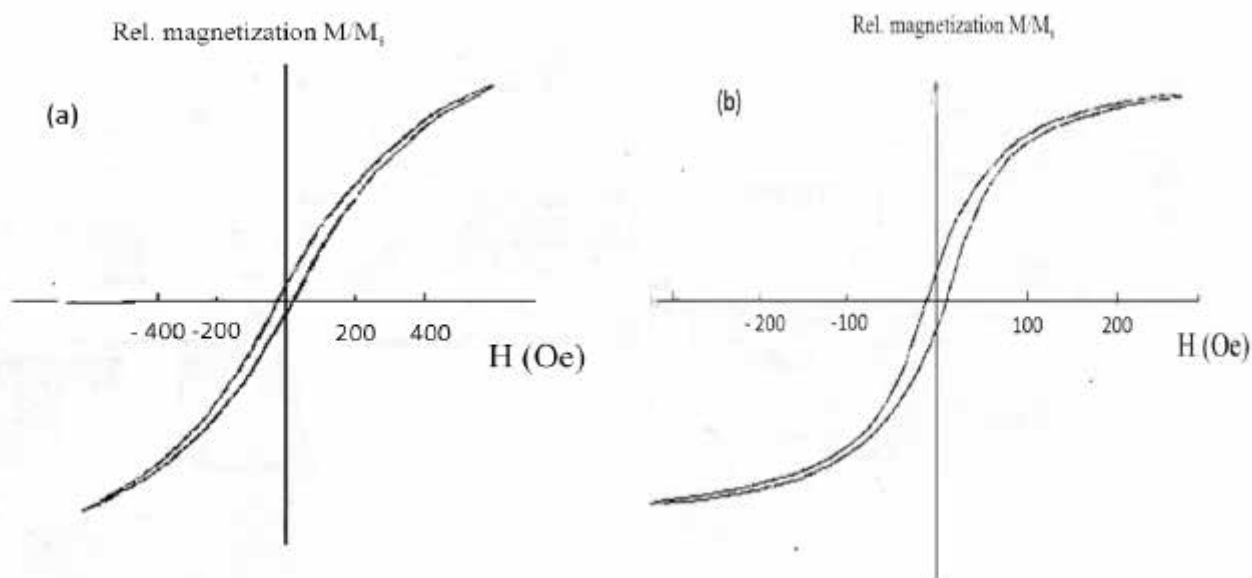


Figure 4. Normalized magnetization loops at temperatures of 300 K (a) and 77 K (b)

be expected. However, no significant differences were observed on the water absorption activity of the formulations under the influence of the magnetic field (100 mT). Reducing of the absorption properties has a positive effect, because it is well known that the hydrophilic compounds (such as PEG) can damage cell membranes causing rashes, dry skin, contact dermatitis and surface damage to the skin²⁷.

3.4 Magnetic characterization of the formulation PEG/MNPs30

Magnetic behavior was studied for the formulation III with the optimal content of magnetite 30% (**Figure 4**).

Figure 4 shows the magnetization versus field plot at temperatures of 300 K (a) and 77 K (b). It can be seen that hysteresis disappeared with a little remanence and coercivity (H_c), indicating the absence as a long range magnetic dipole-dipole interaction among the assemblies of superparamagnetic nanoparticles in the formulation at a room temperature. When the temperature was decreased to 77 K, the magnetization of the sample increased (from 5.32 emu/g till 6.24 emu/g) with a

symmetric hysteresis loop, and showed a transition from superparamagnetic to ferromagnetic behavior of MNPs in the sample ($H_c = 100$ Oe). The difference in the intensity of the saturation between 300 K and 77 K is due to the magnetic ordering of superparamagnetic particles of the low-coercivity phase. Such behavior is typical for magnetite nanoparticles of single-domain size²⁸.

Based on the fact, that magnetite has a high value of thermal conductivity ($9.7 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-129}$), it is reasonable to use the prepared ointment base as a thermal conductivity medium for cryotherapy of the tonsils. Use of such a magnetic formulation with its applying and fixing via an external magnet on the area of pathologies will allow improving the efficacy of cryogenic treatment and destruction, will provide good adhesion and contact of the tonsils with metal applicators through which a cryogen passes. As it is realized, the final temperature level would be significantly lowered, the maximum freezing rate will be increased.

4. Conclusion

In this study a magnetic system has been developed,

PEG/MNPs formulation with a good texture and magnetic properties which might be a suitable ointment base for target treatment of otorhinolaryngological infectious diseases such as tonsillitis or can be used alone (e.g. as thermal conductivity medium for cryotherapy). □

ACKNOWLEDGMENTS

REFERENCES

1. Krishnan K. Biomedical nanomagnetism: a spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Transactions on magnetic*. 46(7), 2523-2558, 2010.
2. Koppiseti V., Sahiti B. Magnetically modulated drug delivery systems. *Int.J.Drug Dev.* 3, 260-266, 2011.
3. Xu Y., Lin Y., Zhuang L., Lin J., Lv J., Huang Q., and Sun J. Bleomycin loaded magnetite nanoparticles functionalized by polyacrylic acid as a new antitumoral drug delivery system. *Biomed. Res. Int.* Article ID 462589, 5 pages. doi:10.1155/2013/462589, 2013.
4. Lokwani P. Magnetic particles for drug delivery: an overview. *Int. J. of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 2, 465-473, 2001.
5. Agnihotri J., Saraf S., Khale A. Targeting: new potential carriers for targeted drug delivery system. *Int.J.Pharm.Sci.Rev.* 8, 117-123, 2011.
6. Tartaj P., Morales M., Veintemillas-Verdaguer S., Gonz'alez T., Serna C. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* 36, 182-197, 2003.
7. Indira T.K., Lakshmi P.K. Magnetic Nanoparticles – A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* 3, 1035-1042, 2010.
8. Faraji M., Yamini Y., Rezaee M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *J.Iran Chem. Soc.* 7, 1-37, 2010.
9. Mahdavi M., Ahmad M. B., Haron M. J., Namvar F., Nadi B., Rahman M. Z., Amin J. Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules.* 18, 7533-7548, 2013.
10. Mascolo M. C., Pei Y., Ring T. A. Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials.* 6, 5549-5567, 2013.
11. Huang G., Deng B., Xi Q., Tao C., Ye L. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and its application for detection of anti-cea using electrochemiluminescent. *Med.Chem.* 5, 50-57, 2015.
12. Skevas T., Klingmann C., Sertel S., Plinkert P., Baumann I. Measuring quality of life in adult patients with chronic tonsillitis. *The Open Otorhinolaryngology J.* 4, 34-46, 2010.
13. Kahani S.A., Yagini Z.A. A comparison between chemical synthesis magnetite nanoparticles and biosynthesis magnetite. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2014, Article ID 384984, 7 pages, doi:10.1155/2014/384984, 2014.
14. Kello R. Polyethylene glycol-novel based nystatin and triamcinolone acetonide ointment. *Int. J. Pharm.Sci and Health Care.* 6, 1-5, 2014.
15. Chirife J., Herszage L., Joseph A., Bozzini J. P., Leardini N., Kohn E.S. In vitro antibacterial activity of concentrated polyethylene glycol 400 solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 24, 409-12, 1983.
16. Du J., Bandara H. M., Du P., Huang H., Hoang K., Nguyen D., Mogarala S. V., Smyth H. D. Improved biofilm antimicrobial activity of polyethylene glycol conjugated tobramycin compared to

The authors thank the Department of Otorhinolaryngology, Kharkiv National Medical University (Ukraine), especially Dr. A.S. Zhuravlev for helpful discussions and invaluable support.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests to disclose.

- tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol.Pharm.* 12, 1544–1553, 2015.
17. Donkor A. M., Bugri K. G., Atindaana E. A. Evaluation of antibacterial potentiation of crude extracts of *Phyllanthus amarus*, *Tamarindus indica* and *Cleome viscosa* and their formulation. *Int.J.Plant Res.* 4, 23–28, 2014.
 18. Peppas N. A., Hilt J. Z., Khademhosseini A., Langer R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* 18, 1345–1360, 2006.
 19. Xu W., Ling P., Zhang T. Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Int. J.Drug.Del.* 2013, Article ID 340315, 15 pages, doi:10.1155/2013/340315, 2013.
 20. Aukunuru J., Bonepally C., Guduri V. Preparation, characterization and optimization of ibuprofen ointment intended for topical and systemic delivery. *Trop.J.Pharm.Res.* 6, 855-860, 2007.
 21. Chaudhary A., Nagaich U., Gulati N., Sharma V.K., Khosa R.L. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* 2, 32-67, 2012.
 22. Pradhan P., Giri J., Banerjee R., Bellare J., Bahadur D. Preparation and haracterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *JMMM.* 311, 208-215, 2007.
 23. Nedelcu G. The heating study of two types of colloids with magnetite nanoparticles for tumours therapy. *Dig. J. Nanomater. Biostructures.* 3, 99-102, 2008.
 24. Sun J., Zhou S., Hou P., Yang Y., Weng J., Li X. Synthesis and characterization of biocompatible Fe_3O_4 nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 10, 333-341, 2006.
 25. Gupta A. K., Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Transactions on Nanobioscience.* 3(1), 66-73, 2004.
 26. Deng J., Ding X., Zhang W., et al. Magnetic and conducting Fe_3O_4 – cross – linked polyaniline nanoparticles with core-shell structure. *Polymer.* 43, 2179-2184, 2002.
 27. Nielsen J. B. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. *Arch. Dermatol. Res.* 296(12), 560–567, 2005.
 28. Brem F., Hirt A.M., Simon C., Wieser H-G., Dobson J. Low temperature magnetic analysis in the identification of iron compounds from human brain tumour tissue. *J. Phys.* 17, 61-64, 2005.
 29. R. Magnus. Processing and properties of magnetite-rubber blends. *Elastomers and Plastics.* 6, 322-329, 2003.



Youden's test of the chromatographic determination of bisoprolol in dosage forms

Liliya Logoyda^{1*}, Larysa Kravchuk², Andriy Sverstiuk³, Sofia Maslii⁴, Lyudmyla Vons⁴, Yuriy Soroka⁵, Roman Ciciura⁶, Olha Poliak¹, Nadiya Zarivna¹

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

²Department of General Chemistry, I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

³Department of Medical Informatics, I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

⁴Department of Internal Medicine №3, I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

⁵Department of Anaesthesiology and Intensive-Care Medicine, I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

⁶Department of Disaster and Military Medicine, I. Ya. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

KEYWORDS:
bisoprolol, High-Performance Liquid Chromatography, validation, robustness, Youden's test

ABSTRACT

Introduction. Analytical method development is a continuous process that progresses in parallel with the evolution of the drug product. The ruggedness or robustness of an analytical method is a measure of its capacity to reproduce results when the procedure is repeated under different circumstances. Robustness should be considered a property of the experimental optimum used in an analytical procedure. **The aim of the study** was to evaluate the robustness of determination of bisoprolol in tablets using Youden's test for HPLC method development. **Research methods.** An efficient method to assess the robustness of analytical methods by Youden's test, by means of an experiment design which involves seven analytical parameters combined in eight tests. In the recent studies, we assessed the robustness of a chromatographic method to quantify bisoprolol in tablets using Youden's test. **Results and discussion.** By using the Youden's test criteria, HPLC method showed to be greatly robust concerning bisoprolol content, at the introduction of variation in seven analytic parameters. The lowest variation in enalapril content was 0.91 %, when was used column Waters Symmetry C18 column (3.9 mm i.d. X 150 mm, 5 µm). For the first time, a holistic approach involving simultaneous innovations in particle technology and instrument design was endeavored to meet and tackle the issues of the analytical laboratory. This was done in order to make analytical scientists more successful and businesses more profitable and productive. **Conclusions.** Youden's test proved to be an efficient and helpful tool for the robustness evaluation of HPLC method for assay of bisoprolol in dosage forms. The main advantage of

* CORRESPONDING AUTHOR:

Liliya Logoyda - PhD, DSc, Head of Department of Pharmaceutical Chemistry
I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine,
Ternopil, Ruska, 36
email: logoyda@tdmu.edu.ua

Youden test is the fact that it keeps the required time and effort to a minimum, since only a limited number of determinations have to be made, using combinations of the chosen investigated factors. Hence, the method can be readily and conveniently applied for routine analysis of quality control of bisoprolol in its dosage form and can be used for dissolution studies.

Introduction

Analytical methods are intended to establish the identity, purity, physical characteristics and potency of drugs. Methods are developed to support drug testing against specifications during manufacturing and quality release operations, as well as during long-term stability studies. Methods may also support safety and characterization studies or evaluations of drug performance. Analytical method development is a continuous process that progresses in parallel with the evolution of the drug product. The notion of phase-appropriate method development is a critical one if time, cost and efficiency are concerns. The goal and purpose of the method should reflect the phase of drug development. During early drug development the methods may focus on API behavior. They should be suitable to support pre-clinical safety evaluations, pre-formulation studies, and prototype product stability studies. As drug development progresses, the analytical methods are refined and expanded, based on increased API and drug product knowledge. The methods should be robust and uncomplicated, while still meeting the appropriate regulatory guidelines¹.

It is a laborious, complex and straining process to evaluate the robustness of chromatographic method of analysis, taking into account the large number of analytical parameters of validation results that should be considered to carry out the test. Robustness High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) testing by the application of Youden's test and statistical analysis were applied to judge the method robustness. The main advantages of Youden's test is that it decreases

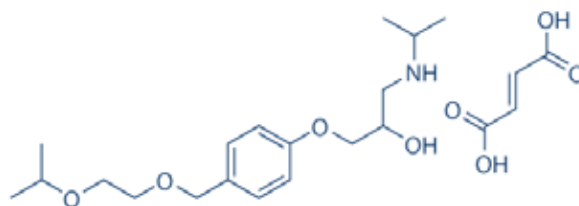


Figure 1: Chemical structure of bisoprolol fumarate

the required time and effort, since only a limited number of determinations have to be made, using combinations of the chosen investigated factors. This study yields useful information, being a fundamental part of method validation. The basic idea of Youden's test is not to study one alteration at time but to introduce several changes at once, in such a way that the effects of individual changes can be ascertained²⁻⁴.

Bisoprolol is a synthetic, beta1-selective (cardioselective) adrenoceptor blocking agent without significant membrane stabilizing activity or intrinsic sympathomimetic activity in its therapeutic dosage range. The chemical name of bisoprolol fumarate is 1-(propan-2-ylamino)-3-[4-(2-propan-2-yloxyethoxymethyl) phenoxy]propan-2-ol (**Fig. 1**)⁵. The two substituents present in the para position of the benzene ring might be the reason for its β_1 -adrenergic receptor selectivity. The most prominent effect of bisoprolol fumarate is the negative chronotropic effect, resulting in a reduction in resting and exercise heart rate. There is a fall in resting and exercise cardiac output with little observed change in stroke volume, and only a small increase in right atrial pressure, or pulmonary capillary wedge pressure at rest or during

Table 1: Analytical parameters and variations for the robustness study of HPLC method development of bisoprolol

Parameter	Nominal condition				Variation		
A/a	Acetonitrile in mobile phase	25	-	A	35	-	a
B/b	Buffer solution pH 7.0 in mobile phase	75	-	B	65	-	b
C/c	pH of buffer solution in mobile phase	7.0	-	C	7.7	-	c
D/d	Column temperature, °C	35	-	D	40	-	d
E/e	Mobile phase flow rate, ml/min	1.4	-	E	1.0	-	e
F/f	Column supplier	Waters Symmetry C18 column	-	F	Nucleosil C18	-	f
G/g	Chromatograph model	Agilent 1290	-	G	HP 1100	-	g

exercise.

The aim of the work was to study the robustness of HPLC method for the quantitation of bisoprolol, using Youden's test, and determine the analytical parameters that present greater influence in the final results of the HPLC method development.

Methods

Chemicals and reagents

Bisoprolol fumarate was obtained as a gift from Farmak pharmaceuticals (Kiev, Ukraine). HPLC grade acetonitrile, triethylamine, ammonium phosphate, orthophosphoric acid were obtained from Merck pharmaceuticals.

Instrumentation and chromatographic conditions

Waters Symmetry C18 column (3.9 mm i.d. X 150

mm, 5 μ m). Chromatographic separation was carried out at ambient temperature (22°C - 25°C). The compound was separated isocratically with a mobile phase consisting of acetonitrile and phosphate buffer solution pH 7.0 (25/75, v/v) at a flow rate 1.4 mL/min with injection volume 10 μ L. The effluent was monitored spectrophotometrically at wavelength 226 nm.

Preparation of mobile phase

To prepare phosphate buffer solution pH 7.0.: 6.60 g of ammonium phosphate dissolve in 980 mL of water, add 2.0 mL of triethylamine, fix the pH of the solution to the value (7.0 $\pm$ 0.05) with phosphoric acid, and then add the volume of the solution with water P to 1000.0 mL and mix.

Stock standard solutions

Primary stock solutions of bisoprolol fumarate

Table 2: Factorial combinations of the analytical parameters for robustness study in HPLC method development

Analytical parameter Parameter	Factorial combination							
Acetonitrile in mobile phase	A	A	A	A	a	a	a	a
Buffer solution pH 7.0 in mobile phase	B	B	b	b	B	B	b	b
pH of buffer solution in mobile phase	C	c	C	c	C	c	C	c
Column temperature	D	D	d	d	d	d	D	D
Mobile phase flow rate	E	e	E	e	e	E	e	E
Column supplier	F	f	f	F	F	f	f	F
Chromatograph model	G	g	g	G	g	G	G	g
Result	s	t	u	v	w	x	y	z

was prepared daily separately by dissolving 25 mg of each in 250 mL volumetric flasks (0.1 mg/mL) in mobile phase. Limits of the range of application of the procedure were determined from 70% to 130% to the nominal concentration of bisoprolol fumarate (0.1 mg/mL) in the test solution.

Procedures

The standard solutions were prepared by dilution of the stock standard solution with mobile phase. Triplicate 20.0 μ L injections were made for each concentration and chromatographed under the condition described above. The peak area of each concentration was plotted against the corresponding concentration to obtain the calibration graph and regression equation was computed.

Results and discussion

The robustness evaluation of HPLC method de-

velopment for bisoprolol assay was studied using the method proposed by Youdene Steiner. Youden's test was applied to examine seven analytical parameters for HPLC method development. Then, eight runs were performed with goal to determine the effect of each parameter in the finishing result. The seven analytical parameters have been employed, as well as the introduced variations are demonstrated at table 1. The analytical conditions at the nominal values are represented by capital letters and the conditions with the small variation are represented by lowercase letters.

The seven parameters and its respective variations were combined in eight assays or chromatographic runs, performed in a random order. Table 2 demonstrates the factorial combination of the parameters for the Youden's test. The analyses results are shown by letters from s to z. Hence, when combination 1 was studied, the obtained result was s. When combination 2 was assayed, the obtained result was t, and so successively.

Table 3: Difference in effects of the analytical parameters in content and retention time (Rt) for bisoprolol HPLC quantitation

Effect	Content (%)	Rt (min)
Acetonitrile in mobile phase	0.21	-0.37
Buffer solution pH 7.0 in mobile phase	0.26	-0.31
pH of buffer solution in mobile phase	0.42	0.45
Column temperature	-0.05	0.05
Mobile phase flow rate	-0.03	0.05
Column supplier	0.91	-2.05
Chromatograph model	-0.02	0.05

In each combination, three injections of each sample and standard solutions were carried out at the working concentration. After the alteration of chromatographic column or mobile phase composition, there was a waiting of 30 min for system stabilization. The evaluated results in each combination were peak area, retention time (Rt), tailing factor (T), theoretical plates number (N) and enalapril content.

For evaluating the effect of the column temperature in the final result of the analyses, the following equation 1 was used:

$$\text{Effect } C/c = (s + u + w + y) / 4 - (t + v + x + z) / 4. \quad (1).$$

Through the use of Youden's test, it is possible to establish certainly the parameters which present higher influence in the final result of the analyses and perform a more rigorous control in the eventual variations of these parameters that may occur during a routine analysis of quality control.

In our study, first trials were directed to find optimal chromatographic conditions for HPLC method development. Our objective of the chromatographic method development was to achieve a peak tailing factor <1.5, retention time in between 2 and 3 min, along with good resolution⁶⁻²³. In both equipments (Agilent 1290 and HP1100), were carried out simultaneously the assays for

the robustness study of the chromatographic method. The results obtained in the eight runs to bisoprolol sample and standard solutions.

The difference in effects of the parameter variations in the analysis results presented **Table 3**.

By using the criteria of Youden's test, HPLC method developed to be greatly robust regarding content of bisoprolol, when variations in seven analytical parameters were evaluated²⁴. The lowest variation in enalapril content was 0.91 %, when was used column Waters Symmetry C18 column (3.9 mm i.d. X 150 mm, 5 µm).

A holistic approach involving simultaneous innovations in particle technology and instrument design was endeavored to meet and tackle the issues of the analytical laboratory in quality control. This was done in order to make chemical scientists more successful and businesses more profitable and productive. Symmetry® LC Columns are manufactured using high purity silica and tightly controlled manufacturing processes to ensure that you receive a column that exceeds the standards for HPLC column performance. Symmetry® C18 columns feature monofunctionally bonded C18 ligands on a high purity base-deactivated silica. Symmetry® columns have the tightest column specifications in the industry giving resulting

highly reproducible chromatographic results.

CONCLUSION

Youden's test proved to be an efficient and helpful tool for the robustness evaluation of HPLC method for assay of bisoprolol in dosage forms. The main advantage of Youden test is the fact that it keeps the required time and effort to a minimum, since

only a limited number of determinations have to be made, using combinations of the chosen investigated factors. Hence, the method can be readily and conveniently applied for routine analysis of quality control of bisoprolol in its dosage form and can be used for dissolution studies. □

Source of Support: Nil. Conflict of Interest: None declared.

REFERENCES

1. <https://lubrizolcdmo.com/technical-briefs/analytical-method-development-and-validation/>
2. Youden W.J., Steiner E.H. (1975) Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington: the Association of Official Analytical Chemists; pp. 33-36, 70-71, 82-83.
3. da Costa Cesar I., Pianetti G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Braz. J. Pharm. Sci.* 45,235-40, 2009.
4. Karageorgou E., Samanidou V. Youden test application in robustness assays during method validation. *J. Chromatogr. A.* 1353, 131-9, 2014.
5. United States Pharmacopoeia (USP). Medicare Prescription Drug Benefit Model Guidelines Source Information. Available from: <http://www.nlm.nih.gov>. Accessed 13 Jan 2019.
6. Arjun G., Sathis K.D., Bindu M.B., Naga M.M., Ramalingam R., RavinderNath A. A simple HPLC method for quantitation of bisoprolol fumarate in tablet dosage form. *Indian Drugs.* 46,39-42, 2009.
7. Yadav S.S., Rao J.R. Simultaneous HPTLC analysis of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5,286-90, 2013.
8. Joshi S.J., Karbhari P.A., Bhoir S.I., Bindu K.S., Das C. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 362-71, 2010.
9. Shaikh S., Thusleem O.A., Muneera M.S., Akmal J., Kondaguli A.V., Ruckmani K. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48:1055-7, 2008.
10. Patel L.J., Suhagia B.N., Shah P.B., Shah RR. Simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet dosage form by RP-HPLC method. *Indian J Pharm Sci.* 2006;68:635-8.
11. Vora D, Kadav A. Development and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70:542-6.
12. Bozal B, Gumustas M, Dogan-Topal B., Uslu B., Ozkan S.A. Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *J. AOAC Int.* 96,42-51, 2013.
13. Kondratova Y., Logoyda L., Voloshko, Y., Abdel-Megied A., Korobko D., Soroka Y. Development and validation of HPLC-DAD method for the determination of bisoprolol in tablet dosage forms. *Int. J. App. Pharm.* 9 (6), 54-59, 2017.
14. Logoyda L., Korobko D., Oleshchuk O., Proniv T., a Dmutriv M.. A HPLC MS/MS method development and validation for the simultaneous determination of bisoprolol and enalapril in the pres-

- ent of enalaprilat in human plasma. *Int. J. Appl. Pharm.* 10 (2), 31-40, 2018.
15. Polyauk O., Logoyda L. The investigation of conditions of API from group of calcium channel blockers extraction by organic solvents by using high-performance liquid chromatography as assay method. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 10(10), 354-356, 2017.
 16. Logoyda L., Korobko D. A high-performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method development for the quantitative determination of bisoprolol from Caco-2 cell monolayers. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 11 (4), 386-389, 2018.
 17. Logoyda L., Abdel-Megied A.M., Kondratova Y., Trofimenko O., Korobko D., Dakhym I. Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of enalapril maleate in present of their impurities: application to tablet analysis. *Int. J. Appl. Pharm.* 10(1), 98-102, 2018.
 18. Logoyda L. Efficient validated method of HPLC to determine enalapril in combined dosage form containing enalapril and bisoprolol and in vitro dissolution studies *Int. J. Appl. Pharm.* 11(4), 19-24, 2019.
 19. Logoyda L., Kovalenko S., Abdel-Megied A.M., Zhulkevych I., Drapak I., Demchuk I., Netsyuk O. HPLC method development for the analysis of bisoprolol in combined dosage form containing bisoprolol and enalapril and in vitro dissolution studied. *Int. J. Appl. Pharm.* 11(3), 186-194, 2019.
 20. Logoyda L. A HPLC-MS/MS method development and validation for the simultaneous determination of nifedipine and enalapril in human plasma. *Int. J. Appl. Pharm.* 10(4): 35-42, 2018.
 21. Logoyda L. Bioanalytical method development and validation from the simultaneous determination of verapamil and enalapril in the presence of enalaprilat by HPLC MS/MS. *Int. J. Appl. Pharm.* 10(3): 19-27, 2018.
 22. Logoyda L., Kovalenko S., Gaafar M., Abdel-Megied A.M., Elbarbry F.A. A validated LC-MS/MS method for the quantification of amlodipine, bisoprolol, enalapril and enalaprilat – Application to pharmacokinetic study in healthy volunteers. *Microchem. J.* 155, 104700, 2020.
 23. Smiyan S., Galaychuk I., Zhulkevych I., Nykolyuk V., Komorovsky R., Gusak S., Bilozetsky I. Sjögren's syndrome and lymphadenopathy unraveling the diagnosis of Lyme disease. *Reumatologia.* 57(1), 59-62, 2019
 24. ICH Q2 (R1), Validation of analytical procedures, Text and methodology. International Conference on Harmonization, Geneva; 2005. p. 1-17. Available from: [http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF) Accessed 18 Jul 2019.



Influence of *Nelumbo Nucifera* Extracts on Exploratory and Despair Behavior of Rats

Natalya A. Lomteva^{*1}, Elena I. Kondratenko¹, Saule K. Kasimova¹, Marina V. Mazhitova²,
Ludmila A. Yakovenkova¹

¹Department of Physiology, Morphology, Genetics and Biomedicine, Astrakhan State University, Astrakhan, 414000, 1 Shaumyana Sq., Russian Federation,

²Department of Chemistry of Pharmaceutical Faculty, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000, 121 Bakinskaya, Russian Federation

KEYWORDS:

Nelumbo nucifera;
extract; seed; leaf; petal;
fruit; neurocognitive
functions; exploratory
behavior; despair
behavior

ABSTRACT

The present study was aimed at the experimental research of the psychotropic action of the seeds, leaves, petals and fruit extracts of *Nelumbo nucifera* grown in Astrakhan. In the article we study general motor activity, exploratory behavior, anxiety and behavior of despair of adult rats after treatment with extracts of seeds, leaves, petals and fruits of *Nelumbo nucifera*. The animals of experimental groups received intragastric *Nelumbo nucifera* extracts for 14 days. Exploratory behavior and anxiety of rats were studied using Suok-test. Despair behavior of rats was studied using Porsolt test. It was found that seeds, leaves, petals and fruits extracts of *Nelumbo nucifera* contributed to the activation of exploratory behavior patterns and to a decrease of anxiety in animals in the Suok-test. More significantly, the behavior of animals in the Suok test was altered by the action of extracts of petals and fruits of the *Nelumbo nucifera*. These extracts have shown antidepressant activity in Porsolt test. The fruit extract of *Nelumbo nucifera* showed the most vivid antidepressant properties.

* CORRESPONDING AUTHOR:

Elena I. Kondratenko,
e-mail: kondratenko.asu@bk.ru

1. Introduction

Prevention of disorder of the higher integrative functions of the brain, learning and memory processes is an urgent problem of medicine and health care. Every year, there is an increase in mental and neurological disorders that arise as a result of a constant increase in the influence of stress factors¹. In this regard, one of the tasks is the development and implementation of new preventive and therapeutic and recovery technologies with the initial forms of violations of higher brain functions.

Herbal substances have a wide spectrum of bio-

logical activity and low toxicity, so they are promising for pharmacological correction and prevention of functional disorders of the nervous system. It was interesting for us to research *Nelumbo nucifera*. *Nelumbo nucifera* Gaertn. Nymphaeaceae also known as sacred lotus is a large aquatic herb with stout, creeping rhizome found throughout India. *Nelumbo nucifera* is native in China, Japan and possibly India. Almost all parts of the lotus plant are eaten as vegetable and also used in the indigenous medical system. *Nelumbo nucifera* is a part of more than two hundred preparations of Chinese and Indian medicine. *Nelumbo nucifera* is reported to possess an an-

tidiarrhoeal, psychopharmacological, diuretic, antipyretic, antimicrobial, hypoglycemic qualities. Its biologically active substances have different effects: adaptogenic, antidepressant, sedative^{2,3}, lipid-lowering⁴, anticarcinogenic^{5,6} and others^{2,7,8}. Antioxidant activity of various parts of *Nelumbo nucifera* is well determined, e.g. leaves^{8,9,10}, stamens¹¹ and rhizomes³.

Large areas of the river Volga delta are occupied with *Nelumbo nucifera*, preserved from the preglacial period. The *Nelumbo* has a scientific value as a relic of the Gondwana flora that existed more than 100 million years ago (Mesozoic, late Cretaceous)¹². *Nelumbo nucifera* belongs to the Nelumbonaceae. The Astrakhan population of *Nelumbo* grows in shallow water areas of the Volga estuary along the banks of small rivers, in delta. It is gelofit, grassy long-rooting polycarpic, coastal-water hyperglyphophyte, hydrophyte¹³.

The major phytoconstituents provided by the *Nelumbo nucifera* are alkaloids like dauricine, lotusine, nuciferine, pronuciferine, liensinine, isoliensinine, roemerine, nelumbine and neferine. *Nelumbo nucifera* also contain flavonoids, saponins, phenolics and carbohydrate¹⁴.

In this study we explored the psychotropic effects of the *Nelumbo nucifera* extracts, which were realized through cholinergic, dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurotransmitter systems by activating cAMP in the hippocampus and prefrontal cortex.

So, the purpose of this article was an experimental study of the psychotropic action of the seed, leaf, petal and fruit extracts of *Nelumbo nucifera* grown in Astrakhan region.

2. Materials and methods:

Plant Material

Lotus seeds, leaves, petals and fruits were collected from natural resource in Astrakhan Nature Reserve (45°34'52" N, 47°54'59" E), Astrakhan Oblast, Russia. The specimens were identified by scientific staff of the Astrakhan Nature Reserve, Astrakhan Oblast, Russia.

Extracts Preparation

Seeds, leaves, petals and fruits of *Nelumbo nucifera* were separately ground to powder. Then, 20 g of powder was poured into 500 ml of 60% ethanol and placed for 3 hours at 60 ° C in the thermostat. After this, the alcohol was distilled off in a rotary evaporator. The extract solutions were administered to the animals intragastric by means of a probe for 14 days at a dose of 200 mg /kg.

Chemical Analysis of Extracts

In the received aqueous-alcoholic *Nelumbo nucifera* extracts, the total content of flavonoids was determined by thin layer chromatography with densitometry.

Preparation of solutions of standard samples.

1 mg of a standard sample of quercetin is dissolved in 5 ml of methanol in a pycnometer with a capacity of 10 ml. the Volume of the pycnometer is brought to the mark with methanol and thoroughly mixed. The resulting solution contains 100mg/l (Level 1) of quercetin.

From this solution, prepare standard solutions in methanol with concentrations of 25mg/l (Level 4); 50mg/l (Level 3) and 75mg/l (Level 2). Solutions are stable during the day.

Sample preparation. Stop-cystitis tablets of at least 3 pieces are weighed, the average weight of the tablet is obtained, then carefully crushed in a mortar and from the resulting powder, a 14-15 mg suspension is taken into a microcentrifuge tube of the Eppendorf type. 1 ml of methanol is added to a test tube with a sample attachment, thoroughly mixed on a shaker for 30 min and centrifuged for 3 min at 12000 rpm. carefully Select the 900 ml aliquot without touching the sediment and place it in a 2 ml vial.

Preparation of the chromatographic chamber and preparation of the eluent. The chromatographic chamber is lined with filter paper along the inner walls so that the lower part of the paper touches the bottom of the chamber.

10 ml of formic acid and 10 ml of water are placed

in a 250 ml measuring cylinder with a lapped stopper, thoroughly mixed and then add 50 ml of ethyl acetate and 30 ml of butanol, again thoroughly mixed. The eluent is introduced into the chromatographic chamber, while wetting the filter paper. The level of the mobile phase at the bottom of the chamber must be at least 1.0 mm and not more than 5.0 mm. the Saturation of the chamber is 1 hour at 20°C.

Preparation of chromatographic plates. Before working, the plates are washed with methanol (ascending method) to the upper edge, dried and activated at 120°C for 20 minutes in a drying Cabinet.

Application of standard samples and samples to the chromatographic plate. CAMAG ATS4 autosampler is used for applying samples.

The washed and activated plate is placed on the autosampler table. Vials with standard solutions and samples are placed in the autosampler tripod.

The distance from the application line to the lower edge of the plate is 15 mm. the Distance from the application point to the edges of the plate is 15 mm. the Total number of samples on a single plate of 10x15 cm (including standards) is up to 24 pieces. The applied volume of standard samples and test samples is 4 µl. The application is carried out with a 4 mm wide strip.

Separation of samples. The plate is placed in a pre-saturated chromatographic chamber and eluted, the length of the run is 4.5 cm. the Plate is dried for 5-10 minutes at room temperature (fume hood!), and then - in a drying Cabinet at a temperature of 85±30°C for 5 minutes. Then leave to Mature the plate for 6-12 hours at room temperature in a dark place.

Quantitative processing of the chromatogram. For quantitative processing of the chromatogram, a CAMAG TLC Scanner 3 scanning densitometer is used at a wavelength of 410 nm and a gap size of 2.00 x 0.2 mm.

Data reception and quantitative processing of the obtained results are carried out on a computer us-

ing the WinCATS program

The concentration of quercetin in the analyzed samples was calculated by the formula:

$$C \text{ mg/tab} = C_{\text{tlc}} (\text{mg/l}) \times P \times V(\text{ml}) \times m_{\text{T}} (\text{mg}) \times 0.001 / m_{\text{H}} (\text{mg})$$

$$C\% = C_{\text{tlc}} (\text{mg/l}) \times P \times V(\text{ml}) \times 0.1 / m_{\text{H}} (\text{mg}),$$

where $C_{\text{mg}} / \text{tab}$ – the concentration of quercetin in the sample, mg / tablet; $C\%$ – the concentration of quercetin in the sample, %; C_{tlc} – the concentration of quercetin in the sample, calculated by TLC calibration, mg / l; P – the dilution factor (used only in case of dilution of the extract); V – the volume of methanol in which the sample was extracted, ml; m_{T} – the mass of the tablet, mg; m_{H} – the sample weight for extraction, mg; 0.001 – is the conversion factor of l to ml; 0.1 – conversion factor to %.

The obtained solutions of extracts with the precipitate were divided into two fractions: 1 - liquid (G); 2 – sediment. The flavonoids were extracted from the precipitate with methanol for 30 minutes, centrifuged for 2 minutes at 16000 rpm, and the resulting methanol extracts were used for analysis (MeOH).

Experimental protocol

Animal care procedures were conducted in accordance with the guidelines set by the European Community Council Directives. The procedures used in this study stand in strict accordance with the European legislation and the guidelines of the National Institutes of Health on the use and care of laboratory animals, the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 199n of April 1, 2016 “On Approval of Laboratory Practice Rules” and the protocol of Ethical Committee of the FSBEI of HE “As-trakhan State Medical University” of the Ministry of Health of Russia No. 8 of November 24, 2015

To prove our hypotheses, we tested rats in the Suok and Porsolt tests. We studied general motor activity, exploratory behavior, anxiety and behavior of despair in adult rats after treatment with extracts of *Nelumbo nucifera*.

Experiments were carried out on 50 adult male rats (weighing about 200 g; $n = 10$ in each group). All the animals used in this study were experimen-

tally naive, housed 6-8 per cage with free access to food. The animals were maintained on a 12:12 h light/dark cycle. Behavioral testing was always conducted between 10.00 and 12.00 o'clock.

The animals were divided into 5 equal groups randomly as follows:

Group I, Control: only saline solution treated;

Group II, Test group I: received seeds extract of *Nelumbo nucifera*, 200mg/kg BW, administered intragastrically for 14 days;

Group III, Test group II: received leaves extract of *Nelumbo nucifera*, 200mg/kg BW, administered intragastrically for 14 days;

Group IV, Test group III: received petals extract of *Nelumbo nucifera*, 200mg/kg BW, administered intragastrically for 14 days;

Group V, Test group IV: received fruits extract of *Nelumbo nucifera*, 200mg/kg BW, administered intragastrically for 14 days.

Porsolt Test

The behavioral despair test (Porsolt forced swimming test) is a test, centered on a rodent's response to the threat of drowning, whose result has been interpreted as measuring susceptibility to negative mood[15,16]. It is commonly used to measure the effectiveness of antidepressants. In the forced swim test rats are placed in a small, confined space, such as a large graduated cylinder filled halfway with water. In our experiments we used a cylindrical plastic tank with a height of 50 cm, with an internal diameter of 38 cm, filled with water to a height of 38 cm, and a water temperature of $22 \pm 1^\circ \text{C}$. Initially, there is a period of vigorous activity during which the animal tries to escape. Eventually, the animal ceases vigorous activity and exhibits a characteristic immobility in which it only moves to maintain its head above water. This physical immobility is thought to be an indication of behavioral despair. Investigators measure the amount of time between the point when the animal is placed in the chamber and the onset of immobility. Testing time was 3 minutes. In the experiments were recorded the latency time to the first movement, the latent period to the first im-

mobility, the time of active and passive swimming, the refusal of active swimming — immobilization or "freezing" (considered as an experimental model of behavior depression or "despair behavior"), number of diving.

Suok-test

The light-dark modification of Suok test (ST) was constructed in accordance with the specifications published in Nature Protocols[17,18] and consisted of an aluminum rod, 2,4-m in length by 2 mm in diameter with four 60-W bulbs 40 cm above the rod (directed light) to illuminate the light part of the test, providing the only lighting in the experimental room. The rod was separated into two lengths of several 15-cm long segments on either side of a 30-cm long central zone and elevated to a height of 20 cm from the cushioned floor by two vertical stands. The experimental room was dimly lit during all tests. In all ST experiments, the rats were placed individually in the middle part of the test (snout facing either end) and their behaviors were observed for 5 min by an experienced observer, scoring the number (frequency) of anxiety and motor-related behaviors. The Suok test measures exploration, risk assessment behaviors, and sensorimotor integration; it was developed to target behavioral abnormalities that arise from pathways mediating anxiety and vestibular function.

We recorded the latent period (LP) of leaving the center; horizontal activity; vertical activity, orientation, the number of head dips, the number of missteps, the number of stops, the number of transitions and time spent in the dark and light compartments of Suok-test. Each group of animals was tested in ST once, 30 minutes after the last feeding by extracts' solutions.

Statistics

All results are shown as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by Student test for comparisons between experimental groups. A probability of less than 0.05 is considered as statistically significant.

Table 1: Concentration of quercetin and rutin in extracts, mg / l

<i>Nelumbo nucifera</i> extracts	flavonoid	Rf	X (average)
Fruits G	rutin	0.33	4.893 mg
	quercetin	0.77	27.26 mg
Leaves G	rutin	0.30	16.63 mg
	quercetin	0.77	25.64 mg
Petals G	rutin	0.28	29.50 mg
	quercetin	0.76	29.28 mg
Seeds G	rutin	-	-
	quercetin	0.77	15.01 mg
Fruits MeOH	rutin	-	-
	quercetin	0.78	14.85 mg
Leaves MeOH	rutin	-	-
	quercetin	0.78	43.12 mg
Petals MeOH	rutin	0.36	14.55 mg
	quercetin	0.77	16.64 mg
Seeds MeOH	rutin	-	-
		0.78	12.21 mg

3. Results and discussion

A chemical analysis was performed to determine the concentration of the main biologically active substances in *Nelumbo nucifera* extracts' samples obtained. Analysis of flavonoids content showed that extracts obtained from different parts of plants differed in the concentration of rutin and quercetin (**Table 1**). The concentration of flavonoids was studied in two fractions: in the liquid phase and in the MeOH precipitate. In the liquid phase, a small concentration of rutin was characteristic of the extract from the petals, the extracts were arranged in the following order: leaves - fruits. In the liquid phase of the *Nelumbo nucifera* seed extract rutin was not detected. The concentration of quercetin in the liquid phase was approximately the same in extracts of fruits, leaves and petals, whereas in the seed extract its concentration was slightly lower. In the

MeOH precipitate, rutin was found only in the petals' extract. The content of quercetin was maximal in the extract of the leaves of the *Nelumbo nucifera*, and then it was decreasing in the extracts of petals, fruits and seeds.

So, the rutin content in samples can be ranked as follows: **petals > leaves > fruits > seeds**.

And quercetin content in samples we can rank as follows: **petals > fruits > leaves > seeds**.

In this study, we explored behavioral and psychophysiological effects of *Nelumbo nucifera* extracts. Control and experimental rats were exposed to Suok and Porsolt tests to assess exploratory behavior, anxiety and behavior of despair.

In the Porsolt test rats after treatment to *Nelumbo nucifera* seeds' extract showed a decrease of latent period before the first movement, significant increase of the time of active swimming in the test ($p \leq 0.05$) and simultaneously reduction of immobi-

Table 2: The influence of *nelumbo nucifera* extracts on the behavior of despair in the porsolt test

Parameters	Control	seeds	<i>Nelumbo nucifera</i> extracts		
			leaves	fruits	petals
Latency period (sec)	1.3±0.28	1.0±0	1.4±0.16	3.0±1.21	0.7±0.18
The time of active swimming (sec)	63.1±16.71	136.6±19.96 *	64.6±17.71	156.5±6.62*	68.0±23.80
The time of passive swimming (sec)	16.9±2.10	13.6±2.26	11.6±2.17	14.4±2.60	9.3±2.51 *
The time of immobilization (sec)	4.8±1.13	0.5±0.32 *	2.0±0.47 *	0.7±0.67*	2.0±0.86
Time before 1-st immobilization (sec)	87.0±15.41	38.8±25.46	60.1±16.60	12.7±12.66*	54.7±21.48

lization time ($p \leq 0.01$), while the remaining parameters varied less significantly in comparison with control animals (**Table 2**).

Rats after treatment to *Nelumbo nucifera* leaves' extract displayed similar changes in behavior in the Porsolt test. The extract treatment decreased the despair behavior in the Porsolt test, while the immobilization time significantly decreased ($p \leq 0.05$).

Rats after *Nelumbo nucifera* fruits' extract treatment showed the most significant changes in the behavior of despair in the Porsolt test. Under the influence of the extract, there was a significant decrease in desperation patterns in the test. The time of active swimming significantly increased in test, while the time spent by the animals for immobilization and the time before the first immobilization reduced (**Table 2**).

The petals' extract of *Nelumbo nucifera* also changed the behavior of the animals in the Porsolt test, but these changes were less significant.

Thus, the fruits' extract of *Nelumbo nucifera* had the most obvious antidepressant properties. Extracts seeds, leaves and petals of *Nelumbo nucifera* also had antidepressant properties, but they were

less evident. So, we can rank the influence of *Nelumbo nucifera* extracts on rats in Porsolt test as follow: **fruits > seeds > petals > leaves**.

So, patterns of behavior of female rats in the Suok-test varied depending on the type of the extract. All of them caused an increase in the patterns of exploratory behavior and a decrease in the anxiety of female rats.

In the light part of the light-dark test, rats after treatment by *Nelumbo nucifera* seeds' extract displayed an increased number of head dips and time spent compared to controls. No significant differences in number of segments which travelled, vertical rears, orientation, defecation boli were detected between controls and rats with treatment to *Nelumbo nucifera* seeds extract (**Table 3**).

Rats after treatment to *Nelumbo nucifera* leaves' extract displayed an increased number of orientation, head dips, number of stops and latency to leave compared to controls. No significant differences in number of segments which travelled and missteps between controls and rats who got treatment to *Nelumbo nucifera* leaves extract were detected (**Table 3**).

Table 3: The influence of *nelumbo nucifera* extracts on the parameters of behavior in the light part of the suok test

Parameters	Control	seeds	<i>Nelumbo nucifera</i> extracts		
			leaves	fruits	petals
Latency to leave, sec	13.4±4.03	13.8±3.73	22.3±7.01	13.1±3.05	11.7±4.21
Horizontal activity (number of sectors visited)	4.5±1.76	3.8±1.38	4.8±1.26	6.0±1.87	11.8±3.11*
Vertical activity (number of vertical rears)	0.2±0.22	0.1±0.11	0	0.1±0.11	0
Orientation (side-directed exploration)	0.7±0.27	1.5±0.54	2.2±0.47*	3.1±1.03*	2.8±0.71
Head dips (number of exploratory looks down)	1.7±0.75	2.8±0.91	4.0±1.48	7.0±2.21*	5.3±0.82*
Time spent, sec	72.1±15.79	90.1±21.29	73.5±24.57	132.7±20.38*	148.2±22.59*
Number of missteps	1.4±0.24	0.5±0.14*	0.7±0.46	2.5±0.72	1.8±0.51
Stopping activity (number of stops)	1.4±0.46	1.6±0.58	4.0±1.06*	3.4±0.94*	2.6±0.83

Extract of *Nelumbo nucifera* fruits led to similar but more prominent changes. In the light part of the light-dark test, rats after treatment to *Nelumbo nucifera* fruits extract displayed a significant increase of number of orientation, head dips, stops and time spent compared to controls. No significant differences in number of vertical rears and missteps between controls and rats after treatment to *Nelumbo nucifera* fruits' extract were detected (**Table 3**).

Rats after treatment to *Nelumbo nucifera* petals' extract displayed an increased number of sectors visited, orientation, head dips, number of stops and time spent compared to controls (Table 3). So, we can rank the influence of *Nelumbo nucifera* extracts on rats in light part of the Suok-test as follow: **petals**

> fruits > leaves > seeds.

In the dark compartment of the Suok-test, there was a similar effect of all studied *Nelumbo nucifera* extracts on rats' behavior (**Table 4**).

In the dark part of the light-dark Suok-test, rats after treatment to *Nelumbo nucifera* seeds extract, as well as in the control group, showed an increase in the number of stops, head dips, orientation and the time spent in the compartment. Also these rats showed significant increase in the number of transitions, and a decrease in displacement activity to zero compared to control values.

Rats after treatment to *Nelumbo nucifera* petals' extract displayed an increase in horizontal activity, the number of stops and the number of head dips,

Table 4: The influence of nelumbo nucifera extracts on the parameters of behavior in the dark part of the suok test

Parameters	Control	seeds	<i>Nelumbo nucifera</i> extracts		
			leaves	fruits	petals
Horizontal activity (number of sectors visited)	4.7± 0.73	9.2± 2.02	6.1± 1.29	4.5± 1.41	9.1± 1.29
Vertical activity (number of vertical rears)	0.5± 0.29	0.2± 0.22	0.1± 0.11	0.1± 0.11	0
Orientation (side-directed exploration)	1.5± 0.32	2.7± 0.71	3.5± 0.61	1.7± 0.68	3.7± 1.04*
Head dips (number of exploratory looks down)	3.3± 1.08	5.6± 1.41	6.3± 1.33	3.5± 0.99	6.6± 1.94
Time spent, sec	109.3± 22.35	166.9± 27.27	202.9± 33.71*	117.6± 24.14	153.3± 29.46
Number of missteps	1.7± 0.36	1.8± 0.27	1.8± 0.42	1.8± 0.53	2.3± 0.84
Stopping activity (number of stops)	1.8± 0.53	2.6± 0.60	4.6± 0.84*	2.8± 0.90	3.6± 0.83
Transitions	1.0± 0.27	2.7± 0.76*	1.3± 0.28	1.1± 0.35	1.8± 0.11

orientation and the number of transitions between compartments in comparison with the control group.

In the dark compartment of the Suok-test, rats after treatment to *Nelumbo nucifera* leaves extract displayed an increase in horizontal activity, the number of stops and the number of head dips, orientation, and the time spent in the dark compartment of the test in comparison with control animals. So, according to the data obtained, we can rank the influence of *Nelumbo nucifera* extracts on rats in dark part of the Suok-test as follow: **petals > leaves > seeds > fruits**.

Thus, biologically active substances of fruits, petals, leaves and seeds of *Nelumbo nucifera* had a similar influence on the behavior of animals in the Suok-test. Their orientation-exploratory behavior was activated, while the emotionality and anxiety level

of the rats under the influence of the biological active substances of *Nelumbo nucifera* was decreased, but the degree of these changes depends on the type of the extract.

The most prominent effect on psychophysiological indicators was typical for petals and fruits *Nelumbo nucifera* extracts, and the highest content of rutin and quercetin according to the results of chemical analysis was detected in them. It is necessary to note that ranks of *Nelumbo nucifera* extracts influence in light part of the Suok-test are the same as ranks of quercetin content in samples, so we can suppose that quercetin content can play the main role in samples' activity in this test. On the other hand, some differences in ranks of rutin and quercetin content and ranks of samples' activity in other tests allows us to suppose their complex activity or an additional activity of other known biologically

active substances[7, 14] found in *Nelumbo nucifera* extracts. □

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported within the framework

of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia № 6.9031.2017/8.9. We express our gratitude to this organization. Authors thank Dr. K.V. Litvinov, Deputy Director for Science of Astrakhan Nature Reserve, Astrakhan Oblast, for collection and identifying of the collected plant material.

REFERENCES

1. Santana L.A., Fontenelle L.F. Review of studies concerning treatment adherence of patients with anxiety disorders. *Patient Prefer. Adherence* 5, 427-39, 2011;.
2. Mukherjee P.K., Balasubramanian R., Saha K., Saha B.P., Pal M. A review of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Ancient Sci. Life* 15:268-76, 1996.
3. Mukherjee P.K., Saha K., Balasubramanian R., Pal M., Saha B.P. Studies on psychopharmacological effects of *Nelumbo nucifera* Gaertn rhizome extract. *J. Ethnopharmacol.* 54, 63-67, 1996.
4. Kondratenko E.I., Lomteva N.A., Mizhitova M.V., Samotrueva M.A. Comparative analysis of the hypolipidemic activity of extracts from sacred lotus. *Pharm. Chem. J.* 49 (7), 470-72, 2015.
5. Mukherjee D., Khatua T.N., Venkatesh P., Saha B.P., Mukherjee P.K. Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J. Ethnopharmacol.* 128, 490-94, 2010.
6. Jiang Y., Ng T.B., Liu Z., Wang C., Li N., Qiao W., Liu F. Immunoregulatory and anti-HIV-1 enzyme activities of antioxidant components from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome. *Biosci. Rep.* 30(5), 381-90, 2011.
7. Abdelhamid M.S., Kondratenko E.I., Lomteva N.A. GC-MS analysis of phytocomponents in the ethanolic extract of *Nelumbo nucifera* seeds from Russia. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5(4), 115-18, 2015.
8. Jung H., Jung Y.J., Yoon N.Y., Jeong D.M., Bae H.J., Kim D.-W., Na D.H., Choi J.S. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation endproducts formation, and oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3818-26, 2008.
9. Choe J.H., Jang A., Choi J.H., Choi Y.-S., Han D.-J., Kim H.-Y., Lee M.-A., Kim H.-W., Kim C.-J. Antioxidant activities of lotus leaves (*Nelumbo nucifera*) and barley leaves (*hordeum vulgare*) extracts. *Food Sci. Biotechnol.* 19, 831-36, 2010.
10. Wu M.J., Wang L., Weng C.Y., Yen J.H. Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Am. J. Chin. Med.* 31 (5), 687-98, 2003.
11. Jung H.A., Kim J.E., Chung H.Y., Choi J.S. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Arch. Pharm. Res.* 26 (4), 279-85, 2003.
12. Gukov G.V., Zinoviev A.S. The experience of growing and introducing a lotus in Primorsky Krai. *Vestnik KrasGAU* 4, 52-57. (in Russ.), 2010.
13. Laktionov A.P. Flora Astrakhanskoi oblasti, [Flora Astrakhan region], Monograph Astrakhan, 2009 (in Russ.).
14. Mukherjee P.K., Mukherjee D., Maji A.K., Rai S., Heinrich M. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) – phytochemical and therapeutic profile. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 407-22, 2009.
15. Sugimoto Y., Furutani S., Nishimura K., Itoh A. et al. Antidepressant-like effects of neferine in the forced swimming test involve the serotonin1A receptor in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 634, 62-67, 2010.
16. Yankelevitch-Yahav R., Franko M., Huly A., Doron R. The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. *J. Vis. Exp.* 97, e-52587, 2015.
17. Kalueff A.V., Tuohimaa P. The Suok («ropewalking») murine test of anxiety. *Brain Res. Protoc.* 14, 87-99, 2005.
18. Kalueff A., Keisala T., Minasyan A., Kumar S.R., LaPorte J.L., Murphy D., Tuohimaa P. The regular and light-dark Suok tests of anxiety and sensorimotor integration: Utility for behavioral characterization in laboratory rodents. *Nature protocols* 3, 129-36, 2008;.

