

**НАЦИОНАЛНА СПОРТНА АКАДЕМИЯ „ВАСИЛ ЛЕВСКИ”**  
**ФАКУЛТЕТ „ СПОРТ“, КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ“**

---



# **АВТОРЕФЕРАТ**

**София, 2020**

**НАЦИОНАЛНА СПОРТНА АКАДЕМИЯ „ВАСИЛ ЛЕВСКИ”**  
**ФАКУЛТЕТ „ СПОРТ“, КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ**

---

**Таня Запрянова Шейтанова**

**Анализ на стероидния профил на спортуващи  
и неспортуващи българи**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за придобиване на образователна и  
научна степен „ДОКТОР” по научна специалност „Теория и  
методология на спортната наука“, професионално  
направление 7.6. „Спорт“

Научен ръководител:  
доц. д-р Любомир Петров, доктор

Рецензенти:  
Проф. Вихрен Бачев, дн  
Доц. Милка Милева, дф

София 2020

Дисертационния труд е обсъден и насрочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Физиология и биохимия“ към факултет „Спорт“ на НСА „Васил Левски“ – София, състоял се на 16.12.2020 г. Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 24.02.2021 година от 15:00 часа в зала А3 в НСА „Васил Левски“ – Студентски град.

Дисертационния труд се състои от четири глави. Съдържа 177 страници, 380 цитирани литературни източници, 13 фигури, 24 таблици.

Тема на дисертационния труд за присъждане на ОНС Доктор:

## АНАЛИЗ НА СТЕРОИДНИЯ ПРОФИЛ НА СПОРТУВАЩИ И НЕСПОРТУВАЩИ БЪЛГАРИ

Таня Запрянова Шейтанова

Защитата на дисертационния труд ще се състои пред

Научни жури:

1. Доц. Милена Георгиева Николова, доктор, НСА „Васил Левски“, София
2. Проф. Вихрен Стойчев Бачев, дпн, НСА „Васил Левски“, София
3. Доц. Милка Милчева Милева, дф, Институт по Микробиология, БАН, София
4. Доц. Албена Георгиева Йорданова, доктор, Медицински Факултет на СУ, София
5. Проф. Росица Николова Замфирова-Митова, доктор, Институт по Невробиология, БАН, София

Област на висше образование: 7. „Здравеопазване и спорт“ Професионално направление: 7.6 „Спорт“

Забележка: използваните номерации на глави се запазват както при разработения дисертационен труд.

## УВОД

Анаболните андрогенни стероиди (AAS) са от съществено значение за адаптацията на организма към физически натоварвания. Освен, че проявяват действие водещо до интензивен белтъчен синтез, ускорен мускулен растеж и увеличаване на физическата сила, намаляване на подкожната мастна тъкан и ускорено възстановяване, AAS блокират глюкокортикоистероидните рецептори (GR), с което показват и антикатаболни свойства (Kisman, 2008). Поддържането на оптимални андрогенни нива зависи от баланса между биосинтеза и метаболитния клирънс и екскрецията им. Това подтиква някои спортуващи към употребата на стероидсъдържащи препарати за подпомагане на възстановяването и постигане на по-високи спортни постижения.

От друга страна, натрупаните данни за доказани нежелани странични ефекти от употребата на AAS, заедно с повишаващите спортните постижения действия, стават причина за включването им в Забранителния списък на WADA.

За откриването на екзогенно приложени синтетични аналози на андрогените стероиди (тестостерон, 5 $\alpha$ -дихидротестостерон (ДХТ) или 4-андростендион (андростендион) се следят промените в биомаркерите на уринния стероиден профил. Първоначално, разграничаването на ендогенния тестостерон от този с екзогенен произход е установявано чрез гранична стойност на съотношението тестостерон/епитестостерон, а впоследствие е въведен GC/C/IRMS анализа и стероидния модул на Биологичния паспорт на спортиста (ABP). Статистиката на WADA от въведеното с ABP индивидуалното лонгитудинално проследяване на всеки спортист, чрез стероидния модул, показва множество атипични резултати, които се нуждаят от експертна оценка и по-нататъшно проследяване на профила. Освен допинга, многото други фактори (пол, възраст, етническа принадлежност, метаболитни особености, ензимна индукция или инхибиране, циркадни ритми и физическа активност) могат да оказват влияние върху биосинтеза, метаболизма и екскрецията на стероидите.

За спортната наука най-голям интерес представлява влиянието на физическите натоварвания върху обмяната на стероидите. Изучаването на този въпрос разкрива процесите на адаптация на хормоналната регулация в различни етапи от подготовката на спортистите.

В научната литература са публикувани много изследвания в кръв и урина на основните андрогени, андрогенните прекурсори и глюкокортикостероидите в кръвта – тестостерон, дехидроепиандростерон (ДХЕА) и кортизол, кортизон и на съотношения между тях като маркери за нивото и баланса на протичащите анаболни и катаболни процеси в организма, непосредствено преди и след различни по вид физически натоварвания, при използване на различни аналитични методи. Изследванията на активни андрогени, техни метаболити и прекурсори в урина чрез GC-MS при хора с различна по интензивност физическа активност са малко на брой и проведени с различни методики. Използването на валидиран метод за анализ на AAS обезпечава получаването на достоверни и възпроизводими резултати в различни лаборатории и позволява натрупване на голямо количество съпоставими данни.

Настоящата работа е насочена към количествено определяне на ендогенни стероиди чрез GC-MS метод, валидиран по изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA, от уринни проби на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи жени и мъже, с което да се демонстрират възможностите на уринния стероиден профил като инструмент за анализ на промени в стероидогенезата, свързани с физическите натоварвания.

Интерпретацията на данните от стероидния профил в урина може да даде по-детайлна информация за адаптацията на спортиста към физическите натоварвания въз основа на измененията в метаболизма на стероидите в хода на спортната подготовка и като неинвазивен метод да подпомогне контрола на тренировъчния процес.

## **2 ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ**

### **2.1 Цел на изследването**

Целта на дисертационния труд е да се направи сравнителен анализ на стероидния профил на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи жени и мъже на възраст от 18 до 30 години и да се определят подходящите биомаркери на адаптационните промени в стероидогенезата, свързани с физическите натоварвания.

### **2.2 Задачи на изследването**

За постигане на поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Анализ на специализираните източници по въпросите на стероидния профил на човека и влиянето, което оказват физическите натоварвания върху него.
2. Събиране на уринни проби от доброволци, жени и мъже, на възраст от 18 до 30 години, неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи.
3. Количествено определяне на стероиди в уринните проби чрез GC-MS метод, валидиран по изискванията на ISO 17025, ISL и TD EAAS на WADA.
4. Статистическа обработка на получените данни.
5. Характеристика и сравнителен анализ на стероидния профил при неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи (състезатели по плуване) 18-30 годишни мъже и жени.
6. Анализ на влиянието на физическите натоварвания върху биосинтеза и метаболизма на стероидите и формулиране на решаващи правила за определяне на адаптацията на стероидния метаболит към различни по интензивност тренировъчни програми.

### **2.3 Обект на изследването**

Обект на изследването е стероидният профил в урина при хора.

### **2.4 Предмет на изследването**

Предмет на изследването е анализа на промените в стероидния профил в урина на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи българи.

### **2.5 Изследвани лица**

Изследваните лица бяха 573 жени и мъже неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи на възраст от 18 до 30 години.

Групите на неспортуващите и спортуващите в свободното време жени и мъже бяха студенти от Университета по архитектура, строителство и геодезия (УАСГ) и Национална спортна академия (НСА) в София.

Групите на активно спортуващите жени и мъже включваха състезатели по плуване, трениращи от 8 до 10 пъти седмично и участващи редовно в национални и международни състезания.

Така бяха оформени 6 групи:

**F0** - 78 неспортуващи жени със средна възраст  $20,92 \pm 3,17$  години

**F1** - 76 спортуващите в свободното време жени със средна възраст  $21,84 \pm 3,87$  години

**F2** - 12 активно спортуващите жени със средна възраст  $19,40 \pm 2,27$  години

**M0** - 107 неспортуващи мъже със средна възраст  $21,03 \pm 2,95$  години,

**M1** - 228 спортуващите в свободното време мъже със средна възраст  $21,06 \pm 2,91$  години

**M2** - 12 активно спортуващите мъже със средна възраст  $19,50 \pm 3,79$  години.

Между сравняваните групи, достоверна разлика във възрастта беше установена само между спортуващите в свободното време и активно спортуващите жени ( $p < 0,05$ ). Наблюдаваната разлика от само 2,44 години в средната възраст, при жени на около 20 години, не може да бъде фактор, съществено повлияващ стероидния профил.

Изследвани са общо 190 уринни проби от доброволци жени и 383 от мъже. След анализ на получените резултати и съпоставка с валидационните параметри на метода и граничните стойности на стероидните концентрации и някои съотношения между тях според критериите WADA, на статистическа обработка са подложени резултатите от 149 проби на жени и 289 проби на мъже (виж Таблица 3, 4, 5, 6, 7 и 8).

## 2.6 Организация на изследването

Изследването беше проведено в периода от 2016 до 2018 година. Всички участници попълниха информирано съгласие за включване в изследването. Водещите заседнал начин на живот и неактивно спортуващите изследвани лица се самоопределиха като неспортуващи или спортуващи в свободното време (от 1 до 3 пъти седмично), респективно.

Уринните проби бяха събирани в стерилни пластмасови контейнери с обем 150 ml и съхранявани при минус  $20^{\circ}\text{C}$  до момента на провеждане на анализа. Пробите от неспортуващи и спортуващи в свободното време са събирани сутрин между 9 и 13 часа.

Активно спортуващите даваха проби веднъж седмично, в понеделник сутрин (между 8 и 10 часа), общо по 4 проби за период от един месец.

Изследването на уринните проби беше извършено в лабораторията за допингов контрол при антидопинговия център към министерството на младежта и спорта.

Беше измерено рН и относителното тегло на урината, след което беше извършено количественото определяне на ендогенните стероиди в урината.

За определяне на концентрациите на ендогенните анаболни андрогенни стероиди (AAS) беше използван валидиран вътрешнолабораторен метод, отговарящ на изискванията на ISO 17025, ISL и TD EAAS на WADA.

## 2.7 Метод за количествено определяне на стероиди в урина

Валидираният вътрешнолабораторен метод е предназначен за количествен анализ, чрез газова хроматография с мас спектрометрия на уринни проби след хидролиза, точно-течна екстракция и дериватизация (TD2014EAAS).

Използваната измервателна единица за концентрация на съответните AAS е ng/ml.

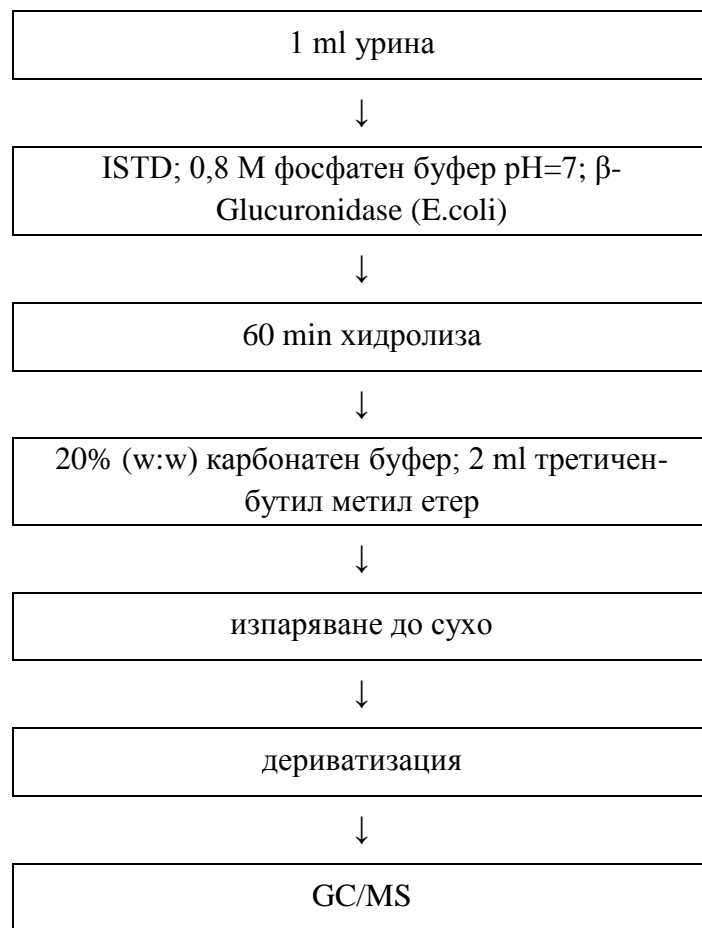
**Експериментален протокол:**

1. Пробоподготовка (**Фигура 1**): 1 ml урина е хидролизирана с  $\beta$ -Glucuronidase (E. coli K12) при pH=7,0 и 50°C за 1 h, след което е извършена течност-течна екстракция (LLE) с *tert*-бутил метилов етер (t-BME) при pH=9,6. Отделената органична фаза е изпарена до сухо, изсушена под вакуум и дериватизирана с 50  $\mu$ l MSTFA/NH<sub>4</sub>I/2-ME (500:1:3). Като вътрешни стандарти (ISTD) са използвани d5-Etiocholanolone, d3-Epitestosterone и d3-Testosterone.

2. Зареждане на пробите на GC/MS.

3. Анализ на пробите и обработка на суровите данни за определяне на концентрациите на измерваните вещества





**Фигура 1.** Последователност на операциите при пробоподготовката

### Хроматографско разделяне и количествено определяне

Пробите са анализирани с газов хроматограф с мас-селективен детектор Agilent Technologies 7890A/5975C. Използвана е газохроматографска колона Agilent DB-1MS (20 m x 180  $\mu$ m x 0,18  $\mu$ m) – 100% Dimethylpolysiloxane. Всяка проба беше изследвана трикратно, като се инжектираха по 2  $\mu$ l. Температурният градиент на пещта започва от 190°C със задържане 0 min. Следва нагряване до 218°C с 2°C/min и задържане 3 min. Втората стъпка на градиента е до 230°C с 2°C/min и задържане 0 min. Третата стъпка на градиента е до 300°C с 20°C/min и задържане 6 min. Като носещ газ е използван хелий със скорост 1 ml/min. Режимът на работа на детектора е SIM, при йонизация с електронен удар (70 eV). Установяваните съединения са: андростерон (m/z 434), етиохоланолон (m/z 434), 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (m/z 436), 5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (m/z 436), епитестостерон (m/z 432), тестостерон (m/z 432), 11 $\beta$ -хидроксиандростерон (m/z 522), 11 $\beta$ -хидроксиетиахоланолон (m/z 522), d4-андростерон (m/z 438), d5-етиахоланолон (m/z 439), d3-епитестостерон (m/z 435), d3-тестостерон (m/z 435). За количественото определяне на съединенията е използвана калибрационна крива с 5 точки.

### 2.8 Използвани реагенти и химикали

Метанол, HPLC

Третичен-бутил метил етер, HPLC

Калиев дихидроген фосфат Fluka, чистота >99,5%

Дикалиев хидроген фосфат Fluka, чистота >99,0%

Калиев хидроген карбонат Sigma, чистота >99,5%

Калиев карбонат Fluka, чистота >99,0%

$\beta$ -Glucuronidase (E. coli K12) Roche Diagnostic GmbH

N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), чистота  $\geq$  97%.

2-mercaptoethanol (2-ME), Sigma чистота  $\geq$  98%.

Ammonium iodide NH<sub>4</sub>I, Sigma чистота  $\geq$  98%.

Използваните сертифицирани референтни материали (CPM) и референтни материали (PM) са представени в **Таблица 1**.

**Таблица 1.** Използвани сертифицирани референтни материали (CPM) и референтни материали (PM).

Субстанция	Описание	
Androsterone		PM
Etiocholanolone	CPM	
5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	CPM	
5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	CPM	
Epitestosterone	CPM	
Testosterone	CPM	
11 $\beta$ -Hydroxyandrosterone		PM
11 $\beta$ -Hydroxyetiocholanolone		PM

Работните параметри на метода за количествено определяне на AAS са представени в Таблица 2.

**Таблица 2.** Граница на откриване (LOD), граница на количествено определяне (LOQ) и линеен обхват на метода.

Substance	LOD, [ng/ml]	LOQ, [ng/ml]	Range, [ng/ml]	Linearity ( $r^2$ )
A	1	250	250 - 10 000	0,9978
E	1	250	250 - 10 000	0,9977
11 $\beta$ -OH-A	2	100	100 - 3000	0,9883
11 $\beta$ -OH-E	2	100	100 - 3000	0,9855
5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	5 - 300	0,9845
5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	5 - 300	0,9869
epiT	0,6	1	1 - 300	0,9984
T	0,4	1	1 - 300	0,9985

### Статистическа обработка

Вариационният анализ на получените резултати и определянето на референтните граници на концентрациите на стероидите в урината проведохме със специализиран софтуер за статистическа обработка на фармакологични данни Refval 4.11 и SPSS 26.

Проверката за нормалност на разпределението на данните извършихме по метода на Kolmogorov-Smirnov. Заключениета за достоверността на разликите в медианите на получените резултати от различните изследвани групи извършихме с непараметрична ANOVA за независими извадки – метод на Kruskal-Wallis като приложихме post hoc тест на Bonferroni.

## 3 РЕЗУЛТАТИ И АНАЛИЗ

### 3.1 Резултати

#### 3.1.1 Валидиране на изследваните проби

Бяха изследвани общо 573 уринни проби, от които 190 от доброволци жени и 383 от мъже. След съпоставяне на измерените концентрации на изследваните стероиди с валидационните параметри на метода за количествено определяне на стероиди в урина (LOD и LOQ), проби в които беше установена стойност на концентрация на един или повече стероиди под LOD или LOQ отпаднаха от съответните извадки. За останалите проби бяха приложени критериите на WADA за максимално допустими концентрации на А, Е,  $5\alpha A3\alpha 17\beta diol$ , еpiТ и Т и за гранични стойностите на съотношенията Т/еpiТ, А/Т,  $5\alpha/5\beta$  и  $5\alpha/epiT$ . Проби, в които едно или повече от тези изисквания не бяха удовлетворени, също бяха отстранени от съответните извадки. Така за статистическа обработка останаха 149 проби на жени и 289 проби на мъже.

В таблици 3, 4, 5, 6, 7 и 8 са представени стойностите на критериите за отхвърляне и броят проби, отпаднали като неотговарящи на съответните изисквания. Общият брой, несъответстващи на критериите резултати, е по-голям от броя на отпадналите проби, защото за част от пробите бяха установени несъответствия с критериите за повече от един изследван показател.

От всички 78 проби на неспортуща жени, както е показано в **Таблица 3**, бяха отстранени 18, за които бяха установени несъответствия общо за 28 резултати. Най-много (8 на брой) от тях бяха отстранени, защото концентрацията на  $11\beta$ -ОН-Е беше под LOQ на метода. Общо 9 резултати отпаднаха поради измерени концентрации на А или Е, или еpiТ под LOQ. Един резултат за  $11\beta$ -ОН-А беше отстранен поради стойност под LOQ. Шест резултата бяха със стойности, надвишаващи граничните концентрации на WADA: 3 за  $5\alpha A3\alpha 17\beta diol$  (над 150 ng/ml) и 3 за еpiТ (над 50 ng/ml). При съотношенията между концентрациите на стероидите, включени в ABP, също бяха наблюдавани отклонения. В една проба беше повишено съотношението Т/еpiТ и в 2 проби - на  $5\alpha/epiT$ . В една проба съотношението на А/Т беше под 20, минимално изискуемата стойност според WADA. След отстраняване от извадката на неотговарящите на критериите проби на неспортущите жени, за статистически анализ бяха използвани резултатите от 60 проби (77% от анализирани проби на неспортуща жени).

**Таблица 3.** Отстранени проби (n = 18) на неспортуващите жени (F0), според валидационните критерии на метода (LOD и LOQ) и критериите на WADA.

Parameter	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WADA	F0 (samples 60/78; 77%)		
				< LOD	< LOQ	≠ WADA
<b>A</b>	1	250	< 10 000 ng/ml		3	
<b>E</b>	1	250	< 10 000 ng/ml		3	
<b>11β-OH-A</b>	2	100	-		1	
<b>11β-OH-E</b>	2	100	-		8	
<b>5αA3α17βdiol</b>	2	5	< 150 ng/ml			3
<b>5βA3α17βdiol</b>	2	5	-			
<b>epiT</b>	0,6	1	< 50 ng/ml		3	3
<b>T</b>	0,4	1	< 50 ng/ml			
<b>T/epiT</b>	-	-	< 4			1
<b>A/T</b>	-	-	> 20			1
<b>5α/5β</b>	-	-	< 2,4			
<b>5α/epiT</b>	-	-	< 10			2
<b>SUM of rejected results:</b>				0	18	10

От анализираниите 76 проби на спортуващи в свободното време жени (**Таблица 4**) бяха отстранени 14. Несъответствие показаха 19 резултата в общо 14 проби. Също както при неспортуващите жени, преобладаващата причина за отстраняване на резултатите беше измерена концентрация на 11 $\beta$ -ОН-Е под LOQ. От отпадналите по критериите на WADA резултати, 4 бяха поради измерена концентрация на Т над граничната стойност за жени 50 ng/ml. В два случая концентрациите на А и в един случай на Е надвишаваха границата от 10 000 ng/ml. Един резултат за концентрация на 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol беше над 150 ng/ml. След отстраняване от извадката на неотговарящите на критериите проби на спортуващи в свободното време жени, за статистически анализ бяха използвани резултатите от 62 проби (82% от анализираниите проби на спортуващи в свободното време жени).

**Таблица 4.** Отстранени проби (n = 14) на спортуващите в свободното време жени (F1), според валидационните критерии на метода (LOD и LOQ) и критериите на WADA.

Parameter	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WADA	F1 (samples 62/76; 82%)		
				< LOD	< LOQ	≠ WADA
<b>A</b>	1	250	< 10 000 ng/ml		1	2
<b>E</b>	1	250	< 10 000 ng/ml		1	1
<b>11<math>\beta</math>-ОН-A</b>	2	100	-			
<b>11<math>\beta</math>-ОН-E</b>	2	100	-		7	
<b>5<math>\alpha</math>A3<math>\alpha</math>17<math>\beta</math>diol</b>	2	5	< 150 ng/ml			1
<b>5<math>\beta</math>A3<math>\alpha</math>17<math>\beta</math>diol</b>	2	5	-			
<b>epiT</b>	0,6	1	< 50 ng/ml			
<b>T</b>	0,4	1	< 50 ng/ml		2	4
<b>T/epiT</b>	-	-	< 4			
<b>A/T</b>	-	-	> 20			
<b>5<math>\alpha</math>/5<math>\beta</math></b>	-	-	< 2,4			
<b>5<math>\alpha</math>/epiT</b>	-	-	< 10			
<b>SUM of rejected results:</b>				0	11	8

Девет, от общо 36 проби на активно спортуващи жени (F2) (Таблица 5), бяха отстранени от извадката. В тези 9 проби бяха установени общо 12 несъответствия на критериите резултати поради измерени концентрации на стероиди под LOQ. Бяха измерени 3 концентрации на 11 $\beta$ -ОН-А и 5 на 11 $\beta$ -ОН-Е по-ниски от LOQ на метода за количествено определяне. Бяха установени 2 резултата за стойностите на Т и 2 за еpiТ под LOQ. В резултат от елиминирането, за статистическа обработка бяха използвани 27 проби (75% от анализираните проби на активно спортуващите жени).

**Таблица 5.** Отстранени проби (n = 9) на активно спортуващи жени (F2), според валидационните критерии на метода (LOD и LOQ) и критериите на WADA.

Parameter	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WADA	F2 (samples 27/36; 75%)		
				< LOD	< LOQ	≠ WADA
A	1	250	< 10 000 ng/ml			
E	1	250	< 10 000 ng/ml			
11 $\beta$ -ОН-А	2	100	-		3	
11 $\beta$ -ОН-Е	2	100	-		5	
5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	< 150 ng/ml			
5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	-			
epiT	0,6	1	< 50 ng/ml		2	
T	0,4	1	< 50 ng/ml		2	
T/epiT	-	-	< 4			
A/T	-	-	> 20			
5 $\alpha$ /5 $\beta$	-	-	< 2,4			
5 $\alpha$ /epiT	-	-	< 10			
<b>SUM of rejected results:</b>				0	12	0

В Таблица 6 са показани отстранените резултати от анализа на проби на неспортуващи мъже (M0). От 107 проби 22 показаха несъответствие на един или повече от критериите. На валидационните критерии на метода не отговориха общо 19 резултата. Както във вече описаните групи, най-много (16 резултата) бяха с концентрация на 11 $\beta$ -ОН-Е под LOQ. Измерена беше една стойност на концентрация на А и две концентрации на Е над 10 000 ng/ml. Два резултата за Т/epiT надвишаваха граничната стойност на съотношението 4,0 и по един резултат за съотношенията 5 $\alpha$ /5 $\beta$  и 5 $\alpha$ /epiT надвишава граничните стойности (2,4 и 10 съответно). Така, за статистически анализ бяха използвани резултатите от 85 проби на неспортуващи мъже (79% от анализираните проби на неспортуващи мъже).

**Таблица 6.** Отстранени проби (n = 22) на неспортуващи мъже (M0), според валидационните критерии на метода (LOD и LOQ) и критериите на WADA.

Parameter	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WADA	M0 (samples 85/107; 79%)		
				< LOD	< LOQ	≠ WADA
<b>A</b>	1	250	< 10000 ng/ml		1	1
<b>E</b>	1	250	< 10000 ng/ml		2	1
<b>11β-OH-A</b>	2	100	-			
<b>11β-OH-E</b>	2	100	-		16	
<b>5αA3α17βdiol</b>	2	5	< 250 ng/ml			3
<b>5βA3α17βdiol</b>	2	5	-			
<b>epiT</b>	0,6	1	< 200 ng/ml			
<b>T</b>	0,4	1	< 200 ng/ml			
<b>T/epiT</b>	-	-	< 4			2
<b>A/T</b>	-	-	> 20			
<b>5α/5β</b>	-	-	< 2,4			1
<b>5α/epiT</b>	-	-	< 10			1
<b>SUM of rejected results:</b>				0	19	9



В най-многобройната група от 228, спортуващи в свободното време мъже (M1) (Таблица 7), отпаднаха 66 проби поради несъответствие с критериите на общо 98 резултати. Бяха установени 21 резултата с концентрация на 11 $\beta$ -ОН-Е под LOQ и един резултат с концентрация на Е под LOQ. В 12 от случаите беше надвишена граничната концентрация на А и в 3 на Е. В 6 случая концентрацията на 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol беше над граничната за мъже (250 ng/ml). Отчетени бяха 14 резултати за Т със стойност над определената от WADA горна граница за мъже от 200 ng/ml. Отклонения от изискванията имаше и при съотношенията Т/epiT, А/Т, 5 $\alpha$ /5 $\beta$  и 5 $\alpha$ /epiT. Поради тези причини бяха отстранени общо 29% от пробите в извадката. За статистически анализ бяха използвани резултатите от 162 проби на спортуващи в свободното време мъже (71% от анализираните проби на спортуващи в свободното време мъже).

**Таблица 7.** Отстранени проби (n = 66) на спортуващи в свободното време мъже (M1), според валидационните критерии на метода (LOD и LOQ) и критериите на WADA.

Parameter	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WADA	M1 (samples 162/228; 71%)		
				< LOD	< LOQ	≠ WADA
A	1	250	< 10000 ng/ml			12
E	1	250	< 10000 ng/ml		1	3
11 $\beta$ -ОН-A	2	100	-			
11 $\beta$ -ОН-E	2	100	-		21	
5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	< 250 ng/ml			6
5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	-			
epiT	0,6	1	< 200 ng/ml			
T	0,4	1	< 200 ng/ml			14
T/epiT	-	-	< 4			25
A/T	-	-	> 20			8
5 $\alpha$ /5 $\beta$	-	-	< 2,4			4
5 $\alpha$ /epiT	-	-	< 10			4
SUM of rejected results:				0	22	76

От пробите на активно спортуващите мъже (M2) бяха отстранени 6 резултата (Таблица 8). Поради отпадането на тези 6 резултата, от 48 анализирани проби в статистическата обработка бяха включени 42. И тук най-голям беше дялът на отстранените резултати поради измерени концентрации на 11 $\beta$ -ОН-А (n = 3) и 11 $\beta$ -ОН-Е (n = 3) под LOQ. Установени бяха 2 резултата за Е със стойности под LOQ. За статистически анализ бяха използвани резултатите от отговарящите на критериите 42 проби на активно спортуващите мъже (87% от анализираните пробите на активно спортуващите мъже).

**Таблица 8.** Отстранени проби (n = 6) на активно спортуващи мъже (M2), според валидационните критерии на метода (LOD и LOQ) и критериите на WADA.

Parameter	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	WADA	M2 (samples 42/48; 87%)		
				< LOD	< LOQ	≠ WADA
A	1	250	< 10000 ng/ml			
E	1	250	< 10000 ng/ml		2	
11 $\beta$ -ОН-А	2	100	-		3	
11 $\beta$ -ОН-Е	2	100	-		3	
5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	< 250 ng/ml			
5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	2	5	-			
epiT	0,6	1	< 200 ng/ml			
T	0,4	1	< 200 ng/ml			
T/epiT	-	-	< 4			
A/T	-	-	> 20			
5 $\alpha$ /5 $\beta$	-	-	< 2,4			
5 $\alpha$ /epiT	-	-	< 10			
SUM of rejected results:				0	8	0

### 3.1.2 Референтни стойности на маркерите на стероидния профил.

В Таблица 9 са представени изчисленията с Refval v.4.11 референтни стойности на концентрациите на изследваните стероиди в урина и техни съотношения, при неспортуващи (F0) и спортуващи в свободното време (F1) жени. Поради недостатъчен брой проби на активно спортуващи жени (n = 27), за тях не беше възможно да бъдат изчислени референтни стойности. Освен 2,5<sup>-ия</sup> персентил и 97,5<sup>-ия</sup> персентил, в таблицата са дадени и стойностите на 95%<sup>-ия</sup> конфиденциален интервал. За включените в стероидния модул на ABP стероиди, референтните граници при неспортуващите жени бяха: от 471,10 ng/ml до 8022,87 ng/ml за концентрацията на А,

от 490,39 ng/ml до 8234,70 ng/ml за Е, от 3,71 ng/ml до 40,29 ng/ml за Т, от 4,74 ng/ml до 33,88 ng/ml за еріТ, от 6,00 ng/ml до 84,78 ng/ml за 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol и от 8,50 ng/ml до 301,46 ng/ml за 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol. При неспортуващите жени, референтните граници на съотношенията между концентрациите на стероидите, които се проследяват в АВР, бяха: от 0,28 до 2,11 за Т/еріТ, от 0,33 до 2,46 за А/Е, от 49,37 до 797,36 за А/Т, от 0,13 до 1,61 за 5 $\alpha$ /5 $\beta$  и от 0,53 до 5,73 за 5 $\alpha$ /еріТ.

При спортуващите в свободното време жени, референтните концентрации на А бяха: от 596,02 ng/ml до 8873,78 ng/ml, на Е - от 723,36 ng/ml до 8209,50 ng/ml, на Т – от 2,27 ng/ml до 37,19 ng/ml, на еріТ – от 6,72 ng/ml до 40,96 ng/ml, на 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol от 5,31 ng/ml до 85,25 ng/ml, на 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol – от 8,62 ng/ml до 311,46 ng/ml. За съотношенията в АВР, получените референтни стойности бяха: от 0,23 до 2,89 за Т/еріТ, от 0,36 до 2,66 за А/Е, от 53,71 до 870,05 А/Т, от 0,10 до 1,88 5 $\alpha$ /5 $\beta$  и от 0,52 до 4,75 за 5 $\alpha$ /еріТ.

**Таблица 9.** Референтни стойности на концентрациите на стероиди в урина и техни съотношения при неспортуващи (F0) и спортуващи в свободното време (F1) жени.

Parameter	Fraction	F0			F1		
		Referent limit	0,95-confidence interval		Referent limit	0,95-confidence interval	
A	0,025	471,10	303,56	1067,43	596,02	466,05	1200,99
	0,975	8022,87	7348,54	8279,23	8873,78	6182,00	9581,55
E	0,025	490,39	452,97	844,44	723,36	607,16	926,62
	0,975	8234,70	6333,48	9926,07	8209,50	5960,13	8616,31
T	0,025	3,71	3,12	6,12	2,27	2,20	4,63
	0,975	40,29	29,86	49,02	37,19	28,91	45,02
epiT	0,025	4,74	2,93	7,94	6,72	6,12	8,45
	0,975	33,88	28,63	35,01	40,96	29,03	45,50
5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	0,025	6,00	5,90	9,69	5,31	4,44	9,49
	0,975	84,78	54,95	95,74	85,25	55,84	112,79
5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	0,025	8,50	8,24	8,24	8,62	6,80	14,59
	0,975	301,46	177,69	402,56	311,46	162,29	406,21
11 $\beta$ -OH-A	0,025	204,07	178,96	300,50	247,00	217,28	337,02
	0,975	1442,36	1280,88	1453,93	1792,62	1330,21	1963,04
11 $\beta$ -OH-E	0,025	104,27	103,59	118,24	106,66	105,31	120,85
	0,975	747,16	533,12	814,70	895,46	517,53	1203,88
T/epiT	0,025	0,28	0,28	0,36	0,23	0,17	0,34
	0,975	2,11	1,84	2,13	2,89	1,70	3,96
A/E	0,025	0,33	0,20	0,55	0,36	0,29	0,52
	0,975	2,46	2,03	2,50	2,66	2,05	2,90
A/T	0,025	49,37	40,22	72,67	53,71	52,60	84,27
	0,975	797,36	598,08	813,56	870,05	536,11	1210,34
5 $\alpha$ /5 $\beta$	0,025	0,13	0,12	0,16	0,10	0,07	0,16
	0,975	1,61	1,36	1,75	1,88	1,38	2,04
5 $\alpha$ /epiT	0,025	0,53	0,51	0,66	0,52	0,48	0,60
	0,975	5,73	3,60	7,00	4,75	4,15	5,46
11 $\beta$ -OH-A/ 11 $\beta$ -OH-E	0,025	1,15	0,94	1,54	0,95	0,75	1,21
	0,975	8,71	1,54	8,98	7,38	6,06	8,22
A/ 11 $\beta$ -OH-A	0,025	1,21	1,13	1,55	1,40	1,22	1,87
	0,975	11,53	9,53	12,07	14,31	10,00	17,60
E/ 11 $\beta$ -OH-E	0,025	3,18	2,98	4,52	3,05	2,45	3,68
	0,975	40,14	27,90	46,14	46,18	24,05	50,92

Изчислените с Refval v.4.11 референтни стойности на концентрациите на стероиди в урина и техни съотношения при неспортуващи (M0), и спортуващи в свободното време (M1) и активно спортуващи (M2) мъже са представени в **Таблица 10**. За концентрация на А референтните граници бяха: от 600,13 ng/ml до 7079,14 ng/ml, от 766,30 ng/ml до 9558,12 ng/ml и от 931,64 ng/ml до 5189,03 ng/ml за неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи мъже, съответно. Референтните стойности за Е бяха от 639,68 ng/ml до 8118,20 ng/ml, от 450,66 ng/ml до 7096,06 ng/ml и от 762,22 ng/ml до 5432,05 ng/ml, за Т – от 8,43 ng/ml до 162,81 ng/ml, от 6,75 ng/ml до 161,28 ng/ml и от 3,79 ng/ml до 139,22 ng/ml, за еріТ – от 8,94 ng/ml до 96,97 ng/ml, от 9,00 ng/ml до 140,30 ng/ml и от 3,53 ng/ml до 80,31 ng/ml, за 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol – от 9,81 ng/ml до 173,78 ng/ml, от 12,79 ng/ml до 148,65 ng/ml и от 6,51 ng/ml до 102,62 ng/ml и за 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol – от 12,70 ng/ml до 449,08 ng/ml, от 19,58 ng/ml до 452,01 ng/ml и от 8,33 ng/ml до 241,65 ng/ml за неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи мъже, съответно.

Съотношението Т/еріТ имаше референтни стойности от 0,22 до 3,69, от 0,19 до 3,59 и от 0,13 до 3,70 за неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи, съответно. За съотношението А/Е референтните стойности бяха от 0,46 до 3,22, от 0,47 до 3,14 и от 0,30 до 2,13, А/Т – от 22,63 до 378,49, от 21,42 до 496,54 и от 22,23 до 327,21, 5 $\alpha$ /5 $\beta$  – от 0,15 до 1,77, от 0,14 до 1,81 и от 0,07 до 1,06, 5 $\alpha$ /еріТ – от 0,49 до 5,79, от 0,54 до 5,72 и от 0,24 до 5,53 за неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи мъже, съответно.

**Таблица 10.** Референтни стойности на концентрации на стероиди в урина и техни съотношения при неспортуващи (M0) и спортуващи в свободното време (M1) и активно спортуващи (M2) мъже.

Parameter	Fraction	M0			M1			M2		
		Referent limit	0,95-confidence interval		Referent limit	0,95-confidence interval		Referent limit	0,95-confidence interval	
A	0,025	600,13	580,70	1131,93	766,30	766,30	887,68	931,64	920,97	1137,77
	0,975	7079,14	6048,91	8912,88	9558,12	8005,73	9820,99	5189,03	3654,19	5248,64
E	0,025	639,68	427,33	837,75	450,66	450,66	708,91	762,22	760,97	921,86
	0,975	8118,20	6384,11	8819,53	7096,06	6000,31	8324,97	5432,05	3002,76	5499,31
T	0,025	8,43	3,32	10,40	6,75	4,56	10,18	3,79	3,60	7,51
	0,975	162,81	116,42	171,27	161,28	129,69	166,89	139,22	86,96	140,42
epiT	0,025	8,94	8,39	11,02	9,00	7,72	12,51	3,53	3,45	7,44
	0,975	96,97	67,72	146,43	140,30	100,48	150,29	80,31	74,01	80,67
5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	0,025	9,81	8,53	14,53	12,79	5,17	17,04	6,51	6,43	8,34
	0,975	173,78	136,64	245,03	175,97	148,65	221,07	102,62	78,60	102,70
5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	0,025	12,70	11,74	16,90	19,58	13,00	29,32	8,33	8,10	22,09
	0,975	449,08	311,73	567,95	452,01	349,07	710,81	241,65	184,81	241,68
11 $\beta$ -OH-A	0,025	182,09	164,18	257,05	226,39	182,93	275,60	156,67	154,37	220,60
	0,975	1516,82	1273,10	1596,21	1772,01	1402,45	2057,80	896,68	702,99	908,91
11 $\beta$ -OH-E	0,025	103,40	100,84	100,84	104,33	100,84	109,68	142,18	141,96	150,87
	0,975	826,67	747,46	1022,49	616,74	519,27	876,41	901,35	448,70	937,71
T/epiT	0,025	0,22	0,18	0,52	0,19	0,12	0,30	0,13	0,13	0,23

Parameter	Fraction	M0			M1			M2		
		Referent limit	0,95-confidence interval		Referent limit	0,95-confidence interval		Referent limit	0,95-confidence interval	
	0,975	3,69	3,32	3,83	3,59	3,15	3,61	3,70	3,19	3,71
A/E	0,025	0,46	0,35	0,59	0,47	0,38	0,63	0,30	0,30	0,68
	0,975	3,22	2,96	4,16	3,14	2,40	3,51	2,13	1,73	2,13
A/T	0,025	22,63	20,86	27,28	21,42	20,93	30,66	22,23	21,66	32,88
	0,975	378,49	216,52	508,82	496,54	327,46	607,73	327,21	252,84	331,45
5 $\alpha$ /5 $\beta$	0,025	0,15	0,15	0,20	0,14	0,13	0,18	0,07	0,07	0,15
	0,975	1,77	1,11	1,82	1,81	1,59	2,09	1,06	0,76	1,07
5 $\alpha$ /epiT	0,025	0,49	0,34	0,68	0,54	0,51	0,64	0,24	0,24	0,32
	0,975	5,79	4,84	6,01	5,72	4,49	6,09	5,53	2,81	5,66
11 $\beta$ -OH-A/ 11 $\beta$ -OH-E	0,025	0,49	0,34	0,68	0,54	0,51	0,64	0,71	0,71	0,79
	0,975	5,79	4,84	6,01	5,72	4,49	6,09	5,48	2,99	5,67
A/ 11 $\beta$ -OH-A	0,025	1,61	0,91	1,99	1,45	1,00	1,82	2,10	2,06	2,84
	0,975	10,06	8,00	10,41	10,25	8,95	11,46	11,43	9,49	11,44
E/ 11 $\beta$ -OH-E	0,025	2,65	1,39	1,39	2,43	2,32	3,89	1,81	1,77	3,02
	0,975	26,25	26,25	34,24	35,61	25,66	55,16	37,60	14,35	38,58

### 3.1.3 Вариационен анализ на изследваните стероидни маркери

В Таблица 11 е представен вариационният анализ на концентрациите на изследваните стероиди в урина при неспортуващи жени (F0) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Най-високи бяха средните стойности на концентрациите на андростерон и етиохоланолон, 3431,164 ng/ml и 3126,795 ng/ml, съответно. Най-ниски средни концентрации, от всички измерени стероиди, имаха тестостерон (15,324 ng/ml) и епитестостерон (16,896 ng/ml). 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol беше със средна концентрация 31,30 ng/ml, а 5 $\beta$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol с 74,21 ng/ml. За невключените в АВР стероиди, 11 $\beta$ -хидрокси андростерон и 11 $\beta$ -хидроксиетиахоланолон, средните стойности бяха 728,49 ng/ml и 257,86 ng/ml съответно.

Статистически достоверни разлики, за включените в АВР стероиди, бяха открити между активно спортуващи и неспортуващи жени, за концентрациите на 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol ( $F_{2<F0}$ ,  $p<0,010$ ) и епитестостерон ( $F_{2<F0}$ ,  $p<0,001$ ). Стойностите при неспортуващите бяха по-високи от тези при активно спортуващите. За невключените в АВР, 11 $\beta$ -хидроксиандростерон и 11 $\beta$ -хидроксиетиахоланолон, също бяха открити разлики между активно спортуващи и неспортуващи жени. За 11 $\beta$ -хидроксиандростерон концентрациите в пробите на неспортуващите жени бяха достоверно по- високи ( $F_{2<F0}$ ,  $p<0,010$ ), а при 11 $\beta$ -хидроксиетиахоланолон – по-ниски от тези измерени в пробите на активно спортуващите ( $F_{0<F2}$ ,  $p<0,010$ ).



**Таблица 11.** Вариационен анализ на концентрациите [ng/ml] на изследваните стероиди в урина при неспортуващи жени (F0).

F0		A	E	11β-OH-A	11β-OH-E	5αA3α17β diol	5βA3α17β diol	EpiT	T
Mean		3431,16	3126,79	728,49	257,86	31,30	74,21	16,90	15,32
Std, Error of Mean		265,87	245,01	44,62	19,72	2,36	9,20	0,92	1,13
Median		3039,98	2758,90	655,85	211,39	27,50	47,25	16,31	12,58
Std, Deviation		2059,42	1897,81	345,60	152,77	18,27	71,28	7,13	8,72
Skewness		0,68	1,18	0,41	1,61	1,02	2,24	0,56	1,37
Kurtosis		-0,40	1,75	-0,76	2,71	1,45	6,97	-0,03	2,56
Range		7975,67	9473,10	1274,97	711,11	89,84	394,32	32,08	45,90
Minimum		303,56	452,97	178,96	103,59	5,90	8,24	2,93	3,12
Maximum		8279,23	9926,07	1453,93	814,70	95,74	402,56	35,01	49,02
Percent tiles	2,5	622,69	524,25	225,38	104,27	6,09	8,74	6,37	4,25
	25,0	1776,79	1773,75	423,98	142,17	15,72	25,06	11,20	10,00
	75,0	4967,21	3892,35	982,91	323,92	42,62	98,43	21,63	20,46
	97,5	8022,87	7401,05	1431,89	686,05	74,86	258,41	33,88	32,58
Differences				F2<F0 p<0,010	F0<F2 p<0,010	F2<F0 p<0,010		F2<F0 p<0,001	

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 12 е представен вариационният анализ на съотношенията между концентрациите на стероиди в урина при неспортуващи жени ( $F_0$ ) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Средните стойности на съотношенията, включени в АВР бяха: 0,98 за  $T/epiT$ , 1,19 за  $A/E$ , 266,19 за  $A/T$ , 0,64 за  $5\alpha/5\beta$ , 2,03 за  $5\alpha/Ep iT$ .

От включените в АВР съотношения, достоверни разлики бяха открити за  $T/epiT$ ,  $A/E$  и  $5\alpha/5\beta$ . Съотношението  $T/epiT$  при неспортуващите жени показва достоверно по-ниски стойности ( $F_0 < F_2$ ,  $p < 0,025$ ), а съотношенията  $A/E$  ( $F_2 < F_0$ ,  $p < 0,010$ ) и  $5\alpha/5\beta$  ( $F_2 < F_0$ ,  $p < 0,050$ ) – по-високи стойности в сравнение с активно спортуващите.

От невключените в АВР съотношения, между неспортуващи и активно спортуващи достоверни разлики имаше при  $11\beta\text{-OH-A}/11\beta\text{-OH-E}$  като при неспортуващите показва по-високи стойности от това при активно спортуващите ( $F_2 < F_0$ ,  $p < 0,001$ ).

**Таблица 12.** Вариационен анализ на съотношенията между концентрациите на изследваните стероиди в урина при неспортуващи жени (F0).

F0		T/epiT	A/E	A/T	5 $\alpha$ /5 $\beta$	5 $\alpha$ /Epi T	11 $\beta$ - OH- A/11 $\beta$ - OH-E	A/11 $\beta$ - OH-A	E/11 $\beta$ - OH-E
Mean		0,98	1,19	266,19	0,64	2,03	3,25	5,15	14,02
Std, Error of Mean		0,06	0,07	23,52	0,05	0,16	0,23	0,36	1,17
Median		0,96	1,17	213,77	0,58	1,87	2,76	4,88	11,91
Std, Deviation		0,49	0,50	182,20	0,40	1,21	1,76	2,78	9,04
Skewness		0,56	0,45	1,21	0,76	1,36	1,46	0,42	1,38
Kurtosis		-0,41	-0,16	1,17	-0,09	3,31	1,92	-0,63	2,21
Range		1,85	2,30	773,34	1,63	6,48	8,04	10,94	43,17
Minimum		0,28	0,20	40,22	0,12	0,51	0,94	1,13	2,98
Maximum		2,13	2,50	813,56	1,75	7,00	8,98	12,07	46,14
Perce ntiles	2,5	0,28	0,44	57,65	0,14	0,54	1,34	1,21	3,36
	25,0	0,56	0,80	127,94	0,30	1,16	2,04	2,74	7,73
	75,0	1,32	1,51	367,22	0,88	2,77	4,06	6,96	18,64
	97,5	2,11	2,42	782,70	1,50	4,59	8,46	11,05	40,14
Differences		F0<F2 p<0,02 5	F2<F0 p<0,01 0		F2<F0 p<0,05 0		F2<F0 p<0,00 1		

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В **Таблица 13** е представен вариационният анализ на концентрациите на изследваните стероиди в урина при спортуващи в свободното време жени (F1) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Андростерона (A) беше с по-висока средна концентрация от етиохоланолонa (E), 3150,01 ng/ml и 2841,33ng/ml, съответно. Средната концентрация на 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol беше 29,27 ng/ml и беше по-ниска от тази на 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol – 68,09 ng/ml. ЕpiT имаше по-висока средна концентрация от тази на T (17,51 ng/ml и 14,83 ng/ml).

Достоверни разлики бяха открити само спрямо активно спортуващите жени за 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol (F2<F1, p<0,025) и ЕpiT (F2-F1, p<0,001), които се проследяват в АВР. И двата стероида имаха по-високи концентрации при спортуващите в свободното време жени. От невключените в АВР стероиди, доказани разлики бяха открити при 11 $\beta$ -ОН-А. Концентрациите на 11 $\beta$ -ОН-А в пробите на спортуващи в свободното време жени бяха по-високи в сравнение с тези при активно спортуващите (F2<F1, p<0,010).

**Таблица 13.** Вариационен анализ на концентрациите [ng/ml] на изследваните стероиди в урина при спортуващи в свободното време жени (F1).

F1		A	E	11β-OH-A	11β-OH-E	5αA3α17β diol	5βA3α17β diol	EpiT	T
Mean		3150,01	2841,33	786,78	287,84	29,27	68,09	17,51	14,83
Std, Error of Mean		249,16	221,97	63,64	22,88	2,45	8,19	1,00	1,11
Median		2600,39	2404,18	699,62	251,99	25,53	45,98 <sup>a</sup>	15,99 <sub>a</sub>	14,44 <sub>a</sub>
Std, Deviation		1961,86	1747,82	501,07	180,19	19,30	64,48	7,86	8,77
Skewness		1,31	1,29	3,08	2,61	1,78	2,90	1,12	0,91
Kurtosis		1,62	1,61	14,86	10,32	5,19	12,02	1,77	1,01
Range		9115,50	8009,15	3456,19	1098,56	108,35	399,42	39,38	42,82
Minimum		466,05	607,16	103,12	105,31	4,44	6,80	6,12	2,20
Maximum		9581,55	8616,31	3559,31	1203,88	112,79	406,21	45,50	45,02
Percentiles	2,5	708,92	799,50 <sup>c</sup>	218,76	106,72	5,45	9,88	7,17	2,35
	25,0	1695,83	1512,96	511,68	164,74	14,71	30,22	11,92	7,11
	75,0	3969,37	3667,13	929,49	338,33	38,72	85,10	21,18	18,44
	97,5	8803,96	7837,82	1946,81	719,67	84,12	238,00	37,41	31,39
Differences				F2<F1 p<0,010		F2<F1 p<0,025		F2<F1 p<0,001	

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests

В Таблица 14 е представен вариационният анализ на съотношенията между концентрациите на стероиди в урина при спортуващи в свободното време жени (F1) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Средната стойност на съотношението T/epiT беше 0,91, за A/E, A/T, 5 $\alpha$ /5 $\beta$ , 5 $\alpha$ /EpiT 1,22; 264,12; 0,62 и 1,81 съответно.

При проследяваните в ABP съотношения, достоверни разлики бяха открити между спортуващи в свободното време и активно спортуващи жени за T/epiT, A/E и 5 $\alpha$ /epiT. При съотношенията T/epiT ( $F1 < F2$ ,  $p < 0,001$ ) и 5 $\alpha$ /epiT ( $F1 < F2$ ,  $p < 0,025$ ) спортуващите в свободното време жени имаха по-ниски стойности от активно спортуващите, а за A/E ( $F2 < F1$ ,  $p < 0,010$ ) - по-високи.

От невключените в ABP съотношения, достоверни разлики между спортуващи в свободното време и активно спортуващи жени бяха открити за 11 $\beta$ -ОН-A/11 $\beta$ -ОН-E и A/11 $\beta$ -ОН-A. Съотношението 11 $\beta$ -ОН-A/11 $\beta$ -ОН-E ( $F2 < F1$ ,  $p < 0,001$ ) имаше по-високи стойности в проби на спортуващи в свободното време, а A/11 $\beta$ -ОН-A ( $F1 < F2$ ,  $p < 0,050$ ) по-ниски спрямо активно спортуващите.

**Таблица 14.** Вариационен анализ на съотношенията между концентрациите на изследваните стероиди в урина при спортуващи в свободното време жени (F1).

F1		T/epiT	A/E	A/T	5 $\alpha$ /5 $\beta$	5 $\alpha$ /Epi T	11 $\beta$ - OH- A/11 $\beta$ - OH-E	A/11 $\beta$ - OH-A	E/11 $\beta$ - OH-E
Mean		0,91	1,22	264,12	0,62	1,81	3,19	4,62	11,65
Std, Error of Mean		0,08	0,07	24,43	0,05	0,15	0,25	0,39	1,10
Median		0,79	1,12	206,26	0,49	1,48	2,77	3,71	9,76
Std, Deviation		0,59	0,54	192,36	0,42	1,17	1,97	3,06	8,68
Skewness		2,48	0,70	2,39	1,13	1,24	1,96	1,90	2,52
Kurtosis		10,37	0,37	8,67	1,28	0,91	5,64	4,69	8,15
Range		3,79	2,61	1157,7 4	1,96	4,98	11,35	16,38	48,47
Minimum		0,17	0,29	52,60	0,07	0,48	0,52	1,22	2,45
Maximum		3,96	2,90	1210,3 4	2,04	5,45	11,87	17,60	50,92
Percenti les	2,5	0,27	0,37	55,28	0,10	0,53	0,76	1,41	3,23
	25, 0	0,50	0,83	144,93	0,29	0,91	2,06	2,52	6,81
	75, 0	1,19	1,57	328,89	0,90	2,16	3,79	6,15	12,92
	97, 5	2,10	2,46	693,65	1,74	4,54	8,18	11,87	42,05
Differences		F1<F2 p<0,00 1	F2<F1 p<0,01 0			F1<F2 p<0,02 5	F2<F1 p<0,00 1	F1<F2 p<0,05 0	

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests

В Таблица 15 е представен вариационният анализ на концентрациите на изследваните стероиди в урина при активно спортуващи жени (F2) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Средната стойност на концентрацията на етиохоланолон 3323,50 ng/ml беше по-висока от тази на андростерон 2838,01 ng/ml. 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol беше със средна концентрация 18,99 ng/ml, 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol 72,86 ng/ml. Тестостерон имаше по-висока средна концентрация от епитестостерон, 12,47 ng/ml и 9,38 ng/ml, съответно.

За невключените в АВР стероиди, 11 $\beta$ -ОН-А и 11 $\beta$ -ОН-Е, съответните средни стойности на концентрациите бяха 507,64 ng/ml и 357,39 ng/ml.

От включените в АВР стероиди достоверни разлики, между активно спортуващи и останалите две групи, бяха открити за 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol - (F2<F1, p<0,025) и ЕpIT (F2<F1, p<0,001). И за двата стероида активно спортуващите имаха по-ниски стойности както спрямо неспортуващите, така и спрямо спортуващите в свободното време жени.

За невключените в АВР стероиди, 11 $\beta$ -ОН-А и 11 $\beta$ -ОН-Е, също бяха открити достоверни разлики. При 11 $\beta$ -ОН-А (F2<F0, p<0,010; F2<F1, p<0,010) тези разлики бяха както с неспортуващите, така и със спортуващите в свободното време и концентрациите при активно спортуващите бяха по-ниски. За 11 $\beta$ -ОН-Е активно спортуващите жени показаха разлика само с неспортуващите. Стойностите на 11 $\beta$ -ОН-Е (F0<F2, p<0,010) при активно спортуващите бяха по-високи.



**Таблица 15.** Вариационен анализ на концентрациите [ng/ml] на изследваните стероиди в урина при активно спортуващи жени (F2).

F2		A	E	11 $\beta$ -OH-A	11 $\beta$ -OH-E	5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	EpiT	T
Mean		2838,0 <sub>1</sub>	3323,5 <sub>0</sub>	507,64	357,39	18,99	72,86	9,38	12,47
Std, Error of Mean		367,48	353,68	49,64	29,99	2,95	14,91	1,82	2,18
Median		2084,4 <sub>1<sup>a</sup></sub>	2764,8 <sub>4<sup>a</sup></sub>	406,44 <sub>a</sub>	301,31 <sub>a</sub>	12,73 <sup>a</sup>	43,42 <sup>a</sup>	4,59 <sup>a</sup>	7,72 <sup>a</sup>
Std, Deviation		1909,4 <sub>6</sub>	1837,7 <sub>7</sub>	257,94	155,82	15,33	77,49	9,47	11,31
Skewness		1,70	1,34	0,88	0,90	1,46	2,07	1,42	1,10
Kurtosis		3,00	1,36	-0,24	-0,05	1,43	4,50	0,73	-0,11
Range		8089,3 <sub>5</sub>	7142,5 <sub>1</sub>	874,06	560,52	54,69	327,39	31,07	35,16
Minimum		934,63	1476,8 <sub>9</sub>	209,13	163,44	2,95	8,86	1,54	1,50
Maximum		9023,9 <sub>8</sub>	8619,4 <sub>0</sub>	1083,1 <sub>8</sub>	723,96	57,65	336,25	32,61	36,67
Percentiles	2,5	952,20 <sub>c</sub>	1489,3 <sub>8<sup>c</sup></sub>	212,27 <sub>c</sub>	166,99 <sub>c</sub>	3,17 <sup>c</sup>	8,97 <sup>c</sup>	1,56 <sup>c</sup>	1,51 <sup>c</sup>
	25,0	1557,6 <sub>9</sub>	1901,4 <sub>2</sub>	293,00	229,78	8,82	24,65	3,15	4,03
	75,0	3464,1 <sub>8</sub>	4148,1 <sub>3</sub>	690,18	474,81	25,13	96,82	12,04	18,96
	97,5	8495,6 <sub>1</sub>	8281,4 <sub>5</sub>	1079,7 <sub>3</sub>	717,67	57,05	319,30	31,98	36,42
Differences				F2<F0 p=0,010 F2<F1 p<0,010	F0<F2 p<0,010	F2<F0 p<0,010 F2<F1 p<0,025		F2<F0 p<0,001 F2<F1 p<0,001	

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 16 е представен вариационният анализ на съотношенията между концентрациите на стероиди в урина при активно спортуващи жени (F2) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis.

Включените в АВР съотношения,  $T/epiT$ ,  $A/E$ ,  $A/T$ ,  $5\alpha/5\beta$  и  $5\alpha/Ep iT$ , имаха средни стойности 1,66; 0,86; 372,75; 0,39 и 2,96, съответно. За тези съотношения, достоверни разлики бяха открити при  $T/epiT$ ,  $A/E$ ,  $5\alpha/5\beta$  и  $5\alpha/Ep iT$ . При съотношенията  $T/epiT$  и  $A/E$  разликите бяха между активно спортуващите жени и останалите две групи. Активно спортуващите имаха по-високи стойности на съотношението  $T/epiT$  както спрямо неспортуващите, така и спрямо спортуващите в свободното време ( $F1 < F2$ ,  $p < 0,001$ ;  $F0 < F2$ ,  $p < 0,001$ ). За съотношението  $A/E$  активно спортуващите показаха достоверно по-ниски стойности както спрямо неспортуващите, така и спрямо спортуващите в свободното време жени ( $F2 < F0$ ,  $p < 0,010$ ;  $F2 < F1$ ,  $p < 0,010$ ). За съотношението  $5\alpha/5\beta$  достоверни разлики имаше между активно спортуващите и неспортуващите. При активно спортуващите стойностите бяха по-ниски ( $F2 < F0$ ,  $p < 0,050$ ). За съотношението  $5\alpha/Ep iT$  бяха открити разлики спрямо спортуващите в свободното време. Отчетите стойности при активно спортуващите бяха по-високи ( $F1 < F2$ ,  $p < 0,025$ ).

**Таблица 16.** Вариационен анализ на съотношенията между концентрациите на изследваните стероиди в урина при активно спортуващи жени (F2).

F2		T/epiT	A/E	A/T	5 $\alpha$ /5 $\beta$	5 $\alpha$ /Epi T	11 $\beta$ - OH- A/11 $\beta$ - OH- E	A/11 $\beta$ - OH-A	E/11 $\beta$ - OH-E
Mean		1,66	0,86	372,75	0,39	2,96	1,53	5,89	9,80
Std, Error of Mean		0,19	0,05	45,63	0,04	0,40	0,15	0,50	0,90
Median		1,49	0,87	256,01	0,36	2,28	1,28	6,04	8,26
Std, Deviation		0,99	0,26	237,07	0,22	2,09	0,80	2,60	4,66
Skewness		0,41	0,02	0,46	-0,02	1,11	1,73	0,47	1,28
Kurtosis		-1,20	-0,67	-1,08	-0,88	0,27	2,88	0,26	0,67
Range		2,97	0,97	781,81	0,76	7,57	3,16	10,35	16,15
Minimum		0,40	0,40	52,40	0,02	0,72	0,76	1,47	3,91
Maximum		3,36	1,37	834,21	0,78	8,30	3,92	11,82	20,06
Percenti les	2,5	0,40 <sup>c</sup>	0,40 <sup>c</sup>	54,22 <sup>c</sup>	0,03 <sup>c</sup>	0,75 <sup>c</sup>	0,76 <sup>c</sup>	1,59 <sup>c</sup>	4,18 <sup>c</sup>
	25,0	0,84	0,66	195,87	0,22	1,36	1,00	4,01	6,53
	75,0	2,45	1,04	586,41	0,56	4,22	1,74	7,01	11,35
	97,5	3,35	1,36	824,94	0,77	8,03	3,86	11,77	20,01
Differences		F1<F2 p<0,00 1 F0<F2) p<0,02 5	F2<F 0 p<0,0 10 F2<F 1 p<0,0 10		F2<F0 p<0,0 50	F1<F2 p<0,025	F2<F 0 p<0,0 01 F2<F 1 p<0,0 01	F0<F2 p<0,05 0	

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В **Таблица 17** е представен вариационният анализ на концентрациите на изследваните стероиди в урина при неспортущи мъже (M0) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. С най-високи средни концентрации бяха А и Е, 3277,20 ng/ml и 2641,50 ng/ml съответно. 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol беше със средна концентрация 67,65 ng/ml, а 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol 155,77 ng/ml. Т беше с по-висока средна концентрация (55,89 ng/ml) от ЕpiТ (34,47 ng/ml). От невключените в АРВ стероиди, 11 $\beta$ -ОН-А беше със средна концентрация 728,60 ng/ml, а 11 $\beta$ -ОН-Е с 288,46 ng/ml.

За включените в АРВ стероиди, достоверни разлики бяха отчетени само спрямо активно спортуващите мъже при А (M2<M0, p< 0,010), 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol (M2<M0, p< 0,001) и 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol (M2<M0, p< 0,010). В пробите на неспортущите мъже концентрациите на тези стероиди бяха по-високи.

Достоверни разлики, за невключения в АРВ 11 $\beta$ -ОН-А, бяха открити и между активно спортуващи и неспортущи мъже. Стойностите на 11 $\beta$ -ОН-А (M2<M0, p< 0,001) бяха по-високи при неспортущите.

**Таблица 17.** Вариационен анализ на концентрациите [ng/ml] на изследваните стероиди в урина при неспортуващи мъже (M0).

M0		A	E	11 $\beta$ -OH-A	11 $\beta$ -OH-E	5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	EpiT	T
Mean		3277,2 0	2641,5 0	728,60	288,46	67,65	155,77	34,47	55,89
Std. Error of Mean		188,41	190,89	35,63	21,05	4,76	11,86	2,53	4,26
Median		2948,6 4	2179,3 2	681,74	236,87	64,70	128,52	28,36	46,59
Std. Deviation		1737,0 9	1759,9 6	328,45	194,11	43,86	109,32	23,34	39,28
Skewness		0,71	1,58	0,50	1,75	1,13	1,27	1,86	0,92
Kurtosis		0,21	2,45	-0,09	2,92	2,07	2,04	5,60	0,24
Range		8332,1 8	8392,2 1	1432,0 4	921,66	236,49	556,20	138,0 4	167,9 5
Minimum		580,70	427,33	164,18	100,83	8,53	11,74	8,39	3,32
Maximum		8912,8 8	8819,5 3	1596,2 1	1022,4 9	245,03	567,95	146,4 3	171,2 7
Percentiles	2,5	649,72	662,64	187,87	104,13	10,76	13,15	9,46	8,66
	25,0	1871,9 3	1535,8 7	517,55	154,00	31,63	85,24	16,67	26,11
	75,0	4353,4 3	2993,2 0	906,62	354,69	95,00	214,86	47,87	81,15
	97,5	6899,8 3	7745,3 0	1454,3 3	814,01	162,34	443,85	92,39	151,0 7
Differences		(M2<M0) p<0,01 0		(M2<M0) p<0,01 01		(M2<M0) ) p<0,010	(M2<M0) ) p<0,010		

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 18 е представен вариационният анализ на съотношенията между концентрациите на стероиди в урина при неспортуващи мъже ( $M_0$ ) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. При неспортуващи мъже средната стойност на съотношението  $T/epiT$  беше 1,78. Съотношенията  $A/E$ ,  $A/T$ ,  $5\alpha/5\beta$  и  $5\alpha/epiT$  бяха със средни стойности 1,48, 87,84, 0,54, 2,30, съответно. При невключените в АВР съотношения,  $11\beta\text{-OH-A}/11\beta\text{-OH-E}$ ,  $A/11\beta\text{-OH-A}$  и  $E/11\beta\text{-OH-E}$ , съответните средни стойности бяха: 3,29; 4,77 и 10,75.

От наблюдаваните в АВР съотношения, достоверни разлики имаше само за  $5\alpha/epiT$  ( $M_2 < M_0$ ,  $p < 0,001$ ) при неспортуващите спрямо активно спортуващите. Стойностите при неспортуващите бяха по-високи.

За невключените в АВР стероидни съотношения, достоверни разлики бяха открити при  $11\beta\text{-OH-A}/11\beta\text{-OH-E}$  и  $E/11\beta\text{-OH-E}$  спрямо активно спортуващите мъже. За съотношенията  $11\beta\text{-OH-A}/11\beta\text{-OH-E}$  ( $M_2 < M_0$ ,  $p < 0,001$ ) и  $E/11\beta\text{-OH-E}$  ( $M_2 < M_0$ ,  $p < 0,010$ ), неспортуващите имаха по-високи стойности в сравнение с активно спортуващите.

**Таблица 18.** Вариационен анализ на съотношенията между концентрациите на изследваните стероиди в урина при неспортущи мъже (M0).

M0		T/epiT	A/E	A/T	5 $\alpha$ /5 $\beta$	5 $\alpha$ /EpiT	11 $\beta$ -OH-A/11 $\beta$ -OH-E	A/11 $\beta$ -OH-A	E/11 $\beta$ -OH-E
Mean		1,78	1,48	87,84	0,54	2,30	3,29	4,77	10,75
Std, Error of Mean		0,10	0,09	8,94	0,04	0,15	0,22	0,22	0,70
Median		1,67	1,28	62,63	0,48	1,97	2,68	4,46	9,09
Std, Deviation		0,93	0,79	82,46	0,35	1,41	2,04	2,06	6,44
Skewness		0,33	1,00	2,80	1,84	0,90	1,13	0,63	1,14
Kurtosis		-0,74	0,59	9,60	3,65	0,04	1,13	0,15	1,38
Range		3,65	3,81	487,96	1,67	5,67	9,80	9,50	32,85
Minimum		0,17	0,35	20,86	0,14	0,34	0,23	0,91	1,39
Maximum		3,83	4,16	508,82	1,81	6,01	10,03	10,40	34,24
Percentiles	2,5	0,22 <sup>c</sup>	0,48 <sup>c</sup>	23,60 <sup>c</sup>	0,16 <sup>c</sup>	0,52 <sup>c</sup>	0,54 <sup>c</sup>	1,64 <sup>c</sup>	2,78 <sup>c</sup>
	25,0	1,01	0,84	38,82	0,31	1,29	1,84	3,41	6,14
	75,0	2,43	1,91	95,97	0,64	3,25	4,35	5,77	14,72
	97,5	3,67	3,20	349,59	1,64	5,64	8,68	10,06	26,16
Differences						M2<M0 p<0,001	M2<M0 p<0,001		M2<M0 p<0,001

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 19 е представен вариационният анализ на концентрациите на изследваните стероиди в урина при спортуващи в свободното време мъже (M1) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Средните стойности на А и Е бяха 3651,75 ng/ml и 2758,20 ng/ml. За 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol и 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol средните бяха 67,73 ng/ml и 140,32 ng/ml. Т беше с по-висока средна концентрация от ЕpiT, 55,51 ng/ml и 42,31 ng/ml, съответно. Невключените в АВР стероиди, 11 $\beta$ -ОН-А и 11 $\beta$ -ОН-Е, имаха средни концентрации от 806,72 ng/ml и 251,79 ng/ml.

От проследяваните в АВР концентрации на стероиди, достоверни разлики бяха установени само за А (M2<M1, p< 0,001), Е (M2<M1, p< 0,050) и 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol (M2<M1, p< 0,001) спрямо активно спортуващите мъже. Стойностите и за трите стероиди бяха по-високи при спортуващите в свободното време.

За 11 $\beta$ -ОН-А и 11 $\beta$ -ОН-Е, които не са включени в АВР, също бяха открити разлики само между спортуващите в свободното време и активно спортуващите мъже. 11 $\beta$ -ОН-А имаха по-високи концентрации при неспортуващите (M2<M1, p< 0,001), а 11 $\beta$ -ОН-Е по-ниски, в сравнение с активно спортуващите (M2<M1, p< 0,010).



**Таблица 19.** Вариационен анализ на концентрациите [ng/ml] на изследваните стероиди в урина при спортуващи в свободното време мъже (M1).

M1		A	E	11 $\beta$ -OH-A	11 $\beta$ -OH-E	5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol	EpiT	T
Mean		3651,7 5	2758,2 0	806,72	251,79	67,73	140,32	42,31	55,51
Std, Error of Mean		170,29	134,26	35,76	11,65	3,36	9,17	2,29	2,97
Median		3187,2 8	2498,3 1	748,86	211,22	57,91	110,45	33,17	46,68
Std, Deviation		2167,4 0	1708,8 3	455,09	148,33	42,79	116,68	29,13	37,76
Skewness		0,88	1,15	2,83	1,90	1,06	2,44	1,70	1,14
Kurtosis		0,38	1,40	17,13	5,72	0,92	8,77	3,33	1,27
Range		9552,6 6	8684,8 5	3991,4 9	984,35	219,47	783,96	143,7 7	190,6 4
Minimum		281,10	278,37	143,46	52,17	4,87	10,60	7,08	3,38
Maximum		9833,7 5	8963,2 1	4134,9 5	1036,5 1	224,34	794,56	150,8 5	194,0 2
Percentiles	2,5	772,32	484,93	233,34	105,54	12,91	19,49	9,16	6,71
	25,0	2055,7 7	1521,8 7	516,04	138,64	33,11	62,03	21,59	28,47
	75,0	5126,3 6	3576,6 1	1014,2 3	324,69	91,12	178,11	53,62	73,16
	97,5	9574,5 3	6925,5 3	1815,6 0	611,49	173,73	446,70	133,4 2	158,9 4
Differences		M2<M1 p<0,001	M2<M1 p<0,050	M2<M1 p<0,001	M2<M1 p<0,010	M2<M1 p<0,001			

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 20 е представен вариационният анализ на съотношенията между концентрациите на стероиди в урина при спортуващи в свободното време мъже (M1) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Средната стойност на съотношението T/epiT беше 1,55. Съотношенията A/E и A/T бяха 1,45 и 97,64, съответно,  $5\alpha/5\beta$  и  $5\alpha/Ep iT$  - 0,65 и 1,88.

Невключените в АВР съотношения  $11\beta\text{-OH-A}/11\beta\text{-OH-E}$ ,  $A/11\beta\text{-OH-A}$ ,  $E/11\beta\text{-OH-E}$  бяха със средни стойности 3,76; 4,74; 12,39.

За включените в АВР съотношения достоверни разлики бяха открити само между активно спортуващи и спортуващи в свободното време мъже при  $5\alpha/5\beta$  ( $M2 < M1$ ,  $p < 0,010$ ) и  $5\alpha/Ep iT$  ( $M2 < M1$ ,  $p < 0,001$ ). И за двете съотношения спортуващите в свободното време имаха по-високи стойности.

За съотношението  $A/11\beta\text{-OH-A}$  ( $M1 < M2$ ,  $p < 0,025$ ) достоверни разлики бяха открити между спортуващи в свободното време и активно спортуващи. Стойностите при спортуващите в свободното време бяха по-ниски, Достоверно по-високи бяха стойностите  $E/11\beta\text{-OH-E}$  при спортуващи в свободното време мъже спрямо активно спортуващи ( $M2 < M1$ ,  $p < 0,001$ ).

**Таблица 20.** Вариационен анализ на съотношения между концентрациите на изследваните стероиди в урина при спортуващи в свободното време мъже (M1).

M1		T/epiT	A/E	A/T	5 $\alpha$ /5 $\beta$	5 $\alpha$ /Epi T	11 $\beta$ - OH- A/11 $\beta$ - OH- E	A/11 $\beta$ - OH-A	E/11 $\beta$ - OH-E
Mean		1,55	1,45	97,64	0,65	1,88	3,76	4,74	12,39
Std, Error of Mean		0,07	0,05	8,61	0,04	0,10	0,18	0,17	0,66
Median		1,50	1,34	62,81	0,52	1,47	3,23	4,30	10,27
Std, Deviation		0,89	0,61	109,60	0,45	1,23	2,23	2,20	8,44
Skewness		0,50	0,96	2,94	1,37	1,93	1,88	0,89	2,54
Kurtosis		-0,45	1,32	8,84	1,68	4,53	5,06	0,64	10,39
Range		3,69	3,20	590,76	2,29	7,19	13,93	11,04	59,08
Minimum		0,09	0,36	20,33	0,08	0,46	0,35	0,96	2,11
Maximum		3,78	3,57	611,09	2,37	7,65	14,29	12,00	61,18
Percenti les	2,5	0,19	0,50	21,67	0,14	0,54	1,06	1,53	2,50
	25,0	0,83	1,04	41,89	0,32	1,08	2,40	3,19	7,06
	75,0	2,10	1,77	95,64	0,81	2,39	4,52	5,84	15,63
	97,5	3,56	3,12	486,56	1,80	5,64	9,57	10,16	32,94
Differences					M2<M1 p<0,010	M2<M1 p<0,010	M2<M1 p<0,001	M1<M2 p<0,025	M2<M1 p<0,001

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 21 е представен вариационният анализ на концентрациите на изследваните стероиди в урина при активно спортуващи мъже (M2) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Андростеронът (A) беше със средна концентрация 2234,73 ng/ml, E – 2116,86 ng/ml, 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol – 35,70 ng/ml, 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol – 100,55 ng/ml. Средната стойност на концентрацията на T (44,30 ng/ml) беше по-висока от тази на EpiT (33,66 ng/ml). Невключените в ABP стероиди, 11 $\beta$ -ОН-A и 11 $\beta$ -ОН-E, бяха със средни концентрации от 417,66 ng/ml и 300,07 ng/ml.

При A, E, 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol и 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol, които се проследяват в ABP, активно спортуващите мъже показаха достоверни разлики спрямо останалите две групи. За A (M2<M0, p< 0,010; M2<M1, p< 0,001) и 5 $\alpha$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol (M2<M0, p< 0,001; M2<M1, p< 0,001) бяха установени разлики и спрямо неспортуващите, и спрямо спортуващите в свободното време. Активно спортуващите показаха достоверно по-ниски концентрации спрямо двете групи. При E разликата беше между активно спортуващи и спортуващи в свободното време. Активно спортуващите мъже имаха по-ниски стойности на E (M2<M1, p< 0,050). За 5 $\beta$ A3 $\alpha$ 17 $\beta$ diol беше установена разлика само спрямо неспортуващите. Концентрациите на този стероид при активно спортуващите мъже бяха по-ниски отколкото при неспортуващите (M2<M0, p< 0,010).

И за двата невключени в ABP стероиди, 11 $\beta$ -ОН-A и 11 $\beta$ -ОН-E, бяха доказани достоверни разлики. При 11 $\beta$ -ОН-A активно спортуващите показаха достоверно по-ниски стойности както спрямо неспортуващите, така и спрямо спортуващите в свободното време (M2<M0, p< 0,001; M2<M1, p< 0,001). За 11 $\beta$ -ОН-E бяха установени разлики само спрямо спортуващите в свободното време мъже. Концентрациите на 11 $\beta$ -ОН-E при активно спортуващите бяха достоверно по-високи (M1<M2, p< 0,010).

**Таблица 21.** Вариационен анализ на концентрациите [ng/ml] на изследваните стероиди в урина при активно спортуващи мъже (M2).

M2		A	E	11β-OH-A	11β-OH-E	5αA3α17βdiol	5βA3α17βdiol	EpiT	T
Mean		2234,7 3	2116,8 6	417,6 6	300,0 7	35,70	100,55	33,66	44,30
Std, Error of Mean		151,84	222,61	29,13	21,05	3,98	10,22	3,52	4,95
Median		2080,2 8	1752,5 5	345,1 4	269,5 5	26,77	92,53	28,41	35,28
Std, Deviation		984,05	1442,6 7	188,7 7	136,4 0	25,76	66,26	22,83	32,09
Skewness		0,99	3,10	0,98	2,56	1,22	1,12	0,63	1,14
Kurtosis		0,97	12,61	0,22	10,75	0,91	1,02	-0,77	1,19
Range		4327,6 7	8245,6 8	754,5 4	795,7 5	96,28	282,60	77,22	136,8 2
Minimum		920,97	760,97	154,3 7	141,9 6	6,43	8,10	3,45	3,60
Maximum		5248,6 4	9006,6 5	908,9 1	937,7 1	102,71	290,70	80,66	140,4 2
Percen tiles	2,5	999,22	774,72	171,2 4	143,6 2	6,10	9,84	4,05	3,87
	25,0	1363,2 0	1306,7 6	288,2 4	225,0 4	18,27	59,01	15,15	21,34
	75,0	2811,5 7	2246,4 6	527,0 2	349,6 5	49,49	110,71	49,30	62,08
	97,5	4811,5 0	7077,6 1	895,0 6	671,2 5	102,04	263,74	78,06	131,6 2
Differences		M2<M0 p<0,01 0 M2<M1 p<0,001 1	M2<M1 p<0,05 0	M2<M0 p<0,01 M2<M1 p<0,001 01	M1<M2 p<0,010	M2<M0 p<0,001 M2<M1 p<0,001	M2<M0 p<0,010		

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

В Таблица 22 е представен вариационният анализ на съотношенията между концентрациите на стероиди в урина при активно спортуващи мъже (M2) и доказаните достоверни разлики между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis. Средните стойности на съотношенията включени в ABP, T/epiT, A/E, A/T, 5 $\alpha$ /5 $\beta$ , 5 $\alpha$ /EpiT, бяха: 1,65, 1,20, 82,65, 0,42, 1,37, съответно. Съотношенията 11 $\beta$ -ОН-А/11 $\beta$ -ОН-Е, А/11 $\beta$ -ОН-А, Е/11 $\beta$ -ОН-Е имаха средни стойности 1,55, 5,88 и 8,12, съответно.

От включените в ABP съотношения само при 5 $\alpha$ /5 $\beta$  и 5 $\alpha$ /EpiT бяха открити достоверни разлики. Между активно спортуващи и останалите две групи бяха установени разлики при 5 $\alpha$ /EpiT. Стойностите на 5 $\alpha$ /EpiT бяха достоверно по-ниски при активно спортуващите мъже и спрямо неспортуващите, и спрямо спортуващите в свободното време (M2<M0, p< 0,001; M2<M1, p< 0,010). При 5 $\alpha$ /5 $\beta$  бяха доказани достоверни разлики само спрямо спортуващите в свободното време. Активно спортуващите имаха по-високи стойности на това съотношение (M2-M1, p< 0,010).

От невключените в ABP съотношения, достоверни разлики бяха установени за 11 $\beta$ -ОН-А/11 $\beta$ -ОН-Е, А/11 $\beta$ -ОН-А и Е/11 $\beta$ -ОН-Е. Стойностите на съотношенията 11 $\beta$ -ОН-А/11 $\beta$ -ОН-Е (M2<M0, p< 0,001; M2-M1, p< 0,001) и Е/11 $\beta$ -ОН-Е (M2<M0, p< 0,010; M2-M1, p< 0,001) бяха по-ниски при активно спортуващите.

И в двата случая стойностите при активно спортуващите бяха по-високи. Разлики между активно спортуващи и спортуващи в свободното време бяха доказани и за съотношението А/11 $\beta$ -ОН-А. Стойностите на А/11 $\beta$ -ОН-А бяха достоверно по-високи при активно спортуващите (M1<M2, p< 0,025). За съотношението Е/11 $\beta$ -ОН-Е достоверните разлики бяха доказани между активно спортуващите и неспортуващите (M2<M0, p< 0,010) и спортуващите в свободното време мъже (M2<M1, p<0,001). И в двата случая стойностите на активно спортуващите бяха по-ниски.

**Таблица 22.** Вариационен анализ на съотношенията между концентрациите на изследваните стероиди в урина при активно спортуващи мъже (M2).

M2	T/epiT	A/E	A/T	5 $\alpha$ /5 $\beta$	5 $\alpha$ /Epi T	11 $\beta$ - OH- A/11 $\beta$ - OH-E	A/11 $\beta$ - OH-A	E/11 $\beta$ - OH-E
Mean	1,65	1,20	82,65	0,42	1,37	1,55	5,88	8,12
Std, Error of Mean	0,15	0,06	12,08	0,04	0,16	0,14	0,38	1,06
Median	1,48	1,28	51,47	0,42	1,13	1,34	5,68	6,46
Std, Deviation	0,97	0,42	78,29	0,23	1,05	0,94	2,47	6,89
Skewness	0,38	-0,06	2,20	0,90	2,22	2,52	0,46	3,02
Kurtosis	-0,52	0,21	3,93	1,24	6,37	8,41	-0,58	10,15
Range	3,58	1,83	309,80	1,00	5,42	4,97	9,38	36,81
Minimum	0,13	0,30	21,66	0,07	0,24	0,70	2,06	1,77
Maximum	3,71	2,13	331,46	1,08	5,66	5,67	11,44	38,58
Percenti les	2,5	0,14	0,32	25,63	0,08	0,25	0,73	2,34
	25, 0	1,01	0,91	38,98	0,25	0,76	0,94	3,75
	75, 0	2,43	1,42	83,13	0,53	1,65	1,66	7,71
	97, 5	3,61	2,11	322,96	1,05	4,70	4,51	11,39
Differences				M2<M 0 M2<M 1 p<0,01 0	M2<M 0 p<0,00 1 M2<M 1 p<0,01 0	M2<M 0 p<0,00 1 M2<M 1 p<0,00 1	M1<M 2 p<0,02 5	M2<M 0 p<0,00 1 M2<M 1 p<0,01

Independent-Samples Kruskal-Wallis Test. The significance level is 0.05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Като база за анализа на получените резултати, наблюдаваните достоверни разлики в концентрациите на AAS и техните съотношения бяха обобщени в Таблица 23.

**Таблица 23.** Съпоставени данни за доказаните достоверни разлики между концентрациите на стероиди в урина и на съотношенията между тях с непараметричния тест на Kruskal-Wallis.

Parameter	F0	F1	F2	M0	M1	M2
<b>A</b>				M2<M0 p<0,010	M2<M1 p<0,001	M2<M0 p<0,010 M2<M1 p<0,001
<b>E</b>					M2<M1 p<0,050	M2<M1 p<0,050
<b>11<math>\beta</math>-OH-A</b>	F2<F0 p=0,010	F2<F1 p<0,010	F2<F0 p=0,010 F2<F1 p<0,010	M2<M0 p<0,001	M2<M1 p<0,001	M2<M0 p<0,001 M2<M1 p<0,001
<b>11<math>\beta</math>-OH-E</b>	F0<F2 p<0,010		F0<F2 p<0,010		M1<M2 p<0,010	M1<M2 p<0,010
<b>5<math>\alpha</math>A3<math>\alpha</math>17<math>\beta</math>diol</b>	F2<F0 p<0,010	F2<F1 p<0,025	F2<F0 p<0,010 F2<F1 p<0,025	M2<M0 p<0,001	M2<M1 p<0,001	M2<M0 p<0,001 M2<M1 p<0,001
<b>5<math>\beta</math>A3<math>\alpha</math>17<math>\beta</math>diol</b>				M2<M0 p<0,010		M2<M0 p<0,010
<b>EpiT</b>	F2<F0 p<0,001	F2<F1 p<0,001	F2<F0 p<0,001 F2<F1 p<0,001			
<b>T</b>						
<b>T/epiT</b>	F0<F2) p<0,025	F1<F2 p<0,001	F0<F2) p<0,025 F1<F2 p<0,001			
<b>A/E</b>	F2<F0 p<0,010	F2<F1 p<0,010	F2<F0 p<0,010 F2<F1 p<0,010			
<b>A/T</b>						
<b>5<math>\alpha</math>/5<math>\beta</math></b>	F2<F0 p<0,050		F2<F0 p<0,050		M2<M1 p<0,010	M2<M1 p<0,010
<b>5<math>\alpha</math>/EpiT</b>		F1<F2 p<0,025	F1<F2 p<0,025	M2<M0 p<0,001	M2<M1 p<0,010	M2<M0 p<0,001 M2<M1 p<0,010
<b>11<math>\beta</math>-OH-A/11<math>\beta</math>-OH-E</b>	F2<F0 p<0,001	F2<F1 p<0,001	F2<F0 p<0,001 F2<F1 p<0,001	M2<M0 p<0,001	M2<M1 p<0,001	M2<M0 p<0,001 M2<M1 p<0,001
<b>A/11<math>\beta</math>-OH-A</b>		F1<F2 p<0,020	F1<F2 p<0,050		M1<M2 p<0,025	M1<M2 p<0,025
<b>E/11<math>\beta</math>-OH-E</b>				M2<M0 p<0,001	M2<M1 p<0,001	M2<M0 p<0,001 M2<M1 p<0,001



### 3.2 Дискусия

Тъй като участниците в изследването бяха разделени по пол и степен на обичайната им физическа активност, получените референтни стойности се отнасят за еднородни популации. Само за групата на активно спортуващите жени пробите, отговарящи на критериите (**Таблица 5**), не бяха достатъчен брой, за да бъдат изчислени референтни стойности. Както съобщават и други автори (Van Renterghem, et al., 2010; Martínez-Brito, et al., 2013) за субстанциите, включени в стероидния профил, не се наблюдава нормално разпределение на измерените концентрации, което определи използването на непараметрични методи.

Референтните стойности представени в **Таблица 9** и **Таблица 10** и извършения вариационен анализ между групите от съответен пол, показват липса на статистически значими разлики, за който и да е от показателите между групите на неспортуващите и спортуващите в свободното време и при двата пола. Това показва, че регулярната, умерена физическа активност (до 3 тренировки седмично), не оказва влияние върху стероидния профил.

Андрогенните метаболити с най-висока концентрация в урината са андростерон ( $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha$ -ol-17-one) и етиохоланолон ( $5\beta$ -Androstane- $3\alpha$ -ol-17-one). Прекурсори на екскретирания в урината андростерон могат да бъдат андростендион и тестостерон, а на етиохоланолон само андростендион. Заедно с тях в урината присъстват  $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol и  $5\beta$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol.  $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol се получава от андростерон в резултат на обратимо превръщане и от ДХТ - при необратимо превръщане.  $5\beta$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol е метаболит на етиохоланолон, а също може да бъде получен и от минорния и неактивен метаболит на тестостерон -  $5\beta$ -ДХТ. Следователно етиохоланолон и  $5\beta$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol произхождат най-вече от андростендион и тъй като са  $5\beta$ -стероиди са продукт основно на чернодробния метаболизъм (Chen & Penning, 2014). Това се потвърждава и от факта, че при мутации на чернодробния изоензим AKR1D1 се наблюдават понижени концентрации или липса на  $5\beta$ -редуцирани стероиди в урината и чернодробна недостатъчност (Gonzales, et al., 2004; Lemonde, et al., 2003; Palermo, et al., 2008).

Тъй като (1) между всички групи жени не са отчетени статистически значими разлики в концентрациите на А и Е, но съотношението А/Е при активно спортуващите жени показва по-ниски стойности спрямо другите две групи (**Таблица 23**) и (2) не са установени статистически значими разлики в измерените концентрации на  $5\beta$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol и при трите групи жени, но  $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol при активно спортуващите жени е с достоверно по-ниски концентрации спрямо другите две групи, тези констатации заедно с резултатите за  $11\beta$ -ОН-А (вж. по-долу), могат да бъдат обяснени не с понижен чернодробен метаболизъм (при  $5\beta$ -метаболитите няма разлики), а по-скоро с намалено периферно инактивиране.

Доказателства за променена скорост на метаболизма на андрогените при активно спортуващи се откриват и в резултатите при мъжете. При активно спортуващите мъже (1) концентрациите на А са по-ниски от тези при останалите групи, а (2) концентрациите на Е са по-ниски само спрямо спортуващите в свободното време, което обаче не се отразява на съотношението А/Е (не са установени статистически значими

разлики между всички групи мъже). Отчетената намалена екскреция на андростерон-глюкуронид може да се дължи на превръщане в периферните тъкани на андрогенно неактивния А, чрез т.нар. “Backdoor pathway” (Kamrath, et al., 2012; Fukami, et al., 2013; Bauman, et al., 2006; Gupta, et al., 2003) в активния андроген ДХТ, което е интракринно активиране за поддържане на необходимите андрогенни нива.

Прави впечатление, че където разликите са по-категорични за А, а именно на активно спортуващите спрямо спортуващите в свободното време мъже ( $M2 < M1$ ;  $p < 0,001$ ), се установява разлика и за Е ( $p < 0,050$ ). Установени са и достоверно по-ниски концентрации на  $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol при активно спортуващите спрямо неспортуващите и спортуващите в свободното време мъже и на  $5\beta$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol при активно спортуващите спрямо неспортуващите мъже. Тези констатации, заедно с откритите достоверно по-ниски концентрация на  $11\beta$ -ОН-Е (5 $\beta$ -метаболит с глюкокортикостероиден произход) спрямо спортуващите в свободното време както и на  $11\beta$ -ОН-А при активно спортуващите спрямо останалите две групи мъже, могат да бъдат обяснени с вероятно намаляване не само на периферния, но и на чернодробния метаболизъм на андрогените (5 $\beta$ -метаболитите намаляват).

На фона на тези метаболитни промени не се установяват статистически значими разлики в групите и на жените, и на мъжете в измерените концентрации на Т и стойностите на съотношението А/Т. В литературата съществуват данни, показващи липса на повишена концентрация на стероидогенни ензими и Т в мускулите в резултат на физически натоварвания (Vingren, et al., 2008). При активно спортуващите мъже неосъществяването на повишен биосинтез на Т се потвърждава от липсата на разлика в количеството инактивиран чрез глюкурониране Т и по-ниските концентрации на неговите глюкуронирани метаболити спрямо останалите две групи мъже. Тези резултати показват, че всички метаболитни промени успяват да задържат обичайното ниво на активен андроген в организма (Т). Сравнението на метаболитните промени между активно спортуващите мъже и жени показва, че жените постигат запазване на нивото на активен андроген (Т) само чрез намален периферен метаболизъм, докато при мъжете това се осъществява в комбинация от намален периферен метаболизъм и понижен чернодробен метаболизъм.

Тъй като съотношенията Т/ $eT$  и  $5\alpha/eT$ , заедно с други параметри на стероидния профил, са критерии за злоупотреба с Т и/или негови прекурсори (Mareck, et al., 2010; Kisman, et al., 1995), анализът на наблюдаваните разлики в стероидния профил на неспортуващи, спортуващи в свободното време и активно спортуващи мъже и жени са важни за изясняване на възможните изменения в стероидния профил в резултат на активни спортни тренировки.

За съотношението Т/ $eT$  между трите групи мъже не са откриват статистически значими разлики, също така не се откриват разлики и в концентрациите на Т и  $eT$ . Концентрациите на  $5\alpha$ -Androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol при активно спортуващите мъже са по-ниски спрямо останалите групи мъже, което заедно с липсата на разлики в концентрациите на  $eT$  между трите групи мъже води до по-ниски стойности на съотношението  $5\alpha/eT$  при активно спортуващите.

При активно спортуващите жени са установени по-ниски концентрации на  $eT$ , но по-високи стойности на съотношението Т/ $eT$  спрямо другите две групи жени, тъй

като разлики с останалите групи жени по отношение на Т не са наблюдавани. По-различно стоят нещата след разглеждане и на зависимостите за съотношението  $5\alpha/\text{epiT}$  при жените. епитестостерон (epiT) и  $5\alpha\text{-Androstane-}3\alpha,17\beta\text{-diol}$  имат по-ниски концентрации при активно спортуващите жени, спрямо останалите две групи, но при съотношението  $5\alpha/\text{epiT}$  активно спортуващите жени показват достоверно повишение на стойностите само спрямо спортуващите в свободното време. Това свидетелства за разлики в скоростта на метаболизма в периферните тъкани ( $5\alpha$ -метаболита) между активно спортуващите и спортуващите в свободното време жени.

Като се вземат пред вид коментираните разлики при активно спортуващите жени за съотношенията  $\text{T/epiT}$  и  $5\alpha/\text{epiT}$  и това, че производството на epiT е само 3% от производството на Т, а скоростта на екскрецията му е 30-50% от тази на Т (Wilson & Lipsett, 1966) както и че взаимното превръщане на Т и epiT е незначително (Dray & Ledru, 1966), може да се предположи, че скоростта на намаляване екскрецията на epiT при активно спортуващите жени е по-ниска отколкото скоростта на намаляване на  $5\alpha\text{-Androstane-}3\alpha,17\beta\text{-diol}$ .

### **11 $\beta$ -ОН-стероиди**

В урината 11 $\beta$ -ОН-Е е метаболит с глюкокортикостероиден произход, а присъстващият в по-високи концентрации 11 $\beta$ -ОН-А произхожда най-вече от 11-оксо С19 стероиди (Jones, et al., 2017; Shackleton, et al., 2008). От друга страна, 5 $\beta$ -редукцията е показателна за чернодробния метаболизъм (Chen & Penning, 2014), а  $5\alpha$ -редукцията - за метаболизма в периферните тъкани (Russell & Wilson, 1994). 11 $\beta$ -ОН-Е е 5 $\beta$ -стероид, а 11 $\beta$ -ОН-А -  $5\alpha$ -стероид. В този смисъл концентрациите на 11 $\beta$ -ОН-А и 11 $\beta$ -ОН-Е и съотношението 11 $\beta$ -ОН-А/11 $\beta$ -ОН-Е могат да се разглеждат като информативни за стероиди, произхождащи основно от надбъбречните жлези. При активно спортуващите и от двата пола са установени статистически значими по-ниски концентрации на 11 $\beta$ -ОН-А спрямо останалите групи от съответния пол, което показва понижен периферен метаболизъм на 11-оксигенирани С19-стероиди. Въпреки измерените по-високи концентрации на 11 $\beta$ -ОН-Е при активно спортуващите мъже спрямо спортуващите в свободното време и при активно спортуващите жени спрямо неспортуващите жени, винаги при активно спортуващите стойностите на съотношението 11 $\beta$ -ОН-А/11 $\beta$ -ОН-Е остават по-ниски спрямо всички останали групи от съответния пол. (т.е. вероятно при неспортуващите и спортуващите в свободното време се получават повече 11-оксигенирани С19 стероиди с произход извън надбъбречните жлези като механизъм за инактивиране; доказателство и за задържането на метаболизма при активно спортуващите).

Тъй като андростерон е източник на активен андроген, получен в периферните тъкани чрез "Backdoor pathway" (Kamrath, et al., 2012; Fukami, et al., 2013; Bauman, et al., 2006; Gupta, et al., 2003), а намалената му екскреция при активно спортуващите мъже свидетелства именно за това, то съотношението  $\text{A/}11\beta\text{-ОН-А}$  може да се разглежда като съпоставящо два възможни пътя за получаване на активни андрогени в периферните тъкани "Backdoor pathway" и 11-оксигенирани андрогенни пътища (Kamrath, et al., 2012; Pretorius, et al., 2017; Swart & Storbeck, 2015). В този смисъл (1) наблюдаваните по-ниски концентрации на А и 11 $\beta$ -ОН-А при активно спортуващите

спрямо останалите две групи мъже и (2) отчетената по-висока стойност на съотношението  $A/11\beta\text{-OH-A}$  при активно спортуващите мъже само спрямо спортуващите в свободното време, навежда на мисълта за използване на 11-оксигенирани андрогенни пътища едновременно с “Backdoor pathway”. Като се има пред вид че (1) при жените няма отчетени разлики в концентрациите на А между всички групи, а (2) са установени по-ниски концентрации на  $11\beta\text{-OH-A}$  при активно спортуващите спрямо останалите две групи жени и (3) по-високи стойности на съотношението  $A/11\beta\text{-OH-A}$  при активно спортуващите спрямо спортуващите в свободното време жени, може да се направи извода, че при активно спортуващите жени също са се включили 11-оксигенирани андрогенни пътища, вероятно поради по-голямото значение на надбъбречните 11-оксигенирани C19 стероиди за баланса на наличните активни андрогени при жените и че използването на 11-оксигенирани андрогенни пътища предхожда “Backdoor pathway”.

Установени са (1) статистически по-високи концентрации на  $11\beta\text{-OH-E}$  при активно спортуващите спрямо неспортуващите жени, (2) липса на статистически значими разлики в концентрациите на Е и (3) на съотношението  $E/11\beta\text{-OH-E}$  и при трите групи. В този контекст, ако разгледаме съотношението  $E/11\beta\text{-OH-E}$  като представително 5 $\beta$ -метаболизъм с глюкокортикостероиден ( $11\beta\text{-OH-E}$ ) и C19-стероиден произход (Е), се установява, че повишената екскреция на  $11\beta\text{-OH-E}$  при активно спортуващите жени не повлиява клирънса на 5 $\beta$ -стероиди. Докато при активно спортуващите мъже се отчитат по ниски концентрации на Е и  $11\beta\text{-OH-E}$  спрямо спортуващите в свободното време и макар, че не показват разлики спрямо неспортуващите мъже, стойностите на съотношението при активно спортуващите мъже  $E/11\beta\text{-OH-E}$  са по-ниски в сравнение с останалите две групи мъже. Това е още едно доказателство за понижен чернодробен метаболизъм при активно спортуващите мъже.

Анализът на разликите от стероидните профили в урина на включените в изследването групи лица показва, че активно спортуващите (10 и повече тренировки седмично) поддържат нивата на активния андроген тестостерон, въпреки намалената продукция на AAS, за сметка на намален метаболизъм и екскреция. От данните в литературата може да се предположи, че при по-продължителни интензивни натоварвания този компенсаторен механизъм може да се окаже недостатъчен и да се получи понижение на концентрацията на тестостерон.

Така на базата на стероидния профил може да се регистрира състояние на компенсиран намален синтез на AAS, което предхожда възможно неблагоприятно понижение на техните нива и да даде възможност за вземане на превантивни мерки по отношение на тренировъчното натоварване и възстановяването.

В Таблица 24 са систематизирани теоретично възможните състояния на стероидния метаболит в хода на тренировъчния процес при активно спортуващи, установими по промените в уринния стероиден профил. Тези състояния най-сигурно могат да бъдат диагностицирани при лонгитудинални наблюдения.

**Таблица 24.** Систематизирани теоретично възможните състояния на стероидния метаболит в хода на тренировъчния процес при активно спортуващи, установими по промените в уринния стероиден профил.

Нормална за индивида екскреция на тестостерон	Нормална за индивида екскреция на тестостерон	Намалена екскреция на тестостерон
<b>Нормално състояние на андрогенния синтез и метаболизъм</b>	<b>Компенсиран намален синтез на андрогени за сметка на намален метаболизъм</b>	<b>Намален синтез на андрогени, например след спрял прием на екзогенни AAS.</b>
Нормална за индивида екскреция на метаболити на тестостерона	Намалена екскреция на метаболити на тестостерона	Намалена екскреция на метаболити на тестостерона

## **4 ИЗВОДИ, ПРЕПОРЪКИ И ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.**

### **4.1 Изводи**

1. Не се откриват статистически значими разлики в стероидния профил на групите на неспортуващите и този на спортуващите в свободното време и при двата пола.

2. Концентрациите на тестостерон и стойностите на съотношението андростерон/тестостерон не показват статистически значими разлики между трите групи и при двата пола.

3. При активно спортуващите жени се наблюдава намалено периферно инактивиране на андрогените.

4. При активно спортуващите мъже се наблюдава намаляване на периферния и на чернодробния метаболизъм на андрогените.

5. При активно спортуващите и от двата пола се установява понижен периферен метаболизъм на 11-оксогенирани C19-стероиди.

6. В изследвания етап от подготовката при активно спортуващите се наблюдава приспособително намаляване на метаболизма и запазване на нивото на AAS в отговор на намаления им синтез.

7. Стероидният профил, изследван с валидирани GC-MS методи, може да служи като инструмент за анализ на свързаните със стероидогенезата метаболитни промени при активно спортуващи.

### **4.2 Препоръки**

1 Да се разшири кръгът на изследваните активно спортуващи с практикуващи различни видове спорт за установяване на референтни стойности специфични за отделни спортове.

2 Да се провежда системно индивидуално лонгитудинално проследяване на промените в стероидния профил през различни етапи от подготовката на спортистите за откриване на процеси на адаптация и дезадаптация на стероидния метаболит.

3. В бъдеще, изследването на стероидния профил да се включи като част от регулярните изследвания на спортистите и интерпретацията на получените резултати да намери приложение в контрола на тренировъчния процес при спорта за високи постижения.

### **4.3 Приноси**

1. За пръв път в България са изведени са референтни стойности на ендогенни анаболни андрогенни стероиди при активно спортуващи мъже с метод, валидиран по изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA.

2. За пръв път в България чрез анализ на получените с метод, валидиран по изискванията на ISO 17025 и ISL и TD EAAS на WADA стероидни профили е установена промяната в биосинтеза, метаболитния клирънс и екскрецията на ендогенните анаболни андрогенни стероиди при активно спортуващите спрямо неспортуващи и спортуващи в свободното време.

### **Публикации във връзка с дисертационния труд**

1. Шейтанова Т. Парадигмата – биологичен паспорт на спортиста, Медицина и спорт, 2020, 1, 48-54.
2. Шейтанова, Таня З., Заркова, Виолета Л., Орбецова, Мария М., Генчев, Генчо Д. Определяне на референтни стойности на андрогенни стероиди в урината при българска популация във възрастта 16-30 години, Ендокринология, 2020, 2, 100-119.

### **Участия в конгреси и симпозиуми с материали свързани с дисертацията**

1. Таня Шейтанова. „Парадигмата – биологичен паспорт на спортиста“, XX<sup>-та</sup> Международна конференция по Спортна медицина, 11.11.2019, Царско село, София.