



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Το προφίλ των ενδογενών στεροειδών ανδρογόνων ως διαγνωστικό εργαλείο για την λήψη συνθετικών αναβολικών στα ούρα αθλητών: το παράδειγμα της στανοζολόλης”

“Steroid profile as a diagnostic tool in detection of usage of exogenous androgenous anabolic steroids in urine sample:stanozolol”



ΜΠΑΛΑΜΠΑΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κιούκια Αθανασία (συνεπιβλέπουσα): Διδάκτωρ Βιοχημικός Μηχανικός, Αναλύτρια Εργαστηρίου Ελέγχου Doping ΟΑΚΑ

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ελέγχου Doping του Ο.Α.Κ.Α. κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016 .

Θα ήθελα, ιδιαίτερα, να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ελέγχου Doping του Ο.Α.Κ.Α, Δρ. Μαρία Τσίβου για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ και να θητεύσω σε ένα διεθνώς αναγνωρισμένο εργαστήριο υπό την επίβλεψη κορυφαίων ερευνητών. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Αθανασία Κιούκια, η οποία ανέλαβε προσωπικά την εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο όπως και την εκπόνηση της παρούσας εργασίας καθώς και για την εμπιστοσύνη της, την υποστήριξή της και την καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τις βαθύτατες μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλο του προσωπικό του Εργαστηρίου Ελέγχου Doping που ουδέποτε άφησε κάποια από τις πολυάριθμες απορίες μου αναπάντητες και ιδιαίτερα στον Δρ. Ιωάννη Αγγελή για τη συνεχή και απλόχερη προσφορά γνώσεων, και την αμέριστη ψυχολογική ενθάρρυνση και συμπαράσταση προς το πρόσωπο μου, συντελώντας έτσι καθοριστικά στην εκπόνηση αυτής της εργασίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Δημήτριο Κουρέτα όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες υποδείξεις του, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό και μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω την παρούσα εργασία στον χώρο του αθλητισμού στον οποίο και μεγάλωσα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Πρίφτη Αλέξανδρο, για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και τις συμβουλές του κατά την εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που εργάστηκαν στο Εργαστήριο για την προθυμία τους και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την υπομονή και τη στήριξη της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο:

Η ανίχνευση των συνθετικών αναβολικών ουσιών κατά την χρήση τους από τους αθλητές ως «ντόπινγκ» τείνει να γίνεται όλο και πιο δυσχερής, αφενός λόγω ταυτόχρονης χορήγησης διαφορετικών αναβολικών ουσιών σε εξαιρετικά χαμηλές ποσότητες, αλλά και της χρήσης από τους αθλητές αναβολικών ουσιών αγνώστου μοριακής δομής (designer steroids) των οποίων οι πρότυπες ουσίες είναι ανύπαρκτες, πράγμα που καθιστά αδύνατη την ποιοτική τους ανίχνευση. Κρίνεται μείζονος σημασίας η ύπαρξη ενός διαγνωστικού εργαλείου το οποίο θα επιτρέπει την έμμεση υπόδειξη της χρήσης τέτοιων συνθετικών αναβολικών ουσιών ακόμη και όταν αυτές είναι μη άμεσα ταυτοποιούμενες. Τελευταία οδηγία (2015-2016) από τον διεθνή οργανισμό αντι-ντόπινγκ (WADA) είναι η ανίχνευση του ατομικού βιολογικού προφίλ του αθλητή, που αφορά την λήψη πολλαπλών του δειγμάτων σε διάφορες χρονικές στιγμές και τη συγκρότηση μιας εξατομικευμένης βάσης δεδομένων με συγκριτικές τιμές για αιματολογικές και άλλες παραμέτρους των δειγμάτων του αθλητή, όπως αυτές είναι των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών ουσιών (μετρημένες στα ούρα του αθλητή), που αποτελούν το steroid profile. Μέσω του ατομικού στεροειδούς προφίλ δίδεται η δυνατότητα της μακροχρόνιας παρατήρησης των παραμέτρων του αθλητή και η στατιστική αξιοποίηση των έκτροπων τιμών που ενδεχομένως παρατηρηθούν, ως η πιθανότητα χρήσης εξωγενών ουσιών.

Σκοπός-σχεδιασμός της εργασίας:

Οι ουσίες και οι μεταβολίτες τους που αποτελούν το steroid profile είναι η τεστοστερόνη (T), επιτεστοστερόνη(E), ανδροστερόνη(AND), επιοχολανολόνη (ETIO), 5α- ανδροσταν-3α, 17βδιόλη, 5β- ανδροσταν-3α, 17βδιόλη, όπως επίσης και οι λόγοι T/E, ETIO/AND, 5A/5B, AND/T και τέλος 5A/E. Εξωγενής λήψη συνθετικών αναβολικών ουσιών, -είτε πρόκειται για ανδρογόνα όπως η τεστοστερόνη, είτε για λοιπές αναβολικές ουσίες όπως η π.χ. ή στανοζολόλη που δεν παράγεται ενδογενώς-, δύναται να παραποιήσουν τον μεταβολισμό των ενδογενών στεροειδών και συνεπώς το στεροειδές προφίλ, προκαλώντας στατιστικά ανιχνεύσιμες μεταβολές. Εικάσθηκε ότι ο στατιστικός έλεγχος ικανού αριθμού θετικών δειγμάτων για συνθετικές αναβολικές ουσίες θα μπορούσε υποδείξει αλλαγές στο στεροειδές προφίλ. Δεδομένου βέβαια ότι αυτές οι ενδεικτικές τιμές για κάθε θετικό δείγμα αθλητή αφορούσαν μια χρονική στιγμή λήψης ενός ή περισσότερων στεροειδών από

τον αθλητή δεν θα μπορούσαμε να καταλήξουμε σε ικανό συμπέρασμα με μόνη την συλλογή αυτών των στοιχείων. Η επιλογή της στανολόλης υπεδείχθη λόγω της σημαντικής στατιστικής διαφοράς σε τιμές του προφίλ των ενδογενών στεροειδών σε επιβεβαιωμένα μεγάλες συγκεντρώσεις της στανολόλης ή και με την συνοδό χρήση τεστοστερόνης. Για τον λόγο αυτό εξετάσαμε τις στατιστικές παρεκκλίσεις που προκλήθηκαν στις ενδογενείς στεροειδείς παραμέτρους σε ένα χρονικό φάσμα εφαρμόζοντας ειδικό μεταβολικό πρωτόκολλο πρόσληψης της στανολόλης. Η χορήγηση της ουσίας σε ειδικό μεταβολικό πρωτόκολλο βασισμένο σε βιβλιογραφικά δεδομένα σκοπό είχε να επιβεβαιώσει τον συσχετισμό της χρονικής μεταβολής των ενδογενών στεροειδών με την συγκέντρωση της στανολόλης στα ούρα του αθλητού.

Τρόπος διερεύνησης:

Η διερεύνηση αυτή βασίσθηκε στον ημιποσοτικό προσδιορισμό της στανολόλης κατά το μεταβολικό προφίλ ως προς τις συγκεκριμένες ενδογενείς παραμέτρους. Η ημιποσοτική ανίχνευση της στανολόλης στα ούρα του αθλητή προσδιορίσθηκαν με την χρήση αέρια χρωματογραφίας μάζας (GCMS, HRMS). Τα στεροειδή αναβολικά ενδογενή που θεωρήθηκαν έκτροπα μετρήθηκαν με βάσει του πληθυσμού τιμών και των ορίων του ποσοστού της επιτρεπόμενης αβεβαιότητας.

Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν α) αδυναμία της στανολόλης να επιφέρει μεταβολές στο steroid profile ικανές να οριοθετήσουν παράβαση του κώδικα β) σημαντική αύξηση του λόγου Τεστοστερόνης/Επιτεστοστερόνης γ) Βραχεία διάρκεια ανίχνευσης σε σχέση με την ανίχνευσης των μεταβολιτών μέσω της μεθόδου HRMS.

Πρόταση για μελλοντική μελέτη:

Προτείνεται ότι περαιτέρω διερεύνηση των ενδογενών μεταβολών του προφίλ ενδεχομένως θα συνδύαζε την μεταβολική μελέτη και άλλων αναβολικών ουσιών με πρώτη επιλογή την χρήση τεστοστερόνης.

ABSTRACT

Background:

The detection of synthetic anabolic substances used by athletes as 'doping', nowadays, tends to become more and more delicate, on one hand due to the multi-use of various anabolic substances at low doses, on the other hand due to the use of unknown substances (designer steroids) with lack of reference standards and thus making their detection impossible. Therefore, the possibility of a diagnostic tool for the indirect detection of such anabolic compounds is of crucial importance. Since January 2016 the world anti-doping agency (WADA) has imposed new guidelines on the construction of the individual biologic profile of athletes with regards to various hematological and other parameters, such as the endogenous steroid profile parameters. Via the endogenous steroid profile of the long term detection of parameters the possibility of the follow-up of samples is given together with the possible detectability of exogenous substances, in case of statistically different values.

Objective of work:

The substances that construct the endogenous metabolic steroid profile is Testosterone (T) Epitestosterone (Epi), Androsterone (And), Etiocholanolone (Etio), 5 α -androstane-3 α -17 β -diol, 5 β -androstane-3 α , 17 β -diol, as well as the ratios T/E, And/Etio, 5 α -diol/5 β -diol, And/T and 5 α -diol/E. The exogenous use of synthetic anabolic substances, androgens like testosterone or other synthetic anabolic substances like stanozolol can interfere with endogenous steroid metabolism causing statistical variations. Therefore, the statistical analysis of positive sample data produced in the antidoping laboratory of Athens could suggest changes in the endogenous steroid profile. However, due to the fact that each positive value refers to a specific moment, after administration of the specific substance, one cannot conclude by the sole analysis of these data. Stanozolol was selected to be administered to an athlete in order to follow his metabolic protocol i.e days after administration and compare the levels of concentration of stanozolol detected in urine, versus the data of endogenous steroid profile. The joint use of testosterone was also investigated.

Methods:

The investigation was based on the semi quantification of stanozolol concentration compared to the levels of endogenous steroid parameters during the metabolic protocol. The detection of stanozolol metabolites in the athletes' urine was based in GC/MS and HR/MS chromatography. The athletes endogenous steroid profile measurements were based on the standard uncertainty percentage as suggested by the endogenous steroid profile the WADA technical document of 2016.

Results:

The results showed a) inability of stanozolol usage alone to elevate steroid profile markers enough for a doping control violation to occur b) a statistically significant yet short lived elevation of the Testosterone/Epitestosterone ratio c) the inferiority of the steroid profile to detect suspicious findings compared to HRMS method.

Future work:

The investigation of the endogenous steroid profile can be furthered by following the metabolic protocol of other synthetic anabolic compounds widely used amongst athletes and especially after testosterone administration.

Περιεχόμενα

Doping.....	9
1.1. Ορισμός του Doping	9
1.2. Ιστορική αναδρομή.....	10
1.3. Η αρχή και η εξέλιξη του αντιντόπινγκ.....	11
1.4. Σύστημα ADAMS.....	13
1.5. Διαδικασίες Ελέγχου Ντόπινγκ.....	14
1.6. Διαπίστευση εργαστηρίων για τον έλεγχο doping.....	17
1.6.1. Ελληνικό εργαστήριο ελέγχου doping.....	18
1.7. Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών	19
1.7.1. Ουσίες που απαγορεύονται σε όλες τις περιπτώσεις (εντός και εκτός αγώνων) .	20
1.7.2. Ουσίες και μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων.....	24
1.7.3. Ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα	26
Κεφάλαιο 2	28
Ανδρογόνα	28
2.1. Ορισμός-Φυσιολογία.....	28
2.2. Δομή και στερεοχημεία των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών	29
2.3. Βιοσύνθεση και μεταβολισμός των ενδογενών ανδρογενών αναβολικών στεροειδών	31
2.3.1. Βιοσύνθεση της τεστοστερόνης	31
2.3.2. Μεταφορά της τεστοστερόνης.....	33
2.3.3. Μεταβολισμός της τεστοστερόνης και των υπολοίπων ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών	34
2.4. Συνθετικά ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή.....	37
2.5. Κατάχρηση των συνθετικών ενδογενών ανδρογενών αναβολικών στεροειδών – παρενέργειες	39
2.6. Στανολόλη.....	40
Κεφάλαιο 3	44
Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή.....	44
3.1 Ορισμός.....	44
3.1.1. Steroid Profile.....	44
3.2.1. Παράμετροι που επηρεάζουν το Steroid Profile	48
3.2.2 Παράγοντες που στοιχειοθετούν την ανίχνευση ύποπτου δείγματος	49
Κεφάλαιο 4	51
Αναλυτικές τεχνικές ελέγχου Doping	51

4.1.	Εισαγωγή στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς	51
4.2.	Αέρια χρωματογραφία.....	52
4.2.1.	Γενικά-Αρχή μεθόδου.....	52
4.2.2.	Οργανολογία Αεριοχρωματογράφου	53
4.3.	Φασματομετρία μαζών	57
4.3.1.	Εισαγωγή	57
4.3.2	Οργανολογία	58
4.3.2.2.	Πηγές ιοντισμού	59
4.3.2.4.	Ανιχνευτής.....	60
4.4.	Διασύνδεση της αεριοχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών	66
	Κεφάλαιο 5	67
5.1	Υλικά και μέθοδοι.....	67
5.1.1	Συλλογή και επεξεργασία μεταβολικών δειγμάτων ούρων	67
5.1.2.	Παρασκευαστική Πορεία TME 106.....	70
5.1.2.1	Υδρόλυση	70
5.1.2.2.	Εκχύλιση	71
5.1.2.3.	Παραγωγοποίηση	71
5.1.3	Επεξεργασία Δειγμάτων.....	72
5.1.4	Στατιστική επεξεργασία	73
5.1.5.	Όργανα, σκεύη και αντιδραστήρια.....	74
5.1.5.1	Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	74
5.1.5.2	Εργαστηριακά σκεύη	74
5.1.5.3	Αντιδραστήρια.....	75
5.1.5.4	Αέριος χρωματογράφος.....	77
	Κεφάλαιο 6	78
6.1	Αποτελέσματα	78
6.1.1	Ανάλυση θετικών δειγμάτων	78
6.1.2.	Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων	81
6.1.3.	Ανίχνευση μεταβολιτών μέσω HRMS	83
6.2	Συζήτηση	88
	Βιβλιογραφία	90

Κεφάλαιο 1

Doping

1.1. Ορισμός του Doping

Στην ιστορία του ντόπινγκ έχουν υπάρξει πολλοί ορισμοί. Ο πρώτος ορισμός, που υιοθετήθηκε το 1963 από το συμβούλιο Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Εξωσχολική Εκπαίδευση, ανέφερε εκτός των άλλων, ότι ως ντόπινγκ στον αθλητισμό ορίζεται η χορήγηση ή η χρήση από ένα υγιές άτομο, οποιαδήποτε ουσίας ή παράγοντα που υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν βρίσκεται στο σώμα ή βρίσκεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες, με σκοπό την αύξηση της απόδοσης του αθλητή κατά την διάρκεια του αγώνα.

Μετά την ίδρυση του παγκόσμιου οργανισμού αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA) το 1999 στην Λωζάννη της Ελβετίας και σύμφωνα με τον καθιερωμένο παγκόσμιο κώδικα αντιντόπινγκ της WADA που ανανεώνεται ετησίως, ως ντόπινγκ ορίζεται η παράβαση ενός ή περισσότερων κανονισμών αντιντόπινγκ. Τα παρακάτω αποτελούν παραβάσεις κανονισμών αντιντόπινγκ:

1. Η παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών της ή δεικτών της σε δείγμα αθλητή με εξαίρεση ουσίες που έχουν συγκεκριμένο ποσοτικό όριο. Ο αθλητής είναι υπεύθυνος για οποιαδήποτε απαγορευμένη ουσία ή μεταβολίτη ουσίας ή δείκτη βρεθεί στο δείγμα του.
2. Χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή. Αποτελεί προσωπική υποχρέωση κάθε αθλητή να διασφαλίζει ότι καμία απαγορευμένη ουσία δεν εισέρχεται στον οργανισμό του και ότι δεν γίνεται χρήση καμίας απαγορευμένης μεθόδου. Αντιστοίχως, δεν είναι απαραίτητο να αποδειχθεί πρόθεση, υπαιτιότητα, αμέλεια ή εσκεμμένη χρήση εκ μέρους του Αθλητή προκειμένου να στοιχειοθετηθεί παράβαση κανόνα αντιντόπινγκ για χρήση απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
3. Η αποφυγή δειγματοληψίας, ή η άρνηση ή η μη υποβολή σε δειγματοληψία χωρίς επαρκή αιτιολόγηση μετά από ειδοποίηση, όπως προβλέπεται στους ισχύοντες κανόνες αντιντόπινγκ.
4. Μη παροχή Πληροφοριών εντοπισμού. Οποιοσδήποτε συνδυασμός τριών άκαρπων ελέγχων και/ή ανεπαρκών υποβολών πληροφοριών εντοπισμού, όπως αυτές ορίζονται στο Διεθνές Πρότυπο Ελέγχων και Ερευνών, εντός περιόδου δώδεκα μηνών από έναν Αθλητή εγγεγραμμένο στον Κατάλογο ελεγχόμενων Αθλητών.
5. Παραποίηση ή απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε μέρους του ελέγχου ντόπινγκ.
6. Κατοχή απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου εντός ή εκτός αγώνα (για τις ουσίες που απαγορεύονται και εκτός αγώνων) από αθλητή ή από μέλος της ομάδας υποστήριξης του αθλητή.
7. Διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου

8. Η εντός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου ή η εκτός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης μεθόδου ή απαγορευμένης ουσίας που απαγορεύεται εκτός αγώνα.

9. Η συνδρομή, ενθάρρυνση, βοήθεια, προτροπή, συνωμοσία, συγκάλυψη ή οποιαδήποτε άλλη μορφή εσκεμμένης συνέργειας που περιλαμβάνει παράβαση κανόνα ντόπινγκ, απόπειρα παράβασης κανόνα ντόπινγκ ή παράβαση του Άρθρου 10.12.1 από άλλο πρόσωπο.

10. Η σύμπραξη από έναν αθλητή ή άλλο πρόσωπο υποκείμενο στη δικαιοδοσία ενός οργανισμού αντιντόπινγκ υπό την επαγγελματική ή αθλητική του ιδιότητα με οποιοδήποτε μέλος προσωπικού υποστήριξης αθλητή. Οι αθλητές δεν πρέπει να εργάζονται με προπονητές, εκπαιδευτές, ιατρούς ή άλλο προσωπικό υποστήριξης των αθλητών που τελούν υπό αποκλεισμό λόγω παράβασης κανονισμών αντιντόπινγκ ή που έχουν καταδικαστεί ποινικά ή τους έχει επιβληθεί ποινή σε επαγγελματικό επίπεδο σχετικά με το ντόπινγκ.

Στα ελληνικά η καλύτερη ερμηνεία του όρου ντόπινγκ είναι ο όρος φαρμακοδιέγερση, όμως για να μπορέσουν να καλυφθούν όλες οι μορφές ντόπινγκ πέρα από την χρήση φαρμάκων, έχει καθιερωθεί ο αγγλικός όρος **[1]** .

1.2. Ιστορική αναδρομή

Το ντόπινγκ αποτελεί στις μέρες μας μια παγκόσμια πραγματικότητα, ένα σοβαρό πρόβλημα στον διεθνή επαγγελματικό αθλητισμό και όχι μόνο. Ένα συνυφασμένο ζήτημα με κάθε αθλητικό γεγονός και που θέτει υπό αμφισβήτηση την προσπάθεια και τις επιδόσεις των αθλητών. Το ντόπινγκ, στοχεύει στην τεχνητή βελτίωση των επιδόσεων και έτσι αντιτίθεται στις δύο βασικές έννοιες του αθλητισμού. Το «ευ αγωνίζεσθαι» και το «νους υγιής εν σώματι υγιή». Το ντόπινγκ δεν αποτελεί πρόβλημα μόνο των σύγχρονων κοινωνιών. Από τότε που εισήχθη η έννοια του ανταγωνισμού στον αθλητισμό, αναζητούνται συνεχώς τρόποι για την τεχνητή βελτίωση της αθλητικής απόδοσης και της υπερνίκησης των ορίων της φύσης. Τον 2ο αιώνα π.Χ. ο Φιλόστρατος και ο Γαλήνος αναφέρουν την κατανάλωση ουσιών από αθλητές για την αύξηση της μυϊκής τους μάζας και ο Πλίνιος αναφέρει τον 1ο αιώνα π.Χ. την κατανάλωση του φυτού ίππουρις από δρομείς για τον σκοπό αυτό. Επίσης υπάρχουν αναφορές για την κατανάλωση ορισμένων μανιταριών και σπόρων σπασαμιού κατά τους ολυμπιακούς αγώνες της αρχαιότητας όπως και επίσης της κατανάλωσης αφεψήματος έφεδρας που την συνιστούσαν κινέζοι θεραπευτές για την αύξηση της αθλητικής απόδοσης. Έχει καταγραφεί επίσης ότι κατά την ρωμαϊκή εποχή οι αρματοδρομείς έτρεφαν τα άλογά τους με διάφορα μίγματα ουσιών έτσι ώστε να τρέχουν πιο γρήγορα. Ωστόσο είναι δύσκολο να βρεθούν πολλές αναφορές για εκείνη την περίοδο καθώς οι γνώσεις για το ντόπινγκ ήταν καλά κρυμμένη από τους ιερείς. Ο όρος ντόπινγκ προέρχεται από την λέξη dop, που αναφέρεται σε φυσικής προέλευσης απόσταγμα από φλοιούς σταφυλιών που χρησιμοποιούνταν ως διεγερτικό σε θρησκευτικές εκδηλώσεις από τους κάφρους την ΝΑ Αφρικής. Οι ολλανδοί άπκοικοι Boers χρησιμοποιούσαν τον όρο dop για να περιγράψουν οποιοδήποτε διεγερτικό αφέψημα και έτσι ο όρος διαδόθηκε παγκοσμίως. Τελικά, ο

όρος υιοθετήθηκε για ένα ευρύτερο φάσμα ουσιών όπου περιγράφηκε ως ντόπινγκ στον αθλητισμό όταν γινόταν χρήση αυτών των ουσιών και εμφανίζεται πρώτη φορά σε Αγγλικό λεξικό το 1889. Η πρώτη αξιόπιστη καταγραφή του ντόπινγκ συνέβη το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα και ήταν το 1865 στην κολύμβηση σε αγώνα στο κανάλι του Άμστερνταμ. Ο πρώτος θάνατος από ντόπινγκ καταγράφεται το 1896, όπου ο Άγγλος ποδηλάτης A. Linton πέθανε μετά από λήψη εφεδρίνης στον αγώνα Παρίσι-Μπορντό. Ωστόσο, η δραματική αύξηση ουσιών ντόπινγκ ξεκίνησε την δεκαετία του 1960, όπου η κοινωνία εκείνες τις μέρες πίστευε ότι υπάρχουν φάρμακα ικανά να οδηγήσουν σε οποιαδήποτε επιτυχία. Δυστυχώς, η χαραυγή του 21ου αιώνα μας βρίσκει αντιμέτωπους με πολλά κρούσματα παραβάσεων από αθλητές αλλά και σκάνδαλα ντόπινγκ που πλήττουν ολόκληρα αθλήματα αλλά και χώρες. Πριν τους ολυμπιακούς αγώνες του Σύδνεϋ η Κίνα απέσυρε 17 μέλη από τα 311 της ισχυρής ολυμπιακής της ομάδας, ύστερα από ανακοίνωση της ΔΟΕ (διεθνής ολυμπιακή επιτροπή) όπου έλεγε ότι θα κάνει εξέταση αίματος, για πρώτη φορά, σε αθλητές για να πιάσει αυτούς που έκαναν χρήση ερυθροποιητίνης. Η επόμενη ολυμπιάδα της Αθήνας αμαυρώθηκε με το σκάνδαλο των δύο ελλήνων πρωταθλητών Κατερίνας Θάνου και Κώστα Κεντέρη όπου τιμωρήθηκαν για αποφυγή αιφνιδίου ελέγχου ντόπινγκ μία εβδομάδα πριν την έναρξη των Ολυμπιακών αγώνων. Υπάρχουν ακόμα πολλά παραδείγματα σπουδαιών αθλητών που βρέθηκαν θετικοί σε χρήση απαγορευμένων ουσιών όπως του χρυσού ολυμπιονίκη Justin Gatlin όπου το 2006 βρέθηκε θετικός σε τεστοστερόνη, τον δια βίου αποκλεισμό του θρύλου της ποδηλασίας Lance Armstrong ο οποίος έκανε χρήση αναβολικών στεροειδών τα οποία έκρυβε μετέπειτα με μεταγγίσεις αίματος, τον αποκλεισμό της Φανής Χαλκιά από τους Ολυμπιακούς αγώνες τους Πεκίνου το 2008 όπου βρέθηκε θετική σε μεθυλτριενολόνη (M3) όπως και την περίπτωση της οικιοθελούς παραδοχής για μακροχρόνια χρήση αναβολικών και συνθετικών στεροειδών αλλά και για συμμετοχή στο σκάνδαλο της BALCO, ύστερα από πιέσεις, της πρωταθλήτριας Marion Jones. Τα παραδείγματα του παρελθόντος είναι πολλά και δυστυχώς δεν σταματούν να ανακοινώνονται συνεχώς νέα κρούσματα. Τελευταία στη λίστα απαγορευμένων ουσιών (2016) η χρήση meldonium από μια διεθνούς φήμης τενίστρια την Sarapona η οποία ισχυρίστηκε ότι το χρησιμοποιούσε από δεκαετίας για ιατρικούς λόγους αλλά και σάλος που ξέσπασε για την Ρωσική ομάδα του στίβου για ψευδή αποτελέσματα χρήσης μείγματος αναβολικών ουσιών φτάνοντας στην συνολική άρσης της πιστοποίησης του Ρωσικού εργαστηρίου αντιντόπινγκ. [2-6]

1.3. Η αρχή και η εξέλιξη του αντιντόπινγκ

Η ανίχνευση των ανεπιθύμητων και αργότερα απαγορευμένων ουσιών φαίνεται ότι συμβαδίζει με την ικανότητα της επιστημονικής κοινότητας να ανιχνεύει τις ουσίες αυτές. Η επιστημονική αρχή των ελέγχων αντιντόπινγκ χρονολογείται κατά τους περισσότερους το 1910 στην Αυστρία όταν σε αγώνες ιπποδρομίας παρατηρήθηκαν κάποια μη αναμενόμενα αποτελέσματα. Επί παραδείγματι, ο ρώσος χημικός Bukowski απομόνωσε αλκαλοειδή από τον σίελο των αλόγων το 1910. Η ανάλυση αποτελούνταν και επιτυγχάνονταν μετά από πολλά στάδια εκχύλισης και συμπύκνωσης του δείγματος, τα οποία οδηγούσαν σε οπτική παρατήρηση ύστερα από αντιδράσεις σχηματισμού έγχρωμων ενώσεων ή αντιδράσεις καθιζήσεως. Με αυτόν τον τρόπο άρχισαν να ανιχνεύονται οι ουσίες στρυχνίνη, ηρωίνη και μορφίνη.

Το 1928, η Διεθνής ομοσπονδία ερασιτεχνικού αθλητισμού έγινε η πρώτη ομοσπονδία αθλητισμού που απαγόρευσε το ντόπινγκ στα αγωνίσματα του στίβου. Ακολούθησαν ακόμα πολλές ομοσπονδίες, αλλά το αντιντόπινγκ βρισκόταν ακόμα σε πρώιμο στάδιο με ελάχιστη αποτελεσματικότητα. Ωστόσο, τα πολλά κρούσματα ντόπινγκ οδήγησαν τις ομοσπονδίες να μιλήσουν ανοιχτά για τις άσχημες επιπτώσεις των ουσιών στον οργανισμό, αφού μέχρι τότε το ντόπινγκ αποτελούσε «κοινό μυστικό», και στην ανακάλυψη νέων και πιο ευαίσθητων μεθόδων για την ανίχνευση διεγερτικών, ναρκωτικών και νιτρογλυκερίνης όπως η χρωματομετρία, η νεφελομετρία, η κρυσταλλογραφία και η μικροκαθίζηση. Γινόταν εκχύλιση με αιθέρα και αντίδραση με πικρικό οξύ προς σχηματισμό διαυγούς κίτρινου διαλύματος. Η ανάγκη για μεγαλύτερη ειδικότητα της μεθόδου οδήγησε στην χρήση της χρωματογραφίας χάρτη. Το 1950, αρχίζει να εφαρμόζεται σε συνδυασμό, με ανιχνευτή φλόγας και αζώτου-φωσφόρου η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Τα επόμενα χρόνια φαίνεται, ότι οι πρώτοι θάνατοι έπαιξαν τον ρόλο τους έτσι ώστε να ευαισθητοποιηθούν οι αρχές για την χρήση ουσιών στον αθλητισμό και έτσι το 1963 εμφανίζεται η πρώτη νομοθεσία αντιντόπινγκ στην Γαλλία. Έλεγχοι φαρμάκων πρωτοεμφανίστηκαν στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικό το 1968, και στους χειμερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες της Γκρενόμπλ του ίδιου έτους. Αξιόπιστες μέθοδοι για τον εντοπισμό αναβολικών ανδρογόνων εισήχθησαν το 1974 και το 1976 με την αέρια χρωματογραφία (GC, gas chromatography) να ακολουθείται από την υγρή χρωματογραφία (LC, liquid chromatography). Παράλληλα την δεκαετία του 1970, αναπτύσσεται και η φασματομετρία μάζας (MS, mass spectrometry). Ο συνδυασμός MS με χρωματογραφία (LC-MS, GC-MS) με την βοήθεια ιοντισμού ηλεκτρονίων (EI Electron Ionization) οδηγεί στην ανίχνευση αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών και άλλων ουσιών όπως οι εφεδρίνες με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια. Ενώ στο παρασκευαστικό μέρος, ακολουθείται η εκχύλιση στερεάς φάσης. Ως επακόλουθο αυτής της προόδου, ο αριθμός των αθλητών που βρισκόντουσαν θετικοί σε χρήση απαγορευμένων ουσιών αυξήθηκε πάρα πολύ την δεκαετία του 1970 και ειδικότερα στα αθλήματα δύναμης. Το 1994, αναφέρεται για πρώτη φορά το σύστημα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας (HR, High Resolution) GC-HRMS/MS που συμβάλει στην ανίχνευση ουσιών όπως οι μεταβολίτες της στανοζολόλης. Από το 1993 μέχρι σήμερα μεγαλύτερη ανάπτυξη σημειώνουν οι συνδυασμένες τεχνικές υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS, LC-MS/MS, MALDI-TOFMS). Το 2004 στους Ολυμπιακούς Αγώνες την Αθήνας, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το απλό τετράπολο (quadropole, Q)όπου παραμένει από τις αρχές του '80 ο βασικός ανιχνευτής μάζας. Μεγαλύτερη ακρίβεια επιτυγχάνεται με την χρήση τριπλού τετράπολου αναλυτή χρόνου πτήσης ιόντων (Time Of Flight, TOF) σε συνδυασμό με τετράπολο (QTOF) και αναλυτή παγίδας ιόντων (Orbitrap). Σε κάθε περίπτωση οι αναλυτικές τεχνικές συνεχώς εξελίσσονται οδηγώντας στην ανίχνευση περισσότερων και καινούργιων ουσιών, κυρίως μικρού μοριακού βάρους, με μεγαλύτερη ακρίβεια, ευαισθησία, ταχύτητα, εκλεκτικότητα και ειδικότητα [7,8].

1.4. Σύστημα ADAMS

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα anti-doping, η WADA φέρει την υποχρέωση να συντονίζει τις ενέργειες κατά του doping και να προσφέρει μηχανισμούς στα συνεργαζόμενα εργαστήρια για την εκτέλεση του Κώδικα.

Το σύστημα ADAMS (Anti Doping Administration and Management System) δημιουργήθηκε για αυτόν τον λόγο. Είναι μια διαδικτυακή αποθήκη δεδομένων, που απλοποιεί τις καθημερινές ενέργειες των άμεσα σχετιζόμενων, από τους αθλητές που δηλώνουν whereabouts, έως τις ομοσπονδίες που οργανώνουν τον έλεγχο και τα εργαστήρια που τους πραγματοποιούν. Είναι ένα απλό πρόγραμμα, εύκολο στην χρήση, διαθέσιμο σε πολλές γλώσσες και δωρεάν για κάθε ενδιαφερόμενο, με απώτερο στόχο την αποτελεσματικότητα στην μάχη κατά του doping.

Το ADAMS λειτούργησε πρώτη φορά τα μέσα του 2005. Το σύστημα έκτοτε εισήχθη και ενισχύθηκε από πολυάριθμους οργανισμούς anti-doping, εργαστήρια και αθλητές ανά τον κόσμο.

Οι κύριες λειτουργίες του ADAMS είναι 4:

1. Whereabouts Αθλητών

Η διαδικτυακή φύση του συστήματος επιτρέπει στους αθλητές να δηλώνουν την παρουσία τους από οποιαδήποτε περιοχή στον κόσμο και όση δεν έχουν πρόσβαση σε διαδίκτυο μπορούν να ορίσουν πληρεξούσιο στην θέση τους. Αυτό επιτρέπει στις άμεσα ενδιαφερόμενες ομοσπονδίες να μοιράζονται πληροφορίες για τα whereabouts των αθλητών μεγιστοποιώντας το στοιχείο του αιφνιδιασμού. Οι αθλητές μπορούν να αλλάξουν τα στοιχεία της παρουσίας τους μέσω αποστολής γραπτού μηνύματος (sms).

2. Πλατφόρμα αποθήκευσης δεδομένων

Αποθηκεύονται δεδομένα, συγκεκριμένα εργαστηριακά αποτελέσματα, θεραπευτικές εξαιρέσεις αθλητών και παραβιάσεις του κώδικα. Επιτρέπει την ανταλλαγή μεταξύ των αρμόδιων ομοσπονδιών κι εργαστηρίων κι εξασφαλίζει την απόλυτη διαφάνεια κατά την πραγματοποίηση των ελέγχων.

3. Πλατφόρμα Ελέγχου Doping

Η προσφορά της βάσης δεδομένων του ADAMS στους οργανισμούς anti doping, είναι ένα απαραίτητο εργαλείο για την διαχείριση ενός προγράμματος anti doping, τόσο εντός όσο και εκτός αγώνων. Οι ενδιαφερόμενοι μπορούν να χρησιμοποιήσουν το ADAMS για τον προγραμματισμό, συντονισμό και την παραγγελία ελέγχων, όπως επίσης και την διαχείριση των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Ο συντονισμός βοηθά στην αποφυγή μη απαιτούμενου επανελέγχου.

4. Διαχείριση Εξαιρέσεων Φαρμακευτικών Θεραπειών (Therapeutic Use Exemption)

Το ADAMS επιτρέπει την διαδικτυακή διαχείριση των αιτήσεων για TUE, όπως και την ενημέρωση όσων περιλαμβάνονται στην διαδικασία [9].

1.5. Διαδικασίες Ελέγχου Ντόπινγκ

Οι διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ ρυθμίζονται από τα Διεθνή Πρότυπα Ελέγχου του Παγκόσμιου Κώδικα Αντιντόπινγκ και βάσει αυτών, έλεγχος πραγματοποιείται με έναν από

τους δύο τρόπους:

1. Εντός αγώνων έλεγχος (σε μια αθλητική διοργάνωση)
2. Εκτός αγώνων έλεγχος (στις συγκεντρώσεις ομάδων, στο σπίτι ή στο χώρο προπόνησης) [1]

Και οι δύο τρόποι ακολουθούν τις ίδιες βασικές διαδικασίες συλλογής δειγμάτων, χρησιμοποιούν τον ίδιο εξοπλισμό δειγματοληψίας και ακολουθούν τα ίδια πρότυπα για τον έλεγχο, όπως ορίζεται στον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ. Σύμφωνα με αυτό το έγγραφο υπάρχει επιλογή αθλητή, ανακοίνωση, δειγματοληψία και εργαστηριακή ανάλυση. Για την εξασφάλιση της ανωνυμίας του αθλητή, παγκοσμίως τα Εργαστήρια Αντιντόπινγκ και το προσωπικό των εργαστηρίων αυτών δεν εμπλέκονται στις άλλες διαδικασίες πέραν της εργαστηριακής ανάλυσης. Για τη δειγματοληψία έχουν καταρτιστεί λεπτομερείς διαδικασίες, οι οποίες είναι ενσωματωμένες, τόσο στο Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους, όσο και στη νομοθεσία κάθε χώρας. Στην Ελλάδα ο θεσμοθετημένος εθνικός φορέας που φέρει την ευθύνη για τη διαδικασία της δειγματοληψίας και την εφαρμογή και διαχείριση αποτελεσματικής πολιτικής αντιντόπινγκ στη χώρα είναι το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.). Ένα αποτελεσματικό πρόγραμμα αρχίζει με ένα πλάνο συλλογής δειγμάτων, το οποίο περιλαμβάνει ελέγχους σωστά σχεδιασμένους ως προς τον χρόνο τέλεσης σε όλη τη διάρκεια του έτους και χωρίς προηγούμενη προειδοποίηση[9]. Οι οργανισμοί αντιντόπινγκ διασφαλίζουν τη διενέργεια δειγματοληψίας σε περιόδους αυξημένου κινδύνου για ντόπινγκ και δρουν αποτρεπτικά για χρήση εργογόνων φαρμάκων σε όλα τα αθλήματα. Στους αγώνες, τα κριτήρια επιλογής ποικίλλουν από άθλημα σε άθλημα ή από διοργάνωση σε διοργάνωση. Οι αθλητές ειδοποιούνται προσωπικά για την επιλογή τους προς εξέταση από τον υπεύθυνο έλεγχου ντόπινγκ (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.). Μετά από τη γνωστοποίηση τόσο για τους εντός όσο και για τους εκτός αγώνων ελέγχους, οι δειγματολήπτες (Ε.Σ.ΚΑ.Ν.) συνοδεύουν συνεχώς τον αθλητή έως ότου ληφθεί και σφραγιστεί το δείγμα. Εντός αγώνων, οι αθλητές ειδοποιούνται συνήθως στον αγωνιστικό χώρο και έχουν 60 λεπτά από τη στιγμή της ανακοίνωσης για να προσέλθουν στο σταθμό ελέγχου ντόπινγκ. Ο αθλητής μπορεί να χρησιμοποιήσει το χρονικό όριο των 60 λεπτών για αποθεραπεία, για να παρευρεθεί στην τελετή απονομής επάθλων, για να εκπληρώσει τις υποχρεώσεις του προς τα ΜΜΕ, να βρει έναν εκπρόσωπο των αθλητών, να βρει τη διαπίστευσή του κ.λπ. Η ανακοίνωση για έλεγχο εκτός αγώνων πραγματοποιείται συνήθως στο σπίτι ή στο χώρο προπόνησης του αθλητή. Στους αγώνες, τα κριτήρια επιλογής ποικίλλουν από άθλημα σε άθλημα ή από διοργάνωση σε διοργάνωση. Συνήθως, δεν επιλέγονται για έλεγχο συγκεκριμένοι αθλητές αλλά οι θέσεις κατάταξης. Εκτός αγώνων, οι επιλογές πραγματοποιούνται συνήθως με τη διαδικασία μιας αυτοματοποιημένης κλήρωσης ή και κατ' επιλογήν. Οι συνήθειες επιλογές δειγμάτων είναι ούρα και αίμα και

σπανιότερα σάλιο ή τρίχες. Για την ανίχνευση των περισσότερων απαγορευμένων φαρμακευτικών ουσιών επιλέγεται το δείγμα ούρων, λόγω της ευκολίας λήψης του, του σχετικά μεγάλου λαμβανόμενου όγκου και κυρίως επειδή η συγκέντρωση των φαρμάκων αναμένεται να είναι υψηλότερη από ότι στο αίμα. Η διαδικασία συλλογής δειγμάτων ούρων ελέγχεται προσεκτικά για να διασφαλιστεί η ακεραιότητα της διαδικασίας ελέγχου ντόπινγκ. Οι υπεύθυνοι για τον έλεγχο ντόπινγκ εργάζονται ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχής εξέταση των αθλητών, να μειωθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης του δείγματος και να διατηρηθεί η ασφάλεια του δείγματος. Όλοι οι αθλητές επιτηρούνται συνεχώς κατά τη διάρκεια της παροχής δείγματος από δειγματολήπτη του ίδιου φύλου (αν είναι διαφορετικού φύλου ο αθλητής έχει δικαίωμα αν επιθυμεί να αρνηθεί να δώσει δείγμα). Οι αθλητές ενθαρρύνονται να έχουν έναν αντιπρόσωπο αθλητών που θα τους συνοδεύει σε όλη τη διαδικασία ελέγχου ντόπινγκ, εκτός από τη διάρκεια παροχής του δείγματος. Οι ελεγχόμενοι αθλητές επιλέγουν από τρεις τουλάχιστον συσκευασίες ένα σφραγισμένο αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη. Ακολούθως, επιλέγεται μία από τουλάχιστον τρεις συσκευασίες ελέγχου ούρων, οι οποίες περιέχουν δύο φιάλες (συνήθως διαφανείς και γυάλινες), μια με την ένδειξη “δείγμα Α” και μια με την ένδειξη “δείγμα Β” και αντίστοιχα πώματα κατάλληλα σφραγισμένα, ενώ πάνω τους είναι ανεξίτηλα αποτυπωμένος ένας μοναδικός κωδικός αριθμός δείγματος. Το δείγμα, έπειτα, μεταγγίζεται από τον αθλητή. Περίπου το 1/3 της ποσότητας των ούρων από τον ουροσυλλέκτη στη φιάλη Β και τα 2/3 περίπου στη φιάλη Α. Στη συνέχεια, ο αθλητής κλείνει ερμητικά τις δύο φιάλες και ελέγχει, όπως και ο υπεύθυνος ελέγχου, εάν υπάρχουν τυχόν διαρροές, ενώ υπολειπόμενα ούρα απορρίπτονται εφόσον υπάρχουν. Ο υπεύθυνος ελέγχου ντόπινγκ παρέχει στον αθλητή οδηγίες για το πώς να επιθεωρήσει τη διαδικασία δειγματοληψίας και να ολοκληρώσει τη γραφική εργασία συμπληρώνοντας το σχετικό πρωτόκολλο, που υπογράφεται από όλους τους εμπλεκόμενους. Τα δείγματα μαζί με τα απαραίτητα έγγραφα τοποθετούνται μέσα σε σάκους μεταφοράς, ασφαρίζονται και μεταφέρονται στο εργαστήριο που θα πραγματοποιήσει την ανάλυση. Όλα τα δείγματα αποστέλλονται στα διαπιστευμένα από την WADA εργαστήρια, ώστε τα αποτελέσματα να αναγνωρίζονται ως έγκυρα από τις αθλητικές αρχές. **[3]**

Η αναγνώριση των εργαστηρίων στα πλαίσια του εξωτερικού ελέγχου ποιότητας περιλαμβάνει μεταξύ άλλων συνεχείς ελέγχους ικανότητας και τυφλούς ελέγχους. Τα διαπιστευμένα από την WADA εργαστήρια, συνολικά 34, βρίσκονται υπό διαρκή έλεγχο και είναι υποχρεωμένα να υποβάλλονται στην δοκιμασία εξωτερικού ελέγχου ποιότητας τουλάχιστον 3 φορές το χρόνο (EQAS-Proficiency Test). Αν ένα εργαστήριο αποτύχει στην ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων, χάνει τη διαπίστευση μέχρι να επιτύχει ή μεταπίπτει σε κατάσταση περιορισμένης δικαιοδοσίας, οπότε και χάνει την διαπίστευση του ολοκληρωτικά. Ο WADA προτείνει μεθόδους επαναδιαπίστευσης. Το Εργαστήριο Ελέγχου Φαρμακοδιέγερσης του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών (Ο.Α.Κ.Α.) διαπιστεύτηκε από τη ΔΟΕ το 1990. Επίσης, τα εργαστήρια πρέπει να είναι διαπιστευμένα από τον Εθνικό Φορέα Διαπίστευσης, που στην Ελλάδα είναι το Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.), σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17025. Η αξιοπιστία του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ του Ο.Α.Κ.Α αυξάνει σημαντικά με τη διαπίστευσή του από το Ε.ΣΥ.Δ. Ακόμη, το εργαστήριο του Ο.Α.Κ.Α. είναι διαπιστευμένο για ανάλυση δειγμάτων αλόγων από τον Α.Ο.Ρ.Σ. (Association of Official Racing Chemists) **[11]**. Κατά την παραλαβή των δειγμάτων

από εξουσιοδοτημένο μέλος του εργαστηρίου ελέγχεται η ακεραιότητα των δειγμάτων και των εγγράφων που τα συνοδεύουν. Το εργαστήριο δε γνωρίζει την ταυτότητα του αθλητή, αλλά εκθέτει το σύνολο των αποτελεσμάτων βασισμένο στο μοναδικό κωδικό αριθμό της φιάλης δειγματοληψίας. Παρακάτω συνοψίζονται οι διαδικασίες που απαιτούνται για την ανάλυση δειγμάτων προερχόμενων από αθλητές:

- Άνοιγμα των εξωτερικών συσκευασιών και έλεγχος της ακεραιότητας των φιαλών.
- Εισαγωγή των δειγμάτων στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων του εργαστηρίου, συνήθως σε παρτίδες, όπου καθορίζονται οι αναλύσεις στις οποίες θα υποβληθεί κάθε δείγμα και αποδίδεται ένας εργαστηριακός κωδικός ανά δείγμα, ο οποίος εξαφανίζει κάθε σχέση του αθλητή με το δείγμα, αφού η ανάλυση πραγματοποιείται μόνο με τον εργαστηριακό κωδικό και όχι με τον κωδικό της συσκευασίας συλλογής ο οποίος είναι γνωστός στον αθλητή
- Αποθήκευση του Β δείγματος σφραγισμένου και ακέραιου στον καταψύκτη, σύμφωνα με τις οδηγίες του Κώδικα.
- Άνοιγμα του Α δείγματος με καταστροφή της σφραγίδας, για τις διαδικασίες σάρωσης (screening). Εκτέλεση προ-αναλυτικών διαδικασιών (μέτρηση όγκου, pH, ειδικού βάρους).
- Επιλογή της μεθόδου ελέγχου που θα ακολουθηθεί στην προσανατολιστική ανάλυση (screening procedure) του Α δείγματος.
- Επιβεβαιωτική ανάλυση (confirmation ή quantification procedure) του δείγματος σε περίπτωση που θεωρηθεί ύποπτο για την ύπαρξη απαγορευμένης ουσίας μετά την προσανατολιστική ανάλυση.
- Έκδοση αποτελεσμάτων και συγγραφή αναλυτικής έκθεσης (report) στην περίπτωση θετικού δείγματος, στην οποία αναφέρεται η ονομασία της απαγορευμένης ουσίας που ανιχνεύτηκε, καθώς και ο κωδικός του θετικού δείγματος, στην περίπτωση ποιοτικού προσδιορισμού (confirmation procedure) και επιπλέον η ακριβής συγκέντρωση της ουσίας στο βιολογικό υγρό, στην περίπτωση ουσιών που απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός (quantification procedure).
- Τα αποτελέσματα της εξέτασης αποστέλλονται στην ενδιαφερόμενη ομοσπονδία (εάν το δείγμα είναι θετικό, το αποτέλεσμα αποστέλλεται επιπρόσθετα στη διεθνή ομοσπονδία του αθλήματος και στην WADA), όπου ο κωδικός αριθμός του δείγματος αντιστοιχείται με τα προσωπικά δεδομένα που καταγράφηκαν κατά τη δειγματοληψία για τον έλεγχο ντόπινγκ.
- Η ανάλυση του Β δείγματος, γίνεται εφόσον το Α δείγμα βγει θετικό εφόσον και βέβαια αν αυτό ζητηθεί από τον αθλητή ή την ομοσπονδία του. Περιλαμβάνει την αποσφράγιση και την εφαρμογή της επιβεβαιωτικής

διαδικασίας που εκτελέστηκε και στο Α δείγμα, παρουσία ή απουσία του αθλητή ή εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου του [10]

1.6. Διαπίστευση εργαστηρίων για τον έλεγχο doping

Η διαδικασία χορήγησης της διαπίστευσης σε ένα εργαστήριο γίνεται με βάση το διεθνές πρότυπο για τα εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL). Το ISL αποτελεί ένα σύνολο κανονισμών που ορίζουν τις απαιτήσεις της WADA για την απόδοση της διαπίστευσης σε ένα εργαστήριο, αλλά και για το επίπεδο λειτουργίας του. Η WADA εξασφαλίζει ότι η λειτουργία των διαπιστευμένων εργαστηρίων διατηρείται στο κατάλληλο επίπεδο με την εφαρμογή του ISO/ IEC 17025 για την ανάλυση δειγμάτων ούρων και αίματος με σκοπό τον έλεγχο doping, αλλά και με την υποχρέωση του εργαστηρίου να συμμετέχει σε διεργαστηριακά σχήματα ελέγχου ποιότητας. Επιπλέον, περιλαμβάνει και κώδικα δεοντολογίας και εχεμύθειας σχετικά με τις γνώσεις και τις πληροφορίες σχετικά με τους αθλητές οι οποίες κοινοποιούνται στο προσωπικό του εργαστηρίου. Ο στόχος του διεθνούς αυτού προτύπου είναι η εξασφάλιση της παραγωγής έγκυρων αποτελεσμάτων από τους ελέγχους doping και ομοιόμορφων αποτελεσμάτων από όλα τα διαπιστευμένα εργαστήρια, τα οποία είναι 34 στον αριθμό, ενώ υπάρχουν και άλλα εργαστήρια τα οποία έχουν εκφράσει ενδιαφέρον να κερδίσουν την διαπίστευση.

Επιπλέον, ένα ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης (Minimum Required Performance Level, MPRL) καθορίζεται από τη WADA για κάθε απαγορευμένη ουσία. Πρόκειται για την ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας την οποία υποχρεωτικά πρέπει να μπορεί να ανιχνεύσει το εργαστήριο. Συνήθως βρίσκεται στην τάξη μεγέθους των ng/ml. Τα εργαστήρια που εκτελούν τους ελέγχους doping πρέπει να αποδείξουν πως μπορούν να λειτουργήσουν στο MPRL. Την επίδοση αυτή μπορούν να την επιτύχουν είτε ακολουθώντας τις κατευθυντήριες οδηγίες που εκδίδονται από τη WADA, είτε χρησιμοποιώντας διαφορετικά μέσα..Επιπρόσθετα, η WADA εκδίδει και έγγραφα πρακτικού περιεχομένου (Technical Documents) τα οποία γνωστοποιούν νέες, υποχρεωτικές υποδείξεις για τα διαπιστευμένα εργαστήρια ως προς τον τρόπο λειτουργίας σε ορισμένους τομείς. Το ISL και τα technical documents διευκρινίζουν ακριβώς τα κριτήρια τα οποία πρέπει να πληρούν τα διαπιστευμένα εργαστήρια. Αν τα ήδη διαπιστευμένα εργαστήρια πάψουν να συγχρονίζονται με τα technical documents κινδυνεύουν να χάσουν προσωρινά τη διαπίστευση τους.

1.6.1. Ελληνικό εργαστήριο ελέγχου doping

Το ελληνικό εργαστήριο doping (Doping Control Laboratory of Athens, DCLA) ιδρύθηκε το 1986 και βρίσκεται στο χώρο του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου της Αθήνας (ΟΑΚΑ), “Σπύρος Λούης”. Ως διαπιστευμένο από τη WADA εργαστήριο, έχει την ικανότητα να παρέχει ολοκληρωμένες υπηρεσίες ελέγχου doping για εθνικές και διεθνείς αθλητικές ομοσπονδίες, για δείγματα αθλητών και αλόγων ιπποδρομιών. Έχει μέχρι στιγμής πρωτοστατήσει σε 3 μεγάλες διοργανώσεις σχετικά με το doping: το 6^ο παγκόσμιο πρωτάθλημα κλασσικού αθλητισμού το 1997, τους 28^{ους} Ολυμπιακούς Αγώνες το 2004 και τους 17^{ους} Μεσογειακούς αγώνες το 2013. Ειδικά για τους Ολυμπιακούς αγώνες του 2004, απέσπασε την παγκόσμια αναγνώριση για τον πλέον αποτελεσματικό έλεγχο doping σε διοργάνωση Ολυμπιακών Αγώνων[4].

.Από το 2000, έχει κερδίσει και διατηρεί την διαπίστευση ISO/ 17025 του ΕΣΥΔ (Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης). Ήταν μάλιστα το πρώτο εργαστήριο στην Ελλάδα το οποίο κέρδισε τη διαπίστευση του ΕΣΥΔ, έχοντας αριθμό πιστοποιητικού Νο.1^[6]. Συμμετέχει στο διεργαστηριακό σχήμα ελέγχου ποιότητας (External Quality Assessment Scheme, EQAS) της WADA, το οποίο περιλαμβάνει 3 εκπαιδευτικά τεστ επάρκειας (educational proficiency tests) το χρόνο και διπλά- τυφλά τεστ. Επιπλέον συμμετέχει σε τεστ επάρκειας από τους συνδέσμους AORC (Association of Official Racing Chemists) και WAADS (World Association of Anti- Doping Scientists). Επιπρόσθετα, το ελληνικό εργαστήριο doping οφείλει να συμβαδίζει με τις εκάστοτε απαιτήσεις της WADA(για παράδειγμα τα technical documents), είτε σχετικά με τη διαχείριση των δεδομένων ή με την προσθήκη νέων μεθόδων ή οργάνων, ώστε να διατηρήσει την διαπίστευσή του.

Μέσα στα επιτεύγματα του ελληνικού εργαστηρίου αντιντόπινγκ είναι ότι έχει καταφέρει να αυξήσει το ποσοστό της ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών κάτω από το MPRL(στο 22,1% το 2011), χρησιμοποιώντας διάφορες μεθοδολογίες (σε όργανα GC/MS, GC/HRMS και LC-Q-TOFMS). Παράλληλα, σημείωσε χαμηλά ποσοστά ανάλυσης Β δειγμάτων. Το Β δείγμα είναι δείγμα που συλλέγεται την ίδια στιγμή με το Α δείγμα, το οποίο όμως αποσφραγίζεται μόνο παρουσία του ενδιαφερόμενου αθλητή ή/και εκπροσώπου του και στο οποίο εκτελούνται μόνο επιβεβαιωτικοί έλεγχοι, έπειτα από θετικό αποτέλεσμα στην ανάλυση του Α δείγματος. Το υψηλότερο ποσοστό σημειώνεται το 2006 (21,3%) ^[4]. Η μείωση του συγκεκριμένου ποσοστού, υποδηλώνει αποδοχή των αποτελεσμάτων των Α δειγμάτων και εμπιστοσύνη των αθλητικών φορέων στην ακρίβεια που επιτυγχάνει το εργαστήριο στις αναλύσεις.

1.7. Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών

Ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ [1] αναφέρει ότι μια ουσία θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών, εάν η WADA καθορίσει ότι η ουσία ή η μέθοδος πληροί δύο από τα τρία κριτήρια που ακολουθούν:

1. Ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η ουσία ή η μέθοδος, από μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες ουσίες ή μεθόδους, έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει ή βελτιώνει την αθλητική απόδοση.
2. Ύπαρξη οποιασδήποτε ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακολογικής επίδρασης ή εμπειρίας ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου αποτελεί πραγματικό ή ενδεχόμενο κίνδυνο για την υγεία του αθλητή.
3. Η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού που περιγράφεται στην Εισαγωγή του Κώδικα.

Επιπλέον, μια ουσία ή μέθοδος θα πρέπει να περιληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών εάν η WADA καθορίσει ότι υπάρχει ιατρική ή άλλη επιστημονική απόδειξη, φαρμακολογική επίδραση ή εμπειρία ότι η ουσία ή η μέθοδος έχει τη δυνατότητα να καλύψει τη χρήση άλλων Απαγορευμένων Ουσιών και Απαγορευμένων Μεθόδων. Για παράδειγμα, το Αμερικάνικο εργαστήριο BALCO παρήγαγε τετραϋδρογεστρινόνη (tetrahydroxygestrinone, THG) μόνο για τις «ανάγκες» αθλητών. Η άμεση αντίδραση της WADA ήταν η τοποθέτηση της THG μεταξύ των απαγορευμένων ουσιών στον αθλητισμό. Η ενσωμάτωση μιας φαρμακευτικής ουσίας σε μια από τις απαγορευμένες ουσίες του Καταλόγου κρίνεται με βάση τη δράση ή τη χημική δομή της από την Επιτροπή Εργασίας Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών της WADA, που αποτελείται από επιλεγμένους επιστήμονες. Σύμφωνα με την έκδοση του Απαγορευμένου Καταλόγου του 2015 οι ουσίες (substances, S) και οι μέθοδοι (methods, M) ταξινομούνται σε κατηγορίες και χωρίζονται σε τρεις ομάδες.

- Αυτές που απαγορεύονται και εντός και εκτός αγώνων
- μόνο εντός αγώνων
- και μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα (particular-P) .

1.7.1. Ουσίες που απαγορεύονται σε όλες τις περιπτώσεις (εντός και εκτός αγώνων)

S0. Μη εγκεκριμένες ουσίες

Κάθε φαρμακολογική ουσία η οποία δεν καλύπτεται από καμία από τις επόμενες κατηγορίες του Καταλόγου και χωρίς ισχύουσα έγκριση από οποιαδήποτε κυβερνητική ρυθμιστική υγειονομική αρχή για ανθρώπινη θεραπευτική χρήση απαγορεύεται σε όλες τις περιπτώσεις (π.χ. φάρμακα υπό προ-κλινική ή κλινική μελέτη ή μελέτη που διεκόπη, σχεδιαζόμενα φάρμακα, ουσίες που έχουν εγκριθεί μόνο για κτηνιατρική χρήση).

S1. Αναβολικοί παράγοντες

Οι αναβολικοί παράγοντες είναι χημικά συστατικά ικανά να ενισχύσουν την αναβολική διεργασία στον οργανισμό. Επηρεάζουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών διεγείροντας την πρωτεϊνوسύνθεση (αναβολική επίδραση) και αναστέλλοντας τη διάσπαση των πρωτεϊνών (καταβολική δράση). Οι δραστικές αναβολικές ουσίες που περιλαμβάνονται στον Απαγορευμένο Κατάλογο του 2016 υποδιαιρούνται στην ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών και στην ομάδα των άλλων αναβολικών παραγόντων.

S1.1. Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή

Η ομάδα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών (Anabolic Androgenic Steroids, AAS) περιλαμβάνει τις ενδογενώς παραγόμενες τεστοστερόνη (testosterone) και διυδροτεστοστερόνη (dehydrotestosterone, DHT), προορμόνες τεστοστερόνης και τους μεταβολίτες τους καθώς και εξωγενή αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή, τα οποία είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης. Η τεστοστερόνη είναι η κύρια ανδρική ορμόνη και αποτελεί ταυτόχρονα και αναβολικό και ανδρογόνο στεροειδές. Συντίθεται από χοληστερόλη στα κύτταρα Leydig των όρχεων, ενώ μικρές ποσότητες τεστοστερόνης εκκρίνονται επίσης από τις ωθήκες και τα επινεφρίδια. Η DHT είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της τεστοστερόνης, ενώ εμφανίζει και ανδρογόνο δράση σε μερικούς ιστούς. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη, η ανδροστενδιόνη και η ανδροστενδιόλη αποτελούν στεροειδή που σχηματίζονται στην πορεία της βιοσύνθεσης των γεννητικών ορμονών και είναι πρόδρομες ορμόνες της ενδογενούς παραγωγής τεστοστερόνης και οιστρογόνων. Αυτά τα πρόδρομα στεροειδή είναι ασθενή ανδρογόνα και εκκρίνονται κυρίως από τα επινεφρίδια και στα δυο φύλλα. Παρέχουν μια δεξαμενή κυκλοφορούντων στεροειδών που μπορούν να μετατραπούν σε δραστικά ανδρογόνα και οιστρογόνα στους περιφερειακούς ιστούς. Η τεστοστερόνη δεν ασκεί κάποια ιδιαίτερη επίδραση στο ανθρώπινο σώμα εάν χορηγηθεί από το στόμα ή παρεντερικά διότι η ορμόνη μεταβολίζεται ταχύτατα από το ήπαρ και θα πρέπει να τροποποιηθεί χημικά, ώστε να παραχθούν κλινικά χρήσιμα παρασκευάσματα. Επιπρόσθετα, ο θεραπευτικός δείκτης της τεστοστερόνης ισούται με 1 που σημαίνει ότι υπάρχει ομοιότητα στην αναλογία μεταξύ αναβολικών και ανδρογόνων επιδράσεων. Τα συνθετικά AAS, διαμορφώνονται έτσι ώστε να επιβραδύνουν τη διαδικασία ορμονικού καταβολισμού και επίσης να διαχωρίζουν τις ανδρογόνες από τις αναβολικές επιδράσεις, έτσι ώστε να διατηρείται μόνο η

αναβολική δράση, ενώ οι ανδρογόνες παρενέργειες να μειώνονται στο ελάχιστο. Οι κύριες τροποποιήσεις του μορίου της τεστοστερόνης είναι η αλκυλίωση στη 17α-θέση (χρήση σκευασμάτων από το στόμα) και η εστεροποίηση στη 17β-θέση (παρεντερική χρήση σκευασμάτων). Για τα ενδογενώς παραγόμενα AAS, θετικό αποτέλεσμα σε έλεγχο ντόπινγκ (Αντικανονικό Αναλυτικό Εύρημα) δίνεται όταν η συγκέντρωση της ουσίας ή των μεταβολιτών της ή των δεικτών της και/ή οποιωνδήποτε άλλων σχετικών αναλογιών στο δείγμα αυτό, παρεκκλίνει από το εύρος των φυσιολογικών τιμών που προκύπτουν ενδογενώς, εκτός αν ο αθλητής μπορεί να αποδείξει ότι η συγκέντρωση οφειλόταν σε μια φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση.

S1.2. Άλλοι αναβολικοί παράγοντες

Η ομάδα των άλλων αναβολικών παραγόντων περιλαμβάνει διάφορες εξωγενείς ουσίες με αναβολικές παρενέργειες, όπως κλενβουτερόλη, ζιλπατερόλη, ζερανόλη, τιμπολόνη. Η κλενβουτερόλη είναι ένα δραστικό βρογχοδιασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άσθματος. Η ζερανόλη είναι ένα μυκητοοιστρογόνο με μη-στεροειδή δομή συντιθέμενο από μύκητες (είδος *fusarium*). Η τιμπολόνη είναι ένα συνθετικό στεροειδές που συνδυάζει τις ιδιότητες των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και των ανδρογόνων. Οι εκλεκτικοί τροποποιητές των υποδοχέων των ανδρογόνων (*selective androgen receptor modulators - SARMS*) αποτελούν καινούργιες μη-στεροειδείς ουσίες.

S2. Πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες και μιμητές

Οι ορμόνες πραγματοποιούν την ενδοκρινή ρύθμιση των λειτουργιών του σώματος. Είναι χημικοί αγγελιοφόροι που παράγονται από τους ενδοκρινείς αδένες και/ή από ενδοκρινικά κύτταρα σε άλλα όργανα (νεφρούς, καρδιά, κ.λπ.) των οποίων οι εκκρίσεις απελευθερώνονται άμεσα στο κυκλοφορικό σύστημα και μεταφέρονται στα κύτταρα στόχους, όπου οι ορμόνες, αφότου δεσμευτούν με τους υποδοχείς των πρωτεϊνικών κυττάρων, ασκούν τις συγκεκριμένες επιδράσεις τους. Οι κύριοι ενδοκρινείς αδένες στο σώμα είναι η υπόφυση, ο θυρεοειδής αδένας, οι παραθυρεοειδείς αδένες, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι ωοθήκες και οι όρχεις. Ο υποθάλαμος αποτελεί βασικό τμήμα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, αλλά επίσης, παράγει και ορμόνες και θεωρείται ως νευροενδοκρινικό όργανο. Ο υποθάλαμος εμφανίζει άμεση αγγειακή σύνδεση με τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Τα υποθαλαμικά νευρικά κύτταρα εκκρίνουν μέσα σε αυτή την πυλαία κυκλοφορία διάφορες εκλυτικές και ανασταλτικές ορμόνες που ρυθμίζουν την υποφυσιακή έκκριση. Κάθε μία από τις αρχικές ορμόνες του προσθίου λοβού της υπόφυσης έχει μια υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη, συχνά αποκαλούμενη ως εκλυτικός παράγοντας (η εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης διεγείρει την έκκριση ταυτόχρονα και των δύο γοναδοτροπινών του προσθίου λοβού της υπόφυσης, της ωχρινοτρόπου και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης). Η ερυθροποιητίνη (*erythropoietin, EPO*) είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που απελευθερώνεται από τους νεφρούς και το ήπαρ (η έκκριση της διεγείρεται υπό συνθήκες υποξίας). Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (*human Growth Hormone, hGH*) είναι μια πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τον αδένά του προσθίου λοβού της υπόφυσης. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (*Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH*) και πιθανώς η γκρελίνη (*ghrelin*) διεγείρουν την έκκριση hGH. Εκτός των άλλων άμεσων επιδράσεων της στα κύτταρα στόχους, η hGH διεγείρει τη σύνθεση του αυξητικού

παράγοντα 1 της ινσουλίνης (Insulin Growth Factor-1, IGF-1) σε όλους τους ιστούς. Στους περισσότερους ιστούς ο IGF-1 ασκεί τοπικές δράσεις, αλλά από το ήπαρ εκκρίνεται μέσα στην κυκλοφορία. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο ενδοκρινές πάγκρεας. Κυρίως δρα στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Επιτρέπεται μόνο για τη θεραπεία αθλητών με βεβαιωμένο ινσουλινο-εξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. Ο μηχανοαυξητικός παράγοντας (Mechano Growth Factor, MGF) προέρχεται από το γονίδιο του IGF-1 με εναλλακτική σύνδεση και εκφράζεται στους σκελετικούς μύες. Οι γοναδοτροπίνες οι οποίες είναι απαγορευμένες μόνο στους άνδρες είναι η ωχρινότροπος ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human Chorionic Gonadotrophin, hCG). Η LH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τον αδένιο του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, η οποία ρυθμίζει τις εκκριτικές και γαμετογενετικές λειτουργίες των όρχεων και των ωοθηκών. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) διεγείρει την έκκριση της LH. Η hCG είναι μια ορμόνη του πλακούντα και η παρουσία της στο πλάσμα και τα ούρα αποτελεί μια από τις πιο πρώιμες ενδείξεις για εγκυμοσύνη και συνιστά τη βάση για τα τεστ εγκυμοσύνης. Μικρές ποσότητες hCG εκκρίνονται επίσης από διάφορες νεοπλασίες και στα δύο φύλα (καρκινικός δείκτης). Η κορτικοτροπίνη (φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη, Adrenocorticotrophic Hormone, ACTH) παράγεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και ρυθμίζει την έκκριση των στεροειδών ορμονών από το φλοιό των επινεφριδίων. Κάτω από την επίδραση ποικίλων στρεσογόνων παραγόντων, ο υποθάλαμος εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone, CRH), η οποία διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH. Οι παραπάνω ορμόνες και οι εκλυτικοί τους παράγοντες καθώς και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοιες βιοϊατρικές επιπτώσεις απαγορεύονται.

S3. Βήτα-2 αγωνιστές

Οι εκλεκτικοί βήτα-2 αγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων (ή β2 αγωνιστές), είναι πιο κοινά γνωστοί ως ανακουφιστικά του άσθματος ή βρογχοδιασταλτικά. Είναι φάρμακα που χαλαρώνουν και ανοίγουν τους αεραγωγούς (βρόγχους) στους πνεύμονες, οι οποίοι γίνονται πιο στενοί κατά τη διάρκεια μιας ασθματικής κρίσης. Τα πιο γνωστά φάρμακα αυτής της ομάδας είναι η σαλβουταμόλη και η τερβουταλίνη.

S4. Ορμονικοί και μεταβολικοί ρυθμιστές

Οι ορμόνες είναι αγγελιοφόρα μόρια που απελευθερώνονται από ενδοκρινείς αδένες για να ρυθμίσουν συγκεκριμένες σωματικές λειτουργίες όπως τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος ή τη μυϊκή ανάπτυξη. Οι ορμόνες δεσμεύονται από τους υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη ή από τους υποδοχείς στον κυτταρικό πυρήνα. Έτσι, λοιπόν, οι ανταγωνιστές ορμονών και οι ρυθμιστές είναι ουσίες που επηρεάζουν αυτές τις δράσεις αναστέλλοντας ή διεγείροντας συγκεκριμένους υποδοχείς και περαιτέρω επιταχύνοντας ή επιβραδύνοντας συγκεκριμένες αντιδράσεις από τα ένζυμα. Βασικές κατηγορίες τέτοιων ρυθμιστών είναι οι αναστολείς της αρωματάσης (π.χ. εξεμεστάνη, φορμεστάνη, εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs, π.χ. ραλοξιφένη, ταμοξιφένη, αντι-οιστρογονικές ουσίες, παράγοντες που τροποποιούν τη λειτουργία της μυστατίνης και μεταβολικοί ρυθμιστές όπως η τριμεταζιδίνη.

S5. Διουρητικά και παράγοντες κάλυψης

Τα διουρητικά είναι προϊόντα που βοηθούν στην αποβολή των υγρών από το σώμα. Προκαλούν απώλεια νερού αναστέλλοντας μερικώς την επαναρρόφηση του νερού, δηλαδή αυξάνουν τον ρυθμό της ούρησης. Ισχυρά διουρητικά μπορούν να αυξήσουν τη ροή των ούρων ως 6 περίπου λίτρα ανά ημέρα. Τα διουρητικά περιέχουν ουσίες όπως ακεταζολαμίδη, αμιλορίδη, κανρενόνη, φουροσεμίδη, ινδαπαμίδη, τριαμερένη και θειαζίδες όπως βενδροφλουμεθειαζίδη, χλωροθειαζίδη, υδροχλωροθειαζίδη και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοιες βιολογικές επιδράσεις.

Τα διουρητικά απαγορεύονται εντός και εκτός αγώνων εκτός από ελάχιστα (π.χ. δροσπερινόνη) που είναι νόμιμα. Τα διουρητικά και οι άλλοι παράγοντες συγκάλυψης ως κατηγορία φαρμάκων βρίσκονται στην πέμπτη θέση στη συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων ντόπινγκ με ποσοστό της τάξης του 6.7% στο σύνολο των θετικών δειγμάτων παγκοσμίως. Οι παράγοντες συγκάλυψης (μάσκες) είναι συστατικά που λαμβάνονται με σκοπό να κρύψουν ή να καλύψουν την παρουσία συγκεκριμένων παράνομων φαρμάκων που εξετάζονται στον έλεγχο ντόπινγκ. Οι παράγοντες συγκάλυψης έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν ή να αποκρύψουν την απαγορευμένη ουσία στα ούρα. Τα διουρητικά μπορούν να θεωρηθούν ως παράγοντες συγκάλυψης εξαιτίας της προκαλούμενης αραιώσης των ούρων που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα έκκρισης της απαγορευμένης ουσίας από το σώμα.

M1. Χειρισμός του αίματος και των συστατικών του

Απαγορεύεται το ντόπινγκ αίματος συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυτόλογου, ομόλογου ή ετερόλογου αίματος ή παραγώγων ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιασδήποτε προέλευσης. Επιπλέον, απαγορεύεται η τεχνητή ενίσχυση της πρόσληψης, μεταφοράς και απόδοσης του οξυγόνου, με υπερφθοριομένες χημικές ουσίες, (εφαπροξιράλη-RSR13) και τροποποιημένα παράγωγα αιμοσφαιρίνης (π.χ. υποκατάστατα του αίματος με βάση την αιμοσφαιρίνη, μικροεγκαψυλιωμένα προϊόντα αιμοσφαιρίνης) χωρίς όμως να περιορίζεται μόνο σε αυτά.

M2. Χημικός και φυσικός χειρισμός

Ο χημικός και φυσικός χειρισμός συνίσταται στη χρήση ουσιών και/ή μεθόδων οι οποίες πιθανά να τροποποιήσουν ή προσπαθήσουν να τροποποιήσουν τα δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των ελέγχων ντόπινγκ, έτσι ώστε να μεταβάλλουν την ακεραιότητα και την εγκυρότητά τους. Ο χημικός και φυσικός χειρισμός των δειγμάτων απαγορεύεται και περιλαμβάνει τον καθετηριασμό, την αντικατάσταση των ούρων (με ούρα άλλου) και/ή τη μεταβολή τους χωρίς όμως να περιορίζεται μόνο σε αυτούς τους χειρισμούς. Επιπλέον, οι ενδοφλέβιες εγχύσεις απαγορεύονται εκτός αν πρόκειται για δικαιολογημένα σύννομη ιατρική θεραπεία. Ο χημικός και φυσικός χειρισμός είναι η τελευταία σε συχνότητα εμφάνισης κατηγορία ντόπινγκ με ποσοστό 0,1% του συνόλου των θετικών δειγμάτων παγκοσμίως. Ο φυσικός και όχι ο χημικός χειρισμός του δείγματος είναι συνήθως η προτιμώμενη μέθοδος. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές χημικής και φυσικής τροποποίησης του δείγματος όπως οι παράγοντες συγκάλυψης με τη προβενεσίδη που μπλοκάρει τη νεφρική απέκκριση τεστοστερόνης, παρέχοντας υποκατάστατα δείγματα ούρων για έλεγχο και χημικά τροποποιημένα ούρα. Η προβενεσίδη χρησιμοποιείται για να καλύψει τη χρήση

ουσιών ντόπινγκ (παράγοντας συγκάλυψης) και ειδικότερα αναβολικών φαρμάκων καθυστερώντας την εξουδετέρωσή τους. Ωστόσο, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι παράγοντες συγκάλυψης είναι η φιναστερίδη και η επιτεστοστερόνη. Συνεπώς, οι έλεγχοι ντόπινγκ ανιχνεύουν τους παράγοντες συγκάλυψης και αναλύουν ένα φάσμα χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των ούρων ώστε να διαπιστωθεί η παραποίηση του δείγματος.

M3. Γονιδιακό ντόπινγκ

Απαγορεύεται η μεταφορά πολυμερών νουκλεϊκών οξέων ή αναλόγων νουκλεϊκών οξέων και η χρήση φυσιολογικών ή γενετικά τροποποιημένων κυττάρων.

1.7.2. Ουσίες και μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων

S6. Διεγερτικά

Ο συμπαθητικός κλάδος του κεντρικού νευρικού συστήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην έκθεση του οργανισμού σε κατάσταση μέγιστης επαγρύπνησης και ολικής φυσικής κινητοποίησης. Τα διεγερτικά (συμπαθομιμητικά) είναι τα φάρμακα που ενεργοποιούν το κεντρικό νευρικό σύστημα με τη δράση της αδρεναλίνης και της νοραδρεναλίνης. Είναι ικανά να βελτιώσουν τη διάθεση και τη διέγερση, να εξαλείψουν ή να μειώσουν το αίσθημα της κόπωσης και να βελτιώσουν τη φυσική απόδοση. Ωστόσο, τα διεγερτικά παρουσιάζουν μία μέτρια επίδραση στην απόδοση και μόνο όταν καταναλώνονται υψηλές δόσεις αυτών των ουσιών δίνεται θετικό δείγμα. Τα πιο διαδεδομένα διεγερτικά που χρησιμοποιούνται για σκοπούς ντόπινγκ είναι οι αμφεταμίνες, οι εφεδρίνες, η κοκαΐνη, το σκεύασμα «έκσταση», η μεθυλφενιδάτη κ.α. Η νικοτίνη και η καφεΐνη χρησιμοποιούνται επίσης συχνά ως διεγερτικά, αλλά δεν απαγορεύονται στον αθλητισμό.

S7. Ναρκωτικά

Τα ναρκωτικά θεωρούνται ως ουσίες και φάρμακα ικανά να μεταβάλουν τη ψυχική και φυσική κατάσταση ενός οργανισμού σε ένα ευρύ πεδίο από τον ύπνο και την πλήρη ακινητοποίηση έως την ευφορία και τη διέγερση. Αυτός ο ευρέως αποδεκτός ορισμός των ναρκωτικών είναι, επομένως, περισσότερο σχετικός με τα συμπτώματα που παρατηρούνται παρά με τη συγκεκριμένη δράση των ναρκωτικών ουσιών. Οι επιδράσεις των διαφόρων ναρκωτικών ουσιών προσδιορίζονται ακριβέστερα με βάση τη χημική τους δομή και τους βιολογικούς μηχανισμούς που διεγείρουν προκαλώντας μεταβολές στον ανθρώπινο οργανισμό. Ένα ναρκωτικό είναι ένα εθιστικό φάρμακο που μειώνει τον πόνο, προκαλεί υπνηλία και μπορεί να μεταβάλει τη διάθεση ή τη συμπεριφορά. Ένα αναλγητικό ναρκωτικό σημαίνει οπιοειδές, που αναφέρεται σε όλες τις φυσικές, ημισυνθετικές και συνθετικές ουσίες που δρουν φαρμακολογικά όπως η μορφίνη (το κύριο συστατικό του φυσικού οπίου) και η κωδεΐνη. Τα οπιοειδή ταξινομούνται στον Κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων της WADA ως ναρκωτικά. Τα οπιοειδή δρουν με οπιούχους υποδοχείς που εντοπίζονται τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Ωστόσο, η κύρια δράση των οπιοειδών είναι η μεταβολή της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η περιφερική δράση των αναλγητικών ναρκωτικών συνδέεται μερικώς

με τις επιδράσεις της απελευθέρωσης της ισταμίνης που ακολουθεί τη λήψη ναρκωτικών. Σε κάποιες χώρες, το όνομα ναρκωτικά αφορά επίσης την κοκαΐνη, η οποία χημικά δεν είναι ναρκωτικό. Η άλλη ομάδα ουσιών, που λαθεμένα ονομάστηκε ως ναρκωτικά, είναι τα συμπαθομιμητικά που ταξινομούνται στον Κατάλογο της WADA ως διεγερτικά, όπως προαναφέρθηκε. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από ουσίες ικανές να προκαλέσουν ψυχικές μεταβολές, όπως αυτές που εκδηλώνονται στην πορεία της ψύχωσης. Αυτές οι ουσίες αποκαλούνται ψυχομιμητικά, ή ψυχεδελικά, ή παραισθησιογόνα. Μεταξύ των ψυχομιμητικών μόνο τα κανναβινοειδή τοποθετήθηκαν στον Κατάλογο της WADA ως ξεχωριστή ομάδα ουσιών.

S8. Κανναβινοειδή

Τα κανναβινοειδή είναι μια ομάδα φυσικών ουσιών που ανευρίσκονται στο φυτό *Cannabis Sativa* καθώς επίσης και τα συνθετικά τους αναλογικά ή οι μεταβολίτες τους. Χημικά, είναι παράγωγα της διβενζοπυρένης ή των μονοτερπενοειδών. Η *Cannabis Sativa* περιλαμβάνει περισσότερα από 420 χημικά συστατικά μεταξύ των οποίων τα πιο σημαντικά είναι: Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ8-THC), κανναβινόλη (CBN) και κανναβιδιόλη (CBD). Η κάνναβη, το χασίς και η μαριχουάνα αποτελούν τα συνηθέστερα φυσικά κανναβινοειδή. Από την άλλη τα κύρια χημικά παράγωγα (της διβενζοπυρένης ή των μονοτερπενοειδών) είναι η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-tetrahydrocannabinol, Δ9-THC), η Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ8-tetrahydrocannabinol, Δ9-THC) ,η κανναβινόλη (cannabinol, CBN) και η κανναβιδιόλη (cannabidiol, CBD). Η χρόνια κατανάλωση κανναβινοειδών μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή μερικών νευρικών κανναβινοειδών υποδοχέων στον εγκέφαλο οδηγώντας σε έλλειψη προσοχής, απώλεια μνήμης και μειωμένη ικανότητα μάθησης.

S9. Γλυκοκορτικοστεροειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι φυσικά παραγόμενες στεροειδείς ορμόνες, ή συνθετικά συστατικά, που εμποδίζουν τη διαδικασία της φλεγμονής. Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή παράγονται στον φλοιό των επινεφριδίων. Φυσιολογικά, συμμετέχουν επίσης σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες και κυρίως στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων. Διαφέρουν από τα αναβολικά στεροειδή που χρησιμοποιούν οι αθλητές για την αύξηση της μυϊκής μάζας και δύναμης. Αντίθετα, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν καταβολικά στεροειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή και τα αλατοκορτικοειδή αποκαλούνται κοινώς κορτικοστεροειδή. Όλα έχουν τον ίδιο κοινό στεροειδή σκελετό αλλά διαφέρουν στην ομάδα που συνδέεται στον C17 ή στην κατεύθυνση αυτής της ομάδας. Η υδροκορτιζόνη, ένα αντιφλεγμονώδες φάρμακο είναι το πιο χρησιμοποιούμενο γλυκοκορτικοστεροειδές. Επιπρόσθετα με τα φυσικά κορτικοστεροειδή, (κορτιζόλη, δεοξυκορτόνη και υδροκορτιζόνη) έχουν αναπτυχθεί και συνθετικά στεροειδή. Αυτά τα χημικά ανάλογα προσπαθούν να διαχωρίσουν τις γλυκοκορτικοειδείς επιδράσεις από αυτές των αλατοκορτικοειδών. Το πιο μελετημένο και χρησιμοποιούμενο γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη.

1.7.3. Ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα

P1. Αλκοόλ

Το αλκοόλ ή χημικώς οριζόμενα η αιθανόλη είναι μια εξωγενής ουσία που περιλαμβάνεται στον Κατάλογο από το 2008. Απαγορεύεται σε ορισμένα αθλήματα και επί του παρόντος μόνο εντός αγώνων και αυτά είναι η αεροναυτική, η τοξοβολία, το αυτοκίνητο, ο μοτοσυκλετισμός και η λεμβοδρομία ισχύος. Η ανίχνευση γίνεται με ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα και/ή του αίματος. Το όριο συγκέντρωσης αλκοόλης (στο αίμα), υπέρβαση του οποίου συνιστά παράβαση ντόπινγκ, είναι τα 0,10 g/L. Το αλκοόλ είναι ένα κατασταλτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος που επιβραδύνει τις λειτουργίες του εγκεφάλου και του σώματος. Σκοπός της χρήσης του αλκοόλ είναι η μείωση της νευρικότητας, η μείωση της υπερκινητικότητας και η χαλάρωση. Συνεπώς, η χρήση του αλκοόλ προτιμάται σε αθλήματα που χρειάζονται αυξημένη συγκέντρωση, όπως η τοξοβολία. Το αλκοόλ δεν οδηγεί σε βελτίωση της φυσικής απόδοσης. Ο συνδυασμός του αλκοόλ με άλλες ουσίες μπορεί να μεγεθύνει την επίδραση του αλκοόλ ή των άλλων ταυτόχρονα χορηγούμενων ουσιών. Γενικά, το αλκοόλ απαγορεύεται σε αθλήματα όπου η χρήση του μπορεί να θεωρηθεί επιζήμια για την απόδοση του αθλητή ή επικίνδυνη για την ασφάλεια, όπως στον μηχανοκίνητο αθλητισμό.

P2. Βήτα-αναστολείς

Οι ουσίες αυτές επιβραδύνουν τους ρυθμούς της καρδιάς και χρησιμοποιούνται σε αθλήματα που στηρίζονται στην ηρεμία του αγωνιζόμενου, για την εκτέλεση λεπτών και ακριβών κινήσεων. Οι β αναστολείς απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων, εκτός εάν καθορίζεται διαφορετικά, στα παρακάτω αθλήματα: τοξοβολία, αυτοκίνητο, μπιλιάρδο, βελάκια, γκολφ, σκοποβολή, σκι, χιονοσανίδα και υποθαλάσσια σπορ. Οι σημαντικότεροι β αναστολείς είναι η ατενολόλη, η καρτεολόλη, η κελιπρολόλη, η λαβηταλόλη, η ναδολόλη, η προπρανολόλη κ.α. Οι β αναστολείς μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία ορισμένων καρδιακών παθήσεων. Είναι ένας τύπος φαρμάκου που χρησιμοποιείται σε διάφορες ενδείξεις, αλλά κυρίως για την αντιμετώπιση καρδιακών αρρυθμιών και προληπτικά μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η προπρανολόλη ήταν ο πρώτος κλινικά χρήσιμος β αναστολέας. Θεωρείται ως μια από τις πιο σημαντικές συνεισφορές στην κλινική ιατρική και φαρμακολογία του 20^{ου} αιώνα [12].

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα περισσότερα από τα συμπληρώματα διατροφής δεν απαγορεύονται από την WADA. Τα συμπληρώματα διατροφής είναι ουσίες που υπάρχουν φυσικά στο σώμα και που καταναλώνονται επιπρόσθετα με τη φυσιολογική καθημερινή διατροφή. Οι ουσίες αυτές είναι εν μέρει απαραίτητες για την αύξηση και την ανάπτυξη ενός πολυκύτταρου οργανισμού, όπως το ανθρώπινο σώμα. Η πρόσθετη λήψη συμπληρωμάτων διατροφής για ιατρικούς λόγους έγκειται σε περιπτώσεις σχετικής ανεπάρκειας στο σώμα λόγω υποσιτισμού ή ασθένειας. Η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής είναι διαδεδομένη στον αθλητισμό παγκοσμίως και δεν αφορά αποκλειστικά αθλητές υψηλού επιπέδου. Οι κύριοι λόγοι για τη χρήση διατροφικών συμπληρωμάτων είναι η βελτίωση της φυσικής απόδοσης, η προαγωγή της υγείας, η μείωση του κινδύνου για εκδήλωση ασθενειών και το λιγότερο ο έλεγχος του σωματικού βάρους. Ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου των συμπληρωμάτων διατροφής εκτός από την πιθανότητα θετικού ελέγχου ντόπινγκ

από «μολυσμένα» συμπληρώματα είναι το γεγονός ότι πολλοί αθλητές χρησιμοποιούν συμπληρώματα χωρίς τη γνώση των παρενεργειών και των συνιστώμενων επιπέδων πρόσληψης. Στο πλαίσιο της τεράστιας αγοράς των συμπληρωμάτων διατροφής, το όριο μεταξύ της συνιστώμενης και της εσφαλμένης χρήσης δεν είναι ξεκάθαρο .

Τύπος Ουσιών	Επιθυμητές ενέργειες	Παρενέργειες
Διεγερτικά-Ψυχοκινητικά Διεγερτικά (πχ αμφεταμίνες)	Αναστολή εμφάνισης κόπωσης	Ταχυκαρδία, αρρυθμίες, ανορεξία, απώλεια βάρους, αυπνίες, κεφαλαλγία, ψυχική και σωματική εξάρτηση, απώλεια γενετήσιας επιθυμίας, απότομη εμφάνιση κόπωσης, θάνατος
Συμπαθητικομιμητικές Αμίνες (πχ εφεδρίνες)	Αύξηση ροής αίματος στους μύες, αύξηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, βρογχοδιαστολή	Ανορεξία, ταχυκαρδία, υπέρταση
Ναρκωτικά Αναλγητικά	Κάλυψη σωματικού άλγους	Σωματική και ψυχική εξάρτηση, ανοχή
Αναβολικά Στεροειδή	Αύξηση μυϊκής μάζας, δύναμης, επιθετικότητας	A:Ατροφία όρχεων, αζωοσπερμία , στείρωση B: δασυτριχισμός, αλλαγή χροιάς φωνής, μεγέθυνση κλειτορίδας, στείρωση Γενικά: αλωπεκία , ακμή, μείωση HDL, βλάβη τοιχωμάτων αγγείων, αύξηση αρτηριακής πίεσης, ηπατική δυσλειτουργία, χολοστατικός ίκτερος, καρκίνος
β-αναστολείς	Ελάττωση στρες, προαγωνιστικής εντάσεως	Βρογχοσπασμός, σεξουαλικές δυσλειτουργίες σε άντρες
Διουρητικά	Ελάττωση σωματικού βάρους, ελάττωση ποσότητας ανιχνεύσιμων ουσιών στα ούρα	Αφυδάτωση, διαταραχές ηλεκτρολυτών
Χοριακή Γοναδοτροπίνη	Διέγερση παραγωγής ενδογενούς τεστοστερόνης	Κεφαλαλγία, μεταβολές διάθεσης, κατάθλιψη, οίδημα
Αυξητική Ορμόνη	Αύξηση σωματικού μεγέθους και δύναμης	Ακρομεγαλία, μυοπάθεια, στεφανιαίες παθήσεις
Ερυθροποιητίνη	Αύξηση αριθμού ερυθροκυττάρων	Υπέρταση, καρδιακή ανεπάρκεια, εγκεφαλικά επεισόδια

Κεφάλαιο 2

Ανδρογόνα

2.1. Ορισμός-Φυσιολογία

Τα αναβολικά στεροειδή είναι οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες απαγορευμένες ουσίες στο σύγχρονο αθλητισμό. Τα αναβολικά στεροειδή εισήχθησαν ως φάρμακα στα τέλη της δεκαετίας του 1950, για την αντιμετώπιση χρόνιων παθολογικών καταστάσεων. Ειδικότερα, τα αναβολικά στεροειδή χρησιμοποιούνται ακόμη στην αντιμετώπιση της γεροντικής αδυναμίας και της σωματικής εξασθένησης, στην αντιμετώπιση νόσων, όπως η απλαστική αναιμία, η νεφρική ανεπάρκεια ή η οστεοπόρωση, στην ανάρρωση από διάφορες παθολογικές καταστάσεις, στην ανορεξία κ.α.

Η χρήση των αναβολικών στεροειδών για μη ιατρικούς σκοπούς, με στόχο τη βελτίωση της αγωνιστικής ικανότητας, ακολούθησε γρήγορα τη θεραπευτική τους χρήση και αφορούσε αρχικά αθλητές της άρσης βαρών, αλλά και άλλων αθλημάτων που απαιτούν αυξημένη μυϊκή δύναμη. Ο στόχος ήταν πάντα η επίτευξη μεγέθους μυών, αλλά και μυϊκής δύναμης σημαντικά μεγαλύτερων από ότι επιτυγχάνεται μόνο με την εντατική προπόνηση και την κατάλληλη διαίτα. Η χρήση για τέτοιους σκοπούς αμφισβητήθηκε έντονα στη διεθνή βιβλιογραφία και σήμερα, είναι γνωστό και γενικά παραδεκτό, ότι αύξηση του μυϊκού μεγέθους και της μυϊκής δύναμης επιτυγχάνεται σε αθλητές που χρησιμοποιούν αναβολικά στεροειδή, πάντα όμως σε συνδυασμό με την αυξημένη, ειδική για κάθε άθλημα, προπόνηση.

Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή διακρίνονται σε ενδογενή, τα οποία παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, και σε συνθετικά, τα οποία λαμβάνονται εξωγενώς. Το φυσικό αναβολικό στεροειδές που διάλεξε η φύση για τον άνθρωπο και το οποίο επιδρά, τόσο στο αναπαραγωγικό σύστημα, όσο και σε μη αναπαραγωγικούς ιστούς, είναι η τεστοστερόνη, η οποία παράγεται από τον ανθρώπινο οργανισμό. Αυτή εμφανίζει δύο σημαντικές δράσεις, την ανδρογόνο (ανάπτυξη των ανδρικών χαρακτηριστικών, όπως γεννητικά όργανα, μυϊκό σύστημα, τριχοφυΐα) και την αναβολική (προαγωγή της σύνθεσης πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς και όργανα). Μεγάλη ερευνητική προσπάθεια καταβάλλεται για να κατανοηθεί η δράση της τεστοστερόνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ύστερα από την απομόνωση της τεστοστερόνης (1935) και την τεκμηρίωση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της, ακολούθησε η παραγωγή μιας σειράς συνθετικών αναβολικών στεροειδών, χημικών και φαρμακολογικών αναλόγων της τεστοστερόνης, στο πλαίσιο της προσπάθειας για τη σύνθεση στεροειδών, τα οποία θα είχαν σημαντική αναβολική δράση, χωρίς όμως να διαθέτουν ανδρογονικές ιδιότητες. Μέχρι σήμερα, η προσπάθεια διαχωρισμού της αναβολικής από την ανδρογόνο δράση των στεροειδών έχει αποβεί άκαρπη.

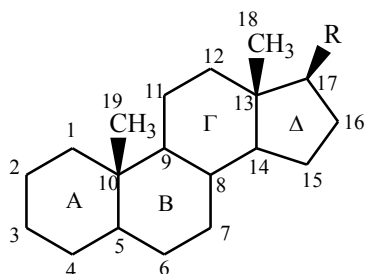
Τα αναβολικά στεροειδή ασκούν τη φαρμακολογική τους δράση σε κυτταρικό επίπεδο, συνδεόμενα με τους υποδοχείς ανδρογόνων και διεγείροντας την παραγωγή mRNA, με τελικό αποτέλεσμα την αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση. Το είδος των κλινικών εκδηλώσεων που θα προκληθούν, προσδιορίζεται από τον τύπο και τις συγκεντρώσεις των υποδοχέων, αλλά και των ενζύμων που ελέγχουν τη βιομετατροπή των στεροειδών σε κάθε συγκεκριμένο όργανο. Τα αναβολικά

εμφανίζουν επίσης, αντικαταβολική δράση, διευκολύνοντας την πιο αποτελεσματική αξιοποίηση των πρωτεϊνικών αποθεμάτων του οργανισμού, μέσω της αυξητικής ορμόνης και του ανταγωνισμού της καταβολικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών.

Ακόμη, τα αναβολικά αυξάνουν τη σύνθεση της ερυθροποιητίνης, με επακόλουθη αύξηση του αιματοκρίτη και τελικό αποτέλεσμα, την καλύτερη οξυγόνωση των ιστών. Τέλος, τα αναβολικά μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της μυϊκής δύναμης, να αυξήσουν την επιθετικότητα των αθλητών, να προκαλέσουν ευφορία, να ελαττώσουν το αίσθημα της κόπωσης και να μειώσουν το χρόνο αποκατάστασης, ύστερα από έντονη προπόνηση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο αθλητής να μπορεί να αντέξει μεγαλύτερης διάρκειας και πιο επίπονη προπόνηση [13-18].

2.2. Δομή και στερεοχημεία των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών

Τα στεροειδή είναι μόρια, των οποίων οι δομές βασίζονται στο τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων που παρατίθεται στο σχήμα 2.1. Οι τέσσερις δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ, Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται, ξεκινώντας από το δακτύλιο Α. Οι τρεις πρώτοι εξαμελείς δακτύλιοι (Α, Β, Γ) υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανακλίντρου. Λόγω της δύσκαμπτης



Σχήμα 2.1. Δομή στεροειδών (R:ανθρακική αλυσίδα).

γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, τα στεροειδή δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή δακτυλίων των κυκλοεξανίων (ring-flip).

Στους ανθρώπους, τα περισσότερα στεροειδή λειτουργούν ως ορμόνες, δηλαδή ως «χημικοί αγγελιοφόροι» που εκκρίνονται από τους αδένες και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μεταφέρονται σε συγκεκριμένους ιστούς. Από χημική άποψη, οι στεροειδείς ορμόνες διακρίνονται, ανάλογα με το είδος του βασικού σκελετού, σε τρεις κατηγορίες:

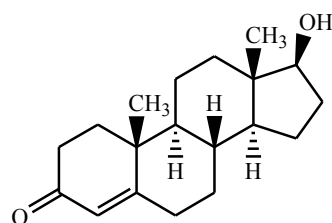
- α) ορμόνες του οιστρανίου, με 18 άτομα άνθρακα, χωρίς ανθρακική αλυσίδα στη θέση 17 και μεθύλιο στη θέση 10 (οιστρογόνα),

β) ορμόνες του ανδροστανίου, με 19 άτομα άνθρακα, χωρίς ανθρακική αλυσίδα στη θέση 17 (ανδρογόνα),

γ) ορμόνες του πρεγνανίου, με 21 άτομα άνθρακα και στη θέση 17 πλευρική αλυσίδα $R=CH_2CH_3$ (προγεστογόνα, κορτικοστεροειδή).

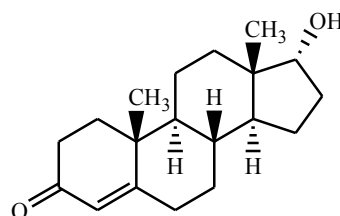
Από άποψη δομής, λοιπόν, τα ανδρογόνα είναι στεροειδή χωρίς πλευρική αλυσίδα, με οξυγονούχες ομάδες (υδροξυλομάδες, κετονομάδες) στις θέσεις C3 και C17. Η κατεύθυνση των υποκαταστατών στο χώρο, σε όλες τις θέσεις, συμβολίζεται συμβατικά με την ένδειξη α ή β, όταν οι υποκαταστάτες βρίσκονται αντίστοιχα κάτω ή πάνω από το επίπεδο του πυρήνα. Οι α-υποκαταστάτες σημειώνονται στο συντακτικό τύπο της ένωσης με διακεκομμένη γραμμή, ενώ οι β-υποκαταστάτες σημειώνονται με συνεχή έντονη γραμμή. Στα συνηθέστερα ανδρογόνα, η σύνδεση των δακτυλίων A και B είναι *trans*, με συνέπεια το υδρογόνο που βρίσκεται στη θέση C5 να είναι κάτω από το επίπεδο του μορίου, ενώ το μεθύλιο στη θέση C19 να έχει κατεύθυνση προς τα πάνω. Αντίθετα στα ανδρογόνα τύπου *cis* A-B, το μεθύλιο του C19, αλλά και το άτομο υδρογόνου του C5, κατευθύνονται προς την ίδια πλευρά του μορίου (επάνω). Η στεreoχημεία 5α ή 5β του C5 σημειώνεται στο όνομα της ένωσης εκτός, εάν υπάρχει διπλός δεσμός στη θέση C5.

Ορισμένα από τα πιο χαρακτηριστικά ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι η τεστοστερόνη, η επιτεστοστερόνη, η ανδροστερόνη, η ανδροστενολόνη και η ετιοχολανολόνη, που παρουσιάζονται στο σχήμα 2.2. [19-21].



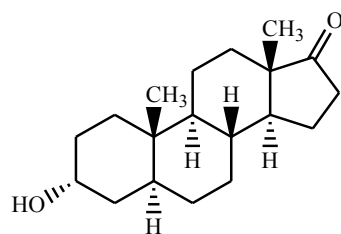
ΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

(17β-υδροξυ-4-ανδροστεν-3-ονη)



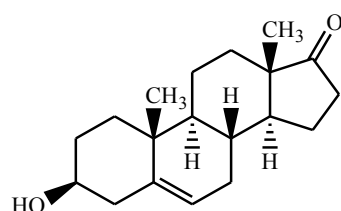
ΕΠΙΤΕΣΤΟΣΤΕΡΟΝΗ

(17α-υδροξυ-4-ανδροστεν-3-ονη)



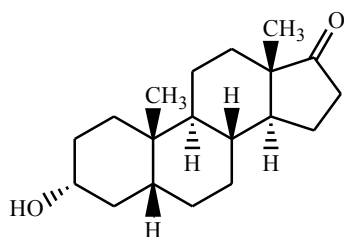
ΑΝΔΡΟΣΤΕΡΟΝΗ

(5α-ανδροσταν-3α-ολη-17-ονη)



ΑΝΔΡΟΣΤΕΝΟΛΟΝΗ

(5-δεϋδροεπιανδροστερόνη)



επιχοχολανολόνη

(5β-ανδροσταν-3α-ολη-17-ονη)

Σχήμα 2.2. Η δομή ορισμένων από τα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή.

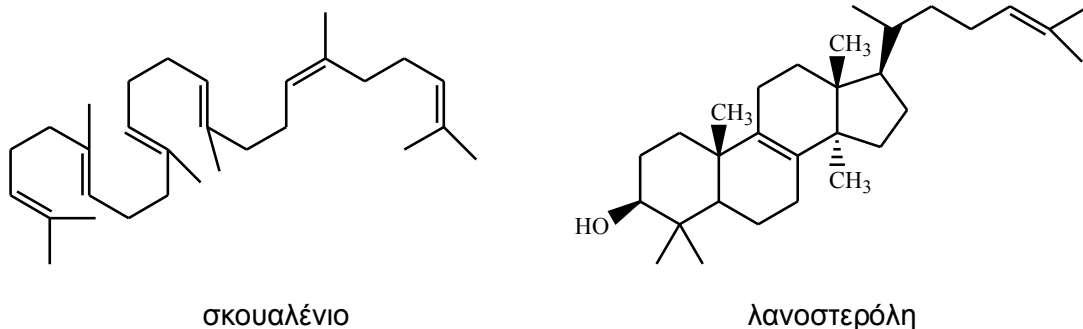
2.3. Βιοσύνθεση και μεταβολισμός των ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών

2.3.1. Βιοσύνθεση της τεστοστερόνης

Η τεστοστερόνη είναι η σπουδαιότερη ανδρική ορμόνη. Πάνω από το 95% εκκρίνεται στους όρχεις και πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα Leydig. Η τεστοστερόνη έχει ως πρόδρομη ένωση τη χοληστερόλη. Τα μεταβολικά στάδια που απαιτούνται για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδρογόνα, λαμβάνει χώρα σε περίπου 500 εκατομμύρια κύτταρα Leydig. Η δεξαμενή της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό, τροφοδοτείται από δύο πηγές:

- τη χοληστερόλη που απορροφάται από την τροφή,
- τη χοληστερόλη που βιοσυντίθεται στο ήπαρ και το λεπτό έντερο, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Το μεβαλονικό οξύ, $\text{HOOCCH}_2\text{COH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, αποτελεί «ένωση κλειδί» στις βιοσυνθετικές πορείες προς σχηματισμό των στεροειδών ορμονών, γιατί η αναγωγή του β-υδροξυ-β-μεθυλο-γλουταρυλο-CoA προς μεβαλονικό οξύ είναι μη αντιστρεπτή πορεία. Κατά συνέπεια, εφόσον σχηματιστεί μεβαλονικό οξύ, τότε αυτό ακολουθεί ποσοτικά τη βιοσυνθετική του πορεία, η οποία αρχικά περιλαμβάνει τη βιοσύνθεση ενός μη κυκλικού τριτερπενίου, του σκουαλενίου (σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3. Η χημική δομή του σκουαλενίου και της λανοστερόλης

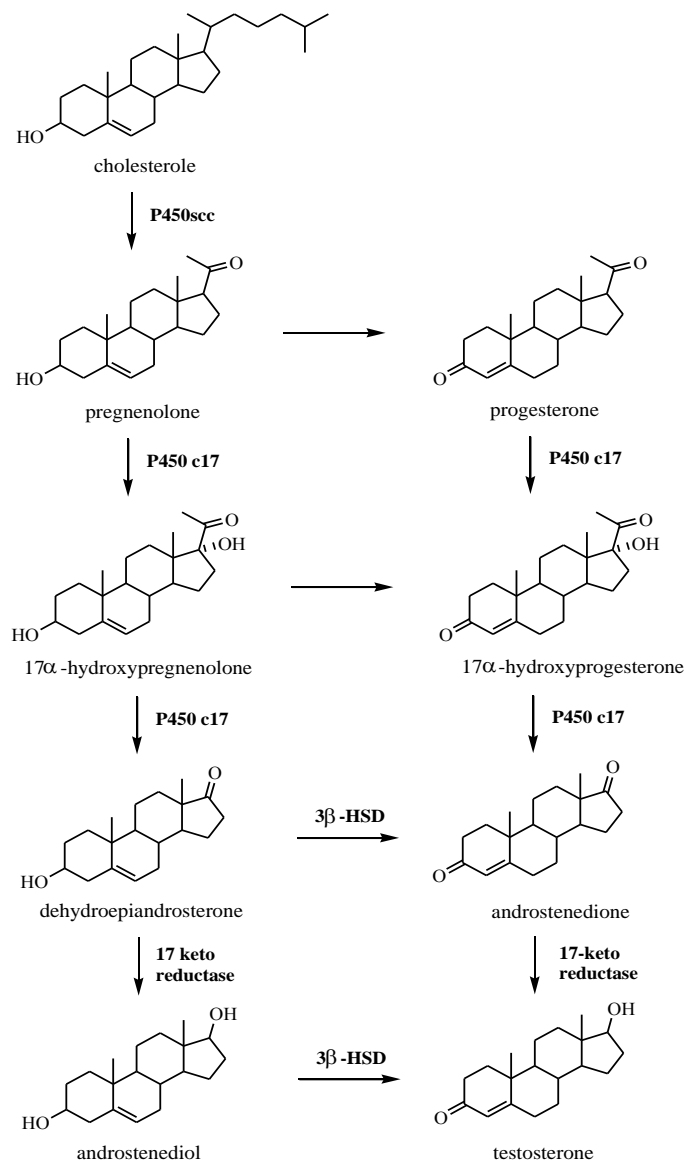
Κατόπιν, μέσω μιας ενζυμικά καταλυόμενης εποξειδωσης του σκουαλενίου, σχηματίζεται το εποξειδίο του σκουαλενίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια όξινα καταλυόμενη κυκλοποίηση του κι έπειτα, μια εξαιρετικά σύνθετη ακολουθία αναδιατάξεων καρβοκατιόντων, προς σχηματισμό της λανοστερόλης (σχήμα 2.3). Στη συνέχεια, η λανοστερόλη μετατρέπεται, παρουσία ορισμένων ενζύμων, σε χοληστερόλη, η οποία μπορεί να μετατραπεί ενζυμικά σε ένα πλήθος από διαφορετικές στεροειδείς ορμόνες. Η χοληστερόλη που βιοσυντίθεται, μεταφέρεται στους περιφερειακούς ιστούς με τις λιποπρωτεΐνες.

Η διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης και ο σχηματισμός της πρεγνενολόνης στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, αποτελεί την έναρξη της βιοσύνθεσης των στεροειδών (σχήμα 2.4). Η αντίδραση διάσπασης καταλύεται από μια αιμοπρωτεΐνη, το κυτόχρωμα P450_{scc} (scc: sidechaincleavage). Κατόπιν αυτού, η πρεγνενολόνη μετατρέπεται, μέσω ενζύμων, σε μια ποικιλία από στεροειδή με 19 άτομα άνθρακα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Κατά συνέπεια, η βιοσύνθεση των βιολογικά ενεργών ανδρογόνων, είναι αποτέλεσμα μίας σταδιακής αποικοδόμησης της βιολογικά ανενεργής πρεγνενολόνης. Η διαδικασία καταλύεται από οξειδωτικά ένζυμα, ορισμένα από τα οποία είναι μέλη της ομάδας των πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με αίμη, γνωστές ως κυτόχρωμα P450.

Η παρουσία πολλών ενζύμων, σχετικών με τη διαδικασία βιοσύνθεσης των στεροειδών, επιτρέπει τη μετατροπή της πρεγνενολόνης προς τεστοστερόνη, μέσω διαφόρων διαδρομών, περισσότερων από μια. Ανάλογα με το εάν ο μετασχηματισμός της πρεγνενολόνης πραγματοποιείται από ένα σύμπλεγμα 3β-υδροξυστεροειδικής- δεϋδρογενάσης/Δ5-Δ4-ισομεράσης ή από το ένζυμο P450_{C17}, τότε κυριαρχεί η διαδρομή Δ4 ή Δ5 (προϊόντα με διπλό δεσμό στη θέση C4 ή C5). Όσον αφορά στους ανθρώπους, τα περισσότερα από τα στεροειδή σχηματίζονται μέσω της διαδρομής Δ5, με πρώτο ενδιάμεσο με 19 άτομα άνθρακα, τη δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA). Το ένζυμο 3β-υδροξυστεροειδική- δεϋδρογενάση/Δ5-Δ4-ισομεράση (3β-HSD) καταλύει τη μετατροπή των Δ5-3β-υδροξυστεροειδών σε Δ4-3-κετοστεροειδή, ένα απαραίτητο στάδιο στη βιοσυνθετική πορεία[21-25].

2.3.2. Μεταφορά της τεστοστερόνης

Στην περιφέρεια, αποκαθίσταται γρήγορη ισορροπία μεταξύ της τεστοστερόνης που συναντάται στα διάφορα όργανα και αυτής που βρίσκεται στο αίμα. Το γεγονός αυτό, αποδεικνύεται από τα ίδια επίπεδα ελεύθερης (μη συζευγμένης) τεστοστερόνης που υπάρχουν στο σάλιο και το αίμα. Η συνολική συγκέντρωση αυτής, και γενικότερα των στεροειδών, στους σχετικούς ιστούς και τα υγρά του αίματος, εξαρτάται κυρίως από της πρωτεΐνες σύνδεσης, όπως η γλοβουλίνη, η οποία έχει υψηλή συγγένεια με ορμόνες φύλου (SHBG) και η αλβουμίνη. Οι πρωτεΐνες σύνδεσης λειτουργούν και ως μια μορφή αποθήκης των στεροειδών, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή ταχύτητα μεταβολισμού, κατά τη διέλευση του αίματος από το ήπαρ.



Σχήμα 2.4. Βιοσύνθεση της τεστοστερόνης από τη χοληστερόλη

Συγκεκριμένα η τεστοστερόνη, εμφανίζει μεγάλη σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Περίπου το 40% είναι συνδεδεμένο με την υψηλής συγγένειας με αυτή, γλοβουλίνη, ενώ περίπου το 60% συνδέεται, με χαμηλή συγγένεια, με την αλβουμίνη. Επίσης, παραμένει ένα ποσοστό 2% ελεύθερο, δηλαδή μη συζευγμένο με κάποια από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες. [22, 24-28] .

2.3.3. Μεταβολισμός της τεστοστερόνης και των υπολοίπων ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών

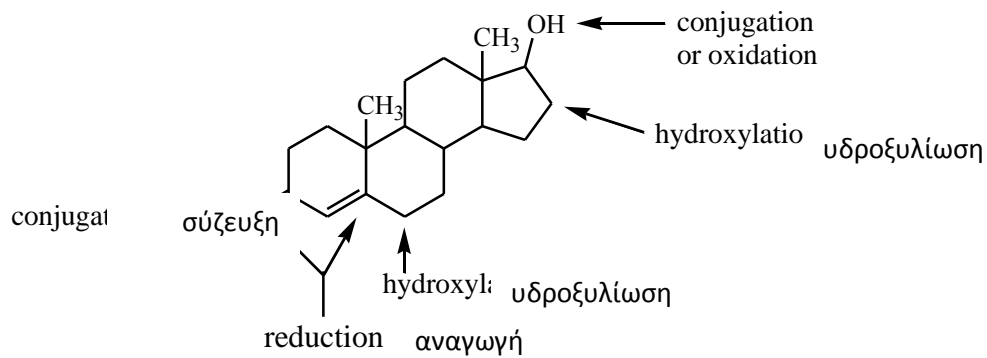
Ο μεταβολισμός των ενδογενών αναβολικών στεροειδών αποτελεί ένα εκτεταμένο πεδίο μελέτης και αυτό αντανακλάται στην ποικιλία των χημικών αντιδράσεων, στις οποίες τα υποστρώματα μπορούν να λάβουν μέρος, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Ο μεταβολισμός τους υποδιαιρείται σε δύο φάσεις:

- φάση 1, η οποία περιλαμβάνει αντιδράσεις των δραστικών ομάδων, όπως οξείδωση, αναγωγή, υδροξυλίωση, επιμερείωση,
- φάση 2, στην οποία λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σύζευξης, σχηματίζοντας γλυκουρονίδια και θειικούς εστέρες των στεροειδών.

Τα τελικά προϊόντα της πρώτης φάσης περιέχουν μια ενεργή ομάδα π.χ. –OH, είναι δηλαδή χημικά ενεργά, ώστε να προχωρήσουν στη δεύτερη φάση του μεταβολισμού ή να αντιδράσουν με ένζυμα σύζευξης. Στην πραγματικότητα, ο κύριος σκοπός της φάσης 1 είναι να προετοιμάσει την ουσία για τη φάση 2 του μεταβολισμού. Η αποτοξίνωση πραγματοποιείται στη δεύτερη φάση, η οποία δίνει προϊόντα που θεωρούνται στο σύνολό τους ανενεργά, γενικά υδατοδιαλυτά και εύκολα απεκκρινόμενα από τον ανθρώπινο οργανισμό.

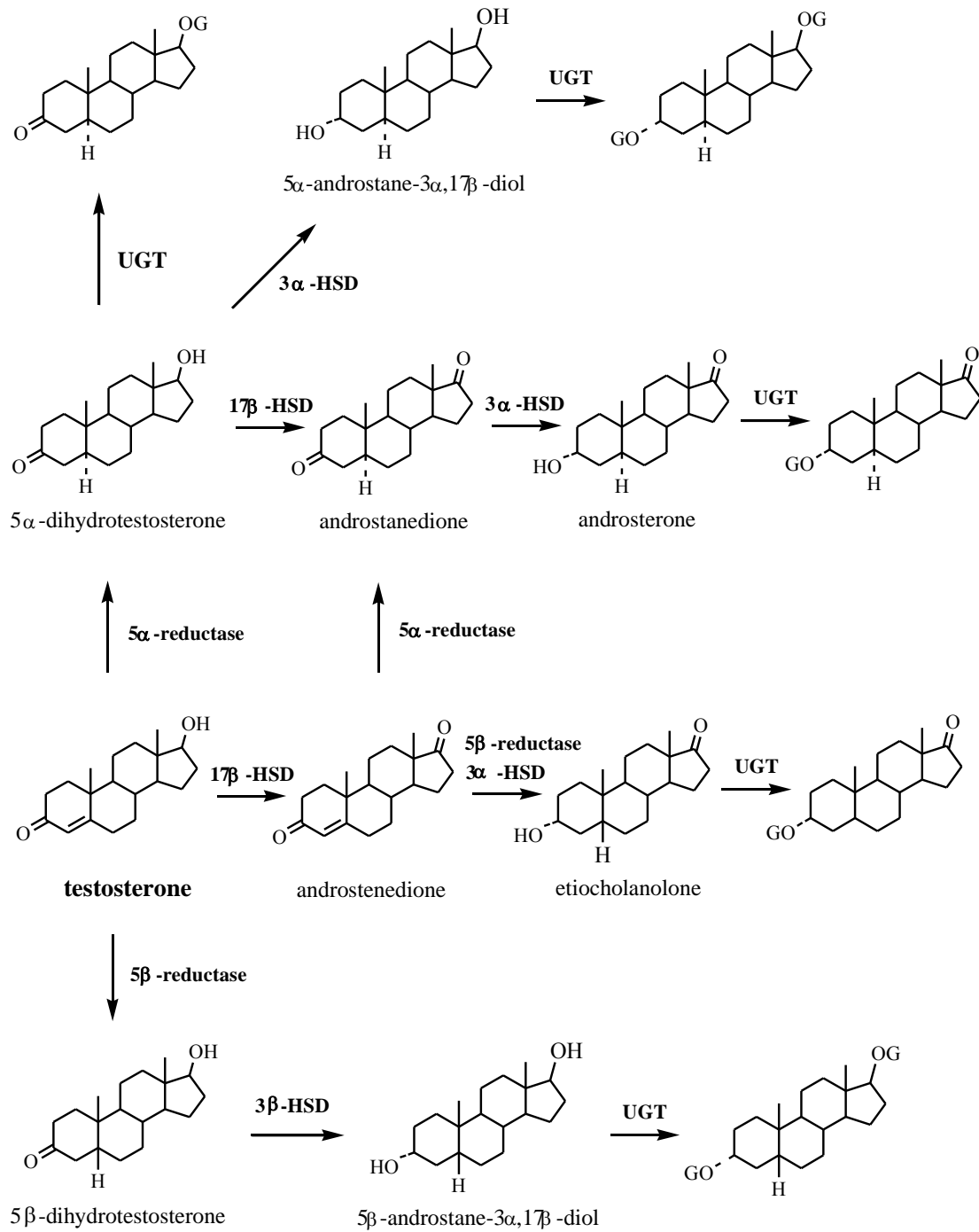
Οι κυριότεροι στόχοι στη φάση 1 του μεταβολισμού είναι οι δακτύλιοι A, B και Δ. Γενικά, η βιολογική δράση των στεροειδών απενεργοποιείται με κορεσμό των διπλών δεσμών. Ο διπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων C4 και C5 ανάγεται προς 5α- και 5β-ισομερή. Επίσης, η κετονομάδα στον άνθρακα C3 ανάγεται εύκολα, δίνοντας κυρίως 3α-υδροξυ-ισομερή. Όσον αφορά στα στεροειδή με δομή 1,4-διένιο, ο δακτύλιος A είναι ανθεκτικός σε αντιδράσεις αναγωγής και η πιο κοινή μεταβολική τους αλλαγή στο δακτύλιο B είναι η 6β-υδροξυλίωση. Επιπλέον, στο δακτύλιο Δ, το άτομο του οξυγόνου στη θέση C17 είναι πολύ ευαίσθητο σε οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις. Πολλά 17β-υδροξυ-στεροειδή οξειδώνονται προς 17-κετο-στεροειδή (σχήμα 2.5).

Οι αντιδράσεις σύζευξης που λαμβάνουν χώρα στη φάση 2 του μεταβολισμού είναι η γλυκουρονίωση και η σουλφονίωση, με κυριότερη την πρώτη, όσον αφορά στους ανθρώπους. Η σύζευξη γίνεται στους δακτυλίους A και Δ. Στα 3α-υδροξυ-στεροειδή επικρατεί η σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, ενώ στα 3β-υδροξυ-στεροειδή με θειικά. Αντίθετα, στα 17β-υδροξυ-στεροειδή είναι δυνατόν να γίνουν και οι δύο αντιδράσεις σύζευξης (σχήμα 2.5).



Σχήμα 2.5. Πιθανές αντιδράσεις των φάσεων 1 και 2 του μεταβολισμού

Η τεστοστερόνη μπορεί να μετατραπεί σε ενεργούς μεταβολίτες, στους ανδρογόνους ιστούς. Στον προστάτη, το δέρμα και το ήπαρ, η τεστοστερόνη ανάγεται σε 5α-διϋδροτεστοστερόνη (DHT), μη αντιστρεπτά, μέσω του αναγωγικού ενζύμου, 5α-ρεδοκτάση, παρουσία NADPH. Η ανδρογόνος ιδιότητα της 5α-διϋδροτεστοστερόνης είναι 2-3 φορές πιο ισχυρή από την πρόδρομη ένωση. Επιπροσθέτως, η τεστοστερόνη μπορεί να αδρανοποιηθεί στο ήπαρ, με αντιδράσεις αναγωγής και οξείδωσης, οι οποίες ακολουθούνται από γλυκουρονίωση και νεφρική απέκκριση. Αρχικά, είναι δυνατόν να μεταβολιστεί σε ανδροστενεδιόνη, με οξείδωση της 17β-OH ομάδας, καθώς επίσης και σε ανδροστανοδιόνη, με 5α-αναγωγή του δακτυλίου A στη θέση C5. Η ανδροστανοδιόνη μετατρέπεται περαιτέρω σε ανδροστερόνη, κατόπιν αναγωγής της κετονομάδας στη θέση C3. Εναλλακτικά, η ανδροστενεδιόνη μπορεί να μετατραπεί σε ετιοχολανολόνη, με αναγωγή της κετονομάδας στη θέση C3 και του διπλού δεσμού του δακτυλίου A. Οι κυριότεροι μεταβολίτες που εκκρίνονται στα ούρα είναι η ανδροστερόνη και η ετιοχολανολόνη. Πρόκειται για δύο ανενεργούς μεταβολίτες, οι οποίοι εκκρίνονται συζευγμένοι, κατά βάση ως γλυκουρονίδια (σχήμα 2.6) [22, 24-29].



Σχήμα 2.6. Ο μεταβολισμός της τεστοστερόνης, όπου G: γλυκουρονίδιο, HSD: υδροξυ-στεροειδική-δεϋδρογονάση, UGT: γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση

2.4. Συνθετικά ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή

Εκτός από τις φυσικά παραγόμενες ανδρικές ορμόνες (ενδογενή στεροειδή), με σημαντικότερη την τεστοστερόνη, υπάρχουν και τα αντίστοιχα συνθετικά στεροειδή. Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα εξωγενώς χορηγούμενα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή και οι αντίστοιχοι συζευγμένοι μεταβολίτες τους στα ούρα, ως γλυκουρονίδια (γ) ή φωσφορικά (φ).

Πίνακας 2.1 Χορηγούμενα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή και οι αντίστοιχοι μεταβολίτες τους στα ούρα

Χορηγούμενα στεροειδή	Μεταβολίτες στα ούρα
τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη	τεστοστερόνη (γ)
επιτεστοστερόνη	επιτεστοστερόνη (γ)
τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη, ανδροστενοδιόλη, διϋδροτεστοστερόνη	ανδροστερόνη (γ)
τεστοστερόνη, ανδροστενεδιόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη, ανδροστενοδιόλη	ετιοχολανολόνη (γ)
δεϋδροεπιανδροστερόνη	δεϋδροεπιανδροστερόνη (γ, σ)
ανδροστενεδιόνη	6α-υδροξυ-ανδροστενοδιόνη (γ)
	6β-υδροξυ-ανδροστερόνη (γ)
	6β-υδροξυ-ετιοχολανολόνη (γ)
	6β-υδροξυ-επιανδροστερόνη (σ)

Η λήψη των συγκεκριμένων απαγορευμένων ουσιών από τους αθλητές, μπορεί να γίνει από το στόμα, με ένεση απευθείας στο μυ ή με τη μορφή αλοιφών που εφαρμόζονται στο δέρμα. Στην πρώτη περίπτωση, η ουσία δε χορηγείται απευθείας στον τόπο, όπου προορίζεται να δράσει. Ακόμη, όμως, και στην περίπτωση τοπικής χορήγησης, τα μόρια θα πρέπει να μεταβούν από το σημείο εφαρμογής της δόσης, μέχρι την «ειδική θέση», όπου θα δράσει. Στις περισσότερες περιπτώσεις, «ειδική θέση» σημαίνει υποδοχέας του στεροειδούς και η δράση που προκύπτει, είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης απαγορευμένης ουσίας-υποδοχέα. Η άφιξη όμως στον υποδοχέα δεν είναι μια απλή διαδικασία, καθώς τόσο η δομή, όσο και σύσταση του ανθρώπινου σώματος δεν είναι ενιαία και επιπρόσθετα, η πρόσβαση στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου υπάρχουν οι υποδοχείς, εμποδίζεται από μια σειρά φυσικών και μεταβολικών φραγμών. Η ενδοφλέβια χορήγηση διασφαλίζει την ταχεία άφιξη του συνόλου της χορηγούμενης δόσης στη γενική κυκλοφορία, με αποτέλεσμα την άμεση εκδήλωση της δράσης της ουσίας. Αντίθετα, όταν οι ουσίες χορηγούνται

από άλλες οδούς, πρέπει να διασχίσουν ένα σύνολο μεμβρανών και ιστών, για να προσεγγίσουν τη γενική κυκλοφορία.

Οι τρεις διακριτές πορείες, οι οποίες συνθέτουν τη γαστρεντερική απορρόφηση των ξενοβιοτικών ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα, είναι η παροχή τους στα γαστρεντερικά υγρά, η μετακίνησή τους στο γαστρεντερικό σωλήνα και η πρόσληψή τους από τη γαστρεντερική βλεννογόνο στιβάδα. Η παροχή, δηλαδή, η τροφοδότηση των γαστρεντερικών υγρών με την απαγορευμένη ουσία, εξαρτάται από τη δυνατότητα που υπάρχει, να διαλυθεί το σκεύασμα στις συγκεκριμένες φυσιολογικές συνθήκες. Τα μόρια διαπερνούν τους επιθηλιακούς φραγμούς του σωλήνα, μόνο εάν βρίσκονται σε διαλυμένη κατάσταση και όχι σε στερεή.

Η άφιξη του στεροειδούς στο αίμα, εκτός από τη μετάβασή του στα γαστρεντερικά υγρά, προϋποθέτει και την παραμονή του, με την επιθυμητή μορφή, σε περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου μεγιστοποιείται η πιθανότητα της ποσοτικής πρόσληψής του από το γαστρεντερικό επιθήλιο. Η μετακίνηση αφορά κυρίως, στη διάβαση της φαρμακοτεχνικής μορφής κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, μαζί με τη φυσιολογική μετακίνηση των περιεχομένων του γαστρεντερικού σωλήνα.

Η πρόσληψη που ακολουθεί, περιλαμβάνει την αρχική προσέγγιση του συνθετικού στεροειδούς στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων και στη συνέχεια, τη διαπέραση της βλεννογόνου στιβάδας. Γενικά, με τον όρο πρόσληψη συνοψίζονται όλες οι επιμέρους πορείες που οδηγούν στη μεταφορά των ξενοβιοτικών ουσιών, από το εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα προς τα αγγεία και κατόπιν, στη γενική κυκλοφορία του αίματος. Η παρουσία τους στα γαστρεντερικά υγρά και στις θέσεις πρόσληψης με την επιθυμητή μορφή, αποτελεί προϋπόθεση για τη μεταφορά αυτή. Για την ολοκλήρωση της πρόσληψης, απαιτείται η υπερπήδηση μιας σειράς φραγμών, των φυσικών, οι οποίοι εμποδίζουν την άμεση πρόσβαση του φαρμάκου στα αγγεία, και των μεταβολικών, οι οποίοι οδηγούν στη βιομετατροπή του φαρμάκου, κατά τη διαπέραση. Η μεταφορά των ουσιών στη γενική κυκλοφορία του αίματος, δια μέσου των αιμοφόρων αγγείων που δικτυώνουν το γαστρεντερικό σωλήνα, αποτελεί τη βασική οδό που ακολουθείται.

Μετά την άφιξη των απαγορευμένων ουσιών στη γενική κυκλοφορία, οι πορείες που προσδιορίζουν την τύχη τους στο σώμα, είναι η κατανομή και η απομάκρυνση. Η κατανομή επιτυγχάνεται, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Μέσω αυτής, επιτρέπεται η ανάμιξη των συνθετικών στεροειδών με τα διάφορα υγρά στους ιστούς και τα όργανα του σώματος και έχει ως αποτέλεσμα, την προσέγγιση στις θέσεις δράσης. Στον τομέα αυτό, πρωταρχικό ρόλο παίζει η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η πρωτεϊνική αυτή σύνδεση μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες.

Στην πρώτη περίπτωση, την ενδοκυττάρια σύνδεση, οι ουσίες συνδέονται με τον υποδοχέα των ανδρογόνων. Επίσης, υπάρχουν και οι δευτερεύοντες ή βουβοί υποδοχείς, με τους οποίους η σύνδεση γίνεται εξωκυττάρια και δε δημιουργεί μια άμεση «φαρμακολογική» απόκριση. Οι πιο σημαντικοί βουβοί υποδοχείς είναι οι πρωτεΐνες του πλάσματος και πιο ειδικά η αλβουμίνη.

Η εκδήλωση της δράσης των απαγορευμένων ουσιών, προϋποθέτει την προσέγγισή τους στους υποδοχείς που συνήθως, βρίσκονται στους ιστούς. Αυτές δεν περιορίζονται στη γενική κυκλοφορία, αλλά διαχέονται προς το μεσοκυττάριο υγρό, διαπερνώντας τους πόρους των τριχοειδών του αίματος. Το μεσοκυττάριο υγρό συνιστά περίπου το 20% του όγκου των ιστών και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες του πλάσματος. Η εύκολη ανταλλαγή ουσιών μεταξύ αίματος και μεσοκυττάριου υγρού, οφείλεται στη μεγάλη έκταση της επιφάνειας των τριχοειδών, καθώς και στη χαμηλή ταχύτητα ροής του αίματος, στα σημεία της ανταλλαγής. Το επόμενο στάδιο που μπορεί να ακολουθήσουν στη διαδικασία της κατανομής, είναι να εισέλθει στα κύτταρα των ιστών και να κατανεμηθεί και στο ενδοκυττάριο υγρό που απαρτίζει περίπου το 65% του όγκου ενός ιστούς [30, 31].

Οι δύο σημαντικότερες διαδικασίες απομάκρυνσης των ξενοβιοτικών ουσιών είναι η απέκκριση και η βιομετατροπή που βασίζονται στη λειτουργία των νεφρών (νεφρική κάθαρση) και του ήπατος (ηπατική κάθαρση), αντίστοιχα. Η εκχύλιση που λαμβάνει χώρα στα συγκεκριμένα όργανα, έχει την έννοια της μη επιστροφής των ουσιών στο αίμα, της οριστικής δηλαδή απομάκρυνσής τους, όπως συμβαίνει με την απέκκριση των απαγορευμένων ουσιών από τους νεφρούς στα ούρα ή της μεταβολής τους σε άλλες ουσίες (μεταβολίτες), όπως συνήθως συμβαίνει στο ήπαρ. Η διαδικασία του μεταβολισμού των συνθετικών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών είναι όμοια με αυτή που αναφέρθηκε για τα αντίστοιχα ενδογενή (εδάφιο 2.3.3).

2.5. Κατάχρηση των συνθετικών ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών – παρενέργειες

Οι δόσεις των συνθετικών ενδογενών ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών που λαμβάνουν οι αθλητές με σκοπό το ντόπινγκ, είναι από δέκα έως σαράντα φορές μεγαλύτερες από τις αποδεκτές για θεραπευτικούς σκοπούς. Είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε χρήση φαρμάκων για θεραπευτικούς σκοπούς, συνοδεύεται σχεδόν πάντα από ανεπιθύμητες ενέργειες. Έτσι, είναι αυτονόητο ότι η λήψη δόσεων, κατά πολύ μεγαλύτερων από τις συνιστώμενες θεραπευτικές και μάλιστα από υγιή άτομα, όπως οι αθλητές, δε μπορεί παρά να συνοδεύεται, ομοίως, από ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η χρόνια λήψη ενδογενών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών προκαλεί σημαντικές δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο ήπαρ, αφού εκεί συντελείται η βιομετατροπή τους. Οι τιμές ηπατικών ενζύμων εμφανίζονται αυξημένες, αλλά συχνά επανέρχονται στις φυσιολογικές, όταν η χρήση των ουσιών διακοπεί. Η διαταραχή των ηπατικών λειτουργιών για μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορεί να προκαλέσει κίρρωση σημαντικού βαθμού.

Επιπροσθέτως, στις γυναίκες τα αναβολικά προκαλούν φαινόμενα «αρρενοποίησης» που εκδηλώνονται με αλλαγές στη χροιά της φωνής, δασυτριχισμό, αλλά και μείωση της τριχοφυΐας της κεφαλής ανδρικού τύπου (φαλάκρα). Οι εκδηλώσεις αυτές μπορεί να παραμείνουν ακόμη και μετά τη διακοπή της λήψης των συγκεκριμένων ουσιών. Στους άνδρες μπορεί να εμφανιστεί γυναικομαστία, λόγω της βιομετατροπής των

ανδρογόνων στεροειδών σε οιστρογόνα, αλλά και ελάττωση της τριχοφυΐας της κεφαλής.

Επίσης, η χρήση συνθετικών ενδογενών αναβολικών στεροειδών είναι δυνατόν να έχει ως αποτέλεσμα, μεταβολές στις συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών του ορού που περιλαμβάνουν αύξηση της LDL, ενώ παράλληλα αυξάνεται η συνολική χοληστερόλη και κατά συνέπεια, ο κίνδυνος αθηροσκλήρυνσης. Οι συγκεκριμένες απαγορευμένες ουσίες προκαλούν αύξηση της αρτηριακής πίεσης, πιθανώς, λόγω κατακράτησης υγρών και νατρίου, αλλά και λόγω της αύξησης των επιπέδων της κορτιζόλης του αίματος και της υπερασβεστιαϊμίας που προκαλούν. Η προκαλούμενη υπερασβεστιαϊμία μπορεί να προκαλέσει στους αθλητές συμπτώματα αδυναμίας και εύκολης κόπωσης, αλλά και σοβαρότερες για την υγεία τους εκδηλώσεις.

Ακόμη, ανεπιθύμητες ενέργειες μπορεί να αφορούν και στο δέρμα. Ειδικότερα, μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της έκκρισης σμήγματος από τους σμηγματογόνους αδένες του δέρματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σμηγματορροϊκής δερματίτιδας και τη δημιουργία φαγεσώρων. Στη συνέχεια, εμφανίζονται χαρακτηριστικές βλάβες της κοινής ακμής σε διάφορες περιοχές του δέρματος, συνήθως στην πλάτη και στο πρόσωπο, και ενδεχόμενη εμφάνιση δευτερογενών μολύνσεων του δέρματος.

Λόγω του γεγονότος ότι οι μεταβολές στη δύναμη των τενόντων δε μπορούν να παρακολουθήσουν τις αυξήσεις της μυϊκής δύναμης από τη χρήση των εξεταζόμενων απαγορευμένων ουσιών, συχνά παρατηρούνται ρήξεις των τενόντων, ενώ δεν είναι σπάνιες και ταυτόχρονες εκτεταμένες κακώσεις των μυών.

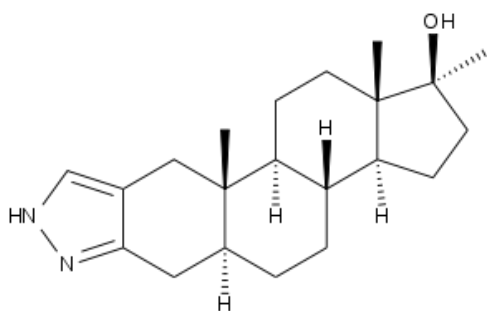
Επίσης, η χρόνια χρήση των συγκεκριμένων αναβολικών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση παραληρήματος και παρανοϊκών, μανιακών εκδηλώσεων και να ενεργοποιήσει λανθάνουσες ψυχοπαθολογικές καταστάσεις και ιδιαίτερα ψυχώσεις. Οι χρήστες εμφανίζουν, συχνότερα από τα φυσιολογικά άτομα, διαταραχές της προσωπικότητας, κυκλοθυμικά επεισόδια, αλλά και επεισόδια ευερεθιστότητας, άγχους, κατάθλιψης, θυμού, εχθρικής συμπεριφοράς και επιθετικότητας.

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η χρόνια χρήση των συνθετικών ενδογενών αναβολικών στεροειδών είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ανάπτυξη ισχυρής ψυχικής, αλλά και σωματικής εξάρτησης, με αποτέλεσμα, μετά τη διακοπή παρατεταμένης λήψης, την εμφάνιση συνδρόμου αποστέρησης. Το σύνδρομο αυτό περιλαμβάνει άγχος, ναυτία, εμετούς ευερεθιστότητα, αϋπνία, ανορεξία, εφίδρωση, ανόρθωση των τριχών, ρίγη, μυαλγίες, κατάθλιψη, ταχυκαρδία και αύξηση της αρτηριακής πίεσης [13, 32, 33].

2.6. Στανολόλη

Η 17 α -Methyl-2 β -H-5 α -androst-2--eno(3,2-c)pyrazol-17 β -ol ή στανολόλη όπως είναι ευρέως γνωστή, είναι ένα από τα πλέον γνωστά ΣΑΑΣ. Με χημικό τύπο C₂₁H₃₂N₂O και μοριακό βάρος 328.5, η ουσία σχηματίζει στερεούς κρυστάλλους, ενώ έχει διαυγές άσπρο χρώμα. Η λήψη της γίνεται κυρίως per os. Για να προστατευθεί από τον πρωτογενή μεταβολισμό του γαστρεντερικού συστήματος, η ουσία είναι αλκυλιωμένη στον C17, ενώ υπόκειται και σε εστεροποίηση της 17-υδροξυλομάδας

της. Οι τροποποιήσεις προστατεύουν την ουσία από τον ταχύ ηπατικό μεταβολισμό επιτρέποντας της να δράσει. Όπως και τα υπόλοιπα αναβολικά στεροειδή, η στανολολόλη συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς στον μυϊκό και λιπώδη ιστό και δρα μεταβάλλοντας το νιτρικό ισοζύγιο αυξάνοντας την κατακράτηση αζώτου από τους συγκεκριμένους ιστούς κι επακολουθως την πρωτεϊνοσύνθεση. Χρόνια χρήση στανολολόλης έχει συνδεθεί με μεγέθυνση του προσάτη και ορισμένες μορφές ηπατικού καρκίνου. Η χρόνια υπέρχρηση έχει συνδεθεί με μια πλειάδα ορμονικών και μεταβολικών παθήσεων. Η στανολολόλη δεν φαίνεται να έχει δηλητηριώδη φύση, αφού καμία περίπτωση οξείας δηλητηρίασης δεν έχει αποδοθεί σε χρήση της παρά την ηπατοτοξικότητά της λόγω της 17-ακυλίωσης.



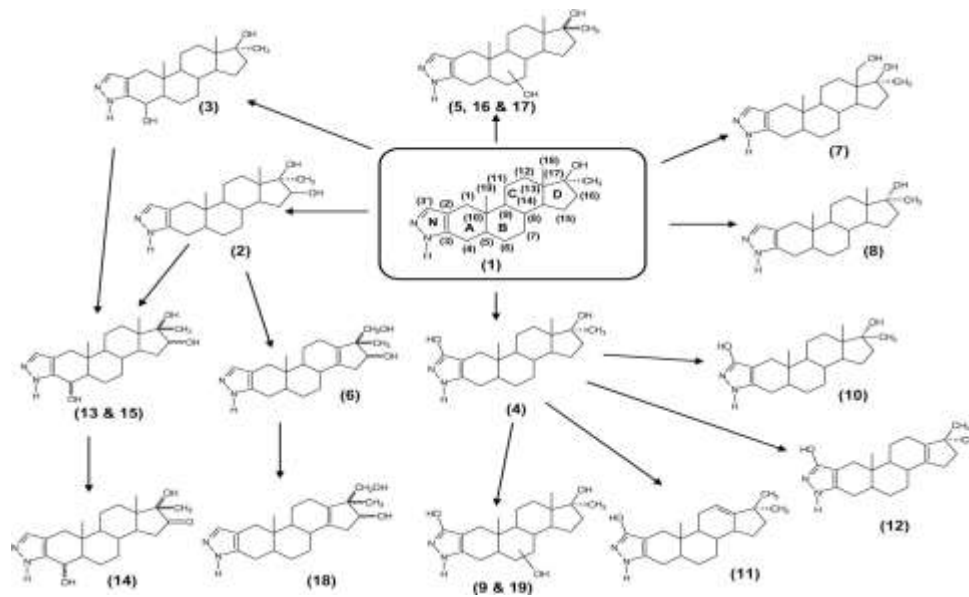
Σχήμα 2.7 Η δομή της στανολολόλης

Η στανολολόλη ανήκει σε μια κατηγορία αναβολικών στεροειδών που χρησιμοποιούνται ευρέως στον αθλητισμό για τις αναβολικές ιδιότητές της και ως εκ τούτου, η WADA την έχει συμπεριλάβει στην λίστα των απαγορευμένων ουσιών. Επιπροσθέτως, η χρήση στανολολόλης έχει απαγορευθεί και στις ιπποδρομίες. Λόγω της ισχυρής αναβολικής της δράσης, η παράνομη μη συνταγογραφημένη χρήση της στανολολόλης από αθλητές, γνώρισε ιδιαίτερη άνθιση με το πέρασμα των χρόνων. Η στανολολόλη είναι ένα τροποποιημένο παράγωγο της διυδροτεστοστερόνης και ως τέτοιο δεν αρωματοποιείται σε οιστρογόνα. Οι αθλητές που κάνουν χρήση της ουσίας, κάνουν συχνά παράπονα για πόνο λόγω «στεγνών αρθρώσεων» είτε με peros χρήση είτε ενδομυϊκά. Αυτό που πραγματικά συμβαίνει, είναι πως η στανολολόλη, ως παράγωγο της διυδροτεστορόνης, ανταγωνίζεται επιλεκτικά την προγεστερόνη και άλλες φυσικές και συνθετικές προγεστίνες (όπως η νανδρολόνη) για την σύνδεση στους υποδοχείς προγεστίνης. Η μειωμένη σύνδεση προγεστινών έχει ως φυσικό επακόλουθο μειωμένη αντιφλεγμονώδη δράση (επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης των προγεστινών στους υποδοχείς τους). Αν και η στανολολόλη είναι γνωστή ως αναβολικός παράγοντας, προτιμάται κυρίως για τις αντικαταβολικές της ιδιότητες, αποτρέποντας την απώλεια μυϊκής μάζας. Αξίζει να σημειωθεί πως πάρα την υψηλή δημοφιλία της, οι λιποδιαλυτικές της ιδιότητες δεν έχουν αποδειχθεί ακόμα επιστημονικά.

Το 1962, η στανολολόλη εισήχθη στην αμερικανική αγορά από την Winthrop υπό την ονομασία Winstrol, ενώ η εισαγωγή της στην Ευρώπη έγινε από την Bayer με την εμπορική ονομασία Stromba. Το 1962, υπογράφεται η συνθήκη Kefauver-Harris, η

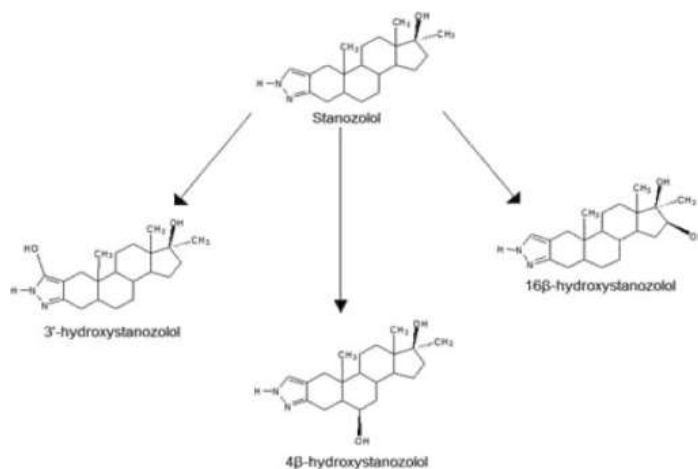
οποία ορίζει πως κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα της αγοράς οφείλει να φέρει επιστημονικές αποδείξεις της αποτελεσματικότητάς του ως απαραίτητο κριτήριο για την έγκρισή του.

Το 1970, ο FDA ανακοινώνει τα τελικά πορίσματά του σχετικά την αποτελεσματικότητα και την δράση ορισμένων αναβολικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης και της στανολόλης. Οι ουσίες κατηγοριοποιήθηκαν ως πιθανόν αποτελεσματικές μόνο ως επικουρική θεραπεία στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης και στον υποθαλαμικό νανισμό. Η έκθεση έδειξε μη αποτελεσματικότητα της στανολόλης να προωθήσει την σύνθεση μυϊκού ιστού και να αποτρέψει τον καταβολισμό του ήδη υπάρχοντος σε χρόνιες και μη εκφυλιστικές ασθένειες. Ο FDA έδωσε διορία 6 μηνών στις φαρμακοβιομηχανίες να αποσύρουν τους θεραπευτικούς ισχυρισμούς για τους οποίους η έκθεση έδωσε αρνητικά αποτελέσματα κι επιπλέον 6 μήνες για να καταθέσουν επιπλέον στοιχεία για τις δράσεις της ουσίας για τις οποίες η έκθεση έδειξε πιθανή αποτελεσματικότητα. Τον Αύγουστο του 1970, η Winthrop κατέθεσε περισσότερα στοιχεία. Τα στοιχεία δεν ήταν επαρκή, ωστόσο ο FDA, επέτρεψε την περαιτέρω εμπορική προώθηση του προϊόντος καθώς στην παρούσα φάση δεν υπήρχαν άλλα φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων παθήσεων. Το 1980, ο FDA αφαίρεσε την ένδειξη για τον νανισμό καθώς εισήχθησαν στην αγορά τα φαρμακευτικά σκευάσματα της αυξητικής ορμόνης. Το 1984 προχώρησε στην αφαίρεση της ένδειξης τόσο για την οστεοπόρωση όσο και για την απλαστική αναιμία. Το 1988 η Sterling εξαγοράζεται από την Eastman Kodak και το 1994 μεταβιβάζει τα φαρμακευτικά δικαιώματα στην Sanofi. Από το 2010 η ουσία αποσύρθηκε από την φαρμακευτική αγορά και πλέον χρησιμοποιείται μόνο ως κτηνοτροφική αγωγή για μυοεκφυλιστικές παθήσεις και ασθένειες του αιμοποιητικού συστήματος, παρά το γεγονός πως οι επιστημονικές αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου παραμένουν ελλιπείς. Οι παρενέργειές του περιλαμβάνουν αύξηση του σωματικού βάρους, ανικανότητα απομάκρυνσης νιτρικών παραπροϊόντων και ηπατοξικότητα τόσο για ανθρώπινη όσο και για κτηνιατρική χρήση.



Σχήμα 2.8 Οι 19 ταυτοποιημένοι μεταβολίτες της στανολόλης

Αν και τα εργαστήρια ανά τον κόσμο έχουν καταφέρει να απομονώσουν και να ταυτοποιήσουν 19 διαφορετικούς μεταβολίτες της στανολόλης, τα διαπιστευμένα εργαστήρια της WADA χρησιμοποιούν μόνο 3, τους 3'-hydroxystanozolol, 4β'-hydroxystanozolol και 16β'-hydroxystanozolol, με έμφαση να δίνεται στον 3OH, ο οποίος είναι και ο πλέον άφθονος. Η μεγάλη προσφορά και φαινομενικά μικρή ανδρογόνος δράση της στανολόλης οδήγησε σε τεράστια αύξηση της δημοφιλίας της κατά την δεκαετία 2000-2010, κάτι που συνεπακόλουθα οδήγησε την WADA σε αναζήτηση νέων τρόπων ανίχνευσης της ουσίας. Έτσι εν έτι 2016, το εργαστήριο ελέγχου Doping της Κολωνίας, μπορεί μέσω της μεθόδου LC (υγρής χρωματογραφίας) να εντοπίσει χρήση 2mg της ουσίας έως και 28 ημέρες μετά. Στο εργαστήριο της Αθήνας συμπεριλαμβάνεται πρόσφατα εκτός των τριών ανιχνευόμενων μεταβολιτών (βλέπε σχήμα 2.9) και η ανίχνευση του γλυκουρουιδίου της στανολόλης με ειδική παρασκευαστική μέθοδο και μέθοδο ανίχνευσης LC/TOF [34-41].



Σχήμα 2.9 Οι 3 μεταβολίτες που χρησιμοποιούν τα εργαστήρια ελέγχου doping

Κεφάλαιο 3

Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή

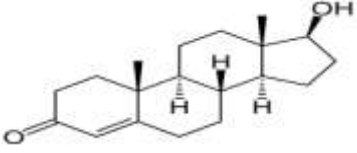
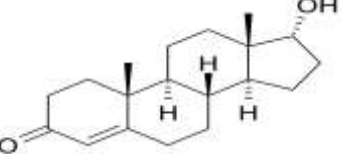
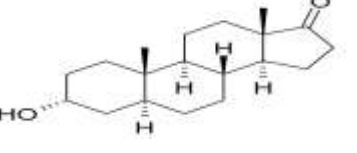
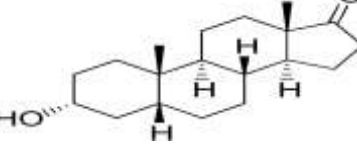
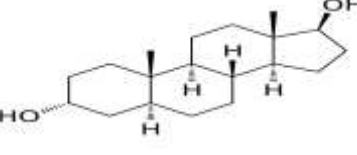
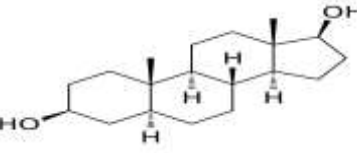
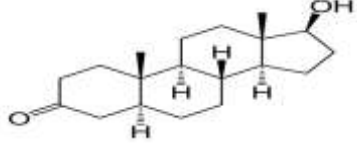
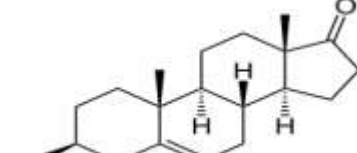
3.1 Ορισμός

Ο WADA εισήγαγε τον όρο «Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή» (Athlete Biological Passport – ABP) στον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-ντόπινγκ ως μία συμπληρωματική μέθοδο για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών. Πρόκειται για έναν έμμεσο τρόπο ανίχνευσης, καθώς ανιχνεύονται οι χειρισμοί των φυσιολογικών παραμέτρων του οργανισμού κι όχι μία συγκεκριμένη απαγορευμένη ουσία. Το ABP έχει ήδη ενσωματωθεί επιτυχώς στα προγράμματα αρκετών Εθνικών Οργανισμών Αντι-ντόπινγκ. Με το ABP ελέγχονται επιλεγμένες παράμετροι ενός αθλητή στη διάρκεια του χρόνου για σημαντικές αλλαγές. Φυσικά ένα δείγμα θα θεωρούταν θετικό εάν η αλλαγή στην παράμετρο ήταν αρκετά μεγάλη. Η τεχνική αυτή έχει ως σκοπό αφενός την προστασία των αθλητών από ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω υψηλών ποσοστών ενδογενών ουσιών, φυσιολογικά προκυπτόντων, και αφετέρου τον εντοπισμό αθλητών που κάνουν λήψη ενδογενών ουσιών. Τον Δεκέμβρη του 2009 τέθηκε σε εφαρμογή η πρώτη ενότητα του ABP που αφορά αιματολογικές παραμέτρους (Haematological module), ενώ τον Ιανουάριο του 2014 τέθηκε σε εφαρμογή η δεύτερη ενότητα, που αφορά συγκεντρώσεις ενδογενών στεροειδών στα ούρα, όπως η τεστοστερόνη (Steroidal module). Τα εργαστήρια anti-doping είναι υποχρεωμένα να ενσωματώσουν τη διατήρηση του ABP στο γενικότερο πεδίο δράσης τους, σε συνδυασμό με τις προσπάθειες ανίχνευσης χρήσης συγκεκριμένης απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, ώστε να ενισχύσουν το anti-doping πρόγραμμά τους[42,43].

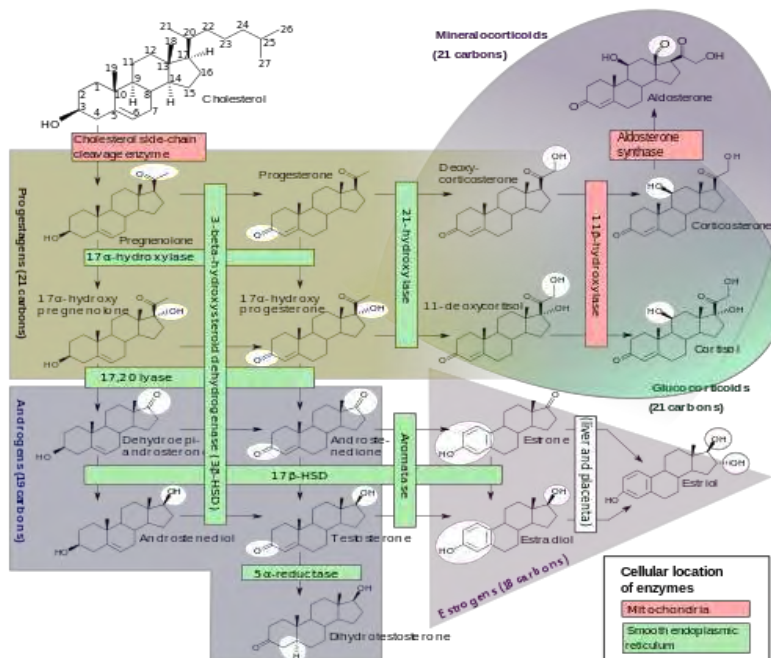
3.1.1. Steroid Profile

Το προφίλ στεροειδών (steroid profile) αποτελείται από τα ενδογενή ανδρογόνα στεροειδή, τα οποία ανιχνεύονται φυσιολογικά στα ούρα ανδρών και γυναικών, χωρίς να έχει προηγηθεί εξωγενής χορήγηση τους. Συγκεκριμένα, πρόκειται για τις ουσίες τεστοστερόνη (T), επιτεστοστερόνη (E), το λόγο τεστοστερόνης/ επιτεστοστερόνης (T/E), την ανδροστερόνη (AND), την ετιοχολανολόνη (ETIO) και τις 5α-diol, 5β-diol, DHT, DHEA (πρόκειται για εμπειρικές ονομασίες). Το προφίλ στεροειδών αποτελεί την επέκταση του βιολογικού διαβατηρίου του αθλητή (Athlete's Biological Passport, ABP) στα ενδογενή ανδρογόνα στεροειδή .

Σχήμα 3.1 Περιέχει την αντιστοιχία των χρησιμοποιούμενων ονομάτων για τους δείκτες του προφίλ στεροειδών με τη δομή τους.

Χρησιμοποιούμενη ονομασία	Δομή
Τεστοστερόνη	
Επιτεστοστερόνη	
Ανδροστερόνη	
Επιχολανολόνη	
5α-diol	
5β-diol	
DHT	
DHEA	

Όπως αναφέρθηκε, το προφίλ στεροειδών απαρτίζουν τα στεροειδή τεστοστερόνη, επιτεστοστερόνη, ανδροστερόνη, ετιοχολανολόνη, 5α-diol, 5β-diol και ο λόγος T/E. Η τεστοστερόνη, όπως και άλλες στεροειδείς ορμόνες, παράγονται από τη χοληστερόλη. Το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσής της είναι η οξειδωτική διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης από το ένζυμο CYP11A(πρόκειται για μιτοχονδριακή οξειδάση του κυτοχρώματος P450) με την απώλεια 6 ατόμων άνθρακα προς το σχηματισμό πρεγνενολόνης. Στο επόμενο βήμα αφαιρούνται δύο επιπλέον άτομα άνθρακα από το ένζυμο CYP17Aστο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπλέον, η 3-υδροξυλομάδα οξειδώνεται από την 3-β-υδροξυστεροειδοδεϋδρογονάση προς σχηματισμό ανδροστενεδιόνης. Στο τελευταίο βήμα της βιοσύνθεσης, η ανδροστενεδιόνη με την C-17 κετοομάδα μειώνεται από τη 17β-υδροξυστεροειδοδεϋδρογονάση προς σχηματισμό τεστοστερόνης.



Εικόνα 3.1 Παρουσιάζει το σχηματισμό των τεστοστερόνη, DHEA και DHT

Η επιτεστοστερόνη είναι ενδογενές στεροειδές, που είναι επιμερές της τεστοστερόνης. Δομικά διαφέρει από την τεστοστερόνη μόνο στην υδροξυλομάδα του C17..Είναι ασθενής ανταγωνιστής του υποδοχέα ανδρογόνων και ισχυρός αναστολέας της 5α-αναγωγάσης. Έχει αντιανδρογόνο δράση. Σε υγιείς άνδρες, ο λόγος τεστοστερόνης/ επιτεστοστερόνης είναι περίπου 1. Η διυδροτεστοστερόνη (dihydrotestosterone, DHT) παράγεται με μείωση του 4,5 διπλού δεσμού της

τεστοστερόνης από το ένζυμο 5α- αναγωγάση. Αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη της τεστοστερόνης. Στους άνδρες, περίπου το 5% της τεστοστερόνης μετατρέπεται σε DHT. Η μετατροπή αυτή είναι μη αντιστρεπτή στον προστάτη, το δέρμα και το ήπαρ. Η DHT έχει 2 με 3 φορές μεγαλύτερη συγγένεια προς τον υποδοχέα ανδρογόνων από την τεστοστερόνη άρα και ισχυρότερη ανδρογόνο δράση, ενώ η ταχύτητα αποσύνδεσης της τεστοστερόνης από τον υποδοχέα είναι 5 φορές μεγαλύτερη.

Η ανδροστερόνη είναι μεταβολίτης της τεστοστερόνης και ασθενές ανδρογόνο. Μπορεί επίσης να μετατραπεί σε DHT με τη δράση των 3-α-υδροξυστεροειδοδεϋδρογονάσης και 17-β-υδροξυστεροειδοδεϋδρογονάσης χωρίς να περάσει από τα ενδιάμεσα στάδια της ανδροστενεδιόνης και της τεστοστερόνης. Η ετιοχολανολόνη είναι το 3β-ισομερές της ανδροστερόνης και επίσης μεταβολίτης της τεστοστερόνης. Η δεϋδροεπιανδροστερόνη (dihydroepiandrosterone, DHEA) είναι η στεροειδής ορμόνη με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ανθρώπινο σώμα. Είναι μεταβολική ενδιάμεση ουσία τόσο για τη βιοσύνθεση ανδρογόνων όσο και οιστρογόνων στεροειδών ορμονών. Η 5α-androstane-3α,17β-diolή 5α-diol είναι ασθενές ανδρογόνο και κύριος μεταβολίτης του DHT. Έχει ασθενή συγγένεια με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Το 3β-ισομερές της, 5α-androstane-3β,17β-diolή 5β-diol, είναι μεταβολίτης του DHEA (με 5α αναγωγή και 17β υδροξυλίωση) και του DHT (με 3β υδροξυλίωση). Είναι εκλεκτικός, ισχυρός, υψηλής συγγένειας αγωνιστής του υποδοχέα οιστρογόνων β, συνεπώς είναι οιστρογόνο. Δε συνδέεται με τον υποδοχέα ανδρογόνων.

Οι τιμές αναφοράς των ενδογενών στεροειδών καθορίζονται από μελέτες πληθυσμών. Από τις μελέτες αυτές αποκλείονται οι αθλητές που συμμετέχουν σε αθλήματα με αυξημένο ρίσκο και οι αθλητές με αναπηρία. Οι τιμές του προφίλ στεροειδών είναι πιο σταθερές στους άνδρες αθλητές σε σχέση με τις γυναίκες. Τα προφίλ στεροειδών αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία των ελέγχων doping. Οι τιμές των στεροειδών που προκύπτουν από τον κάθε έλεγχο του αθλητή καταγράφονται και αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα, δημιουργώντας έτσι μια βάση δεδομένων, η οποία χρησιμεύει στον έλεγχο του αθλητή για doping σε βάθος χρόνου. Σε περίπτωση αποτελέσματος που απέχει από τη φυσιολογική, βιολογική διακύμανση που έχει σημειωθεί για τον υπό εξέταση αθλητή, το εργαστήριο ειδοποιείται για το άτυπο εύρημα (Atypical Biological Passport Finding).

Αφού διαπιστωθεί πως τα αποτελέσματα του προφίλ για κάποιον έλεγχο κυμαίνονται πέρα από τη φυσιολογική διακύμανση που παρουσιάζει το προφίλ του

συγκεκριμένου αθλητή, τότε θεωρούνται αντικανονικά. Συμπεραίνεται δηλαδή πως σε κάποιον ορισμένο χρόνο, ο συγκεκριμένος αθλητής έχει προβεί σε εξωγενή λήψη κάποιου ανδρογόνου αναβολικού στεροειδούς το οποίο ομοιάζει στα ενδογενή, με σκοπό τη βελτίωση της επίδοσής του. Η εξωγενής λήψη ανδρογόνου στεροειδούς, το οποίο στην πλειονότητα των περιστατικών είναι τεστοστερόνη, προκαλεί στο προφίλ αύξηση στη συγκέντρωση του στεροειδούς αυτού, καθώς συνυπολογίζεται η ποσότητα που παράγεται ενδογενώς με εκείνη που χορηγήθηκε εξωγενώς. Επίσης η χρήση άλλου στεροειδούς ενδεχομένως να αλλοιώνει άλλες ενδογενείς τιμές ή λόγους στο προφίλ προκαλώντας *atypical finding*. Για την ακρίβεια το *technical document* του 2016 για τις ενδογενείς ουσίες από τον WADA καθορίζει τις αποδεκτές τιμές των ενδογενών στεροειδών[42-45].

3.2.1. Παράμετροι που επηρεάζουν το Steroid Profile

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες παραγόντων οι οποίοι επιδρούν στις τιμές του προφίλ στεροειδών. Δε σχετίζονται όλοι με κάποια παράβαση doping. Ορισμένοι από αυτούς τους παράγοντες είναι η εθνικότητα, ο τύπος της διατροφής, η παρουσία ανδρογεννητικού συνδρόμου και πολυκυστικών ωοθηκών, ακόμη και γενετικοί πολυμορφισμοί που μπορεί να εντοπίζονται σε ένα άτομο. Το φύλο επίσης είναι ένας παράγοντας ο οποίος έχει πολλαπλή δράση στο προφίλ στεροειδών. Για παράδειγμα, κατά την εφηβεία παρατηρούνται μεταβολές στις τιμές των ενδογενών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών, οι οποίες σχετίζονται με την αύξηση των επιπέδων τεστοστερόνης και DHT στα αρσενικά άτομα. Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος επίσης προκαλεί μεταβολές στις τιμές των στεροειδών. Το ίδιο ισχύει και για την εγκυμοσύνη.

Η λήψη αντισυλληπτικών χαπιών, προκαλεί αύξηση του λόγου Τεστοστερόνης/ Επιτεστοστερόνης (T/E) και μείωση της συγκέντρωσης της επιτεστοστερόνης. Για αυτό το λόγο, η λήψη τους θα πρέπει να δηλώνεται από τις αθλήτριες, πριν τη διεξαγωγή του ελέγχου doping. Η κατανάλωση αλκοόλ (αιθανόλης), σε ποσότητα 2 g/kg σωματικού βάρους προκαλεί αύξηση του λόγου T/E, ιδίως στις γυναίκες. Η κατανάλωση αιθανόλης διαπιστώνεται με την ανίχνευση του αιθυλο-γλυκουρονιδίου, του οποίου την αύξηση ακολουθεί η συγκέντρωση της τεστοστερόνης. Η ανάπτυξη βακτηριακής μόλυνσης των δειγμάτων ούρων πριν από την ανάλυση, προκαλεί μείωση της συγκέντρωσης Androsterone και Etiocholanolone και αύξηση του λόγου T/E. Η ατελής υδρόλυση κατά την προετοιμασία των δειγμάτων ούρων για την ανάλυση επίσης προκαλεί μείωση στις συγκεντρώσεις Androsterone και Etiocholanolone.

Στην κατηγορία των παραγόντων που εμπίπτουν στη λίστα απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων και επιδρούν στο προφίλ στεροειδών, κατατάσσεται η λήψη αναστολέων του ενζύμου 5α- αναγωγάση. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς προκαλούν μείωση των λόγων Androsterone/ Etiocholanolone και 5α/5β diol. Αντίθετα, οι αναστολείς της αρωματάσης προκαλούν αύξηση των λόγων T/E, Androsterone/ Testosterone και 5α/5β diol. Η λήψη διουρητικών προκαλεί μείωση στις συγκεντρώσεις όλων των δεικτών του προφίλ στεροειδών, επειδή τα δείγματα ούρων που συλλέγονται έχουν χαμηλό ειδικό βάρος. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις τους διορθώνονται, με τον ορισμό του ειδικού βάρους των ούρων στην τιμή 1,020 και με βάση την εξίσωση:

$$\text{διορθωμένη συγκέντρωση} = \text{αρχική συγκέντρωση} * \frac{1 - 1,020}{1 - \text{εδ. βάρος}}$$

Υπάρχουν ωστόσο και απαγορευμένες ουσίες όπως η προβενεσίδη, η οποία προκαλεί μείωση όλων των δεικτών του προφίλ στεροειδών, χωρίς να επηρεάζει το ειδικό βάρος, το οποίο εμφανίζει φυσιολογική τιμή. Μια ακόμη κατηγορία απαγορευμένων ενώσεων, η οποία μεταβάλλει τις τιμές του προφίλ στεροειδών, είναι τα συνθετικά αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή. Τα συνθετικά αυτά αναβολικά, έχουν συγγένεια με τον υποδοχέα ανδρογόνων. Η σύνδεσή τους με αυτόν δρα ανασταλτικά για τη σύνθεση των ενδογενών στεροειδών, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μειωμένες οι συγκεντρώσεις των δεικτών του προφίλ στεροειδών [44,45] .

3.2.2 Παράγοντες που στοιχειοθετούν την ανίχνευση ύποπτου δείγματος

Σύμφωνα με τις ισχύουσες τεχνικές διατάξεις της WADA για το έτος 2016, ένα δείγμα κρίνεται ως ύποπτο βάσει του steroid profile όταν ικανοποιείται ένα από τα οποιαδήποτε παρακάτω κριτήρια:

- Ο λόγος Τεστοστερόνης/Επιτεστοστερόνης (υπολογισμένος από διορθωμένες χρωματογραφικές κορυφές) είναι μεγαλύτερος του 4.
- Ο λόγος Ανδροστερόνης/Τεστοστερόνης είναι μικρότερος του 20.
- Ο λόγος 5αdiol/5βdiol είναι μικρότερος από 2,4.
- Η συγκέντρωση της Τεστοστερόνης ή Επιτεστοστερόνης (διορθωμένη σύμφωνα με το ειδικό βάρος) είναι μεγαλύτερη από 200ng/ml και 50ng/ml στους άντρες και τις γυναίκες αντίστοιχα.

- Η συγκέντρωση της Ανδροστερόνης ή της Ετιοχολανολόνης είναι μεγαλύτερη από 10000ng/ml.
- Η συγκέντρωση της 5αdiol είναι μεγαλύτερη από 250ng/ml και 150ng/ml στους άντρες και τις γυναίκες αντίστοιχα.

Κεφάλαιο 4

Αναλυτικές τεχνικές ελέγχου Doping

4.1. Εισαγωγή στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς

Η χρωματογραφία εφευρέθηκε από το Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett στις αρχές του εικοστού αιώνα. Χρησιμοποίησε την τεχνική αυτή για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες και οι ξανθοφύλλες, με διαβίβαση διαλύματός τους μέσω υάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο ο Tswett επέλεξε (από την ελληνική γλώσσα) το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική.

Οι εφαρμογές της χρωματογραφίας αυξήθηκαν με εκρηκτικό ρυθμό κατά τα τελευταία πενήντα χρόνια και αυτό δεν οφείλεται μόνο στην ανάπτυξη νέων τύπων χρωματογραφικών τεχνικών, αλλά και στη συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση από τους επιστήμονες καλύτερων μεθόδων για το χαρακτηρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Η τεράστια απήχηση των μεθόδων αυτών αποδεικνύεται και από το ότι το βραβείο Nobel Χημείας του έτους 1952 δόθηκε στους A.J.P. Martin και R.L. Synge για τις ανακαλύψεις τους στο πεδίο της χρωματογραφίας. Ίσως περισσότερο εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι 12 βραβεία Nobel, από το 1937 έως το 1972, δόθηκαν σε επιστήμονες των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε σημαντικό βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους [46].

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει σειρά μεθόδων διαχωρισμού μειγμάτων ανόργανων ή οργανικών ή οργανομεταλλικών ουσιών, που βασίζονται στις διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις, τη στατική φάση, που αποτελείται από ένα ακίνητο στρώμα μεγάλου εμβαδού επιφάνειας και την κινητή φάση, ένα ρευστό, που κινείται δια μέσου και κατά μήκος της στατικής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στο σημείο ή κοντά στο σημείο, όπου συμβαίνει η πρώτη επαφή των δύο φάσεων. Τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται, στη συνέχεια, κατά μήκος της διαδρομής της κινητής φάσης, με διάφορη ταχύτητα, που εξαρτάται από τις σχετικές συγγένειες των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, όπου στη συνέχεια τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά [46, 47].

Οι παρατηρούμενες διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς είναι δυνατόν να οφείλονται, κυρίως, σε μηχανισμό προσρόφησης ή μηχανισμό κατανομής. Ο διαχωρισμός με προσρόφηση βασίζεται στην προσκόλληση μιας ουσίας πάνω στην επιφάνεια ενός στερεού με δυνάμεις μοριακής φύσεως. Ο διαχωρισμός με κατανομή βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα της ουσίας στις δύο φάσεις με αποτέλεσμα η ουσία να κατανέμεται διαφορετρόπως στις δυο φάσεις.

4.2. Αέρια χρωματογραφία

4.2.1. Γενικά-Αρχή μεθόδου

Με τον όρο αεριοχρωματογραφία χαρακτηρίζεται η κατηγορία εκείνη των μεθόδων χρωματογραφίας, όπου η κινητή φάση είναι αέριος και η στατική φάση είναι είτε στερεή, είτε υγρή επί αδρανούς φορέα. Η αέρια χρωματογραφία μετά την ανάπτυξή της (James, Martin 1985) αποτελεί την πλέον εφαρμοσμένη ενόργανη μέθοδο διαχωρισμού. Με την αέρια χρωματογραφία έχουμε τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε τον αριθμό των συστατικών ενός μίγματος ουσιών, να επισημάνουμε την παρουσία ξένων προσμίξεων σε μια ουσία, και να έχουμε σε πολλές περιπτώσεις, τις πρώτες ενδείξεις για την ταυτότητα των ουσιών.

Στην αέρια χρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και μεταφέρεται μέσω της κινητής αέριας φάσης στη στήλη. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος βασίζεται στη σχετική τάση ατμών τους και στη χημική συγγενείά τους ως προς τη στατική φάση. Η αναλογία κάθε συστατικού, που βρίσκεται στην κινητή φάση σε κάθε χρονική στιγμή, είναι μια συνάρτηση της τάσης ατμών αυτής της ουσίας: τα μόρια των συστατικών που εμφανίζουν υψηλότερες τάσεις ατμών καταμερίζονται περισσότερο προς την κινητή φάση, σαρώνονται από τον ανιχνευτή γρηγορότερα και εκλούνται πρώτα από τη στήλη. Ουσίες που παρουσιάζουν χαμηλότερες τάσεις ατμών και συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση, απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να φτάσουν στον ανιχνευτή. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός.

Η εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας απαιτεί οι προσδιοριζόμενες ουσίες να είναι πτητικές, ώστε να μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κινητής φάσης στη στήλη. Η χρωματογραφική διαδικασία απλοποιείται από το γεγονός ότι υπάρχει μικρή σύζευξη μεταξύ των αεριοποιημένων μορίων των προς διαχωρισμό ουσιών και των μορίων του φέροντος αερίου. Παρ' όλα αυτά, η αέρια χρωματογραφία εφαρμόζεται και στην περίπτωση που οι ουσίες δεν είναι πτητικές. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της

διαδικασίας της παραγωγοποίησης, η οποία ορίζεται ως η παρασκευή ή ο σχηματισμός ενός παραγώγου με σκοπό την αύξηση της πτητικότητας, της ανίχνευσης και ευαισθησίας ενός αναλύτη και τη βελτίωση του διαχωρισμού του με χρωματογραφία [49-51].

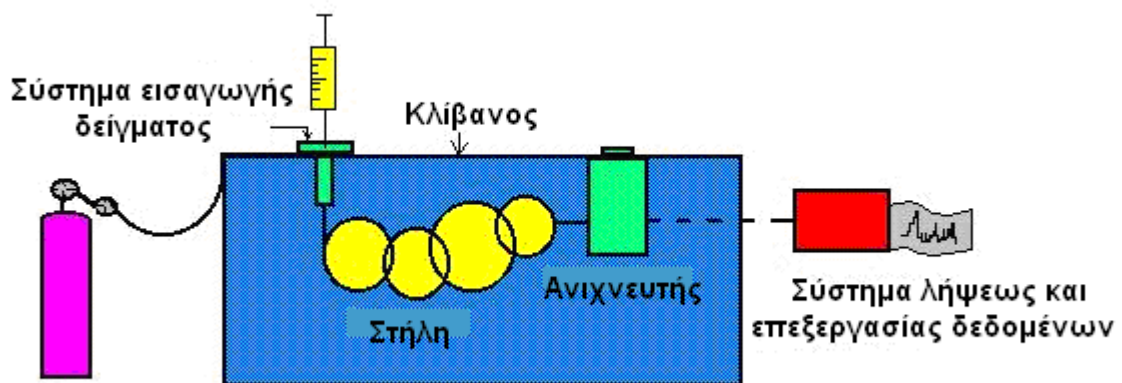
Επιπρόσθετα, επειδή ο διαχωρισμός εξαρτάται από την κατανομή της ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, καταλυτικό ρόλο παίζει η θερμοκρασία της στήλης. Εάν η θερμοκρασία της στήλης είναι χαμηλή, τα συστατικά του υπό ανάλυση μίγματος παραμένουν στη στατική φάση, και σπάνια εισέρχονται στην κινητή φάση. Δε διαχωρίζονται το ένα από το άλλο και στην ακραία περίπτωση δεν εκλούνται από τη στήλη.

Εάν η θερμοκρασία της στήλης είναι πολύ υψηλή, τότε τα συστατικά βρίσκονται τον περισσότερο χρόνο στην κινητή φάση, σπάνια εισέρχονται στη στατική φάση, και εκλούνται ως ένα μη διαχωριζόμενο μείγμα [49].

4.2.2. Οργανολογία Αεριοχρωματογράφου

Όπως φαίνεται στο **σχήμα 4.1** τα κυριότερα τμήματα μιας αεριοχρωματογραφικής διάταξης είναι:

- Φιάλη φέροντος αερίου
- Ρυθμιστής πίεσης-ροόμετρο
- Σύστημα εισαγωγής του δείγματος
- Θερμοστατούμενος κλίβανος
- Στήλη
- Ανιχνευτής
- Σύστημα λήψεως και επεξεργασίας δεδομένων



Σχήμα 4.1: Τα κυριότερα τμήματα ενός αεριοχρωματογράφου.

4.2.2.1. Φέρον Αέριο

Ο αεριοχρωματογράφος απαιτεί την παροχή ενός κατάλληλου αερίου φορέα για την επίτευξη ενός επιθυμητού διαχωρισμού. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικά αδρανές, ξηρό και απαλλαγμένο από οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί η υποβάθμιση της στήλης. Ακόμα, το φέρον αέριο πρέπει να μην περιέχει οργανικές προσμίξεις, οι οποίες θα οδηγήσουν στη μείωση της ευαισθησίας του ανιχνευτή. Τα συνήθη χρησιμοποιούμενα αέρια είναι το άζωτο, ήλιο ή υδρογόνο. Η επιλογή του φέροντος αερίου καθορίζεται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Στην περίπτωση, της GC/MS ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο [46,50].

4.2.2.2. Ρυθμιστής πίεσης - ροόμετρο

Το φέρον αέριο διαβιβάζεται από τη φιάλη που βρίσκεται υπό υψηλή πίεση 100-200 atm στο αεριοχρωματογραφικό σύστημα. Η πίεση του φέροντος αερίου ρυθμίζεται στη 1 έως 2 atm πάνω από την ατμοσφαιρική, μέσω ενός ρυθμιστή πίεσης και με τη βοήθεια ροομέτρου υπολογίζεται η ακριβής ταχύτητά του. Γενικά οι ταχύτητες ροής θεωρούνται σταθερές, εάν η πίεση στο στόμιο εισόδου παραμένει σταθερή [52]

4.2.2.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής του δείγματος είναι να τοποθετήσει μια στενή ζώνη των συστατικών του δείγματος στην αρχή της στήλης ώστε να μεγιστοποιηθεί η διαχωριστική ικανότητα της στήλης.

Για την επίτευξη καλών διαχωρισμών θα πρέπει η εισαγωγή του δείγματος να είναι ακαριαία, ώστε να αποφευχθεί η διασπορά της ζώνης του δείγματος και ο χρησιμοποιούμενος όγκος να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος. Το δείγμα εισάγεται μέσω μικροσύριγγας στην αρχή της στήλης μέσω ενός θερμοανθεκτικού **ελαστικού διαφράγματος (septum)**, το οποίο αποτρέπει την έξοδο της ουσίας ή του φέροντος αερίου από τη στήλη. Ακολουθεί η εξαέρωση του δείγματος και παραλαβή των ατμών του από το φέρον αέριο. **[46,51]**

Για τις κοινές αναλυτικές στήλες η ποσότητα δείγματος κυμαίνεται από λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως 20 μL . Οι τριχοειδείς στήλες απαιτούν πολύ μικρότερα δείγματα.

4.2.2.4. Θερμοστατούμενος κλίβανος

Η θερμοκρασία της στήλης αποτελεί μια σημαντική παράμετρο και πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια, αν απαιτούνται αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό η στήλη τοποθετείται σε θερμοστατούμενο κλίβανο. Η άριστη θερμοκρασία στήλης εξαρτάται από το σημείο βρασμού του δείγματος και τον απαιτούμενο βαθμό διαχωρισμού. Γενικά, μια θερμοκρασία ίση ή λίγο μεγαλύτερη από το σημείο βρασμού του δείγματος, οδηγεί σε λογικούς χρόνους έκλυσης (2-30 min).

Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος και η στήλη θερμοστατούνται συνήθως στην περιοχή 50-300 $^{\circ}\text{C}$. Η επιλογή ενός κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος είναι πάντα απαραίτητη, δεδομένου ότι αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση του χρόνου ανάλυσης, αλλά και ταυτόχρονη μείωση της διαχωριστικότητας. Συνήθως, επιλέγεται θερμοπρογραμματιζόμενη αεριοχρωματογραφία που πλεονεκτεί έναντι της ισόθερμης στην περίπτωση ανίχνευσης και διαχωρισμού πολλών συστατικών, ευρείας περιοχής πολικότητας και σημείων ζέσεως **[46,52]**.

4.2.2.5. Στήλη

Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη φύση της στατικής φύσης :

- Αεριο-στερεοχρωματογραφία

Στη μέθοδο αυτή η στατική φάση αποτελείται από κοκκιώδες υλικό όπως διοξείδιο του πυριτίου, αλουμίνα ή άνθρακα. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των ουσιών στην επιφάνεια του στερεού. Η τεχνική αυτή βρήκε περιορισμένη εφαρμογή, διότι το χρωματογράφημα, συνήθως, παρουσιάζει εκφυλισμένες καμπύλες κανονικής κατανομής.

- Αεριο-υδροχρωματογραφία

Στην αεριο-υδρο-χρωματογραφία η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό, που συγκρατείται πάνω σε μια αδρανή στερεή επιφάνεια με τη μορφή λεπτής στιβάδας. Δύο τύποι στηλών απαντώνται στην αεριοχρωματογραφία, οι **τριχοειδείς (capillary columns)** και οι **πληρωμένες (packed columns)**. Το συνηθέστερο υλικό υποστήριξης της υγρής φάσης στις στήλες πλήρωσης είναι η γη διατόμων, που αποτελεί μια μορφή εφυδατωμένου SiO_2 με πολλές ελεύθερες υδροξυλομάδες στην επιφάνειά της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη βραδεία απελευθέρωση της ουσίας από την υγρή στιβάδα στον αέριο φορέα έτσι, ώστε να δημιουργούνται ουρές στις κορυφές των διαχωριζόμενων ουσιών. Επιπρόσθετα, οι στήλες αυτές παρουσιάζουν φτωχές ιδιότητες μεταφοράς θερμότητας με αποτέλεσμα την αυξημένη τυπική απόκλιση στους χρόνους απόκρισης των κορυφών.

Οι παραπάνω δυσκολίες αίρονται με τη χρήση τριχοειδών στηλών, οι οποίες αποτελούνται από μέταλλο, γυαλί ή οργανικό πολυμερές και συγκρατούν το διαλύτη λόγω ανάπτυξης τριχοειδών φαινομένων με τα τοιχώματα της στήλης. Έτσι, οι λαμβανόμενες κορυφές είναι οξύτερες, με αποτέλεσμα να έχουμε καλύτερη διαχωριστικότητα, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει και η ευαισθησία της ανίχνευσης [46,47].

4.2.2.6. Ανιχνευτής

Πολλοί τύποι ανιχνευτών έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία. Οι ανιχνευτές δύνανται να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες βάσει της αρχής λειτουργίας:

- Ανιχνευτές που αποκρίνονται στη συγκέντρωση της εκλουόμενης ουσίας μέσα στο φέρον αέριο (σε mol/mL)
- Ανιχνευτές που αποκρίνονται στην ταχύτητα ροής μάζας της εκλουόμενης ουσίας (σε mol/s).

Τυπικό παράδειγμα ανιχνευτών πρώτης κατηγορίας είναι οι **Ανιχνευτές Θερμικής Αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector, TCD)** και της δεύτερης οι **Ανιχνευτές Ιοντισμού Φλόγας (Flame Ionization Detector, FID)** και **Ανιχνευτές Συλλήψεως Ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD)**. Το πλεονέκτημα των ανιχνευτών ταχύτητας ροής μάζας είναι ότι πραγματοποιείται ακριβέστερη ποσοτική ανάλυση [47].

4.2.2.7. Σύστημα λήψης και επεξεργασίας δεδομένων

Κατά τη λήψη του σήματος από τον ανιχνευτή πραγματοποιείται ενίσχυση αυτού, στο βαθμό βέβαια όπου ο θόρυβος δεν επηρεάζει το μετρούμενο όριο ανίχνευσης. Το χρωματογράφημα λαμβάνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα, ο οποίος πρέπει να είναι ταχείας απόκρισης και να διαθέτει ηλεκτρονικά υψηλού βαθμού σταθερότητας. Τα σύγχρονα αεριοχρωματογραφικά συστήματα διαθέτουν ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση του οποίου είναι δυνατή η μέτρηση των κορυφών και η ολοκλήρωσή τους με μεγάλη ακρίβεια [54].

4.3. Φασματομετρία μαζών

4.3.1. Εισαγωγή

Η **φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS)** αποτελεί μια από τις πλέον σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και παρουσιάζει ευρύ πεδίο εφαρμογής. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων και την αναλογία ισότοπων ατόμων σε δείγματα. Η φασματομετρία μαζών χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση και κατέχει λόγω αυτών των χαρακτηριστικών μια διακεκριμένη θέση ανάμεσα στις αναλυτικές τεχνικές.

Η χρήση της MS επεκτείνεται σε τομείς, όπως η ατομική φυσική, η ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών ρύπων, η ιατροδικαστική επιστήμη, η μελέτη κινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων, η φαρμακευτική ανάλυση και η ανίχνευση και επιβεβαίωση της λήψης απαγορευμένων ουσιών από αθλητές κατά τον έλεγχο ντόπινγκ [46, 54, 55]. Μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει η χρησιμοποίηση της στους τομείς της **γονιδιωματικής (genomics)** και

πρωτεωμικής (proteomics) , στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων και στη διάγνωση ασθενειών και μεταβολικών νοσημάτων (**metabolomics**) [58].

Η MS αναπτύχθηκε ραγδαία κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, μεταξύ 1995-2005. Η πρόοδος αυτή οδήγησε στην κατασκευή ολοκληρωτικά νέων οργάνων. Αναπτύχθηκαν νέες πηγές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι υπάρχοντες αναλυτές τελειοποιήθηκαν και νέα υβριδικά όργανα δημιουργήθηκαν με πρωτότυπους συνδυασμούς αναλυτών για την εκπλήρωση των σημερινών αναλυτικών απαιτήσεων [55].

4.3.2 Οργανολογία

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα τμήματα:

- το σύστημα εισαγωγής του δείγματος
- την πηγή ιόντων
- τον αναλυτή μαζών και
- τον ανιχνευτή.

Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσίασης των φασμάτων, όπως καταγραφείς και παλμογράφους. Για τα φασματόμετρα μαζών απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση (10^{-4} έως 10^{-8} Torr) σε όλα τα τμήματα του οργάνου, εκτός από το τμήμα του επεξεργαστή του σήματος και του οργάνου παρουσίασης των ενδείξεων. Το υψηλό κενό εξασφαλίζει ότι τα παραγόμενα ιόντα φτάνουν στον ανιχνευτή χωρίς να αλληλεπιδρούν με άλλα αέρια μόρια, γεγονός που θα επέφερε, είτε εκτροπή από την επιθυμητή τροχιά, είτε περαιτέρω θραυσματοποίηση. Ακόμα, το υψηλό κενό προστατεύει την επιφάνεια της πηγής ιοντισμού, του αναλυτή και του ανιχνευτή από τη διάβρωση που μπορεί να επέλθει λόγω των ατμών, γεγονός που θα οδηγούσε στη μείωση της ικανότητας του φασματομέτρου να σχηματίζει, να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ιόντα [55, 59]. Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος.

4.3.2.1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι να επιτρέπει την εισαγωγή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος στην πηγή ιοντισμού με ελάχιστη απώλεια κενού. Τα πιο σύγχρονα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από ποικιλία συστημάτων εισαγωγής μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα συστήματα μεμονωμένης και άμεσης εισαγωγής με δειγματολήπτη, όπως και συστήματα απ' ευθείας εισαγωγής των εκλουσμάτων χρωματογραφικών στηλών και τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης [46].

4.3.2.2. Πηγές ιοντισμού

Τα μόρια του υπό ανάλυση δείγματος πρέπει να ιοντιστούν ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και η ανίχνευσή τους με φασματομετρία μαζών. Έχει αναπτυχθεί ποικιλία τεχνικών ιοντισμού και η επιλογή της εκάστοτε τεχνικής εξαρτάται από το ποσό της ενέργειας που μεταφέρεται κατά τη διαδικασία του ιοντισμού και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό προσδιορισμό ουσίας. Οι πηγές ιοντισμού χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τις **πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources)**, όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και τις **πηγές εκρόφησης (desorption sources)** όπου το δείγμα σε στερεά ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται απ' ευθείας σε ιόντα στην αέρια φάση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πηγές **πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact, EI)** και οι πηγές **χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, CI)**. Οι πηγές αυτές συνήθως περιορίζονται σε θερμικώς σταθερές ενώσεις, με σημεία ζέσεως μικρότερα από περίπου 500 °C. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι πηγές **ιοντισμού πεδίου (Field Ionization, FI)**, **εκρόφησης πεδίου (Field Desorption, FD)**, **ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)**, **ιοντισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix-Assisted Desorption/Ionization, MALDI)**, **εκρόφησης πλάσματος (Plasma Desorption, PD)**, **βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, FAB)** και ιοντισμού με θερμοψεκασμό. Πλεονέκτημα των πηγών εκρόφησης αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής τους σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα [46, 55].

Η ευρύτερα εφαρμοζόμενη τεχνική ιοντισμού στην περίπτωση της GC/MS είναι ο ιοντισμός EI (Σχήμα 4.2). Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μια τάση περίπου 70 eV, η οποία εφαρμόζεται μεταξύ νήματος και μιας ανόδου. Οι διαδρομές των ηλεκτρονίων και των εξαερωμένων μορίων σχηματίζουν ορθή γωνία και διασταυρώνονται στο κέντρο της

πηγής, όπου γίνεται η πρόσκρουση και ο ιοντισμός. Η ενέργεια ιοντισμού για τις περισσότερες οργανικές ενώσεις κυμαίνεται μεταξύ 5-15 eV, με αποτέλεσμα υπό τις συγκεκριμένες φασματομετρικές συνθήκες (70 eV) να πραγματοποιείται όχι μόνο η αποβολή ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων, αλλά και περαιτέρω θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος (M^{+}). Η επιπλέον αυτή θραυσματοποίηση παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τη διευκρίνιση της δομής άγνωστων ενώσεων. Κατά μέσο όρο παράγεται ένα ιόν ανά 1.000 μόρια που εισάγονται στην πηγή ιοντισμού. Επιπρόσθετα, σπάνια πραγματοποιείται πρόσληψη ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα το σχηματισμό αρνητικά φορτισμένων ιόντων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται υπό την παρουσία ηλεκτρονίων πολύ χαμηλής ενέργειας (0,1 eV) [46, 55, 59].

Το σύνολο των ιόντων και των ουδέτερων προϊόντων που παράγονται πρέπει να διαχωριστούν με τέτοιο τρόπο ώστε τα θετικά ιόντα να κινηθούν προς τον αναλυτή, σε αντίθεση με τα αρνητικώς φορτισμένα ιόντα και τα ουδέτερα προϊόντα.

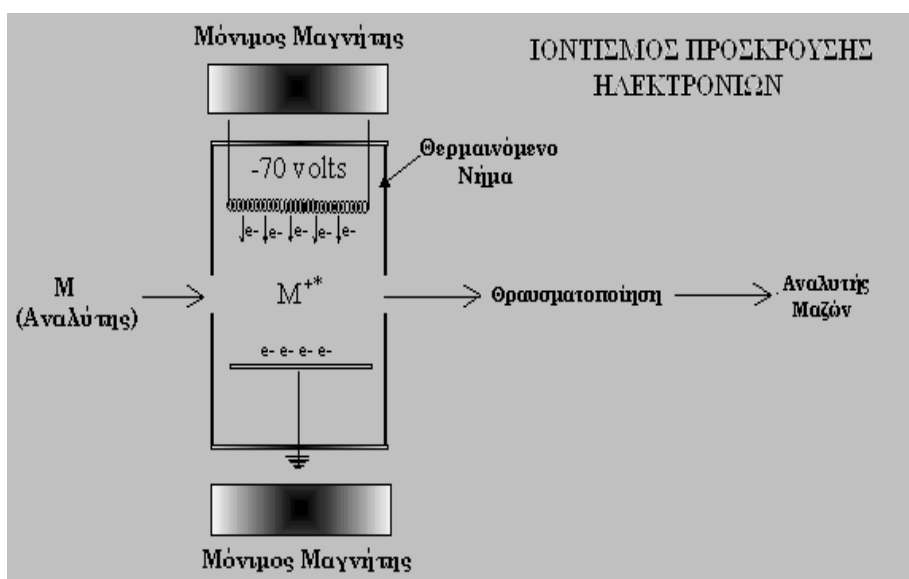
Τα ουδέτερα προϊόντα απομακρύνονται μέσω του συστήματος κενού, καθώς το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο δεν επηρεάζει την κίνησή τους. Παράλληλα, τα θετικά και αρνητικά ιόντα μπορούν να διαχωριστούν μέσω κατάλληλα φορτισμένων επιφανειών που βρίσκονται μέσα στην πηγή ιοντισμού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της **μεταλλικής απωθητικής πλάκας (repeller)**, η οποία είναι θετικού δυναμικού, τόσο για να απομακρύνει τα θετικά ιόντα, όσο και για να έλκει τα αρνητικά ιόντα. Αντίθετα, η "extractorplate" και "ionfocusingplate" είναι αρνητικού δυναμικού με αποτέλεσμα να επιταχύνουν και να κατευθύνουν τη δέσμη ιόντων προς τον αναλυτή μαζών [39].

Οι πηγές EI είναι εύχρηστες και παράγουν μεγάλα ρεύματα ιόντων, οπότε παρέχουν μεγάλη ευαισθησία. Η εκτεταμένη θραυσματοποίηση και επομένως ο μεγάλος αριθμός κορυφών συμβάλλει στην αναμφίβολη ταυτοποίηση μιας ουσίας αλλά συχνά, δεν επιτρέπει την ανίχνευση του μοριακού ιόντος. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των πηγών EI είναι ότι υπάρχουν βιβλιοθήκες φασμάτων EI για πάνω από 100.000 ουσίες.

4.3.2.4. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής ιόντων παράγει στην έξοδο του ηλεκτρικό σήμα ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους, που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Οι συνηθέστεροι ανιχνευτές ιόντων είναι το φαρανταϊκό κύπελλο, ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής και η φωτογραφική πλάκα. Ο ανιχνευτής φασματομέτρου μαζών λειτουργεί με δύο κύριες μορφές η επιλογή την οποία,

καθορίζεται από τη φύση και τον αντικειμενικό σκοπό της ανάλυσης. Αυτοί είναι η **ολική σάρωση (Full Scan)** και η **σάρωση επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM)**. Συγκεκριμένα, ολική σάρωση γίνεται όταν ο ανιχνευτής σαρώνει πάνω από μια περιοχή τιμών μαζών m/z . Η ολική σάρωση είναι απαραίτητη όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε τη δομή μιας άγνωστης ένωσης. Η ευαισθησία της ανίχνευσης μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με τη σάρωση επιλεγμένων ιόντων, επιτρέποντας στον ανιχνευτή να παρακολουθεί μόνο ένα, δύο ή και περισσότερα ιόντα. Η σάρωση επιλεγμένων ιόντων είναι κατάλληλη όταν το φάσμα μαζών και τα χαρακτηριστικά ανίχνευσης της υπό προσδιορισμό ουσίας είναι γνωστά [60, 61].



Σχήμα 4.2: Πηγή ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων.

4.3.2.3. Αναλυτές μαζών

Η βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι διαχωρισμός των ιόντων, που παράγονται στην πηγή, ανάλογα με τις διαφορετικές τιμές των λόγων m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος έτσι, ώστε το μετρούμενο ρεύμα ιόντων στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των αναλυτών μάζας είναι η **διακριτική ικανότητα (Resolving power, R)**. Εκφράζει την ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διακρίνει ιόντα με ίδιες σχεδόν μάζες. Ορίζεται από τη σχέση:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (4.1)$$

όπου, m και $m+\Delta m$ αντιστοιχούν σε δύο λόγους m/z με κορυφές ικανοποιητικά διαχωρισμένες. Κατά συνθήκη, ικανοποιητικός διαχωρισμός θεωρείται όταν ισοϋψείς περίπου κορυφές αλληλεπικαλύπτονται σε ύψος που δεν υπερβαίνει το 1/10 του ύψους των κορυφών.

Ανάλογα με τη διαχωριστική τους ισχύ τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε φασματόμετρα χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Τα πρώτα έχουν διαχωριστική ικανότητα από 100 έως 1000, ενώ στα φασματόμετρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας η τιμή R είναι της τάξεως του 10^4 - 10^5 και μπορούν να διαχωρίσουν τα ιόντα με βάση τις τιμές ακριβούς μάζας που μπορεί να διαφέρουν στο τρίτο ή και το τέταρτο δεκαδικό ψηφίο [46, 55].

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών είναι:

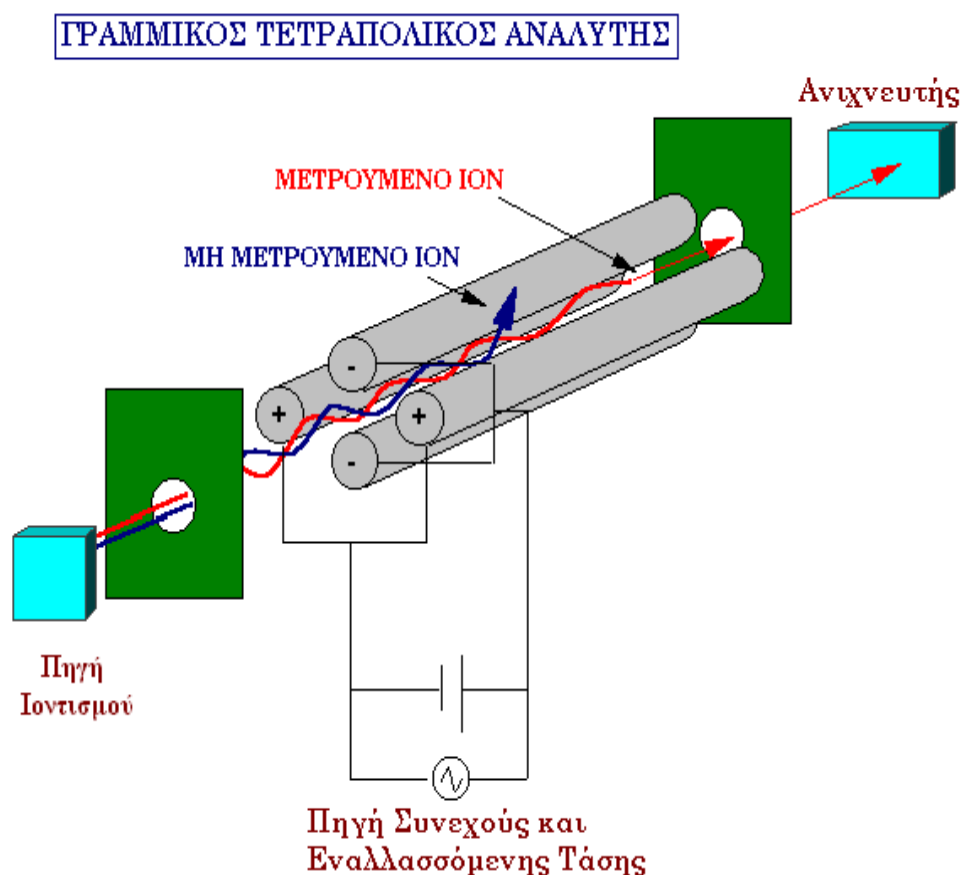
- Αναλυτές απλής εστίασης με **μαγνητική εκτροπή (Magnetic-Electric Sector)**
- Αναλυτές **διπλής εστίασης (Double Focusing)**
- Αναλυτές **χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)**
- **Τετραπολικοί** αναλυτές μαζών (**Quadrupole**)
- **Παγιδευτής ιόντων (Ion Trap)**

Οι αναλυτές διακρίνονται σε συνεχείς αναλυτές μαζών και σε παλμικούς αναλυτές μαζών. Οι πρώτοι μεταφέρουν επιλεγμένο m/z προς τον ανιχνευτή και το φάσμα μαζών λαμβάνεται με σάρωση του αναλυτή οπότε ιόντα διαφορετικού m/z ανιχνεύονται σε κάθε χρονική στιγμή. Οι δε παλμικοί αναλυτές συλλέγουν ολόκληρο το φάσμα από παλμό ιόντων.

Τετραπολικός αναλυτής μαζών : Από αυτούς, ο τετραπολικός αναλυτής αποτελεί σήμερα τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αναλυτή μαζών και ο διαχωρισμός των παραγόμενων ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z βασίζεται στη σταθερότητα της τροχιάς τους. Θεωρείται ιδανικός στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται συστήματα συνδυασμού χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών, λόγω του μικρού χρόνου λήψης ενός φάσματος μαζών.

Στο σχήμα 4.3 απεικονίζεται η διάταξη του γραμμικού τετραπολικού αναλυτή. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους, που δρουν ως ηλεκτρόδια και είναι τοποθετημένες συμμετρικά ως προς τη δέσμη των διερχόμενων ιόντων. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με το θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος εφαρμόζονται μεταβλητές

τάσεις, που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με τον αναλυτή αυτόν, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον ανιχνευτή μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z . Με τα τετραπολικά όργανα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν κατά μια μονάδα μάζας.



Σχήμα 4.3: Γραμμικός τετραπολικός αναλυτής μαζών.

Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την υψηλή επαναληψιμότητα, το σχετικά χαμηλό του κόστος και τη δυνατότητα χρήσης του σε ποσοτικούς προσδιορισμούς αποτελούν πρόσθετα πλεονεκτήματα του τετραπολικού αναλυτή. Η μέγιστη διακριτική ικανότητα που επιτυγχάνεται με τους τετραπολικούς αναλυτές μαζών είναι περίπου 2.000, σπάνια όμως ξεπερνά την τιμή 700-800, ενώ οι μάζες που μπορούν να αναλυθούν έχουν μέγιστη τιμή $m/z = 1200$ [46, 55].

Αναλυτές διπλής εστίασης (Double Focusing): Για να βελτιώσουν την διαχωριστικότητά τους οι αναλυτές διπλής εστίασης συνδυάζουν έναν μαγνητικό αναλυτή με έναν ηλεκτροστατικό αναλυτή. Το ηλεκτρικό πεδίο δρα όταν το φίλτρο της κινητικής ενέργειας επιτρέπει μόνο σε ιόντα με συγκεκριμένη κινητική ενέργεια να περάσουν μέσα από το πεδίο τους, ανεξάρτητα από το λόγο μάζα προς φορτίο.

Ένας ηλεκτρικός τομέας αποτελείται από δύο ομόκεντρα καμπυλωτά πιάτα. Εφαρμόζεται δυναμικό κατά μήκος των πιάτων έτσι, ώστε να “λυγίσει” η δέσμη ιόντων καθώς “ταξιδεύει” κατά μήκος του αναλυτή. Το δυναμικό εφαρμόζεται έτσι, ώστε η ακτινοβολία να ακολουθεί την καμπύλη του αναλυτή. Η ακτίνα της τροχιάς των ιόντων (r) εξαρτάται από την κινητική ενέργεια των ιόντων (V) και το δυναμικό πεδίο (E) το οποίο εφαρμόζεται κατά μήκος των πιάτων.

$$r = \frac{2V}{E} \quad (4.2)$$

Η εξίσωση (4.2) δείχνει ότι οι αναλυτές διαχωρίζουν τα ιόντα με τη βοήθεια του μαγνητικού πεδίου. Στη μαγνητική ανάλυση, τα ιόντα επιταχύνονται (χρησιμοποιώντας ένα ηλεκτρικό πεδίο) και περνούν διαμέσου ενός μαγνητικού πεδίου. Ένα φορτισμένο σωματίδιο ‘ταξιδεύοντας’ με υψηλή ταχύτητα κατά μήκος ενός μαγνητικού πεδίου θα ‘αντιμετωπίσει’ μια δύναμη και θα ταξιδέψει σε κυκλική τροχιά με ακτίνα η οποία θα εξαρτάται από το λόγο τα μάζας προς το φορτίο (m/z) και την ταχύτητα του ιόντος. Ένας μαγνητικός αναλυτής διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με την ακτίνα της ‘κύρτωσης’, συνεπώς μόνο ιόντα με συγκεκριμένα m/z θα μπορούν να φτάσουν στον ανιχνευτή με συγκεκριμένο μαγνητικό πεδίο [62].

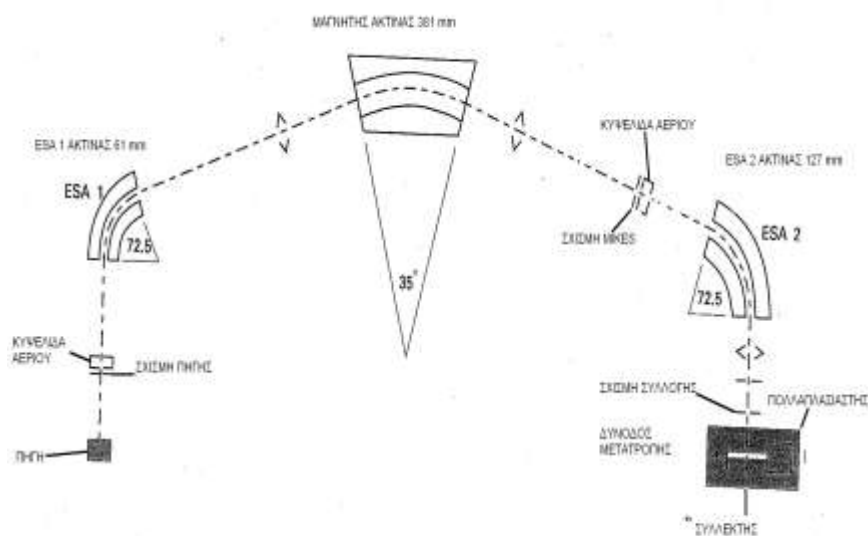
Ο αναλυτής έχει μια τριών τομέων, διπλής εστίασης γεωμετρία του τύπου ESA, μαγνήτη, ESA, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.3 παρακάτω. Η γεωμετρία αυτή καθιστά δυνατό ένα συμβατικό μηχάνημα να κατασκευαστεί με λόγο Διασποράς προς Μεγέθυνση (Dispersion to Magnification ratio) 0,82m και παράγοντα μεταφοράς (Transmission factor) 0,42, περίπου δυο φορές καλύτερος από τα ισοδύναμα όργανα. Η υψηλή διαχωριστική ικανότητα (resolution) του αναλυτή έχει επιτευχθεί με το γεωμετρικό σχεδιασμό με σημαντικά μηδενικές αποκλίσεις εικόνων και κατασκευασμένο με πολύ υψηλά μηχανικά πρότυπα [63].

Χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους φακούς στον αναλυτή **Autospec** επιτυγχάνεται μεγάλη συγκέντρωση ενέργειας διαμέσου της ακτίνας της μάζας του οργάνου χωρίς να καταφεύγουμε σε μηχανική μετακίνηση του μαγνήτη όπως στα

συμβατικά όργανα. Αυτός ο παράγοντας είναι σημαντικός για την ακριβή μέτρηση της μάζας [63].

Η πηγή και ο αναλυτής είναι τοποθετημένοι σε ένα οπτικό "σημείο" (bench) το οποίο είναι απομονωμένο από το κυρίως πλαίσιο του φασματομέτρου μάζών, γεγονός που εξασφαλίζει ένα ελεύθερο από δονήσεις περιβάλλον. Τα πιάτα του ηλεκτρικού τομέα είναι ακριβώς τοποθετημένα στο κάτω τμήμα της βάσης σε αυτό το σημείο (bench), και από εκεί είναι τοποθετημένοι οι διάφοροι τύποι φακών, που δίνουν καλή οπτική ευθυγράμμιση. Αυτή η διεύθεση επιτρέπει στους φακούς να είναι έτσι τοποθετημένοι, ακριβώς στη σωστή θέση κατά μήκος των οπτικών αξόνων έτσι, ώστε η απόδοση κάθε φακού να είναι η βέλτιστη. Επίσης, τα στοιχεία των φακών είναι μεγάλα με μεγάλα ανοίγματα ώστε να μειώσουν την πιθανότητα μόλυνσης και απώλειας. Η συνολική μεταφορά από το όργανο ενισχύεται από το επιπρόσθετο Z φακό εστίασης πριν και μετά το μαγνητικό τομέα [63].

Ο Z φακός κατά μήκος του σωλήνα πτήσης είναι επίσης μεγάλος, εξασφαλίζοντας τη μέγιστη μεταφορά κατά μήκος του αναλυτή. Η εικόνα κυρτότητας και περιστροφής των φακών χρησιμοποιείται επίσης για να μεγιστοποιήσει την ευαισθησία σε υψηλή διαχωριστική ικανότητα [63].

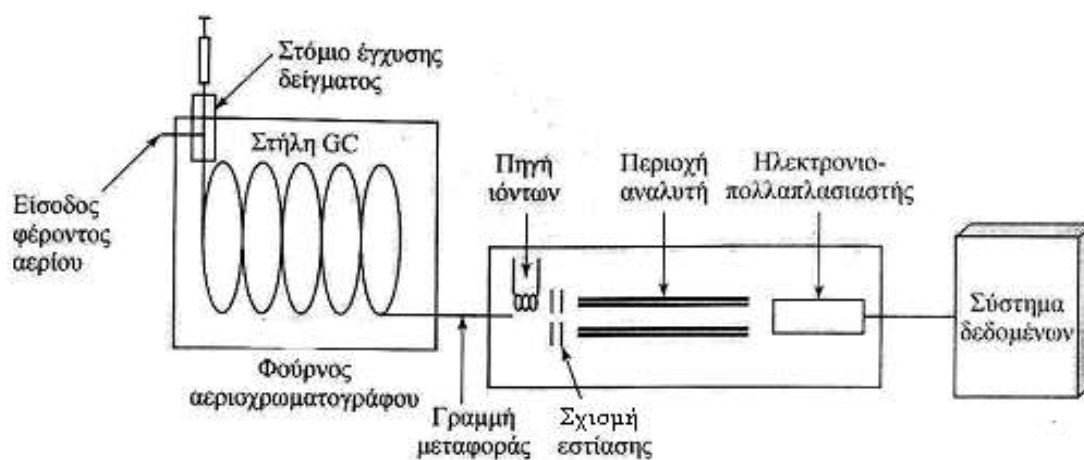


Σχήμα 4.4: Σχηματική απεικόνιση αναλυτή διπλής εστίασης.

4.4. Διασύνδεση της αεριοχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών

Συχνά η αεριοχρωματογραφία συνδυάζεται με εκλεκτικές φασματοσκοπικές τεχνικές παρέχοντας τις συζευγμένες τεχνικές, οι οποίες αποτελούν σημαντικά αναλυτικά εργαλεία. Ο συνδυασμός GC/MS εμφανίζεται για πρώτη φορά το 1957. Από τότε εξελίσσεται σε μια από τις πιο ευαίσθητες και ειδικές αναλυτικές τεχνικές για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση συστατικών πολύπλοκων δειγμάτων. Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα [60].

Καθοριστικό ρόλο για την εξέλιξη του διαχωρισμού παίζει η επιφάνεια (ή η συσκευή) που συνδέει τη χρωματογραφική στήλη με το φασματόμετρο μαζών. Η μεταφορά των εκλουσμάτων πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα υπό προσδιορισμό συστατικά να μη συμπυκνώνονται στη μεσεπιφάνεια, ούτε να διασπώνται πριν την εισαγωγή τους στην πηγή ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών [64]. Στο **σχήμα 4.5** φαίνεται ο συνδυασμός του αεριοχρωματογράφου με τον αναλυτή μαζών.



Σχήμα 4.5. Διασύνδεση αεριοχρωματογράφου και αναλυτή μαζών.

Κεφάλαιο 5

5.1 Υλικά και μέθοδοι

5.1.1 Συλλογή και επεξεργασία μεταβολικών δειγμάτων ούρων

Μεταβολικά ονομάζονται τα ούρα τα οποία γνωρίζουμε πως περιέχουν τουλάχιστον μία απαγορευμένη ουσία, συνεπώς και μεταβολίτες της, είτε επειδή έχουν αναλυθεί από το εργαστήριο, είτε επειδή έγινε ελεγχόμενη χορήγηση απαγορευμένης ουσίας σε κάποιον εθελοντή, με σκοπό την πραγματοποίηση μελέτης. Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν μεταβολικά ούρα, ύστερα από χορήγηση από το φαρμακευτικό προϊόν Winstrol, το οποίο αναφέρει πως περιέχει 2 mg ΔMT ανά χάπι, πριν και ύστερα από μεμονωμένη εφάπαξ κατανάλωση 20mg. Συλλέχθηκαν δείγματα ούρων για 30 ημέρες, τα οποία παρασκευάστηκαν κι εξετάστηκαν αρχικά με τη μέθοδο ρουτίνας. Βάσει οδηγιών της WADA, απαιτούνται τουλάχιστον 3 ατομικά δείγματα για την δημιουργία ατομικού προφίλ. Στην παρούσα έρευνα, συλλέξαμε για 5 ημέρες δείγματα ούρων για την δημιουργία του προφίλ. Μετά την λήψη, συλλέξαμε όλα τα ούρα για περίοδο 5 ημερών, περίοδο στην οποία περιμέναμε να δούμε τις μεγαλύτερες στατιστικές μεταβολές. Με την πάροδο των 5 ημερών, η συλλογή συνεχίστηκε για 25 ακόμα μέρες μια φορά την μέρα με την ώρα συλλογής να ορίζεται στις 9:30 πμ. Οι τιμές που λήφθηκαν μετά την περίοδο λήψης συγκρίθηκαν με το διαμορφωμένο προφίλ του εθελοντή. Παρακάτω ακολουθεί το πρωτόκολλο συλλογής των μεταβολικών δειγμάτων. Τα δείγματα διαχωρίζονται σε προ λήψης και μετά λήψης. Η ποσότητα κάθε δείγματος ήταν σταθερή και ίση με 200 ml.

Before treatment

After treatment

Πίνακας 5.1. Πρωτόκολλο συλλογής ούρων

Κωδικός μεταβολικού δείγματος	Ημερομηνία λήψης (dd/mm/yy)	Ώρα λήψης(24h)	Παρελθών χρόνος από χορήγηση (d,h,m)
M1424	08/06/16	07:30	-
M1425	08/06/16	12:30	-
M1426	08/06/16	16:00	-
M1427	08/06/16	22:00	-

M1428	09/06/16	07:00	-
M1429	09/06/16	12:00	-
M1430	09/06/16	16:30	-
M1431	09/06/16	20:00	-
M1432	10/06/16	07:30	-
M1433	10/06/16	12:00	-
M1434	10/06/16	14:00	-
M1435	11/06/16	12:00	-
M1436	11/06/16	22:00	-
M1437	12/06/16	12:00	-
M1438	12/06/16	22:00	-
M000	13/06/16	13:30	-
M1439	13/06/16	15:20	1h50m
M1440	13/06/16	19:50	6h20m
M1441	13/06/16	23:30	10h
M1442	14/06/16	04:20	14h50m
M1443	14/06/16	11:00	21h30m
M1444	14/06/16	13:30	24h
M1445	14/06/16	15:45	26h15m
M1446	14/06/16	19:00	29h30m
M1447	14/06/16	22:15	32h45m
M1448	15/06/16	02:00	36h30m
M1449	15/06/16	08:30	43h
M1450	15/06/16	11:30	46h
M1451	15/06/16	13:30	48h
M1452	15/06/16	16:30	51h
M1453	15/06/16	19:00	53h30m
M1454	15/06/16	23:00	57h30m
M1455	16/06/16	02:00	60h30m

M1456	16/06/16	06:30	65h
M1457	16/06/16	13:30	72h
M1458	16/06/16	18:00	76h30m
M1459	16/06/16	23:45	82h15m
M1460	17/06/16	08:30	91h
M1461	17/06/16	12:00	94h30m
M1462	17/06/16	16:00	98h30m
M1463	17/06/16	20:00	102h30m
M1464	18/06/16	11:30	4d22h
M1465	19/06/16	09:30	5d20h
M1466	20/06/16	09:30	6d20h
M1467	21/06/16	09:30	7d20h
M1468	22/06/16	09:30	8d20h
M1469	23/06/16	09:30	9d20h
M1470	24/06/16	09:30	10d20h
M1471	25/06/16	09:30	11d20h
M1472	26/06/16	09:30	12d20h
M1473	27/06/16	09:30	13d20h
M1474	28/06/16	09:30	14d20h
M1475	29/06/16	09:30	15d20h
M1476	30/06/16	09:30	16d20h
M1477	01/07/16	09:30	17d20h
M1478	02/07/16	09:30	18d20h
M1479	03/07/16	09:30	19d20h
M1480	04/07/16	09:30	20d20h
M1481	05/07/16	09:30	21d20h
M1482	07/07/16	09:30	23d20h
M1483	08/07/16	09:30	24d20h
M1484	09/07/16	09:30	25d20h

M1485	10/07/16	09:30	26d20h
M1486	11/07/16	09:30	27d20h
M1487	12/07/16	09:30	28d20h
M1488	13/07/16	09:30	29d20h

Την 25η μέρα, λόγω αδυναμίας, η συλλογή παραλείφθηκε. Η συλλογή συνεχίστηκε κανονικά την επομένη. Ως M000 ορίζεται το τελευταίο δείγμα πριν την λήψη της ουσίας.

Ο εθελοντής ήταν άρρεν, 30 ετών, καυκάσιος, ύψους 1,70, 65 κιλών και χωρίς ιατρικό ιστορικό. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με έντυπη δήλωση συναίνεσης και σύμφωνα με τους κανόνες ηθικής του εργαστηρίου του ΟΑΚΑ . Ένα μήνα πριν την συλλογή του πρώτου δείγματος και για όλη τη διάρκεια της ουροσυλλογής, απέχευε αυστηρά από την κατανάλωση αλκοόλ, νικοτίνης, φαρμακευτικών προϊόντων, συμπληρωμάτων διατροφής καθώς και από οποιασδήποτε μορφής άσκηση. Η διατροφή που ακολούθησε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος περιλάμβανε τροφές τόσο ζωικής όσο και φυτικής προέλευσης.

5.1.2. Παρασκευαστική Πορεία TME 106

Η παρασκευαστική πορεία (Technical Document 106) που εκτελείται προκειμένου να καταστεί το δείγμα κατάλληλο για ανάλυση μπορεί να διακριθεί στα εξής στάδια:

- Υδρόλυση
- Εκχύλιση
- Παραγωγοποίηση

5.1.2.1 Υδρόλυση

Τα στεροειδή (φυσικά και συνθετικά) εκκρίνονται στα ούρα, κυρίως ως υδατοδιαλυτοί εστέρες του γλυκουρονικού καιθεικού οξέος. Ως αποτέλεσμα της σύζευξής τους με το γλυκουρονικό οξύ, είναι η αύξηση της πολικότητά τους, γεγονός που οδηγεί στην ευκολότερη απέκκρισή τους στα ούρα. Τα συζευγμένα στεροειδή δεν είναι δυνατόν να αναλυθούν με αεριοχρωματογραφία, οπότε η υδρόλυσή τους είναι συχνά το πρώτο βήμα στη διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων για περαιτέρω ανάλυση. Η υδρόλυση με τη βοήθεια ενζύμου είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη κατά τον προσδιορισμό στεροειδών γιατί είναι πιο ειδική από τη χημική υδρόλυση.

Στην παρούσα μελέτη η υδρόλυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση, το οποίο προέρχεται από το βακτήριο *Escherichiacoli* [65].

5.1.2.2. Εκχύλιση

Μετά την υδρόλυση τα αποσυζευγμένα στεροειδή είναι διαλυμένα σε υδατικούς διαλύτες και έτσι όταν προστεθεί ένας οργανικός διαλύτης στον οποίον τα στεροειδή είναι πιο διαλυτά, το μεγαλύτερο κλάσμα αυτών παραλαμβάνεται με την οργανική φάση. Η επιλογή του οργανικού διαλύτη βασίζεται στην πολικότητα των προς προσδιορισμό ουσιών. Το μη πολικό τετρακυκλικό σύστημα είναι κοινό σε όλα τα στεροειδή, η πολικότητα όμως αυξάνει με τον αριθμό των οξυγονούχων ομάδων (κετόνες και υδροξυλομάδες), καθώς και με τους διπλούς δεσμούς. Στεροειδή με ένα ή δύο οξυγόνα (ανδρογόνα και οιστρογόνα) είναι χαμηλής πολικότητας, άρα ένας καλός διαλύτης για την εκχύλισή τους είναι μια σχετικά μη πολική ένωση, όπως ο διαιθυλαιθέρας. Ανάλογα, στεροειδή με τρία ή περισσότερα οξυγόνα (κορτικοστεροειδή και μεταβολίτες τους) είναι αρκετά πολικά και για την εκχύλισή τους, πολικοί διαλύτες, όπως χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο ή οξικός αιθυλεστέρας είναι πιο κατάλληλοι. Καλύτερη ανάκτηση πολικών ενώσεων από την πολική φάση μπορεί να επιτευχθεί με προσθήκη θειικού αμμωνίου, θειικού νατρίου ή χλωριούχου νατρίου πριν την εκχύλιση. Η προσθήκη ανόργανων αλάτων (εξαλάτωση) αυξάνει το συντελεστή διαχωρισμού, μειώνοντας τη διάλυση του στεροειδούς σε υδατικά διαλύματα [65].

5.1.2.3. Παραγωγοποίηση

Η παραγωγοποίηση αποτελεί σημαντικό στάδιο για την ανάλυση των στεροειδών αναβολικών παραγόντων με τη χρήση του GC/MS. Η σημασία του σχηματισμού παραγώγων στη συνδυασμένη αυτή τεχνική συνοψίζεται στους παρακάτω λόγους:

- Μετατροπή των μη πτητικών ουσιών ή των λίγο πτητικών, σε πτητικές ουσίες ή σε περισσότερο πτητικές.
- Δημιουργία ενός περισσότερο σταθερού προϊόντος, άρα βελτίωση της χρωματογραφικής του συμπεριφοράς, επομένως και του σχήματος της κορυφής.

- Μείωση της θερμικής αποσύνθεσης, της υπό εξέταση ουσίας στον αεριοχρωματογράφο
- Σταθεροποίηση των ιόντων που σχηματίζονται στο φασματόμετρο μαζών και τα οποία αποτελούν θραύσματα της εξεταζόμενης ένωσης. Τα θραύσματα αυτά είναι χαρακτηριστικά της ένωσης και σαφώς διαφορετικά από αυτά που λαμβάνονται, όταν η ουσία δεν έχει παραγωγοποιηθεί, επομένως αποτελούν σημαντικό στοιχείο για τον προσδιορισμό της δομής των ενώσεων.
- Αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου και χρήση αυτής για ποσοτικό προσδιορισμό ή απλώς επιβεβαίωση, με την εκλεκτική παρακολούθηση ενός ή περισσότερων συγκεκριμένων ιόντων (SIM).
- Οι σημαντικότερες μέθοδοι παραγωγοποίησης είναι η σιλανοποίηση, η ακετυλίωση και η αλκυλίωση. Η σιλανοποίηση αποτελεί την πιο εύχρηστη τεχνική για τη δημιουργία πτητικών παραγώγων και ανάλυση αυτών με GC/MS και χρησιμοποιείται κατά τον προσδιορισμό αναβολικών παραγόντων

5.1.3 Επεξεργασία Δειγμάτων

Χρησιμοποιήθηκαν 7,5 ml ούρων από το κάθε μεταβολικό δείγμα, τα οποία μεταγγίστηκαν σε ψηλούς κωνικούς σωλήνες. Το πρώτο στάδιο της προετοιμασίας των μεταβολικών δειγμάτων για τη GC/MS και GC/HRMS ανάλυση είναι η ενζυμική υδρόλυση. Κατά το στάδιο αυτό υδρολύονται τα γλυκουρονίδια, τα οποία σχηματίστηκαν κατά τη φάση II του μεταβολισμού των στεροειδών, ώστε να μπορούν έπειτα τα στεροειδή να ανιχνευθούν. Αρχικά, ρυθμίζεται το pH των δειγμάτων στην τιμή 7,0 με προσθήκη 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, ώστε τα ούρα να έχουν τιμή pH στην οποία μπορεί να δράσει το ένζυμο. Γίνεται προσθήκη σε όλα τα δείγματα 100 μl εσωτερικού προτύπου που περιέχει: μεθυλτεστοστερόνη 7,5 ppm, d4-19-norandrosterneglucuronide 0,3 μg/ml, mefruside 15ppm και bamethan 7,5 ppm. Τέλος προστίθεται σε όλα τα δείγματα 50 μl γλυκουρονιδάσης από *E. coli* και ακολουθεί ανακίνηση τύπου δίνης (vortex), κάλυμμα των δειγμάτων με αλουμινόχαρτο και τοποθέτηση τους σε επωαστικό κλίβανο για 1,5 ώρα στους 50°C. Αν στα αποτελέσματα της ανάλυσης διαπιστωθεί πως λείπουν οι χρωματογραφικές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στις ουσίες του εσωτερικού προτύπου, ο υπεύθυνος ερευνητής αντιλαμβάνεται πως η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί και κάνει την απαιτούμενη διερεύνηση.

Μετά την πάροδο της 1,5 ώρας, τα δείγματα βγαίνουν από τον επωαστικό κλίβανο και παραμένουν στον εργαστηριακό πάγκο για να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (χρόνος παραμονής περίπου 5 λεπτά). Έπειτα προστίθεται

στα δείγματα ποσότητα 1,4 g στερεού μίγματος $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ σε αναλογία 10:1, με σκοπό τη ρύθμιση του pH στην περιοχή 9-10. Γίνεται στερεή εκχύλιση με προσθήκη στα δείγματα ούρων 7,5 ml διαιθυλαιθέρα ως διαλύτη και ανάδευση των δειγμάτων σε αυτόματους ανακινητήρες για 20 λεπτά, αφού προστεθούν και 3g άνυδρου Na_2SO_4 , το οποίο θα δράσει για να γίνει η εξαλάτωση. Με την προσθήκη του διαιθυλαιθέρα, οι μεταβολίτες οι οποίοι υπήρχαν ελεύθεροι πλέον μετά την ενζυμολύση των γλυκουρονιδίων στα ούρα, εκχυλίζονται στην ποσότητα του διαιθυλαιθέρα που προστέθηκε.

Στη συνέχεια οι ψηλοί κωνικοί σωλήνες τοποθετούνται σε φυγόκεντρο όπου τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 1900 – 2000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρωση διαχωρίζεται η οργανική (διαιθυλεθαίρας) από την υδατική φάση (ούρα) και η υπερκείμενη οργανική φάση μεταγγίζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες κωνικής βάσης. Οι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε hot block, το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία 50°C και υπό ρεύμα N_2 , μέχρι η ποσότητα του διαιθυλαιθέρα να εξατμιστεί και να απομένει μόνο το ξηρό υπόλειμμα.

Στη συνέχεια οι κωνικοί σωλήνες μεταφέρονται σε απαγωγό, μέσα στον οποίο θα γίνει η προσθήκη του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης $\text{MSTFANH}_4/\text{DTE}$. Η ποσότητα που προστίθεται είναι 100 μl. Ακολουθεί vortex, οι κωνικοί σωλήνες πωματίζονται και επωάζονται σε hotblock στους 80°C για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης και αφού επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (χρειάζεται λιγότερο από 5 λεπτά), τα παραγωγοποιημένα δείγματα θα μεταγγιστούν σε φιαλίδια (vials) χωρητικότητας 2 ml τα οποία περιέχουν γυάλινο υποδοχέα (insert) χωρητικότητας περίπου 200 μl. Τα vial πωματίζονται ερμητικά με πώματα από teflon και τα δείγματα είναι έτοιμα για την ανάλυση.

5.1.4 Στατιστική επεξεργασία

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των μεταβολικών δειγμάτων βασίσθηκε στην εύρεση της μέσης τιμής και εξετάσθηκε η σημαντικότητα με βάση την μέση τιμή \pm %αβεβαιότητα (% uncertainty, %U) όπως αυτή ορίζεται από τις οδηγίες του WADA (technical document 2016-Endogenous anabolic androgenic steroids measurement and reporting) για τις ενδογενείς ουσίες (Διάγραμμα τύπου Levi-Jennings). Συγκεκριμένα, πρόκειται για τις ουσίες τεστοστερόνη (T), επιτεστοστερόνη (E), το λόγο τεστοστερόνης/ επιτεστοστερόνης (T/E).

- τεστοστερόνη (T), επιτεστοστερόνη (E), το (T/E), %U είναι 15% και για τιμές μικρότερες του 5ng/ml είναι 30%.

- για το λόγο τεστοστερόνης/ επιτεστοστερόνης (T/E), %U είναι 15%

Για τα θετικά δείγματα εξετάστηκε η θέση τους σχετικά με τα κριτήρια επιβεβαίωσης προκειμένου να αποτελέσουν ή όχι άτυπο θετικό δείγμα (atypical finding) από το ADAMS για τους λόγους T/E, AND/ETIO, 5a-diol/5βdiol, όπως αυτό ορίζεται από τις οδηγίες του WADA (technical document 2016-Endogenous anabolic androgenic steroids measurement and reporting) για τις ενδογενείς ουσίες (Βλέπε εισαγωγή Steroid profile).

5.1.5. Όργανα, σκεύη και αντιδραστήρια

5.1.5.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Αυτόματες πιπέτες τύπου Finniripette-Labsystems 5-40, 20-200, 200-1000 ml και 1-5 ml.
- Αυτόματος αναδευτήρας τύπου δίνης, VortexGenie 2, Scientific Industries.
- Οριζόντιοι αυτόματοι ανακινητήρες, τύπου Promax 1020 DT, Heindolph.
- Διανεμητής υγρών (dispenser) μέγιστου όγκου 10 ml.
- Φαρμακευτικός ζυγός τύπου CASBEE, MW 1200.
- Αναλυτικός ζυγός τύπου GR 200, AND τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, μέγιστης ποσότητας 60 g.
- Κλίβανος, τύπου Shimaden SR 30, με εύρος λειτουργίας 0-400 οC.
- Φυγόκεντρος, τύπου Z510 BHG, Hermle, 30 θέσεων.
- Συσκευή εξάτμισης, η οποία αποτελείται από σύστημα διανεμητή αερίου N₂ και μεταλλόλουτρο. Τα μεταλλόλουτρα είναι τύπου TECHNEDRIBLOCK DB3.
- Φαλίδι ανοίγματος και φαλίδι κλεισίματος φαλιδίων αυτόματου δειγματολήπτη.
- Συσκευή απιονισμένου νερού, τύπου Milli-Q Analytical, Millipore, Merck, Γερμανία.

5.1.5.2 Εργαστηριακά σκεύη

Γυάλινα σκεύη

- ◆ Ψηλοί δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 15 ml
- ◆ Δοκιμαστικοί σωλήνες κωνικής βάσης, εσφυρισμένοι, χωρητικότητας 10 ml
- ◆ Εσφυρισμένα πώματα
- ◆ Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- ◆ Ογκομετρικές φιάλες χωρητικότητας 50, 250 και 500 ml
- ◆ Σύριγγα Hamilton όγκου 50 μl

Αναλώσιμα

- Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών.
- Πεχαμετρικός χάρτης εύρους pH6,5-10 και 7,5-14 (Merck).
- Φυαλίδια αυτόματου εισαγωγέα CrimpNeckND-11, χωρητικότητας 1,5 ml, 32 X 11,6 mm, διαφανή.
- Μικροφιαλίδια (insert), χωρητικότητας 0,1 ml, 12 mm, διαφανή, με πυθμένα κωνικού σχήματος.
- Πώματα aluminumcapclearlacquered/ 11 mm/ Septum natural rubber/ TEF, transparent, πάχους 0,1 mmγια τα φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα.

5.1.5.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Ένζυμο β-γλυκουρονιδάση από *E. coli* (Roche).
2. Πρότυπο διάλυμα μίγματος εσωτερικών προτύπων methyltestosterone 7,5ppm, d4-19-norandrosteroneglucuronide 0,3 μg/ml, mefruside 15 ppm και bamethan 7,5 ppm.
3. N-μεθυλο-N-τριμεθυλο-σιλυλο-τριφθορο-ακεταμίδιο, MSTFA
(ChemFabrikKarlBucher, Γερμανία).
4. Άνυδροθειικό νάτριο, Na₂SO₄ (99%, Panreac, Ισπανία).
5. Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH₂PO₄ (99%, Panreac, Ισπανία).
6. Όξινο φωσφορικό κάλιο, K₂HPO₄ (99%, Merck, Γερμανία).
7. Όξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO₃ (99,7%, Merck, Γερμανία).
8. Ανθρακικό νάτριο, Na₂CO₃ (99,8%, Panreac, Ισπανία).
9. Διαιθυλαιθέρας, [(C₂H₅)₂O], καθαρότητας 99,5%.
10. Μεθανόλη, CH₃OH, καθαρότητας 99,8%.
11. Πεντάνιο, C₅H₁₂, καθαρότητας 99,5%
12. Διθειοερυθριτόλη, DTE, (99% Sigma- Aldrich, Γερμανία).
13. Ιωδιούχο αμμώνιο, NH₄I, (99,9% Sigma- Aldrich, Γερμανία).
14. Απιονισμένο νερό από συσκευή Millipore.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=7

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ζυγίζονται 32,4 g όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4) και 13,5 g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) τα οποία μεταφέρονται σε γυάλινη ογκομετρική φιάλη 250 ml με βιδωτό πώμα όπου συμπληρώνεται αποσταγμένο νερό ως τη χαραγή. Ακολουθως το μίγμα θερμαίνεται ήπια, υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμοαντήρα για 10 λεπτά. Όταν η φιάλη επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, το pH ρυθμίζεται στο 7.

Στερεό ρυθμιστικό μίγμα ανθρακικών $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 10:1 w/w

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού μίγματος ανθρακικών ζυγίζονται 200 g $NaHCO_3$ σε ειδικό χαρτί ζύγισης σε φαρμακευτικό ζυγό και μεταφέρονται σε γυάλινη φιάλη με βιδωτό πώμα χωρητικότητας 500 ml. Ζυγίζονται έπειτα και 20 g Na_2CO_3 και μεταφέρονται στην ίδια γυάλινη φιάλη. Η φιάλη πωματίζεται και αναδεύεται πολύ καλά για τουλάχιστον 2 λεπτά. Συμπληρώνονται τα στοιχεία του μίγματος σε ετικέτα και φυλάσσεται στο χώρο του εργαστηρίου.

Πρότυπο διάλυμα μίγματος εσωτερικών προτύπων

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος εσωτερικών προτύπων, μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml (στην οποία έχει προστεθεί μικρή ποσότητα μεθανόλης) 1263 μl μεθυλτεστοστερόνη 198 μg/ml (Cτελ= 5μg/ml), 300 μl mefruside 2080 μg/ml (Cτελ= 12,5μg/ml), 613 μl bamethan 2038 μg/ml (Cτελ= 25μg/ml) και 218 μl 4-19-norandrosterone glucuronide 45.9 μg/ml (Cτελ= 0,2 μg/ml). Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται ως τη χαραγή με μεθανόλη αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Ακολουθεί vortex και η φιάλη φυλάσσεται πωματισμένη στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Αντιδραστήριο παραγωγοποίησης MSTFA/ NH_4 /DTE

Για την παρασκευή του αντιδραστήριου παραγωγοποίησης MSTFA/ NH_4 /DTE 1000:4:4 v/w/w ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό 400 mg ιωδιούχου αμμωνίου σε ειδικό χαρτί ζύγισης. Έπειτα ζυγίζονται 400 mg διθειοερυθρίτης. Οι ποσότητες ιωδιούχου αμμωνίου και διθειοερυθρίτης προστίθενται στη φιάλη του MSTFA την οποία έχει παραλάβει το εργαστήριο.

5.1.5.4 Αέριος χρωματογράφος

- Αεριοχρωματογράφος με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών GC HP6890/5973 με αυτόματο δειγματολήπτη HP7683 και λογισμικό MSD Chemstation
- Αεριοχρωματογράφος με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών GC υψηλής διαχωριστικής ικανότητας HP6890N με αυτόματο δειγματολήπτη HP7683 και λογισμικό MassLynx 4.0.

Παράμετροι Αεριοχρωματογράφου GC/MS

- Κινητή φάση: Ήλιον με ροή 1,2mL/min
- Όγκος εισαγωγής δείγματος: 3 μ L
- Θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος: 250 °C
- Στήλη: Τριχοειδής στήλη AgilentUltra 1 16 m \times 0,2 mm \times 0,11 μ m (μήκος \times εσωτερική διάμετρο \times πάχος στατικής φάσης)
 - Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 180 °C για 0 min, γραμμική αύξηση 3 °C/min μέχρι 235 °C, γραμμική αύξηση 30 °C/min μέχρι 310 °C (τελική θερμοκρασία) για 3,15 min

Παράμετροι Φασματομέτρου μαζών

- Τεχνική ιοντισμού δέσμης ηλεκτρονίων (EI+)
- Χρόνος έναρξης λήψης φασματομετρικών δεδομένων (solvent delay): 2,35 min
- Καταγραφή επιλεγμένων ιόντων(SIM)

Παράμετροι Αεριοχρωματογράφου GC/HRMS

- Κινητή φάση: Ήλιον με ροή 1,6mL/min
- Όγκος εισαγωγής δείγματος: 4 μ L
- Θερμοκρασία εισαγωγής δείγματος: 250 °C
- Στήλη: Τριχοειδής στήλη AgilentUltra 1 12m \times 0,2 mm \times 0,33 μ m (μήκος \times εσωτερική διάμετρο \times πάχος στατικής φάσης)
 - Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 150 °C για 0,50 min, γραμμική αύξηση 12,5 °C/min μέχρι 310 °C για 2,5 min

Παράμετροι Φασματομέτρου μαζών

- Τεχνική ιοντισμού δέσμης ηλεκτρονίων (EI+)
- Χρόνος έναρξης λήψης φασματομετρικών δεδομένων (solvent delay): 1 min
- Καταγραφή επιλεγμένων ιόντων(SIM)

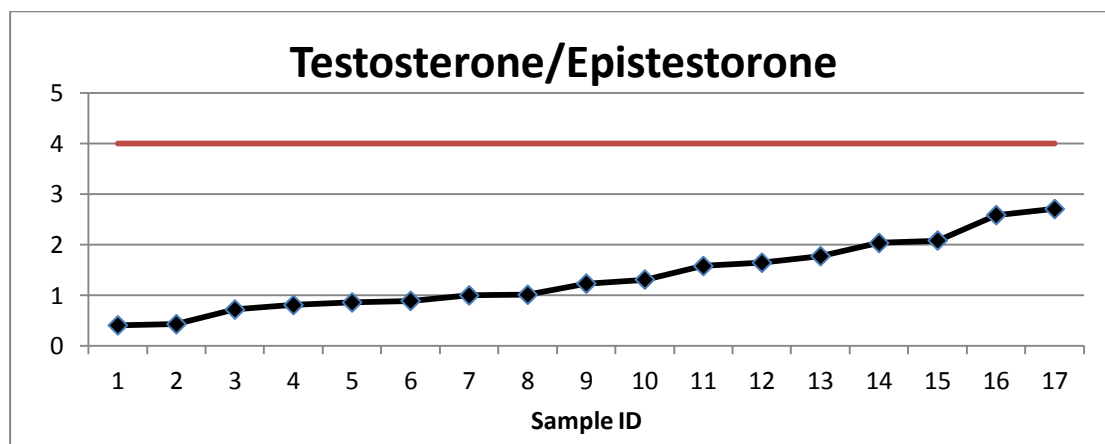
Κεφάλαιο 6

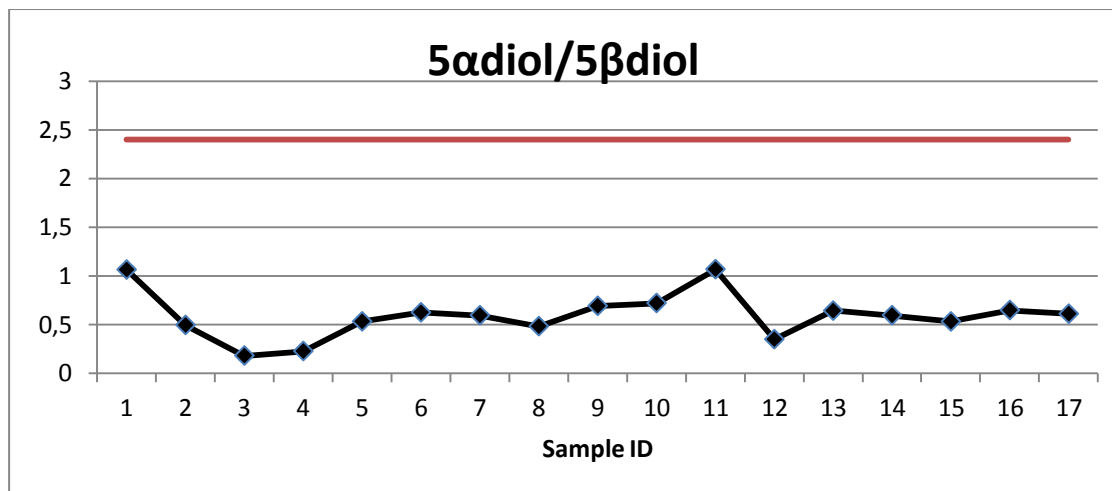
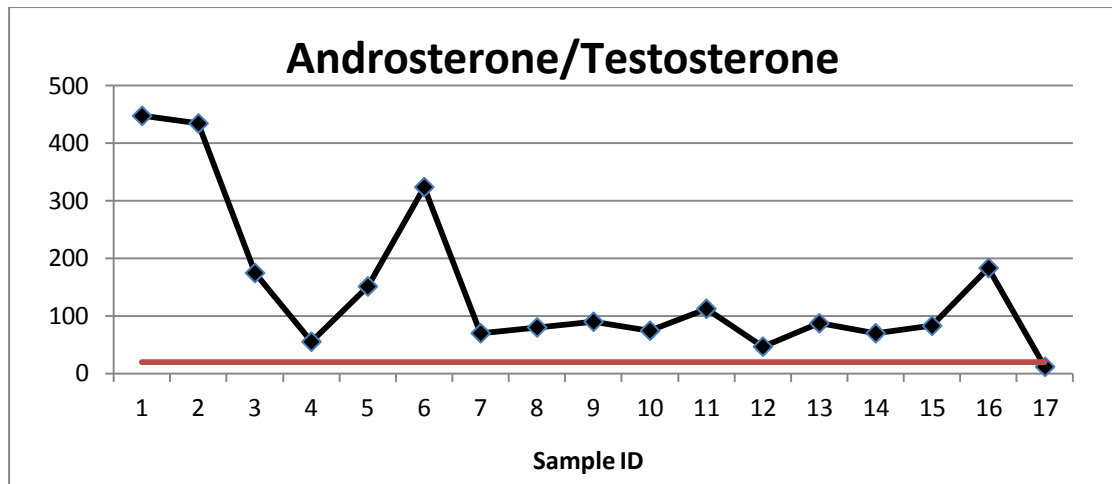
6.1 Αποτελέσματα

6.1.1 Ανάλυση θετικών δειγμάτων

Συγκεντρώθηκαν 30 θετικά δείγματα στανοζολόλης του εργαστηρίου του ΟΑΚΑ κατά την χρονική διάρκεια 2012-2016 και αναλύθηκαν με χρωματογραφική μέθοδο GC/MS. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε αυτά που είχε γίνει λήψη στανοζολόλης (17 στον αριθμό) και σε αυτά που η λήψη στανοζολόλης έγινε συνοδεία χρήσης τεστοστερόνης (13). Η διάκριση αυτή έγινε βάσει των τιμών του λόγου T/E, με τα δείγματα που είχαν λόγο >4 να ανήκουν στην κατηγορία της σύγχρονης πρόσληψη στανοζολόλης και τεστοστερόνης, ενώ τα δείγματα με λόγο T/E <4 στην κατηγορία της πρόσληψης μόνο στανοζολόλης.

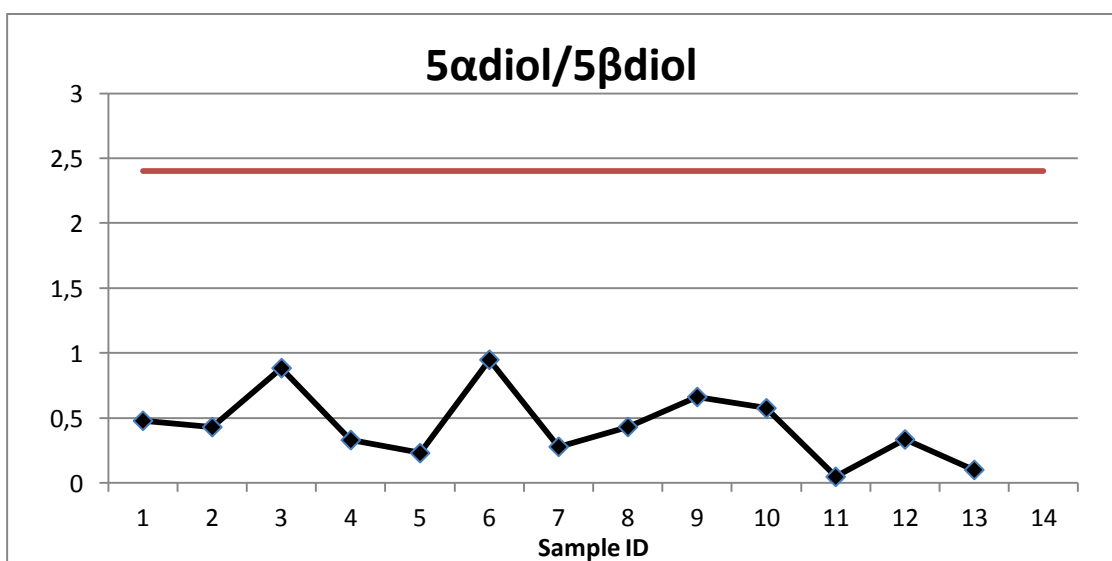
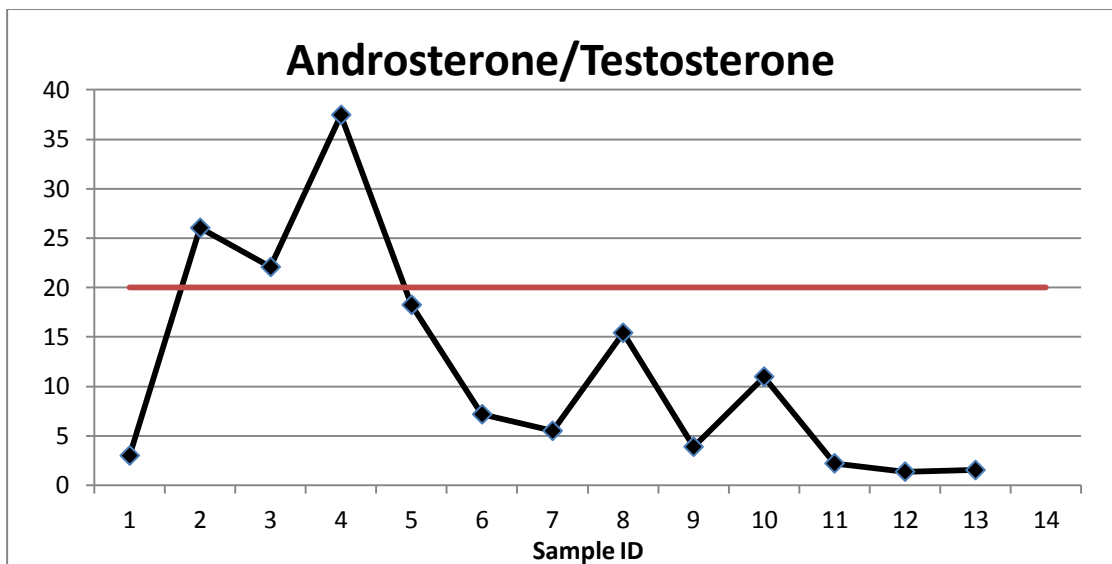
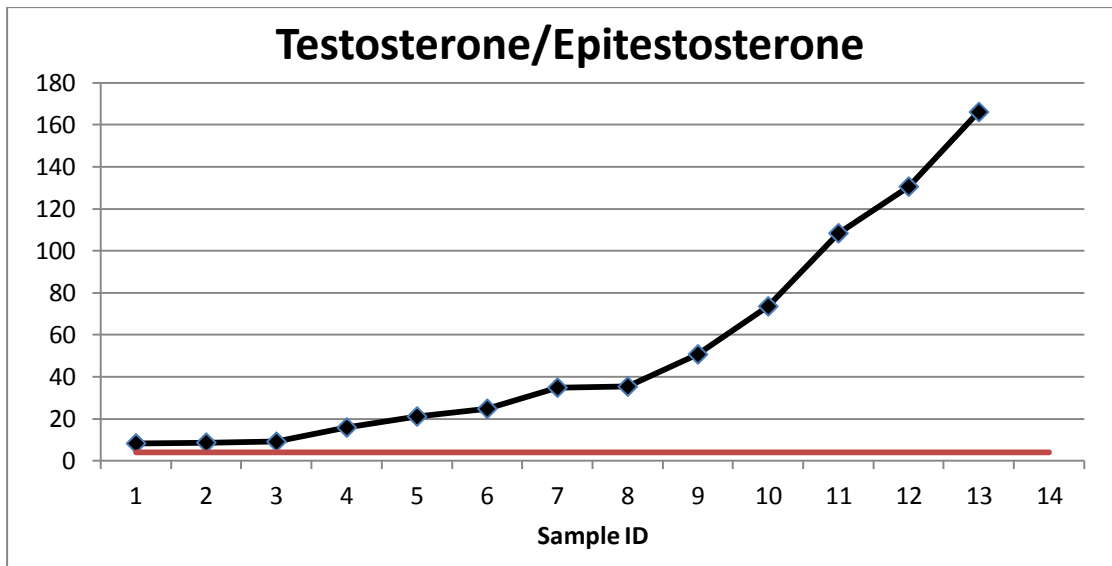
Στην κατηγορία των θετικών δειγμάτων με λήψη μόνο στανοζολόλης κι εξετάζοντας τρία κύρια κριτήρια (3.2.2) δεν παρατηρήθηκε καμία τιμή για κάποιον από τους λόγους που να επιβεβαιώνει τα κριτήρια ATPF. Πιο συγκεκριμένα για την εξέταση του λόγου A/T, όλα τα δείγματα έχουν τιμές κατά πολύ μεγαλύτερες της κατώτερης επιτρεπόμενης τιμής που είναι ίση με 20. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 20 έως και 447,39. Αντίστοιχα για τον λόγο 5αδιολ/5βδιολ, οι τιμές παραμένουν σταθερά κάτω από την τιμή 2.4, η οποία οριοθετεί το κριτήριο ύποπτου δείγματος (βλ. σχήμα 6.1).





Σχήμα 6.1 Τιμές steroid profile θετικών δειγμάτων που έχει γίνει χρήση μόνο στανοζολόλης

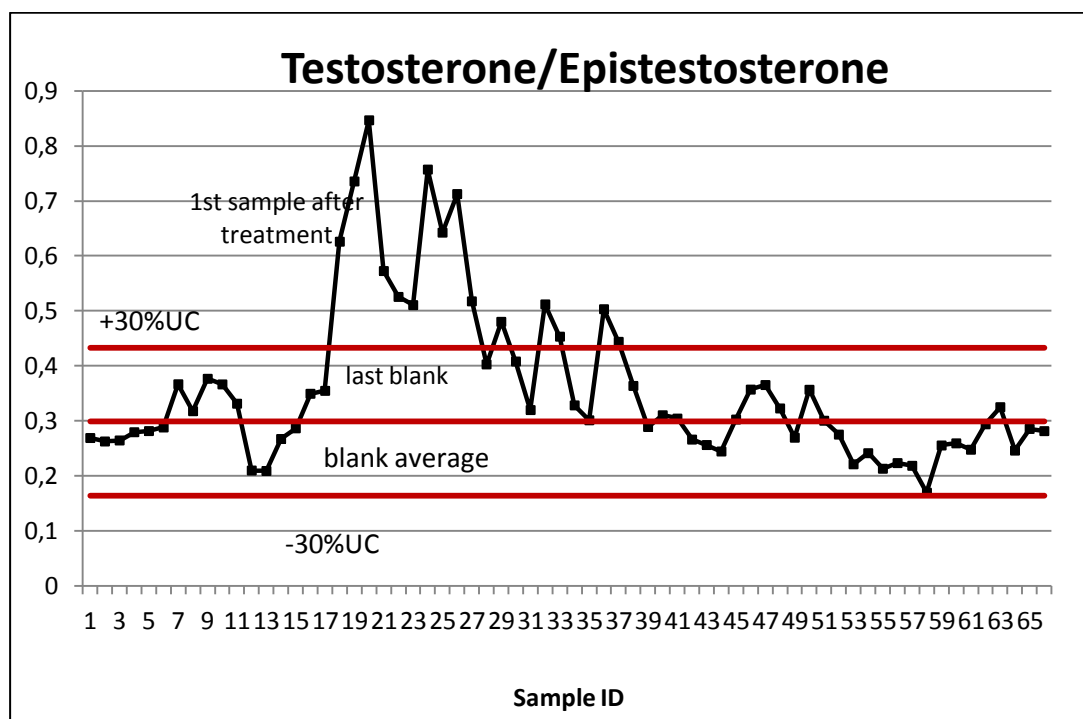
Αντίστοιχα, στην κατηγορία των δειγμάτων που έχει γίνει συνοδός χρήση τεστοστερόνης, μελετήθηκαν τα ίδια 3 κύρια κριτήρια. Πιο συγκεκριμένα για τον λόγο A/T, οι τιμές ήταν κατά κανόνα μικρότερες και διακυμάνθηκαν από 1.52 έως και 37.5. Επίσης παρατηρήθηκε πως για τιμές του T/E>20, οι τιμές του A/T ήταν σταθερά κάτω της τιμής 20 που έχει οριστεί ως κριτήριο ανίχνευσης ATPF. Όσον αφορά τις τιμές του λόγου 5αdiol/5βdiol, οι τιμές σε καμία των περιπτώσεων δεν ικανοποίησαν το κριτήριο και παρέμειναν μικρότερες του 2.4 ακόμα και για τις πολύ ακραίες τιμές του T/E(βλ σχήμα 6.2).

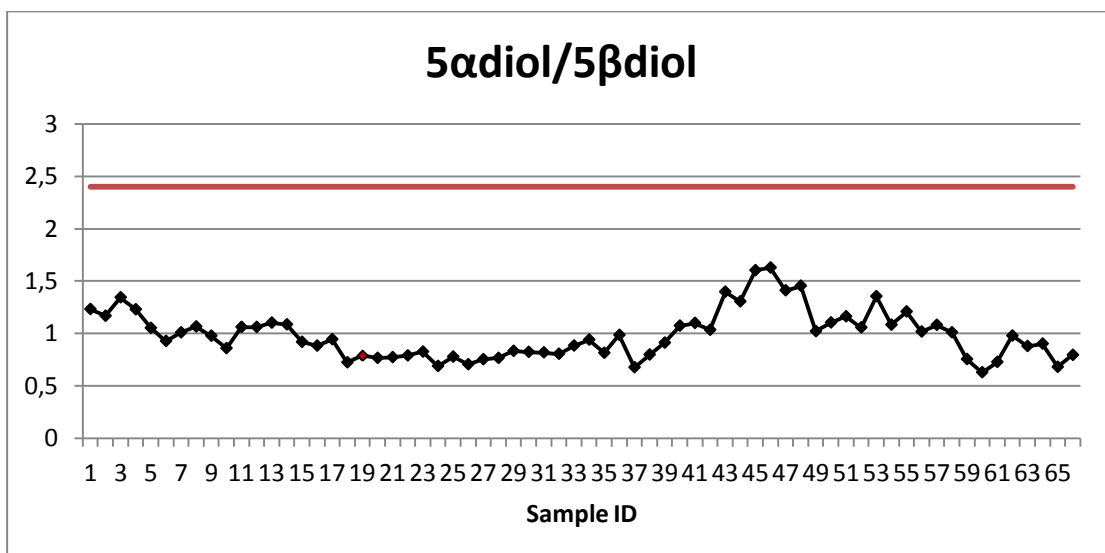
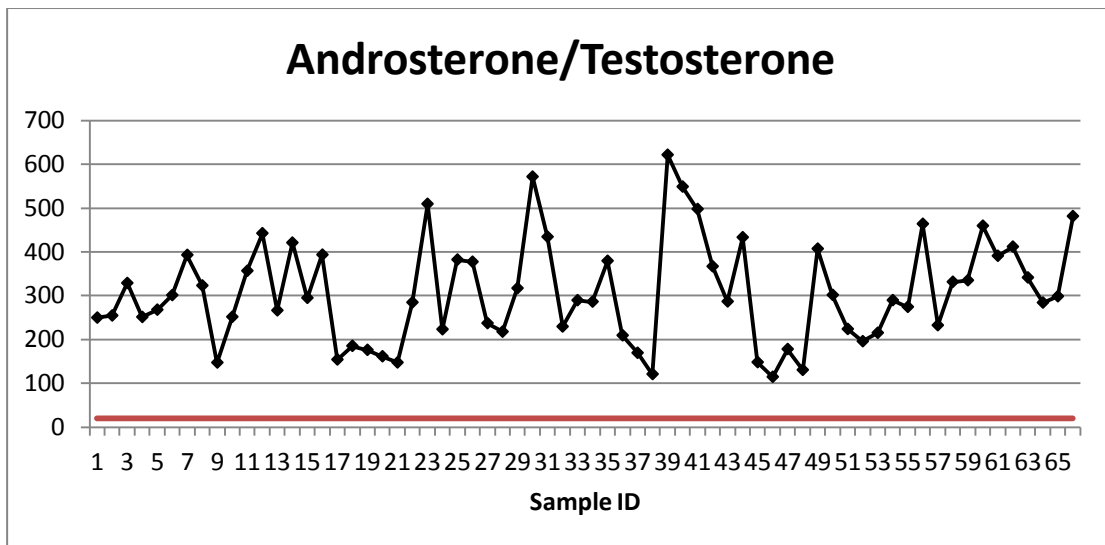


Σχήμα 6.2 Τιμές steroid profile θετικών δειγμάτων που έχει γίνει χρήση στανοζολόλης και συνοδός χρήση τεστοστερόνης

6.1.2. Ανάλυση μεταβολικών δειγμάτων

Μετά την διαδικασία συλλογής μεταβολικών δειγμάτων (65) μετά από εφάπαξ peros χορήγηση 20mg στανοζολόλης και παρασκευής των δειγμάτων για χρωματογραφική ανάλυση GC/MS, HRMS, τα δείγματα αναλύθηκαν για τις ίδιες παραμέτρους του steroid profile που αναλύθηκαν τα θετικά δείγματα. Για τον λόγο T/E, οι τιμές διακυμάνθηκαν από 0,16 έως και 0,85. Αρχικά υπολογίστηκε η μέση τιμή των 17 δειγμάτων blank (0,30), των δειγμάτων δηλαδή που συλλέχθηκαν προ της λήψης στανοζολόλης και χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία του ατομικού προφίλ. Βάσει των 17 δειγμάτων, υπολογίστηκαν τα όρια αβεβαιότητας των τιμών T/E, όπως αυτό ορίζεται από τις τεχνικές διατάξεις της WADA. Τα όρια αυτά είναι ίσα με mean +/- 30%, δηλαδή 0,43 και 0,16 αντίστοιχα. Παρατηρείται περιοχή τιμών από το δείγμα 18 έως και το δείγμα 27 των οποίων η μέση τιμή διαφέρει στατιστικά σημαντικά από αυτές των δειγμάτων blank ($t=-10.72$, $p<0.05$). Το δείγμα 27 συλλέχθηκε 48 ώρες μετά την λήψη στανοζολόλης. Οι τιμές του λόγου T/E επανέρχονται πλήρως εντός των ορίων αβεβαιότητας μετά το δείγμα 38 που αντιστοιχεί σε 80 ώρες μετά την λήψη της ουσίας. Ωστόσο, παρά τις μεταβολές καμία τιμή δεν πληροί τα κριτήρια ATPF, δηλαδή $T/E > 4$. Για τα δύο κριτήρια A/T και 5 α diol/5 β diol δεν καταγράφηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή, με τις τιμές να παρουσιάζουν ένα ακανόνιστο μοτίβο μεταβολής, τόσο πριν όσο και μετά την λήψη της ουσίας. Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση οι τιμές παρέμειναν εκτός των ορίων ATPF, δηλαδή παρέμειναν υψηλότερες του 20 και μικρότερες του 2,4 αντίστοιχα (βλ. σχήμα 6.3).





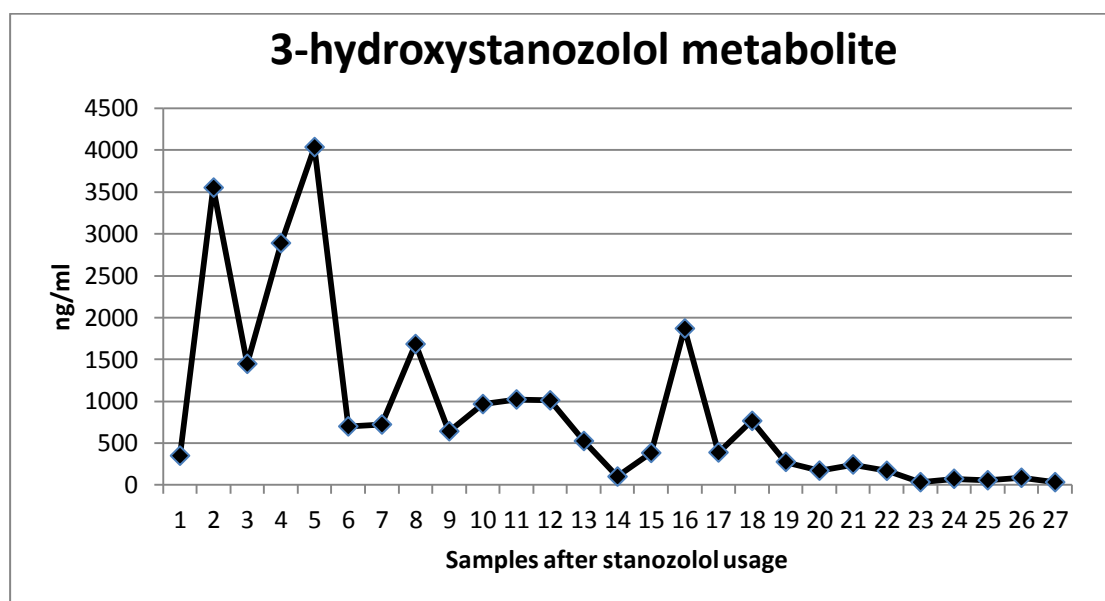
Σχήμα 6.3 Μεταβολές των λόγων του steroid profile στα μεταβολικά δείγματα του εθελοντή

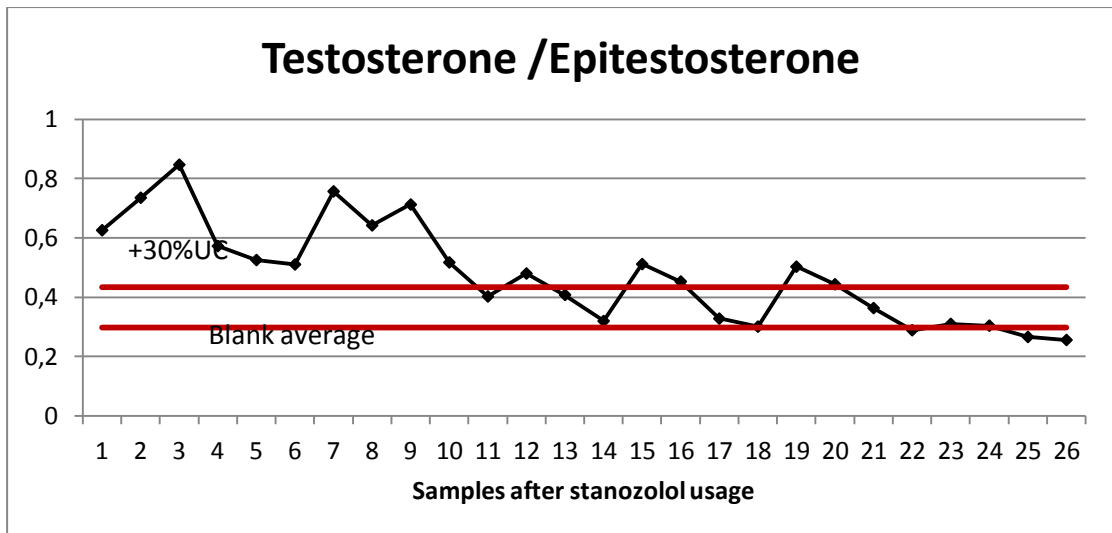
6.1.3. Ανίχνευση μεταβολιτών μέσω HRMS

Μετά την ανάλυση των μεταβολικών δειγμάτων στανοζολόλης με την μέθοδο GC/MS, τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο HRMS, για την ανίχνευση των δύο κύριων μεταβολιτών τους, 3-hydroxystanozolol και 16β-hydroxystanozolol. Η ανάλυση έδειξε πώς ο 3OH εντοπίζεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τον 16β. Η ποσοτικοποίηση του 3OH μεταβολίτη έγινε βάσει του δείγματος M1146, το οποίο περιέχει γνωστή συγκέντρωση ίση με 200ng/ml. Η συγκριτική μελέτη ανίχνευσης των μεταβολιτών και του λόγου T/E ως «δεικτών» πρόσληψης στανοζολόλης, υπέδειξε:

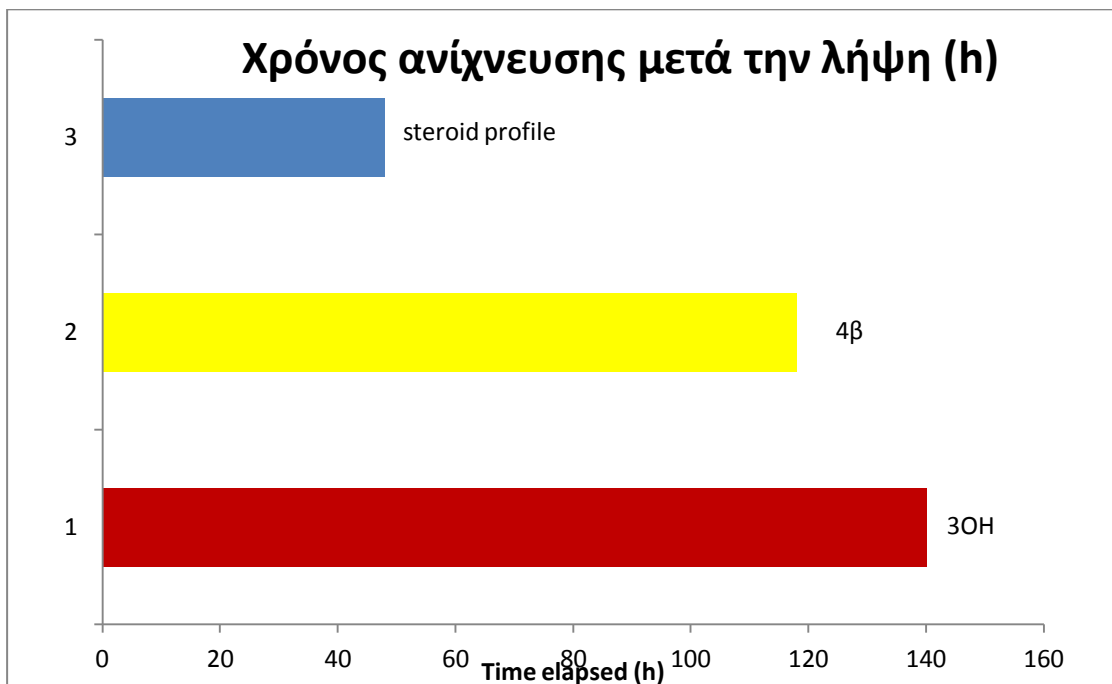
- Ο μεταβολίτης 3OH ανιχνεύθηκε από το πρώτο δείγμα μετά την λήψη (δείγμα 18) και για χρονική διάρκεια 140 ωρών (δείγμα 44).
- Ο μεταβολίτης 16β ανιχνεύθηκε από το πρώτο δείγμα μετά την λήψη (δείγμα 18) και για χρονική διάρκεια 118 ωρών (δείγμα 43).
- Ο λόγος T/E του steroid profile, που ήταν ο πιο βραχύχρονος δείκτης, αυξήθηκε από το πρώτο δείγμα μετά την λήψη (δείγμα 18) και για χρονική διάρκεια 48 ωρών (δείγμα 27).

(βλ. σχήματα 6.4-6.7)



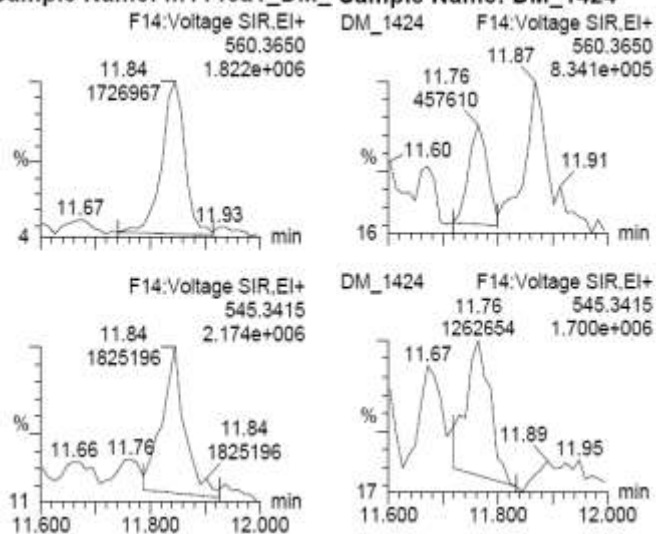


Σχήμα 6.4 Εντοπισμός του 3OH μεταβολίτη της στανολόλης και παράθεση του λόγου T/E για το ίδιο χρονικό φάσμα (140h after use).

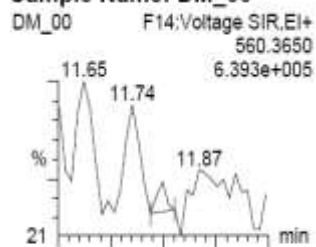


Σχήμα 6.5 Σύγκριση ικανότητας ανίχνευσης ύποπτων δειγμάτων μεταξύ 1) ανίχνευσης του 3OH-μεταβολίτη 2) 4β μεταβολίτη και 3) μεταβολές του steroid profile

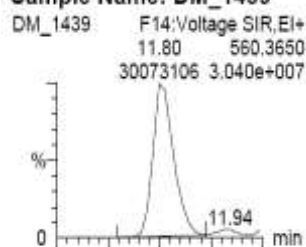
Sample Name: m1146a1_DM_ Sample Name: DM_1424



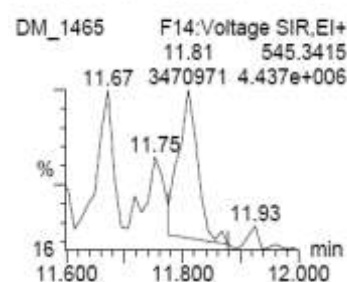
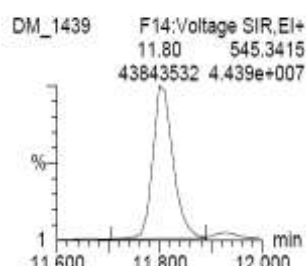
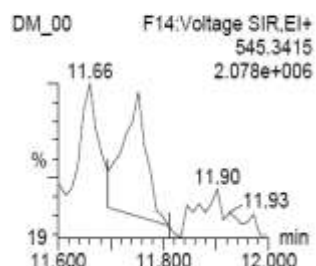
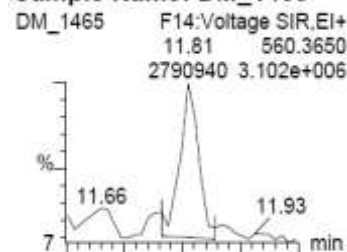
Sample Name: DM_00



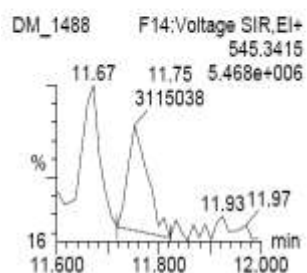
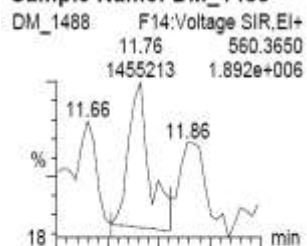
Sample Name: DM_1439



Sample Name: DM_1465

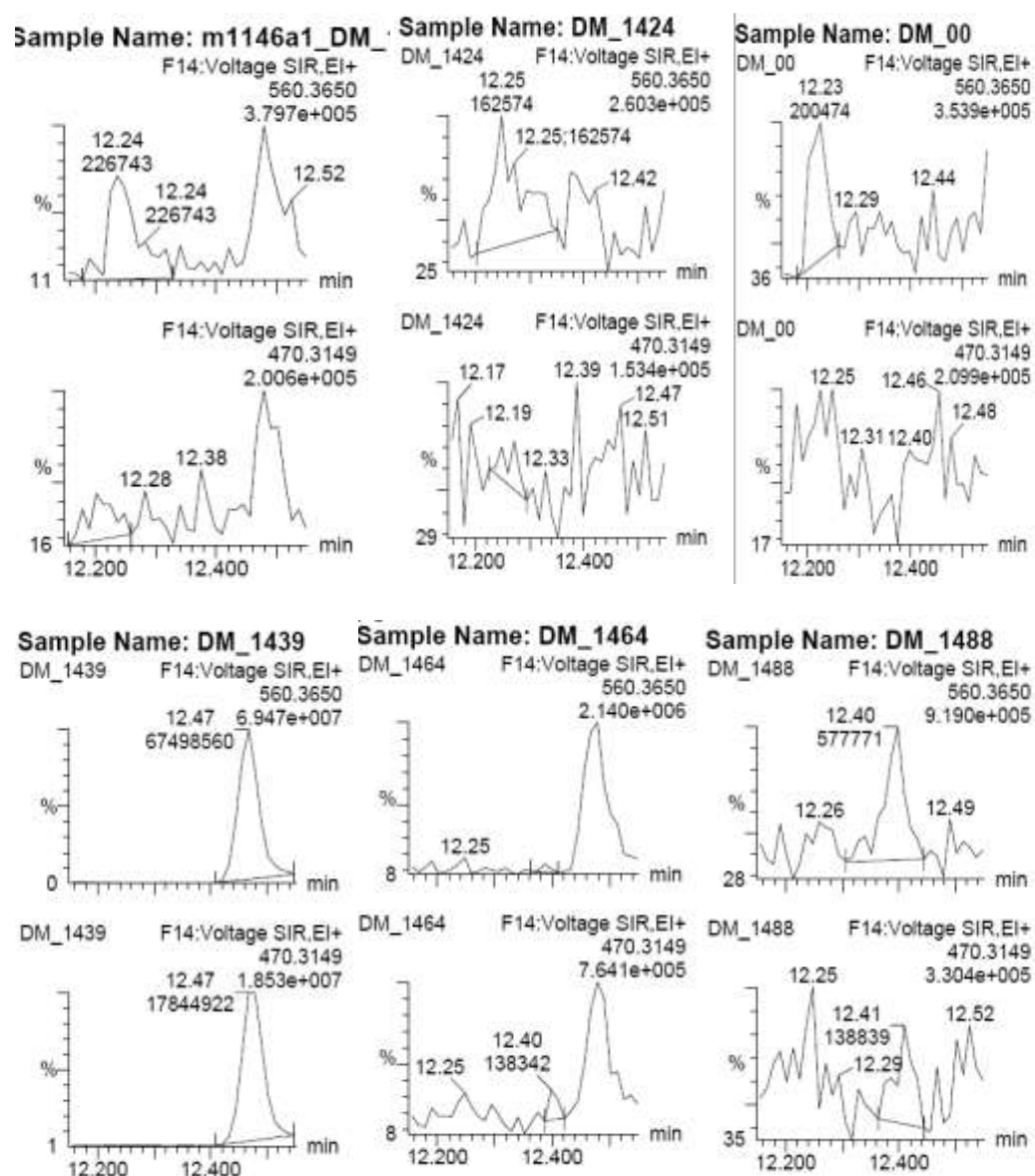


Sample Name: DM_1488



Σχήμα 6.6 Χρωματογραφήματα για τον 3OH-μεταβολίτη για το α)M1146, β)πρώτο δείγμα της μελέτης, γ)τελευταίο δείγμα πριν την λήψη, δ)πρώτο δείγμα μετά την

λήψη, ε)τελευταίο δείγμα ανίχνευσης του μεταβολίτη και στ)τελευταίο δείγμα της μελέτης. Ο μεταβολίτης εκλούεται στην κορυφή 11.84s



Σχήμα 6.7 Χρωματογραφήματα για τον 16β μεταβολίτη για το α)M1146, β)πρώτο δείγμα της μελέτης, γ)τελευταίο δείγμα πριν την λήψη, δ)πρώτο δείγμα μετά την

λήψη, ε)τελευταίο δείγμα ανίχνευσης του μεταβολίτη και στ)τελευταίο δείγμα της μελέτης. Ο μεταβολίτης εκλούεται στην κορυφή 12.47s

6.2 Συζήτηση

Οι ουσίες και οι μεταβολίτες τους που αποτελούν το steroid profile είναι η τεστοστερόνη (T), επιτεστοστερόνη(E), ανδροστερόνη(AND), ετιοχολανολόνη (ETIO), 5α- ανδροσταν-3α, 17βδιόλη, 5β- ανδροσταν-3α, 17βδιόλη (σχήμα 3.1), όπως επίσης και οι λόγοι T/E, ETIO/AND, 5A/5B, AND/T και τέλος 5A/E. Εξετάσαμε την περίπτωση αν η εξωγενής λήψη στανολόλης που δεν παράγεται ενδογενώς, δύναται να παραποιήσει τον μεταβολισμό των ενδογενών στεροειδών και συνεπώς το στεροειδές προφίλ, προκαλώντας στατιστικά ανιχνεύσιμες μεταβολές. Εικάσθηκε ότι ο στατιστικός έλεγχος ικανού αριθμού θετικών δειγμάτων για συνθετικές αναβολικές ουσίες θα μπορούσε υποδείξει αλλαγές στο στεροειδές προφίλ, οι οποίες προτείνονται από την ισχύουσα βιβλιογραφία [65].Ελέγχοντας την επίδραση της στανολόλης στο προφίλ των ενδογενών στεροειδών θετικών δειγμάτων του εργαστηρίου, κατεδείχθη ότι δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ πρόσληψης στανολόλης και δεικτών του προφίλ. Πιο συγκεκριμένα, οι παράγοντες AND/T και 5αδιολ/5βδιολ παρέμειναν εκτός των κριτηρίων επιβεβαίωσης που έχουν θεσπιστεί από την WADA (βλ. 3.1.1). Αν κάποιος λοιπόν εξέταζε το steroid profile αυτών των δειγμάτων για χρήση στανολόλης, εύλογα θα καταχωρούσε τα δείγματα αυτά ως φυσιολογικά .Η μόνη ένδειξη η οποία είχαμε ήταν για υψηλές τιμές T/E>>4, όπου A/T ήταν μικρότερο του 20 εντός των κριτηρίων επιβεβαίωσης για ATPF. Συνεπώς ο A/T είναι μικρότερης δυναμικότητας δείκτης από τον T/E. Παρά ταύτα φαίνεται ότι η συνοδός χορήγηση τεστοστερόνης (σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις) επιφέρει κάποιαν μεταβολή (σχήμα 6.2).

Για τον παραπάνω λόγο εξετάσαμε τις ενδεχόμενες στατιστικές παρεκκλίσεις που προκλήθηκαν στις ενδογενείς στεροειδείς παραμέτρους σε ένα χρονικό φάσμα εφαρμόζοντας ειδικό μεταβολικό πρωτόκολλο πρόσληψης της στανολόλης. Πραγματικά η χορήγηση στανολόλης δεν έδειξε να ικανοποιεί κανένα εκ των τριών από τα κριτήρια της WADA. Η επιλογή των κριτηρίων έγινε βάσει ανεπίσημης πρότασης από άλλα διαπιστευμένα εργαστήρια της WADA τον Μάιο του 2016, που παρατήρησαν πως λόγω της αυξημένης σταθερότητας των επιπέδων της ανδροστερόνης σε σχέση με τους άλλους παράγοντες του προφίλ, οι μεταβολές στον λόγο A/T είναι σαφώς μικρότερες . Κατ' επέκταση, η πιθανότητα ενός άτυπου δείγματος αντικατοπτρίζεται πρωτίστως στον λόγο T/E. Ωστόσο, μέχρι και τον Σεπτέμβριο του 2016 η WADA δεν έχει τοποθετηθεί επίσημα επί του θέματος, ούτε έχει ανανεώσει κάποια εκ των τεχνικών της διατάξεων [9].Σύμφωνα με τα ευρήματα

της μεταβολικής μελέτης, κανένας εκ των τριών λόγων δεν ικανοποίησε τα κριτήρια ATPF, με τις τιμές όλων να εντοπίζονται εντός των αποδεκτών ορίων. (σχήμα 6.3).

Ωστόσο, το T/E έδειξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση 200-250%, εντός βέβαια των φυσιολογικών ορίων (σχήμα 6.3). Ενδεχομένως σε περίπτωση συνοδού πρόσληψης τεστοστερόνης, θα ήταν δυνατή η αύξηση του λόγου T/E από φυσιολογικά σε μεγαλύτερα του 4 επίπεδα. Δηλαδή σε αυτή την περίπτωση θα ικανοποιούνταν το κριτήριο $T/E > 4$ και προφανώς η ύπαρξη ATPF **[67]**.

Η χορήγηση της ουσίας σε ειδικό μεταβολικό πρωτόκολλο βασισμένο σε βιβλιογραφικά δεδομένα σκοπό είχε να επιβεβαιώσει τον συσχετισμό της χρονικής μεταβολής των ενδογενών στεροειδών με την συγκέντρωση της στανοζολόλης στα ούρα του αθλητού.

Ακολουθώντας το προφίλ της παραγωγής μεταβολιτών μέσω του GC/HRMS, ο πλεονάζων μεταβολίτης σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι ο 3-hydroxystanozolol, με μεγαλύτερη διάρκεια ανίχνευσης από αυτή του 16β-hydroxystanozolol **[66]**. Σύμφωνα με τα παρόντα δεδομένα, ο 3OH ανιχνεύθηκε έως και 140 ώρες μετά την λήψη της ουσίας ενώ ο 16β για 118 ώρες. (σχήμα 6.5). Η ένδειξη της αύξησης του λόγου T/E πράγματι αρχίζει από το πρώτο μόλις δείγμα μετά την πρόσληψη της ουσίας και στα σταματά στις 48 ώρες. Αν και ο T/E μπορεί να θεωρηθεί ένας επικουρικός δείκτης ανίχνευσης λήψης στανοζολόλης, υπολείπεται της διάρκειας της ανίχνευσης των 2 μεταβολιτών. Επιπροσθέτως, η ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνικών ανίχνευσης, όπως η μακρόχρονη ανίχνευση, του 3-hydroxystanozolol glucuronide **[68]**, έχει αυξήσει σημαντικά από τον Δεκέμβριο του 2012 την ικανότητα ανίχνευσης σε όλα τα εργαστήρια ανά τον κόσμο, κάτι που συνεπακόλουθα έχει μειώσει την χρήση της ουσίας.

Δεδομένης της σταθερής ώρας δειγματοληψίας μετά την 5^η μέρα λήψης και τις ακραίες μεταβολές στα επίπεδα ορισμένων ορμονών στην διάρκεια της ημέρας, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη του κίρκαδικού κύκλου και η πιθανή σύνδεσή του με τον μεταβολισμό και την έκκριση των στεροειδών ορμονών στα ούρα και κατά πόσο μια πιθανή σύνδεση θα μπορούσε να επηρεάσει τον τρόπο με τον οποίο διεξάγονται παγκοσμίως οι εργαστηριακοί έλεγχοι αντι-doping **[65]**.

Όσον αφορά την περαιτέρω διερεύνηση, θα παρουσίαζε ενδιαφέρον μια μεταβολική μελέτη με χρήση και άλλων αναβολικών ουσιών ως προς την επίδρασή τους στους δείκτες του προφίλ, με πρώτη επιλογή την αποκλειστική χορήγηση τεστοστερόνης.

Βιβλιογραφία

1. WADA, The World Anti-Doping Code 2015
2. A. Κουτσελίνης, Doping: Συνοπτική παρουσίαση του προβλήματος, 1987
3. <http://www.doping-prevention.sp.tum.de/el/doping-in-general.html>
4. A brief history of antidoping <https://www.wada-ama.org/en/who-we-are/a-briefhistory-of-anti-doping>
5. <http://atlantablackstar.com/2013/08/14/the-top-10-doping-scandals-that-rockedthe-a-sports-world/>
6. <http://www.newsbomb.gr/sports/news/story/221562/oi-10-pio-diavoitesypotheseis-ntopingk-stoys-olympiakoys-agonis>
7. Mario Thevis, Mass Spectrometry in Sports drug testing, Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays, Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry-Dominic M. Desiderio & Nico M. Nibbering, Series Editors.
8. M. Thevis and Wilhelm Schanzer, Mass Spectrometry Reviews, 2007, 26, 79-107.
9. <http://www.wada-ama.org>
10. WADA, International Standard for Testing.
11. <http://www.oaka.com.gr/υποστήριξη-αθλητών/έλεγχος-ντόπινγκ/διαδικασίες-ελέγχου-ντόπινγκ-αθλητών/>
12. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Π. Σακελλαρίου, Ποσοτικός προσδιορισμός σαλβουταμόλης και εφεδρινών σε ούρα αθλητών με απευθείας ένεση ούρων για τον έλεγχο ντόπινγκ με χρήση LCQTOFM.2015, 39-55.
13. <http://www.eskan.gr/pdfviewer.php?id=/res/file/pubs/monographia.pdf>
(τελευταία επίσκεψη Ιανουάριος 2009), Σ.Αθανασέλης, Ε.Καμπερίδου, Ι.Λαΐος, Σ.Χαρίτου, Ντόπινγκ σύγχρονη θεώρηση του προβλήματος, ΕΣΚΑΝ.
14. A.T.Kickman, Review, Pharmacology of anabolic steroids, British Journal of Pharmacology, 154, 502-521 (2008).
15. V.Petrow, Review, A history of steroid chemistry: Some contributions from European industry, Steroids, 61, 473-475 (1996).
16. J.P.Gaudilliere, Genesis and development of a biomedical object: styles of thought, styles of work and the history of the sex steroids, Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences, 35, 525-543 (2004).
17. Α.Δέτση, Ο χημικός πόλεμος στον αθλητισμό, Χημικά Χρονικά, 66, 50-53 (2004).

18. G.D.Braunstein, The influence of anabolic steroids on muscular strength, Principles of Medical Biology, Molecular and Cellular Pharmacology, 8, 465-474 (1997).
19. P.S.Rao, H.M.Mehendale, Androgens, Encyclopedia of Toxicology, 121-125, (2005).
20. Β. Ιγνατιάδου-Ραγκούση, Χημεία Φυσικών Προϊόντων, ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας, 1998.
21. J.McMurry, Απόδοση στα ελληνικά: Α.Βάρβογλης, Μ.Ορφανόπουλος, Ι.Σμόνου, Μ.Στρατάκης, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2^η έκδοση, 2001, τόμος 2.
22. E.Nieschlag, H.M.Behre, S.Nieschlag, Testosterone Action, Deficiency, Substitution, Cambridge University Press, 3rd Edition, 2006.
23. Κ.Δημόπουλος, Σ.Αντωνοπούλου, Βασική Βιοχημεία, Αθήνα, 2000.
24. W.Gao, C.E.Bohl, J.T.Dalton, Chemistry and structural biology of androgen receptor, Chemical Reviews, 105, 3352-3370 (2005).
25. B.Green, R.E.Leake, Steroid hormones a practical approach, IRLPress, Oxford, Washington, 1987.
26. A.Leinonen, Novel mass spectrometric analysis methods for anabolic androgenic steroids in sports drug testing, Helsinki University Printing House, Helsinki, 2006.
27. D.H.Kerkhof, Steroid profiling in doping analysis, Universiteit Utrecht, Faculteit Farmacie, Nederlands, 2001.
28. A.G.Fragkaki, Y.S.Angelis, M.Koupparis, A.Tsantili-Kakoulidou, G.Kokotos, C.Georgakopoulos, Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure, Steroids, (2008), (υπόεκτύπωση).
29. L.T.Samuels, Metabolism of the steroid hormones, Progress in the chemistry of fats and other lipids, vol. 3, 1955.
30. World Anti-Doping Agency, WADA Technical Document-TD2004 EAAS, Reporting and evaluation guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids
31. Π.Μαχαίρας, Χ.Ρέππας, Βιοφαρμακευτική, Αθήνα, 1992.
32. J.K.Aronson, Androgens and anabolic steroids, Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions, Elsevier B.V., 216-223 (2006).
33. M.Hart, Laymans guide to steroids, Mick Hart training systems, 2000.

34. ["Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products"](http://www.accessdata.fda.gov). www.accessdata.fda.gov. Retrieved 2016-02-18.
35. [Win, Place, and Dope](#) Slate, May 1, 2009
36. ["Stanozolol \(PIM 918\)"](#). www.inchem.org. Retrieved 2016-02-18.
37. Mateus-Avois L, Mangin P, Saugy M (2005). "Use of ion trap gas chromatography-multiple mass spectrometry for the detection and confirmation of 3-hydroxystanozolol at trace levels in urine for doping control". Journal of Chromatography B.
38. Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Lootens L, Grimalt S, Sancho JV, Hernández F, Meuleman P, Leroux-Roels G, Delbeke FT (2009). "Detection and structural investigation of metabolites of stanozolol in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry". Steroids. 74 (10-11)
39. Baselt, R. (2008). Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man (8th ed.). Foster City, CA: Biomedical Publications. pp. 1442–3.
40. Levin J, Trafford JA, Bishop PM. Stanozolol, a new anabolic steroid. J New Drugs. 1962 Jan-Feb;2:50-5.
41. ["Promoting Safe and Effective Drugs for 100 Years"](#). The Kefauver-Harris Drug Amendments. U.S. Food and Drug Administration.
42. World Anti- Doping Agency. WADA Technical Document- TD2014EAAS: Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting.
43. World Anti- Doping Agency. WADA Technical Document- TD2016EAAS: Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting
44. Mooradian A. D., Morley J.E., Korenman S.G. Biological actions of androgens. Endocrine Reviews 8 (1): 1–28, 1987.
45. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Ι. Ποτηριάδη , Ταυτοποίηση χαρακτηριστικών μεταβολιτών του Madol με ανάλυση GC/MS, καθορισμός του χρόνου ανίχνευσής τους και διερεύνηση της επίδρασής του στο προφίλ στεροειδών
46. Skoog D.A, Holler F.J, Nieman T.A.: Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης 2002. Εκδόσεις Κωσταράκης.
47. Σίσκος Π.Α., Νικολέλης Δ.Π.: Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού. ΕΚΠΑ 1991.
48. McNair H.M., Miller, J.M.: Basic Gas Chromatography. 2nd Ed. John Wiley & Sons 2009.
49. Jennings W., Mittlefehldt E., Stremple P., Analytical Gas Chromatography. 2nd Ed. Academic Press 1997.
50. Fowles, I.A., Gas Chromatography 2nd Ed. John Wiley & Sons 1995;1: 8-15.
51. Blau K., Halket J.: Handbook of Derivatives for Chromatography. 2nd Ed. John Wiley & Sons 1993.
52. Jack Cazes.: Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker America 2001.
53. HP6890 Series Gas Chromatography. Operating Manual, General Information.

54. Χατζηϊωάννου Θ.Π., Κουππάρης Μ.Α.: Ενόργανη Ανάλυση. ΕΚΠΑ 2000.
55. Hoffmann E., Stroobant V.: Mass Spectrometry. 3rd Ed. John Wiley & Sons 2007.
56. Reinders J., Lewandrowski U., Moebius J.: Challenges in mass spectrometry-based proteomics. Proteomics 2004;4: 3686-703.
57. Naylor S., Kumar R.: Emerging role of mass spectrometry in structural and functional proteomics. Adv. Protein Chem. 2003;65: 217-48.
58. Villas-Boas S.G., Mas S., Akesson M.: Mass Spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrom. Rev. 2005;24:613-46.
59. Smith R.M.: Understanding Mass Spectra. 2nd Ed. John Wiley & Sons 2004.
60. Burtis C.A., Ashwood E.R.: Chromatography / Mass Spectrometry. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Ed. Saunders Company 1999.
61. Fearson M., Davis R.: Analytical Chemistry by Open Learning. Mass Spectrometry 1987.
62. Scott. Van Bramer, An introduction to Mass Spectrometry 1997
63. Autospec Operator Manual, Micromass, Code Number 6666395, p. 4-6
64. Kitson F.G., Larsen B.S., McEwen. C.N: Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Academic Press 1996.
65. U Mareck, H Geyer, G Opferman "Factors influencing the steroid profile in doping control analysis" 2008
66. M. Thevis, G. Fuscholler, H. Geyer "Detection of stanozolol and its major metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" 2006
67. DH. Catlin, CK Halton, SH Starcevic "Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine
68. E. Tudela, K. Deventer, P. van Eenoo "Sensitive detection of 3'-hydroxystanozolol glucuronide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" 2013