



«Σχολή Θετικών Επιστημών & Τεχνολογίας»

«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Σύγχρονες αναλυτικές και μοριακές μέθοδοι προσδιορισμού
ουσιών ντόπινγκ»

«Ευθυμία Σπανοπούλου»

Επιβλέπων καθηγητής: «ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ»

Πάτρα, «Ιούνιος» «2023»

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



«Σύγχρονες αναλυτικές και μοριακές μέθοδοι προσδιορισμού
ουσιών ντόπινγκ»

«Ευθυμία Σπανοπούλου»

Επιτροπή Επίβλεψης Πτυχιακής / Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

«ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΣΙΔΕΡΗΣ»

«Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας
ΕΚΠΑ»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

«ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ»

«Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Πατρών»

Πάτρα, «Ιούνιος» «2023»

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος της σχολής Θετικών Επιστημών & Τεχνολογίας «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση» κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023, υπό την επίβλεψη του κύριου καθηγητή Διαμαντή Σίδερη.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Διαμαντή Σίδερη για την εξαιρετική μας συνεργασία κατά την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας. Η καθοδήγηση και η υποστήριξη από πλευράς του ήταν αρκετά πολύτιμες για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνδρα μου Ανδρέα και τους γονείς μου για όλη τη βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχαν, όχι μόνο κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν όλες οι σύγχρονες αναλυτικές και μοριακές μέθοδοι προσδιορισμού των ουσιών ντόπινγκ. Στις τεχνικές αυτές περιλαμβάνονται φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές, μέθοδοι ηλεκτροφόρησης, διάφορες ανοσοδοκιμασίες καθώς και τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν χρωματογραφικές μέθοδοι συζευγμένες με φασματομετρία μαζών, όπως LC-MS/MS και GC-MS/MS.

Στο θεωρητικό μέρος παρατίθενται ορισμένοι βασικοί ορισμοί, όπως ο ορισμός του ντόπινγκ και του αντιντόπινγκ και έπειτα σειρά έχει μια σύντομη ιστορική αναδρομή για το πως καταλήξαμε στον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών, ο οποίος εκδίδεται σε ετήσια συχνότητα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόπινγκ (WADA). Ακολουθεί λεπτομερής παρουσίαση όλων των κατηγοριών ουσιών και μεθόδων που περιλαμβάνονται στον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών. Έπειτα λαμβάνει χώρα ανάλυση των μηχανισμών δράσης όλων των ανωτέρω ουσιών και μεθόδων. Τέλος, αναλύθηκαν όλες οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί έως σήμερα και αφορούν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό για κάθε κατηγορία ουσιών ντόπινγκ ξεχωριστά.

Στο τέλος της εργασίας υπάρχει μια σύνοψη τόσο του συνόλου των εργασιών που πραγματοποιούνται σε έναν έλεγχο ντόπινγκ όσο και του συνόλου των μεθόδων ανίχνευσης που έχει στη διάθεσή του ένα εργαστήριο για ελέγχους ντόπινγκ.

Λέξεις – Κλειδιά

Ντόπινγκ, Αντι-ντόπινγκ, WADA, GC, LC, GC-MS/MS, LC-MS/MS

«Modern analytical and molecular methods for the determination of
doping substances»

«Spanopoulou Efthymia»

Abstract

In this postgraduate dissertation studied all the modern analytical and molecular methods for the determination of doping substances. These techniques include spectroscopic and chromatographic methods, electrophoresis methods, various immunoassays and in recent years chromatographic methods coupled with mass spectrometry such as LC-MS/MS and GC-MS/MS have been developed.

In the theoretical part, some basic definitions are given, such as the definition of doping and anti-doping, followed by a brief historical review of how we came to The Prohibited List, which is issued annually by the World Anti-Doping Agency (WADA). What follows is a detailed discussion of all categories of substances and methods included in The Prohibited List. This is followed by an analysis of the mechanisms of action of all these substances and methods. Finally, all methods developed to date for the qualitative and quantitative determination of each category of doping substances are analyzed separately.

At the end of the paper there is a summary of both all the work carried out in a doping test and all the detection methods available to a laboratory for doping controls.

Keywords

Doping, Anti-doping, WADA, GC, LC, GC-MS/MS, LC-MS/MS

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract.....	vii
Περιεχόμενα	viii
1. Εισαγωγή.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.1 Ορισμός doping.....	1
1.2 Ιστορική αναδρομή	3
1.3 Απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι doping	6
1.3.1 Απαγορευμένες ουσίες & μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων	7
1.3.2 Απαγορευμένες ουσίες εντός και εκτός αγώνων	9
1.3.3 Ουσίες που απαγορεύονται μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα	17
2. Anti-doping.....	18
2.1 Ορισμός Anti-doping.....	18
2.2 Επιτροπές ελέγχου και καταπολέμησης του doping	20
2.2.1 Παγκόσμιος Οργανισμός Anti-doping WADA.....	20
2.2.2 Οργανισμός Anti-doping των Ηνωμένων Πολιτειών USADA.....	22
3. Μηχανισμοί δράσης ουσιών doping.....	23
3.1 Μηχανισμός δράσης Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή AAS.....	23
3.2 Μηχανισμός δράσης Διεγερτικών.....	25
3.3 Μηχανισμός δράσης Κανναβινοειδών	29
3.4 Μηχανισμός δράσης Αυξητικών Παραγόντων	31
3.5 Μηχανισμός δράσης β-αναστολέων.....	35
3.6 Μηχανισμός δράσης διουρητικών	37
3.7 Μηχανισμός δράσης αλκοόλ.....	38
3.8 Μηχανισμός δράσης γοναδοτροπινών	41
3.9 Μηχανισμός δράσης β2-αγωνιστών.....	42
3.10 Μηχανισμός δράσης ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης.....	44
3.11 Μηχανισμός δράσης γονιδιακού ντόπινγκ.....	45
4. Βασικές μέθοδοι προσδιορισμού ουσιών doping	47
4.1 Αέρια Χρωματογραφία GC.....	47
4.2 Υγρή Χρωματογραφία LC & Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC... ..	50
4.3 Φασματομετρία μάζας MS.....	54
4.4 Ανοσοδοκιμασίες	79
5. Συμπεράσματα.....	87
Βιβλιογραφία.....	91

1. Εισαγωγή

1.1 Ορισμός doping

Στην ελληνική γλώσσα η λέξη φαρμακοδιέγερση είναι η πλησιέστερη για να περιγράψει κανείς με ακρίβεια τον αγγλικό όρο *doping*, καθώς δεν υπάρχει κάποιος άλλος συγκεκριμένος όρος. Επειδή το ντόπινγκ δεν προκαλεί πάντα διέγερση και δεν γίνεται πάντα με φάρμακα η έννοια της φαρμακοδιέγερσης είναι περιοριστική. Προκειμένου λοιπόν να καλυφθούν όλες οι μορφές ντόπινγκ επικράτησε η αγγλική ονομασία «ντόπινγκ». Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι ορισμοί για να περιγράψουν τον όρο αυτό, ο πρώτος εκ των οποίων καθιερώθηκε το 1963 από το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Εξωσχολική Εκπαίδευση. Σύμφωνα λοιπόν με την Επιτροπή όταν ένα υγιές άτομο λαμβάνει ή χρησιμοποιεί οποιοδήποτε ουσία ή παράγοντα που φυσιολογικά δεν εντοπίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό ή/και οποιαδήποτε ουσία που χορηγείται είτε σε μη φυσιολογικές επιπλέον ποσότητες είτε με μη φυσιολογικό τρόπο και στοχεύει αθέμητα και τεχνηέντως στην αύξηση της απόδοσης κατά τη διάρκεια του αγώνα. Γενικότερα ορίζουμε ως ντόπινγκ, τη χορήγηση σε κάποιον αθλητή ή η χρήση από τον ίδιο, είτε κατά τη διάρκεια αγώνα είτε κατά τη προπόνηση προετοιμασίας για τους αγώνες, κάποιου απαγορευμένου μέσου (μεθόδου ή ουσίας) που έχει ως στόχο να βελτιώσει την αγωνιστική του απόδοση, ικανότητα ή τη διάθεση.

Από την 1^η Ιανουαρίου 2015 είναι σε ισχύ ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ (World Anti-doping Code) σύμφωνα με τον οποίο το ντόπινγκ ορίζεται ως η εκδήλωση μιας ή περισσότερων παραβάσεων κανόνων αντιντόπινγκ. Η λίστα των απαγορευμένων ουσιών και ενεργειών ενημερώνεται και δημοσιεύεται κάθε χρόνο από την Παγκόσμια Ομοσπονδία Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency-WADA), η οποία ιδρύθηκε το 1999. Οι συνθήκες καθώς και το τι θεωρείται παράβαση των κανόνων αντιντόπινγκ ορίζονται σύμφωνα με τα άρθρα 2.1 έως 2.10 του Κώδικα και είναι οι εξής:

- Η ανίχνευση απαγορευμένης ουσίας ή δεικτών ή μεταβολιτών αυτής σε δείγμα αθλητή. Προκειμένου λοιπόν να καταγραφεί παράβαση κανόνα αντιντόπινγκ δεν κρίνεται αναγκαία να υφίστανται αμέλεια ή πρόθεση ή εσκεμμένη χρήση από την πλευρά του αθλητή. Υπεύθυνος για ό,τι απαγορευμένη ουσία ή μεταβολίτες ή δείκτες εντοπιστούν στο προσωπικό του δείγμα είναι μόνο ο αθλητής. Η διασφάλιση ότι καμία απαγορευμένη ουσία ή μεταβολίτης ή δείκτης αυτής δεν εισέρχεται στον οργανισμό του αθλητή αποτελεί προσωπική ευθύνη του αθλητή.

Εξαίρεση αποτελούν οι ουσίες, στις οποίες στον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών έχει οριστεί συγκεκριμένο ποσοτικό όριο. Ενώ για τον εντοπισμό ουσιών με ικανότητα να παραχθούν ενδογενώς εφαρμόζονται συγκεκριμένα κριτήρια και αποτελούν εξαίρεση του γενικού κανόνα του συγκεκριμένου άρθρου.

- Η χρήση ή η απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή και μεθόδου από τον αθλητή, καθώς αποτελεί προσωπική ευθύνη του αθλητή να διασφαλίσει την μη είσοδο οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας. Η παράβαση αυτή μπορεί να στοιχειοθετηθεί από αξιόπιστα μέσα όπως μαρτυρικές καταθέσεις, η παραδοχή εκ μέρους του αθλητή, αποδεικτικά στοιχεία ή δεδομένα από το βιολογικό διαβατήριο του αθλητή. Εφόσον λοιπόν έγινε χρήση ή απόπειρα χρήσης της απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου, αυτό από μόνο του αρκεί για διάπραξη κανονισμού αντιντόπινγκ. Δηλαδή δεν αποτελεί σημαντικό στοιχείο η θετική ή η αρνητική έκβαση της χρήσης ή της απόπειρας χρήσης.
- Σύμφωνα με το Διεθνές Πρότυπο Ελέγχων και Ερευνών η ανεπαρκής ή ακόμη και η μη παροχή πληροφοριών εντοπισμού σε συνδυασμό με ελέγχους χωρίς αποτέλεσμα σε διάστημα 12 μηνών. Δηλαδή περιλαμβάνει τη μη εμφάνιση του αθλητή σε έλεγχο σε συνδυασμό με την παραβίαση των κανονισμών σχετικά με τη διαθεσιμότητα του αθλητή για να υποβληθεί σε έλεγχο εκτός αγώνων, καθώς επίσης και την αποτυχία υποβολής όλων των απαιτούμενων πληροφοριών διαμονής του αθλητή. Αυτό αφορά αθλητές εγγεγραμμένους στο κατάλογο ελεγχόμενων αθλητών και αναφέρεται σε οποιοδήποτε συνδυασμό τριών άκαρπων ελέγχων σε διάστημα 12 μηνών.
- Ύστερα από ειδοποίηση και χωρίς επαρκής αιτιολόγηση η άρνηση ή η αποφυγή ή η μη υποβολή σε δειγματοληψία, όπως αυτή προβλέπεται στους κανόνες αντιντόπινγκ.
- Η εντός αγώνα κατοχή απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου είτε εντός αγώνα από τον ίδιο τον αθλητή ή από μέλος της ομάδας προσωπικού υποστήριξης του αθλητή είτε η εκτός αγώνα κατοχή απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου. Ο αθλητής δύναται να απαλλαγεί αν αποδείξει ότι η συγκεκριμένη κατοχή χρησιμοποιείται κατ' εξαίρεση για θεραπευτικούς σκοπούς ΕΧΘΣ όπως ορίζεται στο Άρθρο 4.4 ή υποβάλλει κάποια άλλη αιτιολογία.
- Η παραποίηση ή η απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε σταδίου της διαδικασίας ντόπινγκ. Αφορά όλες εκείνες τις κινήσεις που υπονομεύουν τον έλεγχο του ντόπινγκ και φυσιολογικά δε θα συμπεριλαμβανόντουσαν στις Απαγορευμένες Μεθόδους. Τέτοιες κινήσεις γίνονται προς τους υπεύθυνους των ελέγχων ντόπινγκ ή και σε οργανισμούς αντιντόπινγκ και περιλαμβάνουν την απόπειρα παρέμβασης ή την εσκεμμένη παρέμβαση προς τους ανωτέρους με τη παροχή ψευδών πληροφοριών ή ακόμα και τον εκφοβισμό κάποιου πιθανού μάρτυρα. Μια ακόμη παραποίηση αποτελεί η προσθήκη ξένης ουσίας μέσα στο δείγμα με σκοπό την τροποποίηση αυτού.

- Η απόπειρα διακίνησης ή η διακίνηση οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Η κάθε μορφή εσκεμμένης συνέργειας, όπως η προτροπή, η ενθάρρυνση, η συνδρομή, η συγκάλυψη ή η βοήθεια με σκοπό οποιαδήποτε παράβαση ή απόπειρα παράβασης κανόνα ντόπινγκ.
- Η χορήγηση εντός αγώνα ή η απόπειρα χορήγησης σε αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή οποιασδήποτε απαγορευμένης μεθόδου ή εκτός αγώνα χορήγηση σε αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου που είναι απαγορευμένη εκτός αγώνα.
- Οποιαδήποτε απαγορευμένη σύμπραξη. Αφορά στη σύμπραξη αθλητή ή τρίτου προσώπου, το οποίο είναι υποκείμενο σε οργανισμό Αντιντόπινγκ υπό την αθλητική ή την επαγγελματική του ταυτότητα με οποιοδήποτε μέλος προσωπικού υποστήριξης του αθλητή. Ο αθλητής δηλαδή δεν πρέπει να συνεργάζεται με προπονητές, ιατρούς ή με άτομα στο προσωπικό υποστήριξης τα οποία υπόκειται σε καθεστώς περιορισμού λόγω παράβασης κανονισμών αντιντόπινγκ ή που τους έχει επιβληθεί ποινή σχετικά με το ντόπινγκ ή έχουν καταδικαστεί ποινικά. (1)

1.2 Ιστορική αναδρομή

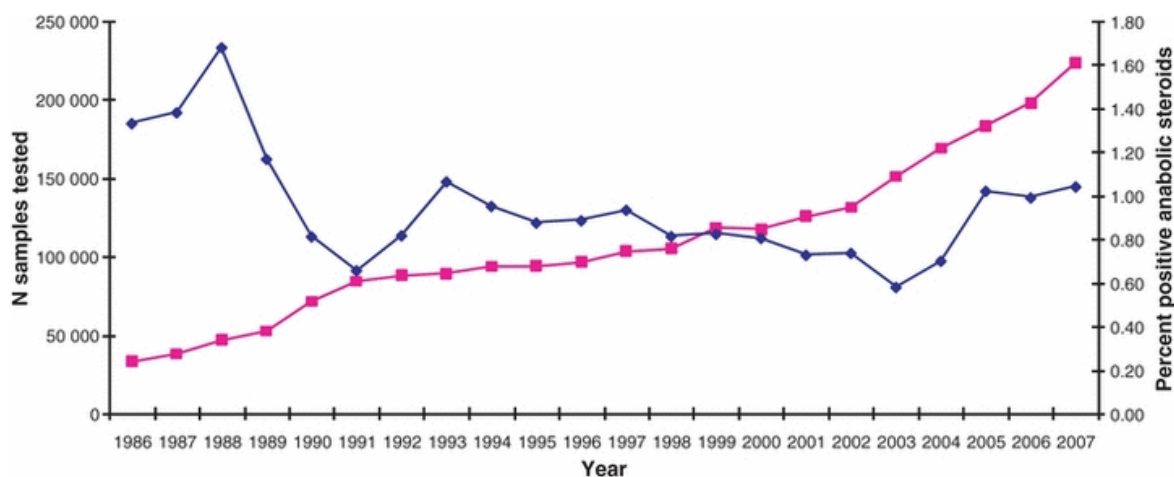
Το ντόπινγκ ή αλλιώς η λήψη ουσιών που έχει ως σκοπό την βελτίωση των αθλητικών επιδόσεων έχει μακρά ιστορία. Υπάρχουν αρκετές πηγές που αναφέρουν ότι στην αρχαία Ελλάδα οι αθλητές προκειμένου να ανακουφιστούν από τον πόνο που τους προκαλούσε ένας τραυματισμός και να καταφέρουν να συνεχίσουν να αγωνίζονται, χρησιμοποιούσαν διάφορα εκχυλίσματα φυτών, μανιταριών ακόμα και έτοιμα μίγματα κρασιού ή βοτάνων. Σύμφωνα με πηγές του Φιλόστρατου και του Γαληνού από τα τέλη του τρίτου αιώνα προ Χριστού εφαρμόστηκαν διάφορες θεραπείες που στόχευαν στην ενίσχυση της απόδοσης των αθλητών. Οι αθλητές πριν τους αγώνες κατανάλωναν διάφορα είδη κρέατος ή ζωμό αίματος ώστε να αυξήσουν τη φυσική τους δύναμη. Μάλιστα τον ίδιο αιώνα κατά τη διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων οι αθλητές λάμβαναν παραισθησιογόνα μανιτάρια προκειμένου να βελτιώσουν την απόδοσή τους στους αγώνες που έλαβαν χώρα μεταξύ 776π.Χ και 393μ.Χ. Έχει καταγραφεί επίσης ότι και οι Ρωμαίοι μονομάχοι χρησιμοποιούσαν διάφορα διεγερτικά ώστε να μην κουράζονται αλλά και διάφορους παράγοντες ντόπινγκ για να ενισχύσουν τη δύναμή τους. Τα άλογα των αρματοδρομέων επίσης τρέφονταν με διάφορα μίγματα ώστε να τρέχουν πιο γρήγορα. Επομένως τα συστατικά που χρησιμοποιούσαν εκείνη την εποχή ήταν είτε συμπληρώματα διατροφής, είτε θρεπτικά συστατικά είτε ουσίες που μοιάζουν με

ναρκωτικά. Όλα τα προηγούμενα φυσικά απαγορεύονταν στους Ολυμπιακούς Αγώνες και όποιος τα χρησιμοποιούσε είχε σοβαρές κυρώσεις που οδηγούσαν σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και σε θανατική ποινή. Μάλιστα ο αυτοκράτορας Θεοδόσιος το έτος 395μ.Χ κατήγγησε τους Αρχαίους Ολυμπιακούς Αγώνες καθώς θεωρούσε ότι οι Αγώνες είχαν καταλήξει να είναι εστία εξαπάτησης, προσβολής της ανθρώπινης αξιοπρέπειας και ντόπινγκ.

Στη σύγχρονη πλέον ιστορία του αθλητισμού το ντόπινγκ εμφανίστηκε τον 19^ο αιώνα ως επί το πλείστον στην επαγγελματική ποδηλασία και στη συνέχεια επεκτάθηκε σε όλους τους κλάδους του αθλητισμού. Το πρώτο περιστατικό ντόπινγκ στη κολύμβηση καταγράφεται το 1865 σε αγώνα στο κανάλι του Άμστερνταμ. Ακολουθεί το 1867 περιστατικό με ποδηλάτες από το Βέλγιο, οι οποίοι κατανάλωναν μίγμα ζάχαρης με αιθέρα, από τη Γαλλία αθλητές χρησιμοποιούσαν μίγματα καφεΐνης, ενώ άλλοι κατανάλωναν διαλύματα νιτρογλυκερίνης. Ενώ το 1896 είναι πλέον γεγονός ο πρώτος θάνατος από ντόπινγκ ενός Άγγλου ποδηλάτη από λήψη εφεδρίνης. Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα και στις αρχές του 20^{ου} αιώνα αν και αρκετοί ποδηλάτες έχασαν τη ζωή τους από την πρόσληψη ισχυρών διεγερτικών οι αρχές του αθλητισμού παρέμειναν παθητικές. Ο Tom Hicks το 1904 ύστερα από λήψη κονιάκ μαζί με στρυχνίνη ως νικητής στον μαραθώνιο του St.Louis κατέρρευσε στη γραμμή τερματισμού με κίνδυνο να έχανε τη ζωή του. Το 1920 παρασκευάστηκαν για πρώτη φορά οι αμφεταμίνες και το 1952 ξεσπάει σκάνδαλο σε παγοδρομίες στο Όσλο εξαιτίας της εύρεσης στα αποδυτήρια των αθλητών αμπουλών και συρίγγων. Το 1960 με αφορμή ότι ένας Δανός ποδηλάτης έχασε τη ζωή του κατά τη διάρκεια αγώνα δρόμου στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Ρώμης δημιουργήθηκε μια σειρά κανόνων από την Union Cycliste Internationale (UCI). Αυτό οδήγησε το 1967 τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ) να συντάξει μια διεθνή επιτροπή (IOC-MC) που είχε ως στόχο την καταπολέμηση της κατάχρησης των ναρκωτικών στα Ολυμπιακά αθλήματα. Από το 1950 και έπειτα άρχισε η χρήση των αναβολικών στεροειδών γεγονός, το οποίο επηρέασε πολύ έντονα και τους Ολυμπιακούς Αγώνες. Χαρακτηριστικό αυτής της νέας εποχής αποτελεί το γεγονός ότι πολλοί Ολυμπιακοί Αγώνες χαρακτηρίστηκαν ως «Ολυμπιακοί Αγώνες των Αναβολικών». Πιο συγκεκριμένα αναφερόμαστε στους Αγώνες του Τόκιο το 1964, του Μεξικό το 1968 και του Μόναχο το 1972. Έτσι λοιπόν η πρώτη φορά που έλαβε χώρα έλεγχος για τη χρήση ουσιών κατά τη διάρκεια των Αγώνων ήταν στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικού το 1968, χωρίς όμως ιδιαίτερα αποτελέσματα καθώς υπήρχαν ουσίες μακράς διαρκείας, όπως είναι τα αναβολικά. Η επίδραση των ουσιών αυτών στην αύξηση της επίδοσης του αθλητή παρέμενε αρκετό χρονικό διάστημα ακόμα και μετά την αποβολή της ουσίας από τον αθλητή. Έτσι λοιπόν αποφασίστηκε οι έλεγχοι ντόπινγκ να διενεργούνται και εκτός αγώνων. Το 1988 στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ ο Καναδός αθλητής Ben Johnson αρχικά αναδεικνύεται νικητής στα 100μ και ύστερα σε έλεγχο στον

οποίο υποβλήθηκε βρέθηκε να έχει κάνει χρήση στεροειδών και ειδικότερα στανολολόλης. Το περιστατικό αυτό έλαβε τεράστιες διαστάσεις και οδήγησε τις ομοσπονδίες και τα κράτη να διενεργούν συστηματικότερους ελέγχους και να λαμβάνουν επιπρόσθετα μέτρα κατά του ντόπινγκ. Το 1998 ο Γαλλικός ποδηλατικός γύρος κινδύνεψε να ακυρωθεί διότι στα Γαλλο-Βελγικά σύνορα οι αρχές εντόπισαν στα αμάξια της Γαλλικής Επαγγελματικής Ποδηλατικής Ομάδας Festina υψηλή ποσότητα διάφορων αυξητικών ορμονών, τεστοστερόνης, αμφεταμινών, κορτικοειδών και διάφορων άλλων απαγορευμένων ουσιών. Από τις ανακρίσεις που ακολούθησαν του προσωπικού και των αθλητών της ομάδας προέκυψε ότι το ντόπινγκ ήταν μια αρκετά καλά οργανωμένη λειτουργία του επιτελείου της ομάδας.

Με αφορμή λοιπόν το παραπάνω ιστορικό περιστατικό το 1999 ιδρύεται στη Λωζάννη ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ (WADA), του οποίου η κύρια αρμοδιότητα είναι η εφαρμογή του Παγκόσμιου Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ. Η WADA αν και αρχικά ιδρύθηκε από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ) στη συνέχεια ανεξαρτητοποιήθηκε από αυτήν. Η καταπολέμηση του ντόπινγκ αποτελεί κοινό μέλημα τόσο των αθλητικών ομοσπονδιών όσο και της ΔΟΕ. Το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ (Ε.Σ.Κ.Α.Ν) είναι ο αντίστοιχος φορέας στην Ελλάδα. Η συνεχώς αυξανόμενη ανάπτυξη των δοκιμών στο διάστημα από το 1988 έως το 2006 σε συνάρτηση με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων είναι κάτι παραπάνω από εμφανές (Σχήμα 1). Τα τετράγωνα (αριστερός άξονας) αντιστοιχούν στο συνολικό αριθμό δειγμάτων ούρων Α που εξετάστηκαν από διαπιστευμένα εργαστήρια της ΔΟΕ και της WADA από το 1986 έως το 2007. Τα διαμάντια (δεξιός άξονας) αντιστοιχούν στο ποσοστό των παραπάνω δειγμάτων που εντοπίστηκαν με απαγορευμένα αναβολικά στεροειδή. Το ποσοστό των θετικών δειγμάτων Α είναι σημαντικά μικρότερο από το ποσοστό των δειγμάτων Β που καταγράφηκαν ως θετικά. Το 1989 παρατηρείται η πρώτη αύξηση πιθανότατα εξαιτίας της τεράστιας έκτασης που έλαβε η δημοσιοποίηση της χρήσης στανολολόλης από τον νικητή των 100μ στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ το 1988. Ακολούθως από το 1988 έως το 1991 εντοπίζουμε ετήσια αύξηση κατά μέσο όρο της τάξης του 21% και αντίστοιχα τη περίοδο 2003 έως 2006 παρατηρείται ετήσια αύξηση της τάξης του 10,8%. Τα στοιχεία στο Σχήμα 1 παραχωρήθηκαν από μέλος της Ιατρικής Επιτροπής της ΔΟΕ, ενώ τα υπόλοιπα στοιχεία μετά τα 2002 προκύπτουν από το διαδικτυακό τόπο της WADA.



Σχήμα 1 Η συνολική αύξηση των δοκιμών σε συνάρτηση με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που εξετάστηκαν ανά έτος από το 1988 έως το 2006.

Το ντόπινγκ δυστυχώς δεν αποτελεί ένα φαινόμενο του παρελθόντος αλλά συνεχίζει και κάνει την εμφάνισή του ακόμη και σήμερα. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα των τελευταίων ετών αποτελεί το κρούσμα της Εθνικής Ομάδας της Ρωσίας το 2016 καθώς και ο χρυσός Ολυμπιονίκης Asbel Kiprop από την Κένυα που εντοπίστηκε θετικός ύστερα από έλεγχο που έλαβε χώρα τον Δεκέμβριο του 2017. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι πρόκειται για ένα μείζον ζήτημα δημόσιας υγείας και αφορά όλα τα αθλήματα και όλες τις ηπείρους. Αισιοδοξία προσδίδει τα τελευταία χρόνια η πρόοδος της τεχνολογίας που έχει συμβάλει ισχυρά στο αντιντόπινγκ καθώς και οι νέες τεχνολογίες που παρέχουν την δυνατότητα να γίνει επανέλεγχος σε παλαιά κατεψυγμένα δείγματα. (2), (3)

1.3 Απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι doping

Η λίστα με τις ουσίες αλλά και τις μεθόδους που απαγορεύονται τόσο εντός όσο και εκτός αγώνα εξαιτίας της ικανότητας που διαθέτουν να ενισχύουν την απόδοση στους αγώνες ή δρουν ως παράγοντες συγκάλυψης, όπως επίσης οι ουσίες και οι μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνα ονομάζεται Κατάλογος Απαγορευμένων Ουσιών. Ο συγκεκριμένος κατάλογος δημοσιεύεται ετησίως από την WADA και συνιστά διεθνές πρότυπο για όλα τα υπογράφοντα μέρη και τις κυβερνήσεις. Προκειμένου λοιπόν μια ουσία ή μια μέθοδος να συμπεριληφθεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών θα πρέπει να πληροί δυο από τα τρία κριτήρια που αναφέρονται παρακάτω. Αρχικά το πρώτο κριτήριο είναι η ουσία ή η μέθοδος είτε από μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλες ουσίες ή μεθόδους να έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει ή βελτιώνει την απόδοση του αθλητή, κάτι για το οποίο απαιτείται η ύπαρξη ιατρικής ή επιστημονικής απόδειξης. Δεύτερο κριτήριο αποτελεί η φαρμακολογική εμπειρία ή επίδραση ότι η χρήση της ουσίας ή της μεθόδου συνιστά πραγματικό ή ενδεχόμενο κίνδυνο για την υγεία του αθλητή, όπου επίσης κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη ιατρικής ή επιστημονικής

απόδειξης. Τρίτο και τελευταίο κριτήριο για να συμπεριληφθεί κάποια ουσία ή μέθοδος στο Κατάλογο είναι η παραβίαση του πνεύματος του αθλητισμού, όπως αυτό περιγράφεται στην εισαγωγή του Κώδικα. Υπάρχει επίσης η περίπτωση κάποια ουσία ή μέθοδος να καλύπτει την χρήση άλλων Απαγορευμένων Ουσιών ή Μεθόδων με αποτέλεσμα αυτή η ουσία ή η μέθοδος να συμπεριληφθεί από τη WADA στον Κατάλογο. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν η WADA ορίσει την ύπαρξη ιατρικής ή άλλης επιστημονικής απόδειξης, φαρμακευτικής εμπειρίας ή επίδρασης ότι υπάρχει η ανωτέρω κάλυψη. Για παράδειγμα μια τέτοια ουσία είναι η τετραϋδρογεστρινόνη THG που παράχθηκε από το αμερικανικό εργαστήριο BALCO με σκοπό να καλύψει τις ανάγκες των αθλητών. Γενικότερα οριστική είναι η κατάταξη μιας ουσίας ή μιας μεθόδου εντός ή εκτός του αγώνα καθώς επίσης και οριστική είναι η απόφαση του παγκόσμιου οργανισμού αντιντόπινγκ για το ποιες ουσίες και μέθοδοι θα συμπεριληφθούν στον Κατάλογο. Η μόνη περίπτωση τα παραπάνω να θεωρηθούν αμφισβητήσιμα από κάποιον αθλητή ή από οποιοδήποτε άλλο πρόσωπο είναι να αποδειχθεί βάση επιχειρήματος ότι η ουσία ή η μέθοδος δεν διέθετε τη δυνατότητα αύξησης της επίδοσης ή δεν αποτελούσε παράγοντα συγκάλυψης ή δεν παραβαίνει το πνεύμα του αθλητισμού ή δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία του αθλητή.

Προκειμένου μια φαρμακευτική ουσία να συγκαταλεγεί στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών θα πρέπει να εξετασθεί η δράση ή η χημική της δομή από την επιτροπή εργασίας του Καταλόγου. Σύμφωνα λοιπόν με τον Κατάλογο του 2018 οι απαγορευμένες ουσίες S και οι απαγορευμένοι μέθοδοι M διακρίνονται σε τρεις ομάδες. Σε εκείνες που απαγορεύονται τόσο εντός όσο και εκτός του αγώνα A, σε εκείνες που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων B και σε εκείνες που απαγορεύονται μόνο σε κάποια συγκεκριμένα αθλήματα P,Γ. (4)

1.3.1 Απαγορευμένες ουσίες & μέθοδοι που απαγορεύονται μόνο εντός αγώνων

Διεγερτικά S6

Η ενεργοποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος μέσω της δράσης της αδρεναλίνης και της νοραδρεναλίνης υποστηρίζεται με τη χρήση διεγερτικών ή συμπαθομιμητικών φαρμάκων. Με την χρήση των φαρμάκων αυτών παρατηρείται μείωση ή και εξάλειψη του αισθήματος της κόπωσης, βελτίωση της φυσικής απόδοσης καθώς και βελτίωση τόσο της διάθεσης όσο και της διέγερσης. Γενικά η συνολική φυσική κινητοποίηση και η μέγιστη επαγρύπνηση ορίζονται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Μόνο η κατανάλωση σε μεγάλες δόσεις των διεγερτικών οδηγεί σε θετικό αποτέλεσμα καθώς σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζονται από χαμηλές αποδόσεις Στην κατηγορία των διεγερτικών ανήκουν τόσο η καφεΐνη όσο και η νικοτίνη χωρίς όμως να

απαγορεύεται η χρήση τους στους αθλητές. Στο χώρο του ντόπινγκ τα πιο συνηθισμένα διεγερτικά είναι η κοκαΐνη, οι εφεδρίνες, οι αμφεταμίνες, η μεθυλφενιδάτη και η έκσταση. (3), (4), (5)

Ναρκωτικά S7

Ως ναρκωτικά ορίζονται διάφορα φάρμακα ή και ουσίες που διαθέτουν την ικανότητα να αλλάζουν τόσο τη φυσική όσο και τη φυσική κατάσταση του ανθρώπινου οργανισμού. Οι μεταβολές αυτές αναφέρονται σε ένα αρκετά ευρύ φάσμα από την διέγερση και την ευφορία έως την απόλυτη ακινητοποίηση και τον ύπνο. Επομένως τα ναρκωτικά ορίζονται όχι σε σχέση με την δράση τους αλλά περισσότερο από τα συμπτώματα που προκαλεί η χρήση τους. Τα κυριότερα από αυτά είναι ο εθισμός, η υπνηλία, ο περιορισμός του πόνου και η δραστική αλλαγή τόσο των συναισθημάτων όσο και της συμπεριφοράς. Η δράση αυτή στηρίζεται κυρίως στη χημική δομή των ναρκωτικών ουσιών και στις μεταβολές που προκαλούν στους βιολογικούς μηχανισμούς που διεγείρουν. Σύμφωνα με τον κατάλογο της WADA τα συμπαθομιμητικά περιλαμβάνονται στα διεγερτικά ναρκωτικά. Επίσης τα οπιοειδή ανήκουν στον Κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων της WADA και πιο συγκεκριμένα συγκαταλέγονται στα αναλγητικά ναρκωτικά. Αν και η κύρια δράση τους είναι η αλλαγή της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος, τα οπιοειδή λειτουργούν ως υποδοχείς τόσο του περιφερικού όσο και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μάλιστα οι επιπτώσεις της απελευθέρωσης της ισταμίνης που ακολουθεί τη λήψη ναρκωτικών είναι μερικώς συνδεδεμένη με τη χρήση των περιφερικών ναρκωτικών. Μια ακόμη χαρακτηριστική κατηγορία των ναρκωτικών είναι τα ψυχομιμητικά ή παραισθησιογόνα ή ψυχεδελικά και περιλαμβάνουν όλες εκείνες τις ουσίες η χρήση των οποίων οδηγεί σε ψυχικές μεταβολές, οι οποίες προσομοιάζουν αρκετά τις μεταβολές που εκδηλώνονται όταν κάποιος πάσχει από ψύχωση. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές χώρες η κοκαΐνη χαρακτηρίζεται ως ναρκωτικό ενώ χημικά κάτι τέτοιο δεν ισχύει. (3), (4), (5)

Κανναβινοειδή S8

Η κάνναβη είναι ευρέως διαδεδομένη παγκοσμίως, καθώς στα διάφορα είδη φυτών κάνναβης έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 400 διαφορετικές χημικές ενώσεις, οι οποίες χωρίζονται με τη σειρά τους σε 18 ομάδες χημικών ενώσεων. Με τη μορφή τσιγάρων ή σε πίτες πραγματοποιείται η κατανάλωση προϊόντων κάνναβης από τετραϋδροκανναβινόλη THC. Τέτοια προϊόντα είναι το χασίς (ρητινώδης κάνναβη) και η μαριχουάνα (φυτική κάνναβη). Η υψηλή συχνότητα ανίχνευσης της κάνναβης προέκυψε από την ευρεία χρήση προϊόντων κάνναβης που έκαναν οι νεαροί αθλητές. Τα κανναβινοειδή αν και συγκαταλέγονται στα ψυχομιμητικά ναρκωτικά, στον Κατάλογο της WADA τοποθετήθηκαν σαν μια ξεχωριστή κατηγορία. Τα συνηθέστερα φυσικά κανναβινοειδή είναι η μαριχουάνα, το χασίς και η κάνναβη. Πιο αναλυτικά, από χημικής άποψης τα κανναβινοειδή αποτελούν παράγωγα των μονοτερπενοειδών ή της

διβενζοπυρένης. Πρόκειται για μια κατηγορία φυσικών ουσιών, τις οποίες συναντάμε στο φυτό CannabisSativa αλλά και στους μεταβολίτες ή στα συνθετικά τους ανάλογα. Η κανναβινόλη (CBN), η κανναβιδιόλη (CBD) ,η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC) και η Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ8-THC) αποτελούν ορισμένα από τα σχεδόν 420 χημικά συστατικά από τα οποία αποτελείται η CannabisSativa. Βέβαια τα συστατικά αυτά (CBN, CBD, Δ8-THC και Δ9-THC) αποτελούν επίσης τα κύρια χημικά παράγωγα των μονοτερπενοειδών ή της διβενζοπυρένης. Τα κύρια αίτια της μακράς κατανάλωσης των κανναβινοειδών είναι η απώλεια μνήμης, η περιορισμένη ικανότητα μάθησης και η έλλειψη προσοχής που προκαλούνται από την καταστροφή ορισμένων νευρικών κανναβινοειδών υποδοχέων του εγκεφάλου. (3), (4), (5)

Γλυκοκορτικοστεροειδή S9

Σε φυσιολογικές συνθήκες τα γλυκοκορτικοειδή λαμβάνουν μέρος σε διάφορες μεταβολικές διαδικασίες, με την κυριότερη να είναι ο μεταβολισμός των λιπιδίων και της γλυκόζης. Η παραγωγή αυτών γίνεται στον φλοιό των επινεφριδίων. Επομένως τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν φυσικά παραγόμενες στεροειδείς ορμόνες ή συνθετικά συστατικά, τα οποία εμποδίζουν την εμφάνιση φλεγμονής. Επομένως τα γλυκοκορτικοειδή είναι καταβολικά στεροειδή και είναι διαφορετικά σε σχέση με τα αναβολικά στεροειδή που λαμβάνουν οι αθλητές με στόχο την αύξηση της μυϊκής τους μάζας και δύναμης. Όλα τα κορτικοστεροειδή αποτελούνται από τον ίδιο στεροειδή σκελετό και έχουν διαφορετική την ομάδα που συνδέεται στον C17 ή έχει διαφορετική κατεύθυνση η ομάδα αυτή. Τέτοια είναι τα αλατοκορτικοειδή και τα γλυκοκορτικοειδή. Η κορτιζόλη αποτελεί το πιο γνωστό γλυκοκορτικοειδές και η υδροκορτιζόνη είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο γλυκοκορτικοειδές ως αντιφλεγμονώδες φάρμακο. Τέλος τα συνθετικά στεροειδή έχουν αναπτυχθεί ως χημικά ανάλογα, με την βοήθεια των φυσικών κορτικοστεροειδών, και στοχεύουν στο διαχωρισμό των γλυκοκορτικοειδών επιδράσεων από εκείνες των αλατοκορτικοειδών. (3), (4), (5)

1.3.2 Απαγορευμένες ουσίες εντός και εκτός αγώνων

Μη εγκεκριμένες ουσίες S0

Οι μη εγκεκριμένες ουσίες περιλαμβάνουν όλες εκείνες τις ουσίες, οι οποίες δεν αναφέρονται σε κανένα σημείο μέσα στον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών. Ουσίες που δεν έχουν λάβει έγκριση από κάποια κυβερνητική ρυθμιστική αρχή υγείας προκειμένου να κυκλοφορήσουν με σκοπό τη θεραπευτική χρήση αν αφορά τον άνθρωπο και βρίσκεται σε στάδιο προ-κλινικής μελέτης. Επιπρόσθετα στις μη εγκεκριμένες ουσίες συγκαταλέγονται τα φάρμακα τα

οποία έχουν λάβει έγκριση μόνο για κτηνιατρική χρήση καθώς και τα συνθετικά ναρκωτικά που αποτελούν νέες ψυχοδραστικές ουσίες. (3)

Αναβολικοί Παράγοντες S1

Όλα εκείνα τα χημικά συστατικά, τα οποία προκαλούν την ενίσχυση της αναβολικής διεργασίας του οργανισμού χαρακτηρίζονται ως αναβολικοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε δυο κατηγορίες, αυτούς με την καταβολική δράση και σε αυτούς με την αναβολική επίδραση. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι παράγοντες εκείνοι που αναστέλλουν την πρωτεϊνική διάσπαση και στην δεύτερη κατηγορία αντίστοιχα ανήκουν εκείνοι που διεγείρουν την σύνθεση των πρωτεϊνών και κατ' επέκταση επηρεάζουν τον μεταβολισμό αυτών. Σύμφωνα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του έτους 2018 ουσίες με δραστική αναβολική δράση διακρίνονται σε δυο κατηγορίες στα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή S1.1 και στους άλλους αναβολικούς παράγοντες S1.2.

Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή AAS (Anabolic Androgenic Steroids) περιλαμβάνουν τα εξωγενή αναβολικά ανδρογόνα που είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης και τα ενδογενώς παραγόμενα AAS, όπως είναι η τεστοστερόνη, η διυδροτεστοστερόνη, οι προορμόνες τεστοστερόνης και οι μεταβολίτες αυτών. Στην περίπτωση λοιπόν ενδογενώς παραγόμενων AAS θα πρέπει σε έλεγχο ντόπινγκ η συγκέντρωση είτε της ουσίας ή δεικτών αυτής ή μεταβολιτών αυτής να μην βρίσκεται εντός των φυσιολογικών ορίων που προκύπτουν ενδογενώς. Μοναδική πιθανότητα εξαίρεσης αποτελεί οποιαδήποτε παθολογική ή φυσιολογική κατάσταση.

Στη δεύτερη κατηγορία των άλλων αναβολικών παραγόντων ανήκουν ουσίες, όπως η ζιλπατερόλη, η τιμπολόνη, η ζερανόλη και η κλενβουτερόλη. Πρόκειται δηλαδή για εξωγενείς ουσίες με αναβολικές παρενέργειες. Για παράδειγμα η τιμπολόνη χαρακτηρίζεται από τον συνδυασμό των χαρακτηριστικών των ανδρογόνων, της προγεστερόνης και των οιστρογόνων και ανήκει στη κατηγορία των συνθετικών στεροειδών. Από την άλλη η ζερανόλη παράγεται από μύκητες, οπότε και χαρακτηρίζεται ως μυκητοοιστρογόνο, αλλά με μη στεροειδή μορφή. Τέλος στη χρήση της κλενβουτερόλης στηρίζεται η θεραπεία του άσθματος καθώς αυτή αποτελεί ένα αρκετά αποτελεσματικό βρογχοδιασταλτικό φάρμακο.

Πρόκειται δηλαδή για χημικά συντιθέμενα ανάλογα, των οποίων η προέλευση είναι από τεστοστερόνη, και έχουν τροποποιηθεί με στόχο την ενίσχυση των αναβολικών τους ιδιοτήτων. Σύμφωνα με τον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών για το έτος 2022 υπάρχουν περισσότερα από 50 αναβολικά στεροειδή που θεωρούνται απαγορευμένα για τους αθλητές. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη το 1,6% των γυναικών και το 6,4% των ανδρών έχουν χρησιμοποιήσει κατά τη διάρκεια της ζωής τους αναβολικά στεροειδή. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι κύριες ηλικιακές ομάδες ενδιαφέροντος για τις συγκεκριμένες ουσίες

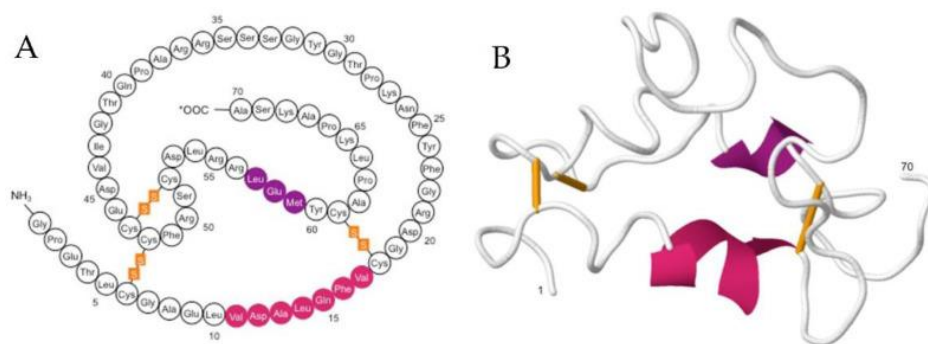
είναι τα νεαρά αγόρια, οι ενήλικες γυναίκες και οι ενήλικες άνδρες. Οι επιδράσεις των ενώσεων που βασίζονται στην τεστοστερόνη είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν την προαγωγή μιας υψηλής ποσότητας αζώτου σε ένα μυ και εν συνεχεία την πρόκληση μιας αναβολικής κατάστασης, η αποτροπή της καταβολικής μυϊκής δέσμμευσης γλυκοκορτικοειδών από τους παράγοντες, η προστασία και διατήρηση της μυϊκής μάζας, η πρόληψη της φθοράς των μυών και η επίδραση στην επιθετικότητα των αθλητών που τους ωθούν στη γυμναστική και στην καταβολή μεγαλύτερης προσπάθειας. Αυξημένη επιθετικότητα, αρρυθμίες, καρδιοτοξικότητα, ανωμαλίες που συνδέονται με το αναπαραγωγικό σύστημα, για παράδειγμα η ελλάτωση των γοναδοτροπικών ορμονών και της σφαιρίνης που είναι υπεύθυνοι για τη δέσμμευση ορμονών του φύλου αποτελούν μερικές από τις πολυάριθμες ανεπιθύμητες επιδράσεις της κατανάλωσης των αναβολικών στεροειδών. Τέλος πάντα υπάρχει ο κίνδυνος από τυχαίας μόλυνσης από αναβολικά στεροειδή από συμπληρώματα διατροφής, τα οποία είτε έχουν προστεθεί σκόπιμα είτε έχουν προστεθεί τυχαία και μπορεί να οδηγήσουν στην καταστροφή της επαγγελματικής σταδιοδρομίας και τον υγιή ανταγωνισμό ανάμεσα στους αθλητές. (3), (4), (5)

Πεπτιδικές Ορμόνες, Αυξητικοί Παράγοντες και Σχετικές Ουσίες, Μιμητές S2

Γενικά οι ορμόνες μπορούν να χαρακτηριστούν ως χημικοί αγγελιοφόροι, οι οποίοι ρυθμίζουν ενδοκρινώς τις λειτουργίες του σώματος και παράγονται είτε από τους ενδοκρινείς αδένες είτε από ενδοκρινικά κύτταρα άλλων οργάνων, όπως νεφροί, καρδιά κ.α. Έτσι λοιπόν τα κύτταρα στόχοι προσλαμβάνουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος τις εκκρίσεις των ανωτέρων κυττάρων και ακολουθεί η πρόσδεση των ορμονών στους υποδοχείς των πρωτεϊνικών κυττάρων. Έπειτα οι ορμόνες είναι ελεύθερες να ασκήσουν η καθεμία την ανάλογη επίδραση. Στον άνθρωπο οι κύριοι ενδοκρινείς αδένες είναι ο θυροειδής αδένας, οι παραθυρεοειδείς αδένες, οι ωθήκες, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, η υπόφυση και το πάγκρεας. Ο υποθάλαμος θεωρείται νευροενδοκρινικό όργανο καθώς αν και ανήκει στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα παράγει και ορμόνες, ενώ αγγειακά συνδέεται άμεσα με τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Πιο συγκεκριμένα η έκκριση της υπόφυσης εξαρτάται από διάφορες ανασταλτικές και εκλυτικές ορμόνες, οι οποίες εκκρίνονται από τα νευρικά κύτταρα του υποθαλάμου μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας. Έτσι λοιπόν χαρακτηρίζουμε ως εκλυτικό παράγοντα ή αλλιώς υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη καθεμία από τις αρχικές ορμόνες του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης.

Ο αδένας του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης εκκρίνει μια πεπτιδική ορμόνη, την ανθρώπινη αυξητική ορμόνη hGH (human Growth Hormone). Η διέγερση της έκκρισης της hGH οφείλεται στην γκρελίνη και στην υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone). Μια ακόμη επίδραση της hGH είναι η ενεργοποίηση της σύνθεσης του αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης IGF-1 (Insouline Growth Factor-1) σε

όλους τους ιστούς, με αποτέλεσμα ο IGF-1 να επιδρά στους διάφορους ιστούς και τελικά να εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος μέσα από το ήπαρ. Η ινσουλίνη, η οποία έχει ουσιαστικό ρόλο στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, των υδατανθράκων, εκκρίνεται στο ενδοκρινές πάγκρεας μέσω των β-κυττάρων των νησιδίων Langerhans και είναι επιτρεπτή στον αθλητισμό μόνο σε εξακριβωμένη περίπτωση αθλητή με ινσουλινο-εξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη. Ο αυξητικός παράγοντας IGF-1 (Σχήμα 2) είναι ο κύριος μεσολαβητής της αυξητικής ορμόνης GH και ουσιαστικά είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από μια αλυσίδα 70 αμινοξέων με 3 δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των αμινοξέων 6-48, 18-61 και 47-52. Οι γέφυρες αυτές συνιστούν την τριτοταγή του δομή, η οποία συμβάλει στην βέλτιστη σύνδεση με τον IGF-1R. Η δομή του είναι παρόμοια με εκείνη της ινσουλίνης, οπότε και έχει την ικανότητα σύνδεσης με τον υποδοχέα ινσουλίνης I-R, αλλά με συγγένεια μικρότερη σε σχέση με τον IGF-1R.



Σχήμα 2 Η δομή του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης IGF-1. (Α) Πρωτογενής δομή που υποδεικνύει την δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των αμινοξέων 6-48, 18-61 και 47-52, (Β) Τρισδιάστατη δομή του IGF-1 που υποδεικνύει την αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας καθώς και τα δευτερογενή στοιχεία ως κορδέλες.

Στην κατηγορία των γοναδοτροπινών ανήκουν η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG (human Corionic Gonadotrophin) και η ωχρινοτρόπος ορμόνη LH (Luteinizing Hormone) και απαγορεύονται μόνο στους άνδρες. Η hCG ανήκει στις γλυκοπρωτεΐνες, η οποία παράγεται σε υψηλές συγκεντρώσεις από τους τροφοβλάστες του πλακούντα και όταν συναντάται στα ούρα και στο πλάσμα αποτελεί μια από τις αρχικές ενδείξεις μιας εγκυμοσύνης και πάνω στην ύπαρξη αυτής της ορμόνης του πλακούντα βασίζονται και τα τεστ εγκυμοσύνης. Τόσο η hCG όσο και η LH διεγείρουν την παραγωγή τεστοστερόνης στους όρχεις των ανδρών και της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στις ωοθήκες των γυναικών. Επομένως παρέχει τη δυνατότητα χρήσης από τους άνδρες αθλητές για αύξηση της παραγωγής της τεστοστερόνης αλλά και για την ομαλοποίηση της παραγωγής τεστοστερόνης από τους όρχεις, η οποία καταστέλλεται λόγω παρατεταμένης χρήσης αναβολικών στεροειδών. Από την άλλη στις γυναίκες αθλήτριες δεν έχει αποδειχθεί η ευεργετική επίδραση της hCG στην απόδοσή τους και θεωρείται εισβολή στην ιδιωτική ζωή μιας εγκύου αθλήτριας. Για το λόγο αυτό η χρήση της hCG θεωρείται παράνομη

στους άνδρες αθλητές και όχι στις γυναίκες. Η έκκριση της ορμόνης hCG σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, αποτελεί καρκινικό δείκτη καθώς αυτή εκκρίνεται από νεοπλασίες. Από την άλλη η LH είναι ο ρυθμιστής των εκκριτικών και των γαμετογενετικών λειτουργιών των ωοθηκών και των όρχεων, καθώς πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τον αδένα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Επίσης η έκκριση της LH ενεργοποιείται μέσω της υποθαλαμικής εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Τα φαρμακευτικά σκευάσματα της hCG είναι πολύ πιο εύκολα διαθέσιμα σε σχέση με αυτά της LH, διότι η hCG έχει πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών GnRH είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της έκκρισης της υποφυσιακής LH και της hCG και διατίθεται ως φαρμακευτικό παρασκεύασμα. Τέλος η GnRH και τα ανάλογα αυτής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση της έκκρισης γοναδοτροπίνης και τεστοστερόνης για σκοπούς ντόπινγκ.

Η έκκριση των στεροειδών ορμονών από τον φλοιό των επινεφριδίων ρυθμίζεται μέσω μιας φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone) της κορτικοτροπίνης, η σύνθεση της οποίας πραγματοποιείται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Σε περιόδους έντονου άγχους, ενεργοποιείται η απελευθέρωση της ACTH μέσω της έκκρισης της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης CRH (Corticotropin Releasing Hormone) από τον υποθάλαμο. Σύμφωνα λοιπόν με τον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών όλες οι ουσίες και παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω ή και ουσίες με παρόμοια δομή και παρενέργειες θεωρούνται απαγορευμένες. (3), (4), (5)

B-2 Αγωνιστές S3

Για την αντιμετώπιση της διάσπασης των βρόγχων από την άθληση και του άσθματος αρκετοί αθλητές καταναλώνουν β2-αγωνιστές. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι β2-αγωνιστές ως φάρμακα έχουν επιδράσεις στη μυϊκή μάζα, ενώ μια συχνότερων παρενεργειών αποτελεί το τρέμουλο των μυών. Σύμφωνα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών για το έτος 2022 περιλαμβάνονται 15 β2-αγωνιστές που απαγορεύονται στο αθλητικό προσωπικό κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Η χρήση της κλενβουτερόλης, η οποία ανήκει στους αναβολικούς παράγοντες, είναι περιορισμένη με κατώτατο όριο απόδοσης στα 0,2 ng/mL. Στους β-2 εκλεκτικούς αγωνιστές των ανδρενεργικών υποδοχέων ανήκουν η τερβουταλίνη και η σαλβουταμόλη, δυο από τα πιο γνωστά βρογχοδιασταλτικά φάρμακα ή διαφορετικά ανακουφιστικά άσθματος. Ο κύριος ρόλος αυτών των φαρμάκων είναι η σταδιακή χαλάρωση και τελικά το άνοιγμα των αεραγωγών/βρόγχων στους πνεύμονες, οι οποίοι κατά τη διάρκεια μιας κρίσης άσθματος στενεύουν. Μάλιστα η εισπνοή της σαλβουταμόλης είναι επίσης επιτρεπτή υπό προϋποθέσεις με όριο συγκέντρωσης κατωφλιού στα 1 μg/mL. Τέλος αναλυτικά οι όροι χρήσης

όλων αυτών των εισπνεόμενων καθορίζονται στον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών. (3), (4), (5)

Ορμονικοί και Μεταβολικοί Ρυθμιστές S4

Διάφορες σημαντικές σωματικές λειτουργίες, για παράδειγμα η μυϊκή ανάπτυξη ή τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, ρυθμίζονται από διάφορα αγγελιοφόρα μόρια που εκκρίνονται από ενδοκρινείς αδένες. Στη συνέχεια είτε οι υποδοχείς στον κυτταρικό πυρήνα είτε οι υποδοχείς στη κυτταρική μεμβράνη δεσμεύουν τις ορμόνες. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι η αναστολή ή η ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων και εν συνεχεία η επιτάχυνση ή η επιβράδυνση συγκεκριμένων αντιδράσεων επηρεάζονται από τους ανταγωνιστές των ορμονών καθώς επίσης και τους ρυθμιστές. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αντίστοιχων ρυθμιστών αποτελούν οι υποδοχείς οιστρογόνων, οι αναστολείς της αρωματάσης, αντιοιστρογονικές ουσίες, μεταβολικοί ρυθμιστές π,χ η τριμεταζιδίνη, καθώς και παράγοντες που μεταβάλλουν την λειτουργία της μυοστατίνης. (3), (4), (5)

Διουρητικά και Παράγοντες Κάλυψης S5

Την πέμπτη θέση με συχνότητας εμφάνισης 6,7%, στη σειρά κατάταξης εμφάνισης κρουσμάτων ντόπινγκ, εμφανίζονται τα διουρητικά και διάφοροι παράγοντες συγκάλυψης. Με εξαίρεση ορισμένα νόμιμα, όλα σχεδόν τα διουρητικά απαγορεύονται τόσο εντός όσο και εκτός των αγώνων. Η αποβολή των υγρών από το σώμα υποβοηθάτε με την χρήση των διουρητικών και τα οποία ενισχύουν την ροή των ούρων έως και κατά 6 λίτρα ημερησίως. Επίσης προκαλούν αύξηση του ρυθμού ούρησης διότι αναστέλλουν μερικώς την επαναρρόφηση του νερού με αποτέλεσμα να προκαλούν απώλεια νερού. Από την άλλη ο περιορισμός ή η απόκρυψη μιας απαγορευμένης ουσίας στα ούρα σε έναν έλεγχο ντόπινγκ υποβοηθάτε με τους παράγοντες συγκάλυψης. Δηλαδή ο σκοπός της χρήσης αυτών των παραγόντων είναι είτε η απόκρυψη είτε η κάλυψη οποιαδήποτε απαγορευμένης ή παράνομης ουσίας στα ούρα του αθλητή. Επειδή με τη χρήση των διουρητικών, όπως είναι φυσικό επόμενο τα ούρα αραιώνονται άρα μειώνεται και η συγκέντρωση έκκρισης της απαγορευμένης ουσίας από τα ούρα γεγονός που καθιστά τα διουρητικά παράγοντα συγκάλυψης. (3), (4), (5)

Χειρισμός του Αίματος και των Συστατικών του M1

Σύμφωνα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων απαγορεύεται η χρήση υπερφθοριομένων χημικών ουσιών καθώς και τροποποιημένων παράγωγων αιμοσφαιρίνης με σκοπό τη τεχνητή ενίσχυση της μεταφοράς, της πρόσληψης και απόδοσης του οξυγόνου. Επίσης απαγορεύεται η αξιοποίηση ομόλογου ή ετερόλογου αίματος καθώς επίσης και παραγώγων ερυθρών αιμοσφαιρίων ανεξαρτήτου προέλευσης. Ο WADA ορίζει ως ντόπινγκ αίματος την

πρακτική χρησιμοποίησης συγκεκριμένων μεθόδων ή/και ουσιών με σκοπό την ενίσχυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα στον οργανισμό να μεταφέρει περισσότερο οξυγόνο σε όλο το σώμα. Πολύ συχνά αθλητές χρησιμοποιούν διάφορες τακτικές αλλά και φάρμακα με στόχο την αύξηση της μάζας της αιμοσφαιρίνης και κατ' επέκταση την ενίσχυση της απόδοσής τους. Έτσι λοιπόν απαγορεύεται ρητά η μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων, η χρήση τεχνητών φορέων οξυγόνου και η έγχυση αιμοσφαιρίνης.

Η αιμοσφαιρίνη εντοπίζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και η κύρια λειτουργία της αποτελεί, σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στους πνεύμονες, την δέσμευση οξυγόνου και έπειτα την μεταφορά και απελευθέρωσή του σε ιστούς (εγκέφαλος, μύες) όπου το οξυγόνο καταναλώνεται. Η αιμοσφαιρίνη συνιστά το 99% της κυτταρικής πρωτεΐνης στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια, γεγονός που συνδέεται με την ανάγκη μεταφοράς οξυγόνου, η οποία οφείλει να στηρίζει την σημαντική κατανάλωση οξυγόνου στους ιστούς. Από την άλλη τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα πιο άφθονα από το σύνολο των κυκλοφορούντων κυττάρων διότι αντιπροσωπεύουν το 99% των κυττάρων που κυκλοφορούν και αντιπροσωπεύουν περίπου το 40-45% του συνολικού όγκου του αίματος. Προκειμένου να καλυφθούν οι τεράστιες ανάγκες μεταφοράς οξυγόνου μετά από άσκηση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη προσαρμογών στην μεταφορά οξυγόνου για να καλυφθεί η μεγάλη ζήτηση. Ο κύριος ρυθμιστής του σχηματισμού των ερυθροκυττάρων είναι η ερυθροποιητίνη Epo και πρόκειται για μια κυκλοφορούσα γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη ορμόνη. Η ενδογενής ερυθροποιητίνη eEpo συντίθεται κυρίως στους νεφρούς, παράγεται επίσης σε χαμηλότερο βαθμό και σε άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος και το ήπαρ και το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι παράγεται σε ποσότητες, οι οποίες αντιστοιχούν στην συγκέντρωση οξυγόνου στο αίμα. Η παραγωγή ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης έγινε πραγματικότητα με την επιτυχή κλωνοποίηση του γονιδίου της ανθρώπινης ερυθροποιητίνης. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και για τη θεραπεία της ανθρώπινης αναιμίας γεγονός το οποίο έδωσε τη δυνατότητα στους ασθενείς να συνεχίσουν τις καθημερινές τους συνήθειες λόγω της αυξημένης ενέργειας. Επειδή όμως η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη έχει τη δυνατότητα ενίσχυσης της παροχής οξυγόνου στους μύες και την ενίσχυση της απόδοσης σε αθλήματα αντοχής (π.χ σκι, τρέξιμο, κολύμβηση) έγινε κατάχρηση της ουσίας αυτής τόσο από αθλητές όσο και από προπονητές για σκοπούς ντόπινγκ. (3), (4), (5)

Χημικός και Φυσικός Χειρισμός M2

Σε ένα έλεγχο ντόπινγκ απαγορεύεται η χρήση τόσο ουσιών όσο και μεθόδων που έχουν ως στόχο την τροποποίηση ή την απόπειρα τροποποίησης των δειγμάτων με απώτερο σκοπό την μεταβολή της ακεραιότητας και της εγκυρότητάς τους. Τόσο ο φυσικός όσο και ο χημικός χειρισμός χρησιμοποιούνται πιο σπάνια σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μεθόδους και πιο

συγκεκριμένα παγκοσμίως χρησιμοποιούνται με συχνότητα 0,1%. Ανάμεσα στα δυο είδη μεθόδων ο φυσικός χειρισμός είναι αυτός που χρησιμοποιείται πιο συχνά. Η αντικατάσταση των ούρων με ούρα άλλου ατόμου ή η μεταβολή αυτών, ο καθετηριασμός καθώς και ενδοφλέβιες εγχύσεις, εκτός και αν αυτό συμβαίνει για ιατρικούς λόγους, αποτελούν ορισμένες από τις χαρακτηριστικές απαγορευμένες μεθόδους χειρισμού. Η χρήση των παραγόντων συγκάλυψης αποτελεί συχνό φαινόμενο τόσο για χημική όσο και για φυσική τροποποίηση των δειγμάτων. Εκείνοι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι η επιτεστοστερόνη και η φιναστερίδη. Ένας ακόμη παράγοντας συγκάλυψης είναι η προβενεσίδη, η οποία καλύπτει την χρήση ουσιών ντόπινγκ και ειδικότερα τη χρήση αναβολικών φαρμάκων με απώτερο σκοπό την καθυστέρηση της εξουδετέρωσής τους. Προκειμένου λοιπόν να προσδιοριστεί η αλλοίωση ενός δείγματος σε ένα έλεγχο ντόπινγκ πραγματοποιείται ανάλυση ενός συνόλου χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των ούρων που έχει ως στόχο την ανίχνευση των παραγόντων συγκάλυψης. (3), (4), (5)

Γονιδιακό Ντόπινγκ M3

Η ανταλλαγή αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε συνδυασμό με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων ή μη-γενετικά τροποποιημένων κυττάρων με σκοπό την ενίσχυση των επιδόσεων των αθλητών ορίζεται ως γονιδιακό ντόπινγκ. Απαγορευμένη θεωρείται η χρήση είτε φυσιολογικών είτε γενετικά τροποποιημένων κυττάρων καθώς επίσης και η μεταφορά πολυμερών νουκλεϊκών οξέων ή αναλόγων νουκλεϊκών οξέων. Πιο αναλυτικά το 1997 μετά από ανακαλύψεις σε εργαστήρια σχετικά με βελτιωμένη μυϊκή απόδοση τρωκτικών με τη βοήθεια γενετικής χειραγώγησης, εκφράστηκε έντονα η ανησυχία ότι κάτι τέτοιο θα μπορούσε να εφαρμοσθεί στους αθλητές και χαρακτηρίστηκε ως γονιδιακό ντόπινγκ. Η κατάχρηση λοιπόν αυτών των τεχνικών γονιδιακής θεραπείας οδήγησε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντιντόπινγκ το 2003 να απαγορεύσει τη μη θεραπευτική χρήση γονιδίων, κυττάρων, γενετικών στοιχείων ή τη τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης με στόχο την ενίσχυση της απόδοσης των αθλητών. Γενικά η γονιδιακή θεραπεία έχει πολλές προοπτικές να θεραπεύσει άρρωστους ανθρώπους και επειδή σε θεωρητικό επίπεδο όλα τα επίπεδα των υπαρχόντων πρωτεϊνών στο ανθρώπινο σώμα μπορούν να μεταβληθούν με τη βοήθεια της γονιδιακής θεραπείας, η σύνδεσή της με τον αθλητισμό είναι αναπόφευκτη καθώς οι πρώτες δοκιμές έγιναν με πρωτεΐνες που σχετίζονται με το ντόπινγκ, όπως η αυξητική ορμόνη και η ερυθροποιητίνη. (3), (4), (5)

1.3.3 Ουσίες που απαγορεύονται μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα

Αλκοόλ P1

Από το 2008 το αλκοόλ ή αλλιώς η αιθανόλη άρχισε να συγκαταλέγεται στον Κατάλογο των Απαγορευμένων Ουσιών. Η ανίχνευση της αιθανόλης γίνεται είτε με ανάλυση δείγματος αίματος είτε με ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα. Αν λοιπόν ανιχνευτεί συγκέντρωση αιθανόλης στο δείγμα μεγαλύτερη από 0,10g/L θεωρείται παράβαση. Πιο αναλυτικά απαγορεύεται η χρήση της στο αυτοκίνητο, το μοτοσυκλετισμό, την λεμβοδρομία ισχύος, την αερονautική και την τοξοβολία, δηλαδή δεν απαγορεύεται σε όλα τα αθλήματα. Η κατανάλωση αλκοόλ λειτουργεί κατασταλτικά για το κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς επιβραδύνει τις λειτουργίες τόσο του εγκεφάλου όσο και του σώματος. Επομένως η κατανάλωση αλκοόλ προτιμάται σε αθλήματα που απαιτούν αυξημένη συγκέντρωση, όπως για παράδειγμα είναι η τοξοβολία, διότι το αλκοόλ περιορίζει την υπερκινητικότητα καθώς και τη νευρική δραστηριότητα και έχει ως στόχο την χαλάρωση. Από την άλλη η κατανάλωση αλκοόλ συνδυαστικά με άλλες ουσίες μπορεί να υπερτονίσει τόσο την επίδραση του αλκοόλ όσο και των άλλων ουσιών που μπορεί να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα. Επίσης η κατανάλωση αλκοόλ είναι αρκετά επιζήμια για τη φυσική κατάσταση του αθλητή. Επομένως σε όλα εκείνα τα αθλήματα, όπως για παράδειγμα είναι εκείνα του μηχανοκίνητου αθλητισμού, όπου η κατανάλωση του αλκοόλ μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα στην απόδοση του αθλητή αλλά και να είναι επικίνδυνη για την ασφάλειά του, απαγορεύεται η κατανάλωση αλκοόλ. (3), (4), (5)

Β-αναστολείς P2

Η χρήση των β-αναστολέων απαγορεύεται μόνο εντός των παρακάτω αγώνων που είναι οι εξής: σκι, γκολφ, σκοποβολή, χιονοσανίδα, υποθαλάσσια σπορ, μπιλιάρδο, βελάκια, αυτοκίνητο καθώς και τοξοβολία. Η χρήση των β-αναστολέων έχει ως στόχο την επιβράδυνση των ρυθμών της καρδιάς, επομένως τα συναντάμε σε αθλήματα που στηρίζονται στην συγκέντρωση του αθλητή διότι απαιτούν ακριβείς και πολύ προσεχτικές κινήσεις. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι β-αναστολείς είναι η ναδολόλη, η προπανολόλη, η λαβεταλόλη, η κελιπρολόλη, η καρτεολόλη και η ατενολόλη. Επίσης η χρήση των συμπληρωμάτων διατροφής είναι αρκετά δημοφιλής, όχι μόνο από αθλητές. Ουσιαστικά πρόκειται για ουσίες, οι οποίες υπάρχουν φυσιολογικά στο ανθρώπινο σώμα και τις οποίες τις καταναλώνουμε επιπρόσθετα μέσω της καθημερινής μας διατροφής. Δηλαδή από τη μια πλευρά η κατανάλωση των συμπληρωμάτων αυτών είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ενός οργανισμού, όπως είναι ο άνθρωπος και η επιπρόσθετη λήψη τους αφορά ανθρώπους που βρίσκονται είτε σε υποσιτισμό είτε έχουν κάποια ασθένεια. Η κατανάλωση λοιπόν αυτών έχει ως στόχο την προάσπιση της υγείας, τον περιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης κάποιας ασθένειας καθώς και την βελτίωση της φυσικής κατάστασης του αθλητή. Επειδή το εύρος

των συμπληρωμάτων διατροφής είναι τεράστιο δεν έχει διευκρινιστεί ποιο είναι το όριο ανάμεσα στην συνιστώμενη και ποιο στην εσφαλμένη χρήση αυτών. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος της χρήσης συμπληρωμάτων διατροφής είναι αρχικά ο εντοπισμός θετικού δείγματος σε έλεγχο ντόπινγκ αλλά και ο κίνδυνος που ελλοχεύει από τη χρήση ακατάλληλων συμπληρωμάτων, χωρίς οι αθλητές να γνωρίζουν τις συνιστώμενες ποσότητες πρόσληψης καθώς και τις παρενέργειες αυτών. (3), (4), (5)

2. Anti-doping

2.1 Ορισμός Anti-doping

Η κοινότητα κατά του doping (anti-doping) αντιμετωπίζει το ντόπινγκ ως απάτη και παραβίαση του αθλητικού ιδεώδους. Τέτοια περιστατικά είναι καταγεγραμμένα στην αθλητική από τους αρχαίους Ολυμπιακούς Αγώνες, ενώ από τον περασμένο μόλις αιώνα έχει ξεκινήσει ένα κύμα ευαισθητοποίησης ως προς την επικράτηση του ντόπινγκ στον αθλητισμό καθώς επίσης και τους κινδύνους στην υγεία που μπορεί να προκαλέσει. Το κίνημα κατά του ντόπινγκ έχει καταφέρει σήμερα να διεξάγονται σχεδόν σε όλες τις χώρες έλεγχοι ντόπινγκ, αλλά επίσης εκπαιδευσε αθλητές και φορείς του αθλητισμού σχετικά με τα προβλήματα που μπορεί να προκαλέσει. Βέβαια επειδή οι αθλητές διαρκώς ανακαλύπτουν νέους τρόπους ντόπινγκ είναι πλέον αναγκαία η συστηματική και ενισχυμένη εκπαίδευση και αποτροπή του ντόπινγκ στο χώρο του αθλητισμού.

Πιο αναλυτικά η λέξη ντόπινγκ έχει τις ρίζες της στην ολλανδική λέξη dop, που ήταν η φλούδα σταφυλιών από την οποία παρασκεύαζαν κρασί οι αθλητές Ζουλού για να ενθαρρύνονται κατά τη διάρκεια της μάχης. Αρκετές ιστορικές πηγές αναφέρουν ότι οι αθλητές των αρχαίων Ολυμπιακών Αγώνων προκειμένου να βελτιώσουν την απόδοσή τους κατανάλωναν ωμούς όρχεις ζώων και έπιναν ποτίσματα. Φυσικά η τεχνική της χρήσης φαρμάκων με στόχο την βελτίωση της αθλητικής απόδοσης συνεχίστηκε και στους πρώιμους Ολυμπιακούς Αγώνες, με το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό του νικητή μαραθωνοδρόμου Thomas Hicks, ο οποίος το 1904 λίγο έλειψε να χάσει τη ζωή του μετά από κατανάλωση κονιάκ με στρυχνίνη. Η μέθοδος αυτή της χρήσης φαρμάκων συνεχίστηκε έντονα τα επόμενα 20 χρόνια, κυρίως με τη χρήση διάφορων διεγερτικών ουσιών όπως η κοκαΐνη και η στρυχνίνη, αλλά και ηρωίνης. Έτσι λοιπόν το 1928 με αφορμή την εκτεταμένη χρήση φαρμάκων στο χώρο του αθλητισμού σε συνδυασμό με την ολοένα και μεγαλύτερη αναγνώριση των κινδύνων και των προβλημάτων που προκαλούσαν τα φάρμακα αυτά στην υγεία, η Διεθνής Ένωση Αθλητικών Ομοσπονδιών (IAAF) απαγόρευσε για πρώτη φορά το ντόπινγκ. Ο έλεγχος αντιντόπινγκ ξεκίνησε στα ιπποειδή στις αρχές της δεκαετίας του 1900. Ακολουθούν δυο σημαντικά που συνοδεύονταν με θανάτους αθλητών, το 1960 στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Ρώμης έχασαν τη ζωή τους ποδηλάτες εξαιτίας των αμφεταμινών και το 1967 ακολουθούν θάνατοι επίσης ποδηλάτων στον Γύρο της Γαλλίας. Μάλιστα το 1960 η Διεθνής

Ένωση Ποδηλασίας είχε εισάγει για πρώτη φορά τον έλεγχο αντντόπινγκ σε ανθρώπους αθλητές. Όλα τα παραπάνω γεγονότα συνέβαλλαν στο γεγονός ότι στους Ολυμπιακούς Αγώνες το 1968 η Ολυμπιακή Επιτροπή εισάγει τον έλεγχο ντόπινγκ στους αθλητές, τότε μόνο για τη χρήση διεγερτικών ουσιών. Ομοίως το 1966 στο Παγκόσμιο Κύπελλο διενεργήθηκαν για πρώτη φορά έλεγχοι σε ποδοσφαιριστές από τη Διεθνή Ομοσπονδία Ποδοσφαιρικών Σωματείων.

Το 1967 έλαβε χώρα η πρώτη συντονισμένη προσπάθεια αντιμετώπισης της χρήσης ουσιών στο χώρο του αθλητισμού με την Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ) να παρουσιάζει τον πρώτο Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών. Ο πρώτος εκείνος Κατάλογος δεν περιείχε ούτε αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή ούτε αναβολικά στεροειδή. Τα στεροειδή απαγορεύτηκαν το 1974 από την Διεθνή Ένωση Ομοσπονδιών Κλασσικού Αθλητισμού (International Association of Athletics Federation) IAAF στο Ευρωπαϊκό Πρωτάθλημα Στίβου στην Ρώμη. Αυτό συνέβη με τη βοήθεια μιας ανάλυσης ανοσοπροσδιορισμού, η οποία το 1976 στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μόντρεαλ βοήθησε στο να εντοπιστούν οκτώ θετικά κρούσματα. Σήμερα η χρήση των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών AAS βρίσκεται στη κορυφή των πιο συχνών παραβάσεων στο χώρο του αθλητισμού. Μέχρι το 2004 που ανέλαβε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Anti-doping (World Ant-Doping Agency) WADA τη διαχείριση του Καταλόγου Απαγορευμένων Ουσιών, η προσθήκη οποιασδήποτε ουσίας στον Κατάλογο πραγματοποιούνταν χωρίς καμία διαβούλευση. Σε περίπτωση λοιπόν θετικού αποτελέσματος, οι αθλητές αμφισβητούσαν διαρκώς την εργαστηριακή διαδικασία είτε λόγω ανάμειξης δειγμάτων (τα οποία συνήθως ήταν ούρα) είτε λόγω χρήσης λανθασμένων αναλυτικών τεχνικών από τα εργαστήρια. Προκειμένου λοιπόν να εξασφαλισθούν η ασφάλεια και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, ήταν αναγκαία η θέσπιση αυστηρών εργαστηριακών πρωτοκόλλων, ανεξάρτητα από αυτά που υπήρχαν ήδη στα εργαστήρια. Στα τέλη λοιπόν του 1970 καθιερώθηκε το σύνολο των οδηγιών που θα πρέπει να ακολουθούν τα εργαστήρια που διενεργούν τον έλεγχο ντόπινγκ και μόνο τα συγκεκριμένα εργαστήρια που θα λάβουν τη δεδομένη διαπίστευση θα διενεργούν τέτοιου είδους ελέγχους. Το 1986 η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή ενθάρρυνε το σύνολο των οργανισμών να συνεργάζονται μόνο με τα διαπιστευμένα εργαστήρια. Από το 2004 την ευθύνη αυτή έχει αναλάβει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Anti-doping WADA.

Το Παγκόσμιο πρόγραμμα αντντόπινγκ περιλαμβάνει το σύνολο των κανόνων που έχουν ως κύριο στόχο τόσο την τέλεια εναρμόνιση όσο και υλοποίηση των παγκόσμιων και εθνικών προγραμμάτων αντντόπινγκ και διακρίνεται σε τρεις βασικούς πυλώνες. Αυτοί είναι αρχικά ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντντόπινγκ, ο οποίος συνιστά το θεμέλιο του Παγκόσμιου προγράμματος αντντόπινγκ διότι καθορίζει το πλαίσιο αρμονικής σύμπραξης των κανονισμών, των ρυθμίσεων και των πρακτικών ανάμεσα τους δημόσιους φορείς και στο αντντόπινγκ στους αθλητικούς οργανισμούς. Ακολουθούν οι Οδηγίες Βέλτιστης Πρακτικής, οι οποίες δεν είναι υποχρεωτικές

αλλά συνίστανται και η υλοποίησή τους είναι προαιρετική. Τέλος ο τρίτος πυλώνας είναι τα Διεθνή πρότυπα, τα οποία αποτελούνται από έξι κείμενα που δημοσιεύει ο WADA, τα οποία είναι: 1) ο Κατάλογος των Απαγορευμένων Ουσιών, βάσει του οποίου καθορίζονται οι απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι αλλά και οι απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι εντός και εκτός των αγώνων, 2) το Διεθνές Πρότυπο για τα εργαστήρια τα οποία είναι διαπιστευμένα από τον WAD. Αυτό έχει ως στόχο την εξαγωγή τόσο ομοιόμορφων όσο και αξιόπιστων αποτελεσμάτων από το σύνολο των δεδομένων εργαστηρίων ανά τον κόσμο. Περιλαμβάνει επίσης τις προδιαγραφές λειτουργίας των εργαστηρίων, την διαδικασία που απαιτείται για να λάβει το εργαστήριο τη διαπίστευση αλλά και όλα τις απαραίτητες ενέργειες που είναι υποχρεωτικές για την απόκτηση και τη διατήρηση της διαπίστευσης, 3) το Διεθνές Πρότυπο για τους Ελέγχους, που περιέχει τη διαδικασία προγραμματισμού των ελέγχων, 4) το Διεθνές Πρότυπο για την προστασία των προσωπικών δεδομένων, κατά τη διάρκεια της συλλογής και διαχείρισης των προσωπικών δεδομένων του αθλητή, που στοχεύει στη διασφάλιση και τήρηση όλων των απαραίτητων προφυλάξεων από τους αρμόδιους φορείς στο αντιντόπινγκ, 5) το Διεθνές Πρότυπο για την εναρμόνιση των υπογραφόντων μερών με τον Κώδικα, που έχει ως στόχο τη διασφάλιση της εφαρμογής των κανόνων καταπολέμησης του ντόπινγκ με όμοιο και δραστικό τρόπο σε όλα τα αθλήματα και σε όλες τις χώρες. Κάτι τέτοιο είναι απαραίτητο ώστε να εξασφαλιστεί η εμπιστοσύνη του κοινού στην δικαιοσύνη που αντιπροσωπεύει το αθλητικό ιδεώδες αλλά και να διασφαλιστεί στους «σωστούς» αθλητές η ύπαρξη ισότιμου ανταγωνισμού και 6) το Διεθνές Πρότυπο για τις εξαιρέσεις χρήσης για θεραπευτικούς σκοπούς και εξασφαλίζει την διαφύλαξη της ισορροπίας στην χορήγηση εξαιρέσεων μεταξύ διαφορετικών χωρών και αθλημάτων. Επομένως όλες εκείνες οι αλλαγές που σχετίζονται με αναλύσεις δειγμάτων και εκτίμηση αποτελεσμάτων, αλλαγές στις διαδικασίες ελέγχου καθώς επίσης και αλλαγές στις λειτουργίες διαπίστευσης εργαστηρίων και λειτουργίας αυτών ανανεώνονται είτε κάθε χρόνο είτε ανά τακτά χρονικά διαστήματα από τον WADA. (1) , (2)

2.2 Επιτροπές ελέγχου και καταπολέμησης του doping

2.2.1 Παγκόσμιος Οργανισμός Anti-doping WADA

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Anti-doping WADA αποτελεί έναν ανεξάρτητο διεθνή οργανισμό, ο οποίος χρηματοδοτείται τόσο από τις κυβερνήσεις ανά τον κόσμο όσο και από αθλητικές ομοσπονδίες συμπεριλαμβανομένου της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής. Η ιδέα του WADA προέκυψε για τέσσερις λόγους: α) η εκτεταμένη χρήση των διάφορων αναβολικών ουσιών και ειδικά των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών AAS επεκτάθηκε και εκτός του αθλητικού στίβου. Αυτό είχε αρνητικό αντίκτυπο στην κοινωνία καθώς η πρόσληψη των AAS προκαλεί σταδιακά διάφορα προβλήματα υγείας, β) Η ύπαρξη όλο ένα και περισσότερων προς αμφισβήτηση

υποθέσεων ντόπινγκ στα δικαστήρια, εξαιτίας του γεγονότος ότι υπήρχαν διαφορετικοί εθνικοί αλλά και διεθνείς οργανισμοί με διαφορετικούς κανόνες. Ήταν λοιπόν αναγκαία η εναρμόνιση των κανόνων αντιντόπινγκ, γ) Η συνεχής κυκλοφορία νέων αναλυτικών μεθόδων αλλά και φαρμακευτικών ουσιών κατέστησε αναγκαία την ύπαρξη διαρκούς έρευνας στον κλάδο της φαρμακευτικής βιομηχανίας. Φυσικά όλες αυτές οι μέθοδοι έπρεπε να είναι γνωστές καθώς συνεχώς κυκλοφορούν στην αγορά νέες φαρμακευτικές ουσίες και μέθοδοι και 4) Η ανάγκη ύπαρξης ενός ελεγκτικού οργάνου ή φορέα που θα ελέγχει όλες τις ενέργειες αντιντόπινγκ τόσο σε διεθνές όσο και σε εθνικό επίπεδο, καθώς επίσης και η προώθηση όλων αυτών των ενεργειών προκειμένου να γίνουν γνωστές.

Ουσιαστικά επειδή η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή αντιλήφθηκε ότι δε μπορεί να καλύψει όλα τα παραπάνω χρειαζόταν την στήριξη των διαφόρων κυβερνήσεων. Έτσι λοιπόν η κοινή προσπάθεια ανάμεσα στις δημόσιες αρχές και στη ΔΟΕ οδήγησε το 1999 στην ίδρυση του WADA. Μάλιστα από το 2007 και μετά θεσπίστηκε σύμβαση της UNESCO με την οποία τόσο ο Κώδικας όσο και το σύνολο των δραστηριοτήτων του WADA έχουν την υποστήριξη των κυβερνήσεων, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δε παρέχεται η δυνατότητα αυτά να τροποποιούνται διαρκώς. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο WADA από την ίδρυση του έως το 2007 είχε ξοδέψει 31,4 εκατομμύρια USD σε διάφορα ερευνητικά έργα, ενώ το 26% του προϋπολογισμού του αφορά στην έρευνα. Αυτή η χρηματοδότηση έχει ως στόχο να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι αλλά και να βελτιωθούν οι υπάρχουσες μέθοδοι εντοπισμού ντόπινγκ. Μάλιστα ο κώδικας WADA έχει υπογραφεί από τις περισσότερες χώρες και από την πλειονότητα των αθλητικών συνδέσμων. Το 2013 ο WADA έφτασε να εποπτεύει 630 αθλητικούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων όλες τις ομοσπονδίες όλων των Ολυμπιακών αθλημάτων, την Ολυμπιακή επιτροπή και την Παραολυμπιακή επιτροπή.

Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι οι βασικοί πυλώνες του WADA στη μάχη κατά του ντόπινγκ είναι οι έλεγχοι ντόπινγκ, η ενημέρωση, η εκπαίδευση και η έρευνα. Ο κώδικας του WADA αντιτίθεται στην κατανάλωση φαρμάκων και ναρκωτικών στον αθλητισμό, επικροτεί και επιβραβεύει τους ίσους όρους ανταγωνισμού μεταξύ των αθλητών, ιδρύει προγράμματα διεθνών προδιαγραφών κατά του ντόπινγκ και ενημερώνει τους αθλητές σχετικά με τους κινδύνους που επιφυλάσσει η εμπλοκή με το ντόπινγκ. Στόχος λοιπόν του WADA σε περίπτωση θετικού ελέγχου είναι η επιβολή αυστηρών κυρώσεων και τιμωριών με στόχο τον παραδειγματισμό των εκάστοτε αθλητών. Ο Κατάλογος των Απαγορευμένων Ουσιών δημοσιεύεται από τον WADA κάθε 1^η Οκτωβρίου του εκάστοτε έτους, με τον ετήσιο επικαιροποιημένο πίνακα να τίθεται σε ισχύ την 1^η Ιανουαρίου του έτους. Αυτός ο Κατάλογος περιλαμβάνει τις ουσίες που είναι πάντα απαγορευμένες αλλά και εκείνες που απαγορεύονται μόνος εντός των αγώνων, καθώς επίσης και τις ουσίες που είναι απαγορευμένες μόνο σε συγκεκριμένα αθλήματα.

Σε περίπτωση θετικού ελέγχου ντόπινγκ και δεδομένου των σοβαρών επιπτώσεων τόσο με κοινωνικό όσο και οικονομικό αντίκτυπο για τον ίδιο τον αθλητή, του δίνεται η δυνατότητα απολογίας. Αυτό πραγματοποιείται μέσω μιας δίκαιης, αμερόληπτης, διαφανούς και ανεξάρτητης διαδικασίας. Κάθε οργανισμός που αναλαμβάνει την ακρόαση τέτοιων υποθέσεων θα πρέπει να είναι σύμφωνος με τη διαχείριση κινδύνων της ασφάλειας των πληροφοριών (Information Security Risk Management) ISRM και να λειτουργεί σύμφωνα με τις παρακάτω αρχές: 1) Η διαδικασία ακρόασης θα πρέπει να είναι οικονομικά προσιτή και προσβάσιμη, 2) Η διαδικασία της ακρόασης θα πρέπει να λάβει χώρα εντός λογικού χρονικού διαστήματος, 3) Η επιτροπή της ακρόασης θα πρέπει καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας να παραμένει αμερόληπτη, δίκαιη καθώς και λειτουργικά ανεξάρτητη, 4) Να γίνεται σεβαστό το δικαίωμα του αθλητή να ζητήσει δημόσια ακρόαση και 5) Να γίνονται σεβαστά τα παρακάτω δικαιώματα, όπως η εκπροσώπηση του αθλητή από δικηγόρο με δική του οικονομική επιβάρυνση, η πρόσβαση και η παρουσίαση αποδεικτικών στοιχείων, η υποβολή γραπτών αλλά και προφορικών παρατηρήσεων, η έγκαιρη ενημέρωση του αθλητή σχετικά με τις παραβιάσεις ντόπινγκ για τις οποίες κατηγορείται, η κλήση και η εξέταση μαρτύρων καθώς και η πρόσληψη διερμηνέα κατά την ακρόαση με έξοδα του αθλητή. Επομένως ως κεντρικό της δόγμα το δικαίωμα της αμερόληπτης απόφασης και το δικαίωμα της δίκαιης ακρόασης. (1), (2)

2.2.2 Οργανισμός Anti-doping των Ηνωμένων Πολιτειών USADA

Ο Οργανισμός Anti-doping των Ηνωμένων Πολιτειών USADA συνεργάζεται με τον WADA και είναι υπεύθυνος για την τήρηση του παγκόσμιου Κώδικα Anti-Doping στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Ο USADA ιδρύθηκε τον Οκτώβριο του 2000, σύμφωνα με τις συστάσεις της Αμερικανικής Ολυμπιακής Επιτροπής, για να προάγει το δίκαιο παιχνίδι και να διασφαλίσει την ορθή επιλογή των Αμερικανών αθλητών που προορίζονται για διεθνείς αγώνες. Το φάσμα των εργασιών επομένως του USADA είναι η θέσπιση ενός εθνικού αμερικανικού προγράμματος αντιντόπινγκ για την εκπαίδευση, τον έλεγχο και την εγκαθίδρυση των όρων και αφορούν όλες τις διαδικασίες που συνδέονται με τη χώρα και την πρόκριση αθλητών σε αγώνες. Πιο αναλυτικά ένας από τους ρόλους του USADA είναι η εκπόνηση προγραμμάτων με στόχο την εκπαίδευση σε σχέση με τους κινδύνους που εγκυμονεί ντόπινγκ και αφορά τους αθλητές, τους εκπαιδευτές, τους προπονητές και όλου του προσωπικού που πλαισιώνει τον αθλητή για να του παρέχει ιατροφαρμακευτική περίθαλψη. Ο USADA επίσης διεξάγει ελέγχους σε Αμερικανούς αθλητές που είναι εγγεγραμμένοι στις εθνικές λίστες για παράδειγμα των Ολυμπιακών Αγώνων, των Παραολυμπιακών και των Παναμερικανικών αγώνων. Στην Αμερική όλες οι διεθνείς ομοσπονδίες λειτουργούν ως αρχές αντιντόπινγκ για τα εκάστοτε αθλήματα τους, π.χ κατά την διάρκεια παγκοσμίου πρωταθλήματος και παγκοσμίου κυπέλλου κωπηλασίας η διεθνής ομοσπονδία κωπηλασίας λειτουργεί ως αρχή αντιντόπινγκ. Αυτό φυσικά είναι εφικτό συνεργατικά τόσο με τον

WADA όσο και με τους εκάστοτε περιφερειακούς και εθνικούς οργανισμούς αντιντόπινγκ. Αντίστοιχα δηλαδή κατά την διάρκεια των Ολυμπιακών Αγώνων η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή δρα ως αρχή αντιντόπινγκ.

Ο USADA χρησιμοποιεί τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών της WADA, θέτοντας τον σε ισχύ από την 1^η Ιανουαρίου του εκάστοτε έτους. Οι ουσίες που απαγορεύονται τόσο στον WADA όσο και στον USADA βασίζονται σε τρία κριτήρια. Πρώτον, είναι η δυνατότητα βελτίωσης της απόδοσης του αθλητή. Δεύτερον, η ύπαρξη πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου υγείας του αθλητή. Τρίτον, το κατά πόσον παραβιάζει το πνεύμα του αθλητικού ιδεώδους. Τέλος, σύμφωνα με τον USADA ο έλεγχος ενός αθλητή μπορεί να διεξαχθεί ανά πάσα χρονική στιγμή σε οποιαδήποτε εθνική ή διεθνή διοργάνωση. Δηλαδή ο έλεγχος ντόπινγκ σε διεθνείς οργανώσεις ο έλεγχος ντόπινγκ οργανώνεται από τη διεθνή ομοσπονδία και αντίστοιχα σε εθνικές διοργανώσεις ο έλεγχος ντόπινγκ οργανώνεται από την εθνική ομοσπονδία. Φυσικά ο WADA παραμένει πάντα ο κεντρικός πυλώνας όλων των ελέγχων. (1), (2)

3. Μηχανισμοί δράσης ουσιών doping

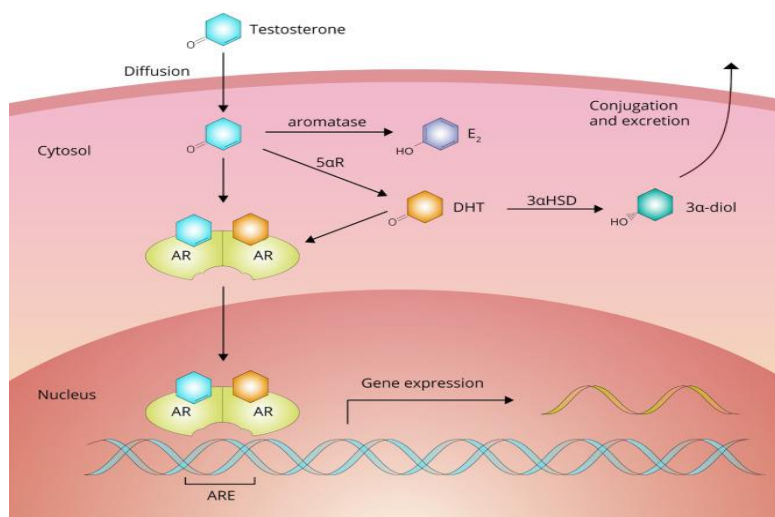
3.1 Μηχανισμός δράσης Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή AAS

Τα AAS απορροφούνται στην κυκλοφορία του αίματος, είτε μέσω λήψης από το στόμα είτε με ενδομυϊκή ένεση, όπου στη συνέχεια μεταφέρονται στους ιστούς για να βρεθούν τελικά στο εξ αγγειακό διαμέρισμα και τελικά να διαχυθούν στα κύτταρα-στόχους. Στο εσωτερικό αυτών των κυττάρων λαμβάνει χώρα ο βιοσχηματισμός των AAS σε διάφορους μεταβολίτες ή εναλλακτικά προκύπτει η σύνδεσή τους με τον υποδοχέα ανδρογόνων. Οι επιπτώσεις των AAS και των μεταβολιτών αυτών ποικίλλουν και ανάμεσά τους είναι η υπέρταση, η ακμή, η ηπατοτοξικότητα, η ανεπάρκεια τεστοστερόνης, η στυτική δυσλειτουργία, η καρδιομυοπάθεια και δυσλιπιδαιμία.

Αφού γίνει η είσοδος των AAS στη συστηματική κυκλοφορία ακολουθεί η μεταφορά τους ιστούς όντας συνδεδεμένα με δεσμευτικές πρωτεΐνες όπως είναι η αλβουμίνη, με σφαιρίνη που δεσμεύει κορτικοστεροειδή (CBG), με δεσμευτικές ορμόνες του φύλου σφαιρίνης (SHBG) και οροσομουκοειδές. Φυσιολογικά η τεστοστερόνη δεσμεύεται κυρίως στην αλβουμίνη και την SHBG, ενώ η εναπομένουσα κυκλοφορούσα τεστοστερόνη που δεν δεσμεύεται είναι της τάξης του 1 έως 4%. Από τη μια η αλβουμίνη δεσμεύει τη τεστοστερόνη με χαμηλή συγγένεια αλλά με απεριόριστη ικανότητα δέσμευσης και από την άλλη η SHBG δεσμεύει τη τεστοστερόνη με υψηλή συγγένεια αλλά χαμηλή ικανότητα δέσμευσης. Η SHBG συναντάται στην κυκλοφορία του αίματος, όπου κάθε μονομερές της διαθέτει μια θέση δέσμευσης στεροειδών και υπό φυσιολογικές συνθήκες το ένα τρίτο των θέσεων καταλαμβάνεται από τεστοστερόνη. Η επιπλέον κατάληψη των θέσεων από άλλα στεροειδή έχει ως αποτέλεσμα το 44% των θέσεων της SHBG να παραμένουν αδέσμευτες. Όταν τα φυσιολογικά επίπεδα της SHBG κυμαίνονται από 10 έως 56 nmol/L

αντιλαμβανόμαστε ότι οι υπερφυσιολογικές δόσεις τεστοστερόνης μειώνουν δραστικά τα επίπεδα της κυκλοφορούσας SHBG καθώς επίσης κορένουν τη δεσμευτική της ικανότητα. Δηλαδή οι αυξανόμενες δόσεις τεστοστερόνης οδηγούν σε μεγαλύτερο ποσοστό τεστοστερόνης δεσμευμένης σε λευκώματα. Η ανδρογονική ανεπάρκεια παρουσία φυσιολογικών επιπέδων τεστοστερόνης έχει συνδεθεί με χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης, ενώ αντίστοιχα τα επίπεδα της φυσιολογικής ελεύθερης χοληστερόλης δεν συσχετίζονται με συμπτώματα ανδρογονικής ανεπάρκειας παρουσία χαμηλών επιπέδων ολικής χοληστερόλης. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν, αν και δεν είναι υπεύθυνο για όλες τις επιπτώσεις, το αδέσμευτο κλάσμα τεστοστερόνης αποτελεί σημαντικότερο ερέθισμα της ανδρογονικής ανεπάρκειας σε σύγκριση με την ολική τεστοστερόνη.

Τα AAS έχοντας διασχίσει την πλασματική μεμβράνη έπειτα είναι διαθέσιμα είτε υφίστανται βιοσχηματισμό είτε γίνεται σύνδεση με τον υποδοχέα ανδρογόνων AR (Σχήμα 3). Ο βιοσχηματισμός επομένως μπορεί να οδηγήσει είτε σε ένα ισχυρότερο ανδρογόνο, είτε σε ένα λιγότερο ισχυρό ή ακόμα και ανενεργό μεταβολίτη και είτε σε οιστρογόνο. Η βιοενεργοποίηση της τεστοστερόνης λαμβάνει χώρα ιστούς που εκφράζουν ένζυμα της οικογένειας της 5 α -αναγωγάσης και οδηγεί σε ένα ισχυρό ανδρογόνο. Από τη συγκεκριμένη αντίδραση με την τεστοστερόνη ως υπόστρωμα προκύπτει το ισχυρότερο φυσικό ανδρογόνο η διυδροτεστοστερόνη DHT. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις στους ενήλικες εκφράζονται στο ήπαρ, το δέρμα, στο πάγκρεας, στον εγκέφαλο, στους όρχεις και στους νεφρούς. Η μετατροπή της τεστοστερόνης σε DHT, δηλαδή η βιοενεργοποίηση της σε ένα ισχυρότερο ανδρογόνο, δεν συμβαίνει σε κανένα άλλο από τα γνωστά AAS.



Σχήμα 3 Η διαδρομή της τεστοστερόνης από την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση. Στο εσωτερικό του κυττάρου, είτε γίνεται άμεση σύνδεση με τον υποδοχέα ανδρογόνων AR με σκοπό την επιρροή της έκφρασης του γονιδίου, είτε έχουμε βιοενεργοποίηση σε διυδροτεστοστερόνη DHT από της οικογένειας 5 α R-αναγωγάσης 5 α R ή σε οιστραδιόλη E2 από την αρωματάση.

Η βιοενεργοποίηση των AAS λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, στους νεφρούς και σε άλλους ευαίσθητους στα ανδρογόνα ιστούς και υφίστανται μεταβολισμό τόσο φάσης I όσο και φάσης II. Κατά τον μεταβολισμό της φάσης I, γίνεται μείωση στους άνθρακες 3 και 5 του δακτυλίου A και οξείδωση του υδροξυλίου στον άνθρακα 17 του δακτυλίου D του πυρήνα των στεροειδών. Η βιοενεργοποίηση σε οιστρογόνο μπορεί να πραγματοποιηθεί με τα AAS που αποτελούν α-υπόστρωμα του ενζύμου αρωματάση. Η συγκεκριμένη οδός σχετίζεται αρκετά με την τεστοστερόνη που τελικά οδηγεί στην παραγωγή 17b-οιστραδιόλης, καθώς τα περισσότερα AAS είτε μετατρέπονται με χαμηλότερους ρυθμούς είτε δεν αποτελούν υπόστρωμα για το ένζυμο αρωματάση.

Όταν είναι αδέσμευτος ο υποδοχέας των ανδρογόνων AR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα μαζί με πρωτεΐνες συνοδούς. Έτσι λοιπόν η πρόσδεση του συνδέτη οδηγεί σε ένα καταρράκτη γεγονότων, το οποίο τελικά καταλήγει στο να μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα το σύμπλοκο AR-συνδέτη, να διασπάται η σχετική συνοδός πρωτεϊνών και τελικά να σχηματίζεται ένα ομοδιμερές. Αυτό επιτρέπει τη δέσμευση στα στοιχεία απόκρισης των ανδρογόνων AREs που εντοπίζονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων των ανδρογόνων. Γενικά το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει χιλιάδες θέσεις πρόσδεσης AR και η πρόσδεση σε αυτές τις θέσεις είναι εκείνη που ρυθμίζει την γονιδιακή μεταγραφή και κατ' επέκταση ασκεί τις διάφορες επιδράσεις. Υπάρχουν όμως και μη-γονιδιακές επιδράσεις που είναι ακόμα ασαφείς, οι οποίες φαίνονται να μεσολαβούνται από κάποιον υποδοχέα που δεν είναι όμως ο AR. Ένας τέτοιος υποδοχέας είναι ο συζευγμένος υποδοχέας G-πρωτεΐνη GPRC6A. Ωστόσο αρκετά σαφείς είναι οι συνολικές κλινικές επιδράσεις, με τη κυριότερη επίδραση να αποτελεί η αύξηση της μυϊκής ανάπτυξης που επιδιώκεται μέσω της χρήσης των AAS. Αυτό αποδείχθηκε το 1996 μέσα από μια τυχαία αλλά ελεγχόμενη δοκιμή από τους Bhasin. Η δοκιμή αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση τεστοστερόνης σε δόσεις ανωτέρων του φυσιολογικού (έως 600mg τεστοστερόνη εβδομαδιαία) ήταν αποτελεσματική στην αύξηση τόσο του μυϊκού μεγέθους όσο και της δύναμης σε υγιείς άνδρες με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και ειδικότερα όταν συνδυάζεται με προπόνηση δύναμης. (6), (7), (8)

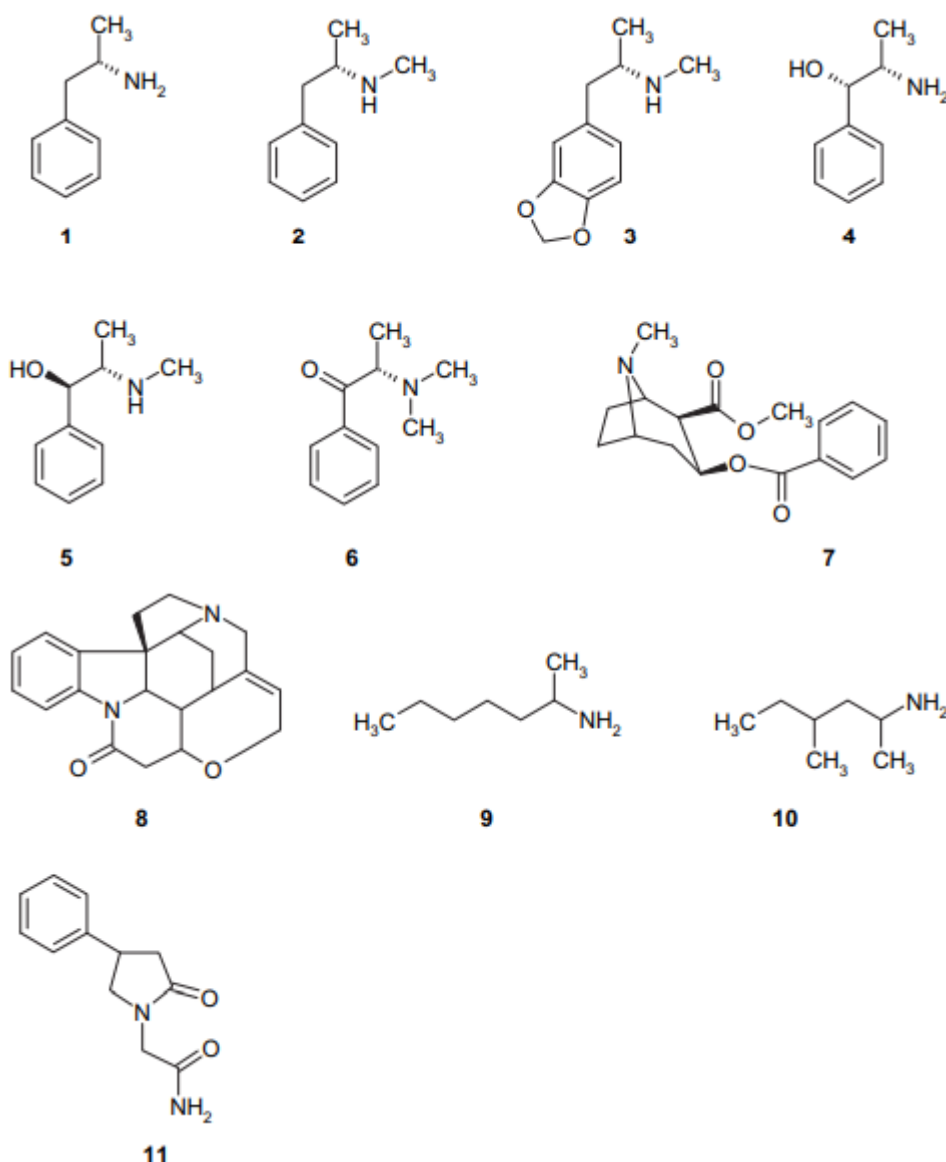
3.2 Μηχανισμός δράσης Διεγερτικών

Οι ολοένα και πιο εξελιγμένες τεχνικές απομόνωσης, καθαρισμού και χαρακτηρισμού ουσιών από πολύπλοκα μίγματα, καθώς επίσης και οι επιλογές για τη χημική τροποποίηση των ενώσεων αυτών, όπως και η δραστηκή έρευνα κατά τον 19^ο αιώνα για τα δραστικά συστατικά των φυτών είχαν ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό, την παραγωγή και την εφαρμογή διαφόρων διεγερτικών παραγόντων σε κλινικές αλλά και μη κλινικές εφαρμογές. Ορισμένες μόνο μελέτες έδειξαν ότι τα διεγερτικά φάρμακα προκαλούν αύξηση της αθλητικής απόδοσης από 0,6 έως 4% αν πρόκειται για τις αμφεταμίνες, ενώ η αποτελεσματικότητα άλλων διεγερτικών φαρμάκων όπως

εφεδρίνη, στρυχνίνη ή κοκαΐνη δεν έχει αξιολογηθεί απόλυτα. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχουν διεξαχθεί διάφορες έρευνες που αφορούν τους μηχανισμούς δράσης συγκεκριμένων ουσιών του κεντρικού νευρικού συστήματος, οι οποίοι κατέληξαν από κοινού ότι υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τρόποι να επηρεαστεί η διαδικασία της νευροδιαβίβασης στο νευρικό τερματικό. Ο πρώτος τρόπος είναι η άμεση διέγερση των μετασυναπτικών υποδοχέων. Εναλλακτικός δεύτερος τρόπος αποτελεί η αυξημένη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, όπως η ντοπαμίνη, η σεροτονίνη ή η νοραδρεναλίνη, στη συναπτική σχισμή. Ενώ ο τρίτος και τελευταίος τρόπος είναι η αναστολή της επαναπρόσληψης των νευροδιαβιβαστών.

Η αμφεταμίνη αποτελεί ένα από τα περισσότερο μελετημένα θέματα όσο αφορά τα διεγερτικά και πιο συγκεκριμένα έχει μελετηθεί η επίδρασή της στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Η αμφεταμίνη αποδείχθηκε ότι χειραγωγώντας το εξαρτώμενο σύστημα Na/Cl μεταφορέα ντοπαμίνης DAT, προκαλεί αυξημένη έκκριση του νευροδιαβιβαστή. Η παρουσία εξωκυττάριας αμφεταμίνης προκαλεί αντιστροφή της λειτουργίας του DAT ως προς την απομάκρυνση της εξωκυτταρικής ντοπαμίνης από την συναπτική σχισμή. Η ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση γίνεται αρκετά λεντονη καθώς μεγάλες ποσότητες ντοπαμίνης απελευθερώνονται στη συναπτική σχισμή με τη μορφή καναλιού. Επίσης η αμφεταμίνη διαθέτει ανασταλτική επίδραση στην οξειδάση της μοναμίνης MAO, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τον μεταβολισμό και κατ' επέκταση την αποβολή της ντοπαμίνης.

Η κοκαΐνη, ένα ακόμη διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος, μέσω της σύνδεσής της με τους DAT επιτυγχάνει την αύξηση της συγκέντρωσης των ντοπαμινεργικών και νοραδρενεργικών διαβιβαστών στην νευρωνική σύναψη. Δηλαδή εμποδίζει την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης και δεν προκαλεί αύξηση της απελευθέρωσης ντοπαμίνης μέσω των νευρικών απολήξεων.



Σχήμα 4 Δομές επιλεγμένων διοεργετικών. (1) αμφεταμίνη (M.B 135), (1) μεθαμφεταμίνη (M.B 149), (3) MDMA/έκσταση (M.B 193), (4) καθίνη (M.B 151), (5) εφεδρίνη (M.B 165), (6) μεταμεπεπραμόνη (M.B 177), (7) κοκαΐνη (M.B 303), (8) στρυχνίνη (M.B 334), (9) τουαμινοεπτάνιο (M.B 115), (10) μεθυλεξαν-2-αμίνη (M.B 115) και (11) καρφεδόνη (M.B 218).

Η εφεδρίνη έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει ασθενώς μεν αλλά άμεσα τους α- και β-ανδρενεργικούς υποδοχείς και πιο συγκεκριμένα τους υποδοχείς που ανήκουν στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα και όχι στο κεντρικό. Αυτό οφείλεται στην λιποφιλικότητα της εφεδρίνης εξαιτίας της πρόσδεσης στους DAT των β-θέσεων των υδροξυλικών λειτουργιών των νοραδρενεργικών διαβιβαστών στην νευρωνική σύναψη. Εμποδίζει επίσης και την επαναπρόσληψη ντοπαμίνης. Ομοίως και οι συμπαθητικομιμητικές ενώσεις μεθυλεξαν-2-αμίνη και τουαμινοεπτάνιο εμποδίζουν την επαναπρόσληψη της νοραδρεναλίνης. Η εκτόπιση των νευροδιαβιβαστών από τις αντίστοιχες θέσεις αποθήκευσης αποτελεί τον κύριο μηχανισμό στον

οποίο στηρίζεται η διεγερτική δράση της εφεδρίνης (Σχήμα 4). Εξαιτίας της μεθυλιωμένης αμινολειτουργίας της, η εξωκυτταρική εφεδρίνη μεταφέρεται στον προσυναπτικό νευρώνα και αποθηκεύεται με τη μορφή κυστιδίων, όπου εμφανίζει σημαντική αντίσταση έναντι των ΜΑΟ και ασκεί επιπλέον επίδραση στους απελευθερωμένους νευροδιαβιβαστές. Τέλος ορισμένες από τις επιδράσεις των συμπαθομιμητικών αμινών αποτελούν ο αυξημένος αριθμός παλμών, η αυξημένη αρτηριακή πίεση, η βρογχοδιαστολή, η οποία συνοδεύεται από μειωμένη κόπωση και βελτιωμένη εγρήγορση. Όλες αυτές λοιπόν οι επιδράσεις είναι ο λόγος για τον οποίο οι αθλητές καταχράζονται τα διεγερτικά στον αθλητισμό και έχουν προβεί σε πάρα πολλές παραβάσεις των κανόνων ντόπινγκ.

Ο κύριος μηχανισμός δράσης της καφεΐνης αποτελεί την προσωρινή αναστολή της αδενοσίνης, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες συνδέεται στους υποδοχείς αδενοσίνης, οι οποίοι επίσης αναστέλλονται προσωρινά από την καφεΐνη. Το κύριο χαρακτηριστικό τη καφεΐνης στον μηχανισμό δράσης της αποτελεί το γεγονός ότι είναι εξίσου υδατοδιαλυτή και λιποδιαλυτή, οπότε αυτό της δίνει την δυνατότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Πιο συγκεκριμένα η συσσώρευση αδενοσίνης στις συνδέσεις των νευρών, οδηγεί στη συνέχεια στη σύνδεση της αδενοσίνης με τους υποδοχείς της, οπότε και προκαλείται το αίσθημα της υπνηλίας και της κόπωσης. Η κατανάλωση όμως καφεΐνης έχει ως αποτέλεσμα το αίσθημα της υπερδιέγερσης, καθώς οδηγεί σε ανταγωνισμό με την αδενοσίνη για τις ειδικές θέσεις σύνδεσης και τελικά σε προσωρινή καταστολή αυτής. Η αυξημένη λοιπόν αυτή δράση έχει ως τελικό αποτέλεσμα τον αυξημένο αναπνευστικό ρυθμό, εξαιτίας της ενεργοποίησης των αιμοφόρων αγγείων, του πνευμονογαστρικού νεύρου και των αναπνευστικών κέντρων γενικότερα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος. Επιπλέον η καφεΐνη λειτουργεί ανασταλτικά στην απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου εξαιτίας της ιδιότητας της ως αναστολέας της δράσης των φωσφοδιεστερασών. Απαραίτητες είναι οι πολύ υψηλές και μη-φυσιολογικές συγκεντρώσεις καφεΐνης προκειμένου να λάβει χώρα η επιρροή στα ιόντα ασβεστίου και να ανασταλεί η δράση των φωσφοδιεστερασών. Αυτό σημαίνει αύξηση της φυσικής ανοσίας και μείωση της δημιουργίας φλεγμονών εξαιτίας της ενεργοποίησης του ενδοκυτταρικού cAMP και την πρωτεϊνική κινάση A. Μια ακόμη συνέπεια της κατανάλωσης της καφεΐνης αποτελεί η εγκεφαλική υποαιμάτωση, όπου έχουμε την ταυτόχρονη ελάττωση της ροής του αίματος με την ενίσχυση του μεταβολισμού, κυρίως στον εγκέφαλο.

Η νικοτίνη δρα αγωνιστικά στην πλειονότητα των νικοτινικών-ακετυλοχολινικών υποδοχέων και ανταγωνιστικά δρα μόνο σε δυο υπομονάδες νικοτινικών υποδοχέων. Οι νικοτινικοί-ακετυλοχολινικοί συγκαταλέγονται στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς και απαρτίζονται από διάφορες υπομονάδες. Ο κύριος ρόλος τους είναι η λειτουργία του Κεντρικού και Περιφερικού Νευρικού Συστήματος, όπου είναι υπεύθυνοι για τη διαμόρφωση δευτέρων μηνυμάτων (π.χ η δράση των ιόντων ασβεστίου) και τη διαμόρφωση απελευθέρωσης των

νευροδιαβιβαστών. Αύξηση των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών του εγκεφάλου παρατηρείται με την πρόσδεση της νικοτίνης στους αντίστοιχους υποδοχείς του εγκεφάλου. Στο σημείο αυτό υπάρχει έκκριση διαφόρων οπιοειδών (π.χ ντοπαμίνη) που είναι η αφορμή για την έναρξη μιας σειράς αντιδράσεων, με στόχο την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος μέσω σπλαχνικών νέρων στα επινεφρίδια. Δηλαδή η σύνδεση στους ειδικούς υποδοχείς δημιουργεί ένα ιοντικό κύμα ασβεστίου, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την έκκριση στη ροή του αίματος τόσο της επινεφρίνης όσο και της νορεπινεφρίνης. Όλη αυτή η σειρά των αντιδράσεων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πίεσης του αίματος, την αύξηση της αναπνοής καθώς και την αύξηση του καρδιακού ρυθμού.

Η κοκαΐνη αποτελεί ένα ακόμη ισχυρό διεγερτικό του νευρικού συστήματος. Η κύρια λειτουργία της να είναι η καταστολή της πρωτεΐνης μεταφορέα της ντοπαμίνης DAT, που αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που επάγει τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη πέρα από τη σύναψη προς το κυτταρόπλασμα. Ο ρυθμός της ντοπαμίνης μειώνεται εξαιτίας της απευθείας σύνδεσης της κοκαΐνης με τον DAT και το μετέπειτα μπλοκάρισμά του από εκείνη. Από την τόσο ισχυρή ένωση της κοκαΐνης με τον μεταφορέα προκύπτει η δημιουργία ενός ισχυρού συμπλόκου, το οποίο εντοπίζεται στη συναπτική σχισμή και εμποδίζει την μετακίνηση της ντοπαμίνης στον μετασυναπτικό νευρώνα. Η διάσπαση προσοχής, η υποθερμία, οι παραισθήσεις, η αύξηση του καρδιακού ρυθμού, η αγγειοσυστολή και ο περιορισμός της διάθεσης για πρόσληψη τροφής αποτελούν μερικά εκ των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης της κοκαΐνης με τους υποδοχείς. Ενώ μια ακόμη λειτουργία της κοκαΐνης αποτελεί η διάδοση του δυναμικού ενέργειας, διότι μπλοκάρει τα κανάλια κυκλοφορίας των ιόντων νατρίου και λειτουργεί ως τοπικό αναισθητικό. (9), (10)

3.3 Μηχανισμός δράσης Κανναβινοειδών

Η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC) αποτελεί το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης και διαθέτει ένα ενδογενές σύστημα δράσης, το οποίο περιλαμβάνει δυο υποδοχείς κανναβινοειδών τον CB1 και τον CB2. Πιο συγκεκριμένα η δέσμευση της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης και στους δυο αυτούς υποδοχείς οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών G-πρωτεϊνών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων καλίου και ασβεστίου, καθώς και στην ενεργοποίηση ορισμένων νευροδιαβιβαστών και στην απελευθέρωση ντοπαμίνης. Μέχρι τα μέσα του 12^{ου} αιώνα τα σηματοδοτικά μονοπάτια των ανθρώπινων κανναβινοειδών δεν ήταν γνωστά και η ανακάλυψη της κανναβιδιόλης (CBD) και της τετραϋδροκανναβινόλης (THC) συνέβαλε δραστικά στον εντοπισμό αυτών των μονοπατιών. Η THC αλληλεπιδρά με συγκεκριμένο στόχο θηλαστικών, κάτι το οποίο προέκυψε σε κύτταρα

νευροβλαστώματος ποντικού, τα οποία εξέφραζαν ρυθμιζόμενη αδενυλική κυκλάση ύστερα από έκθεση στην ένωση ή στα συνθετικά της ανάλογα. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε αρχικά στον υποδοχέα κανναβινοειδών τύπου 1 CB1, δηλαδή στην απομόνωση και στην κλωνοποίηση ενός υποδοχέα που συνδέεται με πρωτεΐνη G και στη συνέχεια στην απομόνωση του κανναβινοειδούς υποδοχέα τύπου 2 CB2 από κύτταρα ανθρώπινης λευχαιμίας. Η CB1 ασκεί άμεση δράση στην CB2, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι πιθανόν στα θηλαστικά να υπάρχει ένα ενδογενές σύστημα κανναβινοειδών, που ονομάζεται ενδοκανναβινοειδή. Ακολούθησε η απομόνωση της N-αραχιδονοϋλαιθανολαμίνης AEA, που αποτελεί τον πρώτο ενδογενή κανναβινοειδή προσδέτη και ύστερα απομονώθηκε ο δεύτερος ενδογενής προσδέτης από ιστό του εντέρου και ονομάστηκε 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλη 2-AG. Και οι δυο αυτοί προσδέτες αποτελούν παράγωγα του αραχιδονικού οξέος, τα οποία προκύπτουν από πρόδρομες ουσίες φωσφολιπιδίων μέσω της εξαρτώμενης από τη δραστηριότητα ενεργοποίησης ειδικών ενζύμων φωσφολιπάσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δυο παραπάνω προσδέτες AEA και 2-AG δεν ακολουθούν όμοια μεταβολικά μονοπάτια ή βιοσύνθεσης. Δηλαδή από την πρόδρομη φωσφολιπιδική ουσία N-αραχιδονοϋλοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη υπάρχουν διαφορετικοί οδοί για τη παραγωγή AEA. Μια από αυτές τις οδούς αποτελεί η άμεση μετατροπή που καταλύεται από μια N-άκυλο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη-επιλεκτική φωσφοδιεστεράση. Ύστερα από την επαναπρόσληψή της, ακολουθεί παραγωγή αιθανολαμίνης και αραχιδονικού οξέος, μέσω υδρόλυσης της AEA με τη βοήθεια του ενζύμου υδρολάση των αμιδίων των λιπαρών οξέων. Από την άλλη η σύνθεση της 2-AG αρχίζει με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C και ακολουθείται από τη παραγωγή διάκυλογλυκερόλης, η οποία με τη βοήθεια της λιπάσης της διακυλογλυκερόλης μετατρέπεται σε 2-AG. Αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη προκύπτουν από το μεταβολισμό της 2-AG από τη λιπάση της μονοακυλογλυκερόλης.

Τόσο η AEA και η 2-AG αποτελούν τους πιο γνωστούς στόχους για τους υποδοχείς CB1 και CB2, με την AEA να έχει μεγαλύτερη συγγένεια ενεργοποίησης και για τους δυο υποδοχείς. Η σύνθεση και η απελευθέρωση ενδοκανναβινοειδών, εξαιτίας φυσιολογικών ή παθολογικών αιτιών, οδηγεί στην ενεργοποίηση των υποδοχέων κανναβινοειδών. Επίσης οι υποδοχείς κανναβινοειδών CB1 και CB2 που συνδέονται με πρωτεΐνες G μπορούν να συνδεθούν τόσο με την CBD όσο και με την TCH. Πιο αναλυτικά οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται τόσο στους διεγερτικούς γλουταματεργικούς νευρώνες όσο και στους ανασταλτικούς GABAεργικούς νευρώνες, καθώς επίσης αφθονούν στα βασικά γάγγλια, στο μετωπιαίο φλοιό, στην παρεγκεφαλίδα, στο περιφερικό νευρικό σύστημα και στο νωτιαίο μυελό. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι οι ψυχοτροπικές επιδράσεις της μαριχουάνας οφείλονται στο γεγονός ότι οι CB1 υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Αντίστοιχα οι CB2 παράγοντες κάτω από φυσιολογικές υγιείς συνθήκες εκφράζονται στην περιφέρεια, ενώ σε συνθήκες ασθένειας ή τραυματισμού ρυθμίζονται

αι εκφράζονται αντίστοιχα εντός του εγκεφάλου. Οι CB2 εντοπίζονται σε αφθονία στα κύτταρα της γλοίας, στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στα αιμοποιητικά κύτταρα. Επομένως η αναλγητική δράση της κάνναβης οφείλεται στο γεγονός ότι οι CB2 υποδοχείς εντοπίζονται στους αισθητήριους ιστούς, οι οποίοι μεσολαβούν σε μια αναλγητική δράση. Γενικά τόσο οι CB1 και οι CB2 υποδοχείς είναι ομοιόμορφα κατανομημένοι στο καρδιαγγειακό σύστημα. Τέλος, τα φυτοκανναβινοειδή και τα ενδοκανναβινοειδή συνδέονται και με άλλους υποδοχείς που συνδέονται αντίστοιχα και εκείνοι με πρωτεΐνες G, όπως GPR55, GPR3, GPR6, GPR12 και GPR18, με μεταφορείς μονοαμινών, όπως νορεπινεφρίνη, υποδοχέας σεροτονίνης, ντοπαμίνη, με υποδοχείς λιπαρών οξέων και με διάλυτους δυναμικού παροδικών υποδοχέων, όπως TRPV, TRPA και TRPM.

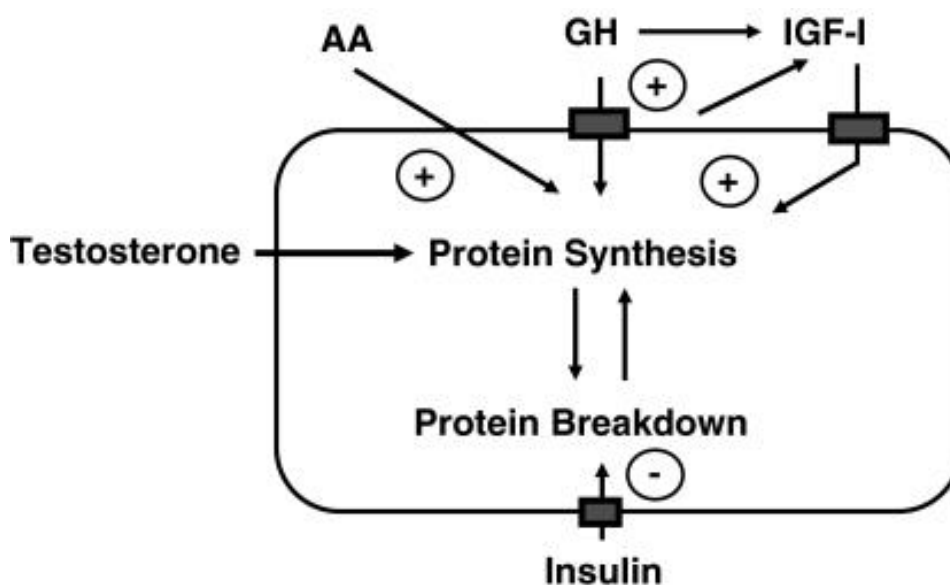
Γενικά ο στόχος είναι τα κανναβινοειδή να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη φαρμάκων με διάφορες θεραπευτικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα στην καταπολέμηση συμπτωμάτων κινητικών διαταραχών. Αυτό είναι πιθανό να συμβεί διότι μέσα από τους μηχανισμούς δράσης των κανναβινοειδών υπάρχει η δυνατότητα παρασκευής ουσιών, οι οποίες ενισχύουν τα επίπεδα ενδογενών κανναβινοειδών αποκλειστικά στις περιοχές που λαμβάνει χώρα η φυσιολογική τους παραγωγή. Με το τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εμφάνιση όσο το δυνατόν λιγότερων ανεπιθύμητων παρενεργειών. (11), (12)

3.4 Μηχανισμός δράσης Αυξητικών Παραγόντων

Η χορήγηση θεραπείας με αυξητική ορμόνη GH επιδρά στη μείωση του σωματικού λίπους, στη βελτίωση της δύναμης και της φυσικής κατάστασης, στην αύξηση της άλιπης σωματικής μάζας και στην ενίσχυση της απόδοσης. Επομένως μια τέτοιου είδους θεραπεία έχει αρκετά μεγάλο ενδιαφέρον καθώς η GH κατέχει εξέχουσα θέση στην βελτίωση της αθλητικής απόδοσης. Απόκριση σε σήματα βλάβης αποτελεί η απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων από τα αιμοπετάλια, γεγονός που τα καθιστά ευεργετικά για τους αθλητές και αξιοποιήσιμα για τη θεραπεία διαφόρων αθλητικών τραυματισμών. Παρολαυτά το μεγαλύτερο μέρος αυτών δεν επηρεάζουν την απόδοση των αθλητών με εξαίρεση τον αυξητικό παράγοντα 1 της ινσουλίνης IGF-1, ο οποίος έχει εργογόνο δράση. Η σύνθεση της τεστοστερόνης στους άνδρες ενισχύεται με παρεντερική έγχυση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH ή της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης hCG και οδηγεί σε αύξηση της μυϊκής δύναμης.

Η πρόσδεση της GH σε ειδικούς υποδοχείς της που βρίσκονται σε κάθε κύτταρο του σώματος, αποτελεί τον τρόπο με τον οποίο η αυξητική ορμόνη ασκεί πολυάριθμες αναβολικές και μεταβολικές δράσεις. Η αυξητική ορμόνη ασκεί τις περισσότερες από τις αναβολικές της δράσεις μέσω της παραγωγής της κυκλοφορούσας IGF-1, μεγάλο μέρος της οποίας παράγεται στο ήπαρ. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο αυξητικός παράγοντας 1 της ινσουλίνης IGF-1 είναι ο βασικός μεσολαβητής της αυξητικής ορμόνης GH. Έχει καθοριστικό ρόλο κατά τη παιδική ηλικία στην

προώθηση της ανάπτυξης των κυττάρων και διαφοροποίησης αυτών, ενώ στην ενήλικη ζωή συνεχίζει την αναβολική επίδραση και έχει πλέον αποκτήσει την φήμη ενός δημοφιλούς παράγοντα ντόπινγκ στον αθλητισμό. Η φήμη αυτή οφείλεται στην διεγερτική δράση που διαθέτει το πεπτιδίο στην ανάπτυξη των μυών και την αποκατάσταση των ιστών. Μέσα από τη μελέτη της ανεπάρκειας της GH σε ενήλικες εξετάζονται οι φυσιολογικές επιδράσεις της GH. Μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι η GH συμβάλλει σημαντικά στην ευεξία, στη σύνθεση του σώματος, στην σωματική απόδοση και την καρδιαγγειακή υγεία σε άτομα με κατάλληλη υποκατάσταση των στεροειδών, του θυροειδούς και των στεροειδών φύλου. Απουσία GH έχουμε συσσώρευση λίπους και απώλεια του απαχούς ιστού και παρατηρείται ταυτόχρονη αύξηση του λόγου μέσης-ισχίων με το σπλαχνικό λίπος.



Σχήμα 5 Ο άξονας της αυξητικής ορμόνης GH – ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα IGF-1. Η GH εκκρίνεται από την υπόφυση υπό τον έλεγχο της σωματοστατίνης, της γκρελίνης, της ορμόνης απελευθέρωσης της GH GHRH και των υποθαλαμικών ορμονών. Η κυκλοφορία της GH γίνεται ενώ είναι συνδεδεμένη με τη δεσμευτική της πρωτεΐνη και η δράση της επιτυγχάνεται μέσω υποδοχέων της GH στην επιφάνεια των κυττάρων. Ο IGF-1 δρα μέσω του υποδοχέα IGF-1 με αυτοκρινείς, ενδοκρινείς και παρακρινείς μηχανισμούς και διαμεσολαβεί εν μέρει στις αναβολικές δράσεις της GH. Ο IGF-1 αναστέλλει την έκκριση της GH και της GHRH μέσω μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης.

Συνεργιστική αναβολική επίδραση στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών έχουν η ινσουλίνη, η GH και ο IGF-1 (Σχήμα 5). Αυτό συμβαίνει διότι πολλαπλοί διατροφικοί και ορμονικοί παράγοντες ρυθμίζουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, με τον κύκλο εργασιών των πρωτεϊνών στους επιμέρους ιστούς να είναι σε διαρκή ροή. Κατακράτηση αζώτου προκαλεί η αυξητική ορμόνη, κάτι το οποίο φαίνεται από τα μειωμένα ποσοστά απέκκρισης ουρίας αμμωνίου και κρεατινίνης. Μέτρια διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης των μυών και ολόκληρου του σώματος

προκαλεί η οξεία χορήγηση GH σε υγιείς ανθρώπους. Από την άλλη η χορήγηση GH με τοπική έγχυση σε βραχιόνιο αρτηρία παρατηρείται αύξηση της πρωτεϊνوسύνθεσης των μυών του αντιβραχίου με τις συστηματικές συγκεντρώσεις IGF-1 να παραμένουν σταθερές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η GH διεγείρει την πρωτεϊνوسύνθεση μέσω του IGF-1 τόσο με άμεσο όσο και με έμμεσο τρόπο. Αναβολική επίδραση στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών έχει ο IGF-1, η οποία εξαρτάται από μια επαρκή παροχή αμινοξέων και την ινσουλίνη ορού. Δηλαδή ο IGF-1 αναστέλλει την πρωτεϊνική διάσπαση σε ολόκληρο το σώμα και διεγείρει την πρωτεϊνوسύνθεση. Ύστερα από συστηματική χορήγηση IGF-1, παρατηρείται μείωση της ινσουλίνης του ορού μέσω της μειωμένης της παραγωγής και μείωση των αμινοξέων εξαιτίας της αυξημένης κάθαρσης από το αίμα. Όλο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της διέγερσης της πρωτεϊνوسύνθεσης σε ολόκληρο το σώμα. Η GH έχει επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης, καθώς τόσο σε άτομα με διαβήτη τύπου I όσο και σε υγιή άτομα, η GH αυξάνει την παραγωγή ηπατικής γλυκόζης νηστείας. Αυτό γίνεται μέσω αύξησης της ηπατικής γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης και μείωσης της χρήσης της περιφερικής γλυκόζης με αναστολή της σύνθεσης γλυκογόνου και οξείδωσης της γλυκόζης. Αν και η επίδραση στην ομοιόσταση της γλυκόζης φαίνεται αρνητική για τους αθλητές, κάτι τέτοιο στην πραγματικότητα δεν ισχύει, καθώς οποιαδήποτε οξεία επίδραση στην ομοιόσταση γλυκόζης και ευαισθησία στην ινσουλίνη δεν λαμβάνει υπόψη τις μεταβολές τους IGF-1 και επίσης η μακροχρόνια ανεπάρκεια GH σε αθλητές είναι συνδεδεμένη με αντίσταση στην ινσουλίνη. Αυξημένη περιφερική πρόσληψη γλυκόζης και μειωμένη ηπατική παραγωγή γλυκόζης είναι οι τρόποι με τους οποίους αυξάνεται η ευαισθησία στην ινσουλίνη σε σχέση με την γλυκόζη από τον IGF-1.

Η παραγωγή της GH στην πρόσθια υπόφυση και εν συνεχεία η απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της παραγωγής και απελευθέρωσης του IGF-1. Έπειτα ακολουθεί η πρόσδεση του IGF-1 με τον IGF-1R, ο οποίος εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια σχεδόν όλων του κυττάρων του σώματος. Από 2 α και 2 β υπομονάδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς αποτελείται ο IGF-1R, εκ των οποίων στις διαμεμβρανικές β υπομονάδες συναντάμε ενδοκυτταρικές περιοχές κίνησης-τυροσίνης, οι οποίες ενεργοποιούνται όταν ο IGF-1 συνδέεται με τις εξωτερικές υπομονάδες α. Έτσι λοιπόν την ενεργοποίηση των παραπάνω κινασών ακολουθεί η ενεργοποίηση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως το μονοπάτι PI3K/Akt και ο καταρράκτης αντιδράσεων Raf/MEK/ERK. Το σύνολο αυτών των αντιδράσεων προάγει την κυτταρική ανάπτυξη και την επιβίωση αποτρέποντας την απόπτωση. Τόσο ο IGF-1 όσο και ο υποδοχέας του IGF-1R συμμετέχουν ενεργά στα παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια και συμβάλλουν καθοριστικά στην ομοιόσταση των υγείων ιστών και σε μικρότερο βαθμό σε ασθένειες που στηρίζονται στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό κακοήθων κυττάρων, όπως ο καρκίνος.

Η πρόδρομη πρωτεΐνη IGF-1 αποτελείται από ένα πεπτίδιο σήματος (θέσεις 1-21), ένα προπεπτίδιο (θέσεις 22-48), μια αλληλουχία IGF-1 (θέσεις 49-118) καθώς και μια αλληλουχία πεπτιδίου E (θέσεις 119-195). Οι 3 προ-ορμόνες ή διαφορετικά τα «E» πεπτίδια (Ea, Eb, Ec), που προκύπτουν από την εναλλακτική ωρίμανση του mRNA του IGF-1, έχουν ουσιαστικό ρόλο ανεξάρτητο από την ενεργοποίηση του υποδοχέα IGF-1, και αφορά την επίδρασή των πεπτιδίων αυτών στον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων. Τα πεπτίδια E διαθέτουν την ικανότητα να διατηρούν τις συγκεντρώσεις του IGF-1 στη θέση σύνδεσής του, οπότε έτσι επιτυγχάνονται περισσότερο εντοπισμένα αποτελέσματα. Επίσης τα πεπτίδια Ea και Eb συμβάλλουν στην πρόσληψη του IGF-1 στα κύτταρα ή εναλλακτικά συμβάλλουν στην απελευθέρωση του IGF-1 από τα IGF-BPs και έπειτα στη σύνδεσή τους στους υποδοχείς IGF. Ως παράγοντας μηχανικής ανάπτυξης MGF, χαρακτηρίζεται το πεπτίδιο IGF-1 διότι έχει νευροπροστατευτικό ρόλο έναντι της ισχαιμίας, ρυθμίζεται προς τα πάνω στους γυμνασμένους και κατεστραμμένους μύες, έχει ενεργό ρόλο στις ενέργειες του IGF-1 με στόχο τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και συμβάλλει στην ενεργοποίηση πληθυσμών μόνιμων βλαστοκυττάρων. Από την άλλη η εξωγενής χορήγηση συνθετικών πεπτιδίων Ec έχει ως αποτέλεσμα να φωσφορυλιώνονται οι εξωκυτταρικές κινάσες που ρυθμίζονται μέσω του σήματος ERK1-ERK2, η ειδική σε σερίνη/θρεονίνη κινάση πρωτεΐνης Akt καθώς και ο IGF-1, ενώ έχουμε κυτταρική ανάπτυξη ανεξάρτητη από τον υποδοχέα ινσουλίνης και τέλος παραγωγή μιτογόνου δράσης στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά.

Η GH κατά τη σύνδεσή της με τον υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα, καθώς διαθέτει δυο υποδοχείς-δεσμευτές. Προκειμένου να συνδεθεί η κινάση τυροσίνης Janus κινάση 2 JAK2 με την μεμβρανική εγγύς περιοχή του πλούσιου σε προλίνες κουτιού 1, καθώς και να πραγματοποιηθεί η αυτοαπενεργοποίηση της JAK2 είναι απαραίτητη η ύπαρξη υποδοχέα διμερισμού. Κατά τη διέγερση της GH, παρατηρείται αυξημένη κυτταρική είσοδος ιόντων ασβεστίου. Στο σημείο αυτό η ενεργοποιημένη JAK2 ευθύνεται τόσο για την φωσφορυλίωση του υποδοχέα GH, τον οποίο συναντάμε στην μεταγωγή του σήματος GH, όσο και για πολλές άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με την μεταγωγή του σήματος της GH. Στις πρωτεΐνες αυτές ανήκουν διάφορες κινάσες υποδοχέων (κινάση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα), μη υποδοχικές κινάσες (c-Src, FAK), μέλη της κινάσης MAP (κινάση p44/42 MAP, κινάση SAPK που ενεργοποιείται από το στρες, p38 MAP, η οικογένεια IRS (IRS1, IRS2, IRS3) και η οικογένεια STAT (STAT1, STAT3, STAT5). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι ο σχηματισμός ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου διεγείρεται από την GH. Το σύμπλοκο αυτό έχει ως επίκεντρο την p130Cas και την Crldl και περιέχει επίσης τις FAK, tensin, IRS-1, paxillin, την υπομονάδα p85 της κινάσης, της φωσφατιδυλνισιτόλης PI-3, c-Src, c-Fyn, c-cbl, C3G, Nck, SHC, η son του Sevenless (SOS)-I και τέλος την συνδεδεμένη με τον υποδοχέα του αυξητικού

παράγοντα 2 Grb2. Ο σχηματισμός του πρωτεϊνικού συμπλόκου καθιστά εφικτή την πραγματοποίηση διαφόρων κυτταρικών επιδράσεων της GH. Διάφορες φωσφατάσες (SHP-24) συμβάλλουν στη θετική ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος της GH, ενώ η οικογένεια των καταστολέων της σηματοδότησης των κυτταροκινών πρωτεϊνών SOCS συμβάλλουν στην καθοδική ρύθμιση της απόκρισης της GH. Τέλος ο τερματισμός της μεταγωγής γίνεται με τη βοήθεια του συμπλόκου του πρωτεασώματος και με τις κατάλληλες φωσφατάσες (SHP-144), τα οποία απομακρύνουν τα συστατικά μεταγωγής του σήματος. (13), (14), (15)

3.5 Μηχανισμός δράσης β-αναστολέων

Οι β-αναστολείς αποτελούν μόρια, τα οποία ανταγωνίζονται τους β-ανδρενεργικούς υποδοχείς AR, οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων που συνδέονται με πρωτεΐνες G και διεγείρονται από ενδογενείς κατεχολαμίνες. Καρδιακή συστολή ή αγγειακή διαστολή προκαλείται ανάλογα με τη θέση και τον υπότυπο των β-AR, οι οποίοι διεγείρονται και ως αποτέλεσμα ενεργοποιούν διάφορους ενδοκυτταρικούς καταρράκτες. Γενικά έχουν εντοπιστεί τρεις κατηγορίες υπότυπων που εκφράζονται διαφορετικά στον οργανισμό και είναι οι β1-ARs, β2-ARs και β3ARs. Όλοι οι β-αναστολείς μοιράζονται έναν κοινό μηχανισμό που είναι η συγγένεια για τη σύνδεση με τους β-ARs χωρίς όμως να είναι αποτελεσματικοί στην πρόκληση φυσιολογικών αποκρίσεων. Γενικότερα τα φάρμακα διακρίνονται σε αγωνιστές ή ανταγωνιστές ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία αποτελεσματικότητας αντίστοιχα. Η ικανότητα ενός φαρμάκου να δεσμεύει τον υποδοχέα λέγεται συγγένεια και η ικανότητα πρόκλησης απόκρισης λέγεται αποτελεσματικότητα. Έτσι λοιπόν οι β-αναστολείς ανταγωνίζονται με τους αγωνιστές για τη θέση πρόσδεσης στο β-AR, οπότε αναστέλλεται η δράση του αγωνιστή. Αυτός είναι και ο λόγος που οι αναστολείς των αναστολέων θεωρούνται πολύ ισχυροί ως ανταγωνιστικοί ανταγωνιστές και η απόδοσή τους ενισχύεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του αγωνιστή. Σύμφωνα όμως με διάφορες κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί οι β-αναστολείς δεν λειτουργούν ως ενιαία κατηγορία φαρμάκων.

Αρχικά οι β-αναστολείς εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για κάθε υπότυπο β-AR άρα και διαφορετικό φαρμακολογικό προφίλ. Ο βελτιωμένος χρόνος πλήρωσης διαστολής των στεφανιαίων αγγείων, οι μειωμένες απαιτήσεις σε οξυγόνο, η βραδυκαρδία και η μείωση της ρενίνης αποτελούν μερικές από τις συνέπειες αποκλεισμού των β1-ARs στην καρδιά. Αντίθετα αρνητικές είναι οι συνέπειες αποκλεισμού των β2-ARs και β3-ARs καθώς δεν λαμβάνει χώρα τόσο η βρογχοδιαστολή που μεσολαβεί από τον υπότυπο β2 όσο και οι αγγειοδιασταλτικοί και καρδιοπροστατευτικοί μηχανισμοί που αποτελούν αποτέλεσμα των δυο υπότυπων. Άρα μεγαλύτερη συγγένεια για τον β1 υπότυπο σε σχέση με τους υπότυπους β2 και β3 διαθέτουν οι καρδιοεκλεκτικοί β-αναστολείς. Αυτό σημαίνει ότι η χρήση τους σε χαμηλή δοσολογία έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των καρδιακών β1-ARs και όχι των β2-ARs μεσολαβούμενων

βρογχοδιαστολής ή αγγειοδιαστολής. Επειδή όμως σε υψηλότερες δόσεις η εκλεκτικότητα των β_1 -ARs χάνεται, σε ασθενείς με παθήσεις στους αεραγωγούς θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή η χρήση των συγκεκριμένων αναστολέων.

Απουσία αγωνιστών οι β -ARs έχουν την ικανότητα να υιοθετήσουν αυθόρμητα ενεργές διαμορφώσεις με δυνατότητα ρύθμισης σηματοδοτικών συστημάτων και σύνδεσης με διαφορετικούς μεταγωγικούς μηχανισμούς. Καθώς λοιπόν τα αποτελέσματα των β -ARs απουσία αγωνιστών ήταν αντίθετα από τα αναμενόμενα οι β -αναστολείς θεωρήθηκαν ως αντίστροφοι αγωνιστές. Δηλαδή οι β -ARs δεν καταλαμβάνουν μόνο τη θέση πρόσδεσης, με αποτέλεσμα να εμποδίζουν τις δράσεις των αγωνιστών αποτρέποντας την ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης και σταθεροποιώντας τις διαμορφώσεις του υποδοχέα που δεν συνδέονται με τις G πρωτεΐνες. Το χαρακτηριστικό αυτό λοιπόν της συστατικής δραστηριότητας του υποδοχέα έδειξε ότι ένας αντίστροφος αγωνιστής θα περιορίσει τον υποδοχέα απόκρισης σε αντίθεση με τον ανταγωνιστή, ωστόσο και οι δυο εμποδίζουν τη δραστηριότητα του αγωνιστή. Ένα ακόμα αποτέλεσμα αυτής της δραστηριότητας είναι η υπορύθμιση των υποδοχέων καθώς ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί απευαισθητοποίησης. Επομένως η εφαρμογή θεραπείας με έναν αντίστροφο αγωνιστή βάζει τέλος στην υποδοχή υπορύθμισης, οπότε οδηγούμαστε σε αυξημένη ανταπόκριση στη διέγερση με αγωνιστή και σε αυξημένη έκφραση του υποδοχέα. Τέλος η διαρκής έκθεση των β_2 -ARs σε αντίστροφους αγωνιστές είχε ως αποτέλεσμα περίπου τον διπλασιασμό των μεμβρανικών επιπέδων του υποδοχέα.

Η μερική ενεργοποίηση των β -ARs έχει ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της διεγερτικής ικανότητας των αγωνιστών υψηλής αποτελεσματικότητας (κατεχολαμίνες), καθώς επίσης και την ελαττωμένη διέγερση των β -ARs χωρίς την παρουσία αγωνιστή. Ως μερικός αγωνιστής χαρακτηρίζεται ένα φάρμακο όταν έχει ανταγωνιστική δράση στον β_1 -AR υπότυπο αλλά δρα ως αγωνιστής σε άλλον ή άλλους ή διαφορετικά όταν το φάρμακο διεγείρει μια μερική ανταπόκριση 1,2 ή και των 3 υπότυπων. Η παραπάνω συνδυασμένη δράση μαζί με την εγγενή συμπαθομιμητική που διαθέτουν οι β -αναστολείς, θα μπορούσε να είναι ευεργετική καθώς ενεργοποιείται και εκδηλώνεται μόνο όταν το συμπαθητικό σύστημα είναι ενεργό. Αγγειοδιαστολή και καρδιοπροστατευτική επίδραση προκαλεί η δραστηριότητα ανταγωνιστή στους β_1 -ARs σε συνδυασμό με δράση αγωνιστή στους β_2 -ARs ή β_3 -ARs. Μια ακόμη λειτουργία των β -αναστολέων είναι ο αποκλεισμός των διαύλων K μέσω της σοταλόλης, η οποία διαθέτει μια αντιρυθμική ιδιότητα επαναπόλωσης και παράταση του δυναμικού δράσης στους καρδιακούς ιστούς. Επίσης η α_1 -αδρενεργική ανασταλτική δραστηριότητα που ασκείται μέσω της λαβεταλόλης και της καρβεδιλόλης έχει ως αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή και τη μείωση της περιφερικής αγγειακής αντίστασης, οπότε επιτυγχάνονται υψηλότερα επίπεδα καρδιακής παροχής.

(16)

3.6 Μηχανισμός δράσης διουρητικών

Τα διουρητικά αποτελούν μια ετερογενής ομάδα φαρμάκων και χρησιμοποιούνται συνήθως στην θεραπεία της υπέρτασης, των ηλεκτρολυτικών διαταραχών και της καρδιακής ανεπάρκειας. Ο αποκλεισμός επαναρρόφηση νατρίου σε διάφορες θέσεις εντός των νεφρικών σωληνίσκων αποτελεί την αρχική λειτουργία όλων των διουρητικών. Εξαίρεση από τη λειτουργία αυτή αποτελούν η μαννιτόλη και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της αγγειοπιεστίνης. Έπειτα τα διουρητικά βρόγχου, οι αναστολείς της καρβονικής ανυδράσης και τα θειαζιδικά διουρητικά καταφθάνουν στις θέσεις δράσης τους μέσω της εκκριντικής οδού των οργανικών οξέων. Από την άλλη οι ανταγωνιστές της αλδοστερόνης φθάνουν στο σημείο δράσης τους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η ακεταζολαμίδη, ο αναστολέας της καρβονικής ανυδράσης εξασθενεί την επαναρρόφηση του Na^+ , του νερού και του HCO_3^- , ενώ ταυτόχρονα ενισχύει την απομακρυσμένη παράδοση του Na^+ στον απω-συλλεκτικό πόρο καθώς και την απώλεια K^+ .

Η τορασεμίδη, η αζωσεμίδη, η φουροσεμίδη και η βουμετανίδη που αποτελούν διουρητικά του βρόγχου, δρουν στο παχύ άνω σκέλος του βρόγχου του Henle και λαμβάνει χώρα η επαναρρόφηση περίπου 20-30% του διηθημένου NaCl . Έπειτα τα διουρητικά βρόγχου συνδέονται με την πρωτεΐνη μεταφοράς Na-K-2Cl και αναστέλλουν την δράση τους, αυξάνοντας το K^+ στον άπω σωληνίσκο και ελαττώνοντας την επαναρρόφηση του Na^+ , K^+ , Cl^- . Στο σημείο αυτό λόγω ανταλλαγής Na^+ με K^+ , έχουμε αυξημένη έκκριση K^+ στον απομακρυσμένο σωληνίσκο. Όλες αυτές οι μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της ωσμωτικής κινητήριας δύναμης καθώς και τη συμπυκνωτική ικανότητα του νεφρού.

Ο τύπος δράσης των θειαζιδών και των σχετικών διουρητικών είναι ο άνω συγκερασμένος σωληνίσκος, όπου εξαιτίας της αδρανοποίησης του συμμεταφορέα NaCl , οδηγούμαστε σε μειωμένη επαναρρόφηση Na^+ και Cl^- , αυξημένη παροχή Na^+ στους συλλεκτικούς αγωγούς, σπατάλη K^+ και τέλος ενισχυμένη ανταλλαγή Na^+ και K^+ . Επίσης η αποδυνάμωση της αραιωτικής ικανότητας του νεφρού καθώς και η μείωση επαναρρόφησης Mg^{2+} , όπως και η διέγερση της επαναρρόφησης Ca^{2+} λαμβάνουν χώρα εξαιτίας των θειαζιδών. Αυτός είναι και ο λόγος που οι θειαζίδες χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των ασβεστοπεριεχόντων νεφρικών λίθων. Χωρίς να έχει γίνει ακόμα γνωστός ο μηχανισμός δράσης, οι θειαζίδες είναι υπεύθυνες για τη μείωση της περιφερικής αντίστασης καθώς και της αρτηριακής πίεσης. Επίσης οι θειαζίδες έχουν την ικανότητα μείωσης του εξωκυττάριου όγκου και της καρδιακής παροχής. Ωστόσο σε βάθος αρκετών εβδομάδων ή και μηνών ο εξωκυττάριος όγκος επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα.

Στον φλοιό του συλλεκτικού πόρου εντοπίζονται τα καλιοσυντηρητικά διουρητικά, όπως είναι τα ανάλογα της πτεριδίνης (αμιλορίδη και τριαμετερένη), αναστέλλουν την επαναρρόφηση από το επιθηλιακό κανάλι Na^+ του συλλεκτικού πόρου. Η συγκεκριμένη κατηγορία φαρμάκων δεν οδηγεί σε αξιοσημείωτη διούρηση και διαθέτουν ελάχιστη αντιυπερτασική δράση ως

μονοθεραπείες. Αυτό συμβαίνει διότι μόνο το 3% του διηθημένου Na^+ επανααρροφάται στο συλλεκτικό πόρο. Τα καλιοσυντηρητικά διουρητικά χρησιμοποιούνται από την άλλη μαζί με άλλους παράγοντες για την διόρθωση της ανεπάρκειας K^+ . Στο κυτταρόπλασμα των κύριων κυττάρων δρα ο αναστολέας της αλδοστερόνης με στόχο την προς τα κάτω ρύθμιση της αντλίας Na^+/K^+ . Έτσι λοιπόν το αποτέλεσμα αυτών των διουρητικών είναι η αποδυνάμωση της επαναρρόφηση Na^+ συνδυαστικά με τη μειωμένη έκκριση H^+ και K^+ .

Η άλλη κατηγορία των διουρητικών είναι εκείνα που έχουν ωσμωτική δράση σε όλο το μήκος του σωληνίσκου ανεξάρτητα από τις συνθήκες ενυδάτωσης και επηρεάζουν τη φυσιολογική επαναρρόφηση του νερού στον σωληνίσκο. Τέτοια είναι η μαννιτόλη, η οποία ξεπλένει τη διαλυτική βαθμίδα του μυελού και κατ' επέκταση ελαττώνει τη συμπυκνωτική ικανότητα του νεφρού. (17)

3.7 Μηχανισμός δράσης αλκοόλ

Σοβαρές επιπτώσεις στον ανθρώπινο καρδιακό μυ έχει η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ και ένας εκ των μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η καρδιακή δυσλειτουργία είναι η επαγωγή αυξημένου οξειδωτικού στρες. Γενικότερα μέσω της προπόνησης με άσκηση επιτυγχάνεται η ανοδική ρύθμιση των αντιοξειδωτικών της καρδιάς και κατ' επέκταση περιορίζονται οι επιβλαβείς επιπτώσεις του χρόνιου οξειδωτικού στρες που προκαλεί η κατανάλωση αλκοόλ. Από την άλλη η οξεία κατανάλωση αλκοόλ έχει συνέπειες στους καρδιαγγειακούς καθοριστικούς παράγοντες της απόδοσης κατά την άσκηση. Πιο αναλυτικά με την αυξημένη κατανάλωση οινοπνεύματος παρατηρείται μειωμένη ταχύτητα της συντόμευσης των μυοκαρδιακών ινών και μειωμένη κλίση της ενδοσυστολικής πίεσης-διαστολής. Επομένως το αλκοόλ έχει σημαντική κατασταλτική επίδραση στο μυοκάρδιο, καθώς η οξεία χορήγηση αλκοόλ έχει αρνητικές επιδράσεις στη συσταλτικότητα της αριστερής κοιλίας. Επιπλέον η ευρεία κατανάλωση αλκοόλ οδηγεί σε περιορισμό της χρήσης της γλυκόζης και των αμινοξέων, γεγονός που δημιουργεί δυσμενείς συνθήκες στην παροχή ενέργειας στους ασκούμενους μυς. Άρα και στη χρήση του υποστρώματος των σκελετικών μυών κατά τη διάρκεια της άσκησης το αλκοόλ έχει σημαντικές επιδράσεις. Υπογλυκαιμία και περιορισμός της εμφάνισης γλυκόζης στο πλάσμα άρα και μείωση της ηπατικής γλυκονεογένεσης προκαλεί η κατανάλωση αιθανόλης. Επιδείνωση της πυκνότητας των μυϊκών τριχοειδών και της επιφάνειας διατομής των μυϊκών ινών, δηλαδή των σκελετικών μυϊκών προσδιορισμών της απόδοσης κατά τη διάρκεια της άσκησης, προκαλεί η χορήγηση αιθανόλης. Μια ακόμη επίπτωση *in vitro* της αλκοόλης είναι ο περιορισμός της μυϊκής απόδοσης, καθώς αναστέλλει το σαρκολεμφικό ασβέστιο με αποτέλεσμα να βλάψει τη σύζευξη διέγερσης-σύσπασης. Η ανάπτυξη αλκοολικής μυοπάθειας, δηλαδή η μείωση της τριχοειδικότητας των σκελετικών μυών, συνδέεται επίσης με την μακροχρόνια κατανάλωση αλκοόλ. Η οξειδωτική ικανότητα των σκελετικών μυών σχετίζεται με τη πυκνότητα των μυϊκών τριχοειδών. Δηλαδή η

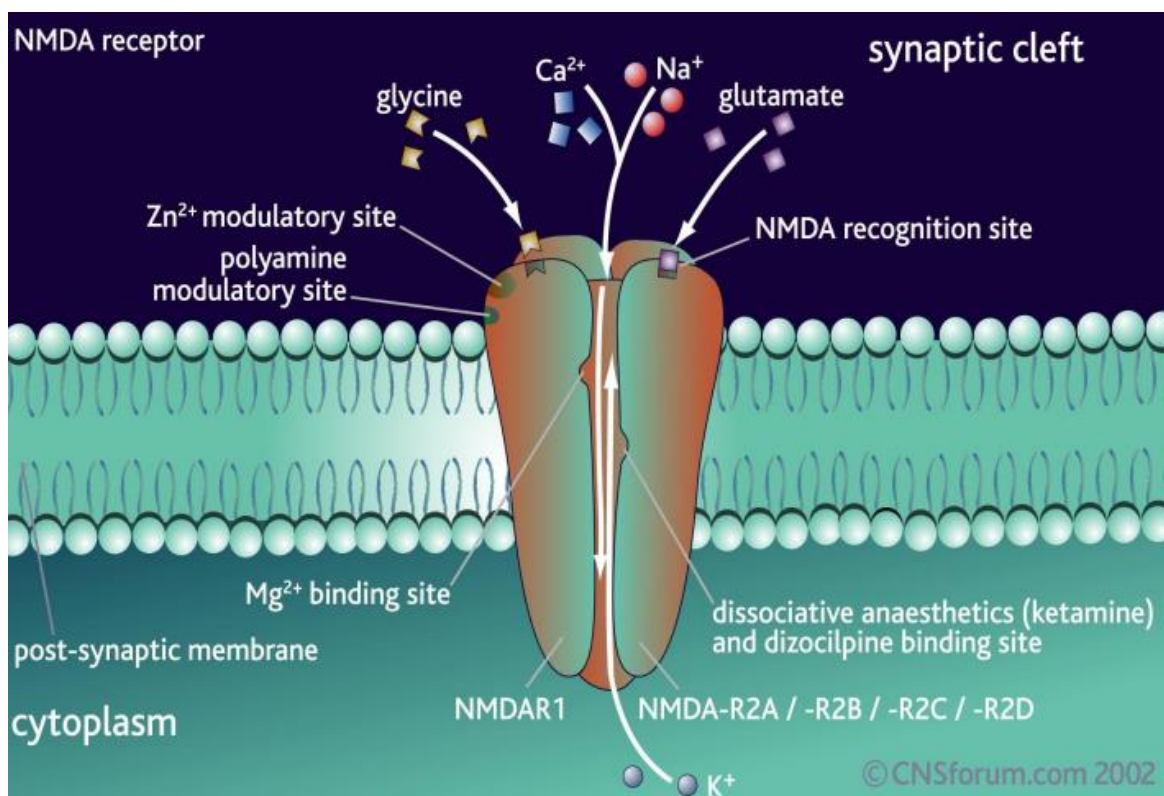
ύπαρξη μεγαλύτερης τριχοειδούς πυκνότητας, παρέχει μεταβολικά υποστρώματα και μεγαλύτερη επιφάνεια ανταλλαγής αερίων. Μια καλή λύση για το περιορισμό των επιπτώσεων στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η προπόνηση.

Η κατανάλωση αλκοόλ μετά την άσκηση μπορεί να προκαλέσει σοβαρές διαταραχές στα επίπεδα των παραγόντων πήξης. Για παράδειγμα, 5 και 22 ώρες μετά την άσκηση παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII. Οι διαταραχές στη συσσώρευση αιμοπεταλίων σχετίζονται με την κατανάλωση αλκοόλ ύστερα από αθλητική συμμετοχή. Δηλαδή η λήψη αλκοόλ 1 ώρα μετά την άσκηση συνδέεται άμεσα με την αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων. Η συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι αποτέλεσμα της δράσης της διφωσφορικής αδενοσίνης, της οποίας τα επίπεδα μειώνονται όταν μετά την άσκηση ακολουθεί κατανάλωση αλκοόλ. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι η καθυστερημένη αποκατάσταση των συσσωρευμένων επιπέδων των αιμοπεταλίων σχετίζεται με την κατανάλωση μέτριας ποσότητας αλκοόλ. Η επιδείνωση των ψυχοκινητικών ικανοτήτων συνδέεται με την οξεία κατανάλωση αλκοόλ. Επίσης στο χώρο του αθλητισμού παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα ποσοστά τραυματισμών μεταξύ των αθλητών που πίνουν και εκείνων που δεν πίνουν με τους ακριβείς μηχανισμούς δράσης να είναι άγνωστοι. Δηλαδή στο μεγαλύτερο ποσοστό των αθλημάτων, ισχύει ότι οι αθλητές που καταναλώνουν αλκοόλ τουλάχιστον μια φορά εβδομαδιαία έχουν διπλάσιο κίνδυνο τραυματισμού συγκριτικά με αυτούς που δεν πίνουν. Τέλος, το αλκοόλ επηρεάζει την ικανότητα ανάκαμψης του οργανισμού ύστερα από τραυματισμό, καθώς η κατανάλωση αλκοόλ ύστερα από βλαπτική άσκηση καθιστά εντονότερη την απώλεια παραγωγής μυϊκής δύναμης δυναμικού.

Η τροποποίηση της δράσης των πρωτεϊνών των νευρικών κυττάρων είναι άμεσα συνδεδεμένες με την επίδραση του αλκοόλ στον οργανισμό. Από τη μία είναι η πρωτεϊνική θεωρία δράσης, κατά την οποία υπάρχει άμεση επιρροή του αλκοόλ στις νευρωτικές πρωτεΐνες και από την άλλη είναι η επιρροή του αλκοόλ στα λιπίδια των μεμβρανών των νευρικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την μεταβολή της ρευστότητας αυτών των μεμβρανών και ορισμένων καναλιών ιόντων. Οι κύριοι στόχοι του αλκοόλ, δηλαδή της αιθανόλης, στο νευρικό σύστημα είναι οι εξής οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος A GABA_A, οι υποδοχείς του N-μεθυλ-D-ασπαρτικού NMDA, ο υποδοχέας γλυκίνης, οι νικοτινικοί ακετυλοχολινικοί υποδοχείς και ο υποδοχέας 5-υδροτρυπταμίνης-3 5-HT₃. Επίσης το αλκοόλ επηρεάζει τις G-πρωτεΐνες και τα κανάλια ασβεστίου τύπου L που επηρεάζουν τα κανάλια των ιόντων καλίου.

Πιο αναλυτικά ο NMDA υποδοχέας διακρίνεται σε 4 υπομονάδες ή αλλιώς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (2 NR1 και 2 NR2) και συνιστά ένα τετραμερές κανάλι ιόντων (Σχήμα 6). Στην υπομονάδα NR1 οφείλεται η λειτουργία του καναλιού ιόντων και στην υπομονάδα NR2 εντοπίζεται η περιοχή σύνδεσης του γλουταμινικού οξέος και οι λειτουργικές διαφορές. Όσο πιο αλκαλικό είναι το pH τόσο περισσότερο έχουμε αύξηση της συχνότητας διάνοιξης. Διάφορες

μελέτες έδειξαν ότι η αιθανόλη συνδέεται με τις 2 αυτές υπομονάδες με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την δράση τους. Έπειτα μέσω της σύνδεσής του NMDA υποδοχέα με ειδικούς νευροδιαβιβαστές και στη συνέχεια της ενεργοποίησής του, παρέχει την δυνατότητα να διέλθουν από την κυτταρική μεμβράνη θετικά φορτισμένα ιόντα. Η είσοδος του ασβεστίου περιλαμβάνει διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Ακόμη μια λειτουργία του NMDA υποδοχέα είναι ο έλεγχος μετασυναπτικών καναλιών ιόντων ασβεστίου, τα οποία έχουν καθοριστικό ρόλο στις λειτουργίες του νευρικού συστήματος της μνήμης και της μάθησης, καθώς και στην ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση της δράσης της καταστολής. Η εμφάνιση συμπτωμάτων, όπως είναι οι επιληπτικές κρίσεις και το άγχος, έχουν συνδυαστεί με την παρεμπόδιση της λειτουργίας του NMDA υποδοχέα κατά τη κατανάλωση αλκοόλ.



Σχήμα 6 Η δομή του NMDA υποδοχέα. Τετραμερές με 2 υπομονάδες NR1 και 2 υπομονάδες NR2 (https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/MED1190/%CE%93%CE%9A%CE%91%CE%A4%CE%96%CE%A9%CE%9D%CE%97%CE%A3/%CE%93%CE%9A%CE%91%CE%A4%CE%96%CE%A9%CE%9D%CE%97%CE%A3_%CE%91%CE%9C%CE%99%CE%9D%CE%9F%CE%9E%CE%95%CE%91%202.pdf)

Με τους υποδοχείς της γλυκίνης, τόσο στη διαμεμβρανική περιοχή των υποδοχέων όσο και στην εξωκυτταρική τους περιοχή, δρα η αιθανόλη. Τα αποτελέσματα από την παραπάνω άμεση αλληλεπίδραση εξαρτώνται από την δόση της αιθανόλης στον οργανισμό και συνιστούν το

σύνολο των θετικών και των αρνητικών επιδράσεων της αιθανόλης στα διάφορα σημεία σύνδεσης της με τους υποδοχείς.

Οι υποδοχείς του γ-αμινοβουτυρικού οξέος A GABA_A είναι οι πιο άφθονοι υποδοχείς του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος των θηλαστικών. Αποτελούνται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες (α-, β-, γ- και δ-) και ταυτόχρονα συνδέονται με τον νευροδιαβιβαστή GABA που διακρίνεται για την ανασταλτική του δράση. Συγκεκριμένα ο GABA νευροδιαβιβαστής είναι υπεύθυνος για το ποιοι νευρώνες θα διεγερθούν και είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση του μυϊκού τόνου. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς χαρακτηρίζονται από την αύξηση του αρνητικού φορτίου στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης άρα και την ανάγκη ύπαρξης εντονότερου ερεθίσματος για την δημιουργία νευρικής ώσης. Όλα τα παραπάνω οφείλονται στην ενεργοποίηση των υποδοχέων GABA_A που επιτρέπει την ροή ιόντων χλωρίου. Η δράση των υποδοχέων GABA_A επηρεάζεται από διάφορες αλλοστερικές θέσεις σύνδεσης που διαθέτουν και οι οποίες αποτελούν στόχους για διάφορες ουσίες όπως η αιθανόλη, τα βαρβουριτικά και τα στεροειδή. Συμπτώματα όπως η ξαφνική αίσθηση ευφορίας, παροδικά φαινόμενα αμνησίας και αδρανοποίηση των αντανακλαστικών είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης της αιθανόλης στους GABA_A υποδοχείς. Τέλος, αφού επέλθουν τα πρώτα αποτελέσματα της σύνδεσης/αλληλεπίδρασης της αιθανόλης με όλους τους παραπάνω υποδοχείς, ακολουθεί μια σειρά οξείων συμπτωμάτων που είναι αποτέλεσμα της κατανάλωσης αλκοόλ. Αυτά μπορεί να είναι από μια απλή αδρανοποίηση του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος έως την πρόκληση κόματος. Υπεύθυνοι για όλα αυτά τα οξεία αποτελέσματα είναι οι ενέργειες άλλων νευροδιαβιβαστών, όπως τα οπιοειδή, οι αμίνες και τα ενδοκανναβινοειδή. Το εύρος της εκδήλωσης των συμπτωμάτων είναι άμεσα συνδεδεμένο με την ποσότητα αλκοόλ που καταναλώθηκε. (18) , (19)

3.8 Μηχανισμός δράσης γοναδοτροπινών

Η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών GnRH είναι ένα πεπτίδιο 10 αμινοξέων που παράγεται από τον υποθάλαμο και είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της έκκρισης της LH. Η έκκριση της GnRH πραγματοποιείται με παλμικό τρόπο σε διαστήματα 60-120 λεπτών με την ίδια συχνότητα, μέσω ενός πυλαίου φλεβικού συστήματος που καταλήγει στην πρόσθια υπόφυση. Η διατήρηση της παραγωγής προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο κατά τη διάρκεια πρώιμης εγκυμοσύνης αποτελεί την κύρια φυσιολογική λειτουργία της hCG. Η LH είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της παραγωγής της τεστοστερόνης των όρχεων στους άνδρες και για τη παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης στις γυναίκες. Η χορήγηση LH και hCG στους άνδρες αποτελεί τη βάση της χρήσης τους για σκοπούς ντόπινγκ, καθώς διεγείρουν τη παραγωγή τεστοστερόνης στα κύτταρα των όρχεων.

Η παλμική έγχυση GnRH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης LH και την διέγερση παραγωγής γοναδικών στεροειδών. Η ελλειπτική έκκριση της GnRH πολλές φορές

οδηγεί σε ιδιοπαθή υπογοναδισμό και αντιμετωπίζεται με την παροχή GnRH με αντλία συνδεδεμένη με υποδερμική βελόνα. Η συγκεκριμένη θεραπεία εφαρμόζεται επίσης με σκοπό την ομαλοποίηση της λειτουργίας των όρχεων που έχουν κατασταλεί εξαιτίας της μακροχρόνιας χρήσης αναβολικών στεροειδών. Η χρήση της GnRH μπορεί να θεωρηθεί παράνομη αν και ο εντοπισμός της είναι αρκετά δύσκολος εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής του μικρού αυτού πεπτιδίου. Από την άλλη η χορήγηση GnRH σε μεγάλες δόσεις, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκκρισης γοναδοτροπίνης από τα ανάλογα της GnRH. Η διαρκής χορήγησή της GnRH από υποδόριες κάψουλες εφαρμόζεται ευρέως για την καταστολή της έκκρισης τεστοστερόνης σε άνδρες με καρκίνο του προστάτη. Έτσι λοιπόν αρχικά παρατηρείται παροδικά αύξηση της τεστοστερόνης του ορού και με τη βοήθεια χορήγησης αναλόγων GnRH σε κατάλληλες δόσεις παρατηρείται παρατεταμένη έκκριση τεστοστερόνης και διέγερση γοναδοτροπίνης.

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα για ντόπινγκ είναι η τεστοστερόνη. Τόσο η τεστοστερόνη όσο και η επίτεστοστερόνη εκκρίνονται σε ίσες συγκεντρώσεις από τους όρχεις και ο μέσος λόγος τους T/E στα ούρα είναι περίπου ίσος με 1. Καταστολή της γοναδοτροπίνης άρα και μειωμένη ορχική παραγωγή τεστοστερόνης και επίτεστοστερόνης προκαλεί η χορήγηση τεστοστερόνης. Επομένως η χρήση εξωγενούς τεστοστερόνης αυξάνει τον λόγο T/E, ο οποίος γίνεται μεγαλύτερος του έξι και αποτελεί ένδειξη ντόπινγκ τεστοστερόνης. Η τιμή της αναλογίας T/E δεν επηρεάζεται από την χορήγηση αποκλειστικά hCG αλλά με την επαναλαμβανόμενη χορήγηση τεστοστερόνης και hCG καταστέλλεται η αύξηση της τιμής της αναλογίας, κάτι το οποίο συμβαίνει όταν έχουμε αποκλειστική χορήγηση τεστοστερόνης. Από την άλλη η ταυτόχρονη χρήση γοναδοτροπινών και τεστοστερόνης αναμένεται να μειώσει τη τιμή της αναλογίας T/E αλλά αυξάνοντας την ορχική έκκριση της τεστοστερόνης και της επίτεστοστερόνης. Τέλος η επίδραση της hCG στην τιμή της αναλογίας T/E είναι περιορισμένη γεγονός που σχετίζεται με τον χρόνο και τη δοσολογία των ορμονικών σκευασμάτων. (20)

3.9 Μηχανισμός δράσης β2-αγωνιστών

Διάφορους τρόπους χρησιμοποιούν οι αθλητές προκειμένου να βελτιώσουν την απόδοσή τους, ένα εκ των οποίων είναι η χρήση φαρμάκων που δρουν άμεσα ή έμμεσα στο β-αδρενεργικό σύστημα. Ο β2-AR αποτελεί τον κύριο στόχο στον αθλητισμό από τους 3 υπότυπους των β-αδρενοϋποδοχέων AR που ενισχύουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των κορτικοστεροειδών και διαθέτουν αναβολικές δράσεις και βρογχοδιασταλτικές ιδιότητες. Οι δράσεις των β2-αγωνιστών διακυβεύονται από τους πολυμορφισμούς, τις κοινές φυσικές μεταλλάξεις δηλαδή, που επηρεάζουν τη σήμανση των υποδοχέων και την απευαισθητοποίηση των υποδοχέων. Η απελευθέρωση και η επαναπρόσληψη της αδρεναλίνης και της νοραδρεναλίνης επηρεάζονται από τους έμμεσα δρώντες παράγοντες, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τελικά και οι τρεις τύποι β-

AR. Την ψευδαίσθηση καλύτερης απόδοσης μέσω ισχυρών ψυχοδιεγερτικών επιδράσεων παρέχουν αυτοί οι παράγοντες.

Εξαιτίας της ισχυρής βρογχοδιασταλτικής τους δράσης οι αγωνιστές των β2-ανδροϋποδοχέων χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην θεραπεία του άσθματος. Σύμφωνα με την WADA απαγορεύεται η χρήση τους όταν γίνεται χορήγηση με μορφή εισπνοής. Εξαίρεση στον συγκεκριμένο κανόνα αποτελούν η σαλβουταμόλη, η σαλμετερόλη, η τερβουταλίνη και η φορμοτερόλη. Η βρογχοδιαστολή καθώς επίσης οι αντιφλεγμονώδεις και οι αναβολικές δράσεις που διαθέτουν οι β2-αγωνιστές συμβάλουν στην βελτίωση της απόδοσης του αθλητή. Παρόλο που υπάρχουν ελάχιστες ενδείξεις ότι η εισπνοή θεραπευτικών δόσεων β2-AR προκαλεί ενίσχυση της απόδοσης του αθλητή, εάν γινόταν εισπνοή πολύ μεγάλων δόσεων ή υπήρχε εναλλακτικός τρόπος χορήγησης, τότε οι αναβολικές επιδράσεις στους μυς θα μπορούσαν να εντοπιστούν.

Η κλενβουτερόλη, αποτελεί έναν μακράς διάρκειας β2-αγωνιστή με άδεια για τη θεραπεία του άσματος σε συγκεκριμένο μόνο αριθμό χωρών, ενώ αναπτύχθηκε αρχικά ως μη στεροειδής αναβολικός παράγοντας με στόχο την βελτίωση της αποτελεσματικότητας μετατροπής ή του ρυθμού μετατροπής των τροφίμων σε σωματική μάζα σε ζώα. Επίσης η κλενβουτερόλη αποτελεί την ουσία για την οποία έχουν γίνει οι μελέτες αναβολικών επιδράσεων των β2-αγωνιστών. Η αύξηση των σκελετικών μυϊκών πρωτεϊνών εξαιτίας της αναστολής της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης είναι άμεσα συνδεδεμένη με τις αναβολικές επιδράσεις των από του στόματος χορηγούμενων β2-αγωνιστών. Μια ακόμα επίπτωση των β2-αγωνιστών αποτελεί η μείωση του σωματικού λίπους και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται επίσης και ως παράγοντες ανακατανομής. Αύξηση μυϊκής μάζας σημαίνει και αύξηση της παραγωγής μυϊκής δύναμης. Η επαγόμενη από β2-AR αγωνιστές μυϊκή υπερτροφία των σκελετικών μυών διακρίνεται σε αργού και γρήγορου τύπου, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να συμβεί μεταβολή της αναλογίας των ινών από ταχείας σε βραδείας σύσπασης. Δεν είναι αρκετά σαφές το κατά πόσο αυτό συνοδεύεται και από αύξηση της απόδοσης σε ένα άθλημα. Παρολαυτά ύστερα από χορήγηση κλενβουτερόλης σε ποντίκια έχει εντοπιστεί μείωση της απόδοσής τους κατά την άθληση αλλά και στα σπριντ. Ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι οι αναβολικές επιδράσεις αυτής της ουσίας οδηγούν σε αύξηση της κόπωσης. Η οδός χορήγησης των β2-αγωνιστών είναι αποδεδειγμένο ότι επηρεάζει τις επιδράσεις των β2-αγωνιστών στην απόδοση καθώς επίσης και στη μυϊκή μάζα και δύναμη. Η πυκνότητα των υποδοχέων των συγκεκριμένων μυών έχει καθοριστικό ρόλο στην αναβολική δράση των β2-αγωνιστών, ενώ η χρόνια χορήγηση των αγωνιστών έχει άμεση σχέση με την υπορύθμιση του υποδοχέα γεγονός που περιορίζει την αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων παραγόντων. Γενικότερα η σηματοδότηση που είναι κατευθυνόμενη από προσδέτες οφείλεται στην ικανότητα των συνδέσμων να δημιουργούν διακριτές διαμορφώσεις-σύμπλοκα με τον υποδοχέα που οδηγούν σε ποιοτικά διαφορετικές αποκρίσεις. Πολλές ενώσεις για τις οποίες

αρχικά πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς με σκοπό να εμποδίσουν τις δράσεις των αγωνιστών, ως ανταγωνιστές, στην πραγματικότητα διαθέτουν την ικανότητα επιλεκτικής ενεργοποίησης διακριτών μονοπατιών μέσω της αλληλεπίδρασής τους με συγκεκριμένες διαμορφώσεις του υποδοχέα. Τέλος, ενώσεις που θεωρούνταν απλά αποκλειστές, τώρα έχουν ένα τεράστιο φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων. (21)

3.10 Μηχανισμός δράσης ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης

Άμεση σχέση υπάρχει ανάμεσα στην αυξημένη απόδοση και στα αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, ύστερα από μελέτες που ασκούνται σε αρουραίους. Εκεί εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης που είχαν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της παροχής οξυγόνου στον εγκέφαλο, αυξημένα μυϊκά λιπαρά οξέα και γλυκογόνο με μειωμένη συσσώρευση γαλακτικού οξέος. Από την άλλη στους ανθρώπους, εξαιτίας της αυξημένης μέγιστης ικανότητας μεταφοράς και αξιοποίησης του οξυγόνου και της μέγιστης αερόβιας ισχύος εντοπίστηκε βελτίωση απόδοσης της τάξης του 5-10%. Η βελτίωση αυτή αναφέρεται δηλαδή σε μεταβολή στην απόδοση σε μεγάλες αποστάσεις αλλά και στην χρονομέτρηση. Το όφελος λοιπόν από την αυξημένη αιμοσφαιρίνη ήταν συγκρίσιμο είτε η αύξηση οφειλόταν σε χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης είτε σε μετάγγιση. Αυτό μας δείχνει ότι η αιτία της βελτίωσης δεν ήταν η μέθοδος με την οποία αυξήθηκαν τα ποσοστά αιμοσφαιρίνης αλλά ήταν τα ίδια τα αυξημένα ποσοστά αιμοσφαιρίνης και έπειτα η αυξημένη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου.

Η αύξηση του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων προκαλείται από τους αγωνιστές του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης μέσω της διέγερσης της ερυθροποίησης και έχει ως απώτερο σκοπό την βελτίωση της αθλητικής απόδοσης. Στην κατηγορία των αγωνιστών υποδοχέων ερυθροποιητίνης περιλαμβάνονται οι ανασυνδυασμένες ανθρώπινες ερυθροποιητίνες rHuEPOs, η κύρια λειτουργία των οποίων είναι η διέγερση ερυθροποίησης μέσω της αύξησης των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Η ενίσχυση της αιμοσφαιρίνης επάγει την ενίσχυση της ικανότητας μεταφοράς οξυγόνου που διαθέτει η αιμοσφαιρίνη με απώτερο σκοπό την βελτίωση της αντοχής του αθλητή.

Η ενδογενής ερυθροποιητίνη eEpo παράγεται στα νεφρά από τα διάμεσα ινοβλαστικά κύτταρα και στο ήπαρ από τα ηπατοκύτταρα. Αποτελεί ένα πολύπλοκο βιολογικό προϊόν, οι ιδιότητες του οποίου εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου από το οποίο παράγεται. Μάλιστα το κύτταρο που παράγει την ενδογενή ερυθροποιητίνη επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις των κυκλοφορούντων αυξητικών παραγόντων και θρεπτικών ουσιών καθώς και από ειδικές αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου. Οι φυσικές και βιοφυσικές ιδιότητες των μορίων της ενδογενούς ερυθροποιητίνης, οι τρισδιάστατες δομές του πεπτιδίου και το μοντέλο της μικροετερογένειας που συνδέεται με τη μετα-μεταφραστική επεξεργασία επηρεάζονται από την

εκκρινόμενη ουσία, η οποία υφίστανται μηχανισμούς διαφορικής κάθαρσης. Από την άλλη η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη προκύπτει υπό ελεγχόμενες συνθήκες ανάπτυξης από μη φυσικά μετασχηματισμένα κύτταρα (π.χ κύτταρα ωοθήκης κινεζικού χάμστερ) και εν συνεχεία υπόκεινται σε διαδικασίες καθαρισμού και αποθήκευσης. Επομένως οι μέθοδοι παρασκευής δεν ακολουθούν τη φυσική διαδικασία ούτε για την φυσική ούτε για την ανασυνδυασμένη ουσία, οπότε οι διαφορές μεταξύ των δυο ουσιών μπορούν να ανιχνευθούν στις δοκιμές. Μια μετα-μεταφραστική προσθήκη τριών N-συνδεδεμένων και μιας O-συνδεδεμένης αλυσίδας υδατανθράκων εκ των οποίων μπορεί να διαθέτει παραλλαγές στο μέγεθος, στην περιεκτικότητα σε διάφορα σάκχαρα στο μήκος της αλυσίδας, στο μοτίβο διακλάδωσης ή στη σύνθεση, γεγονός που αφορά τόσο την ανασυνδυασμένη όσο και την ενδογενή ερυθροποιητίνη. Επίσης και οι δυο αυτές ουσίες χαρακτηρίζονται από μια φυσική διακύμανση στο φορτίο, εξαιτίας της ύπαρξης σε κάθε μια από τις τρεις N-συνδεδεμένες αλυσίδες υδατανθράκων έως και τεσσάρων σιαλικών οξέων και στη μοναδική O-συνδεδεμένη υδατανθρακική αλυσίδα έως και δυο σιαλικά οξέα. Για το λόγο αυτό και οι δυο αυτές ουσίες μπορεί να διαθέτουν συνολικά έως και 14 σιαλικά οξέα, ενώ διαφέρουν ως προς τις αναλογίες των γλυκομορφών και ως προς τους δεσμούς μεταξύ των σακχάρων αν και διαθέτουν τον ίδιο αριθμό υδατανθρακικών αλυσίδων που αποτελούνται από τα ίδια σάκχαρα. Διαφέρουν επίσης στο φορτίο γεγονός το οποίο οφείλεται στην περιεκτικότητα σε αρνητικά φορτισμένα θειικά άλατα, με την ενδογενή ερυθροποιητίνη να είναι αρκετά θειωμένη με έως και τρεις ομάδες ανά υδατανθρακική αλυσίδα. Δηλαδή η ενδογενής ερυθροποιητίνη είναι αρκετά πιο όξινη συγκριτικά με την ανασυνδυασμένη, γεγονός που συμβάλλει στην διάκριση τους κατά την έκκριση τους από τα ούρα. (22)

3.11 Μηχανισμός δράσης γονιδιακού ντόπινγκ

Αν και η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει διάφορους ορισμούς, στην πραγματικότητα πρόκειται για την διαχείριση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στο σώμα ενός ασθενούς και τις περισσότερες φορές επιτυγχάνεται με τη χορήγηση μιας λειτουργικής έκδοσης του μη-λειτουργικού γονιδίου. Στη περίπτωση όμως κάποιας λοίμωξης ή ισχαιμικής καρδιοπάθειας, λαμβάνει χώρα μεταφορά γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που τροποποιούν κάποια επίκτητη ασθένεια. Γενικά οι στόχοι του γονιδιακού ντόπινγκ είναι διάφοροι, όπως για παράδειγμα η αύξηση της παροχής οξυγόνου μέσω αύξησης του αιματοκρίτη με τη βοήθεια της ερυθροποιητίνης, με μεταβολές στον φαινότυπο των μυών με την έκφραση του δέλτα υποδοχέα που ενεργοποιείται από τον πολλαπλασιαστή και άλλα συναφή μόρια, με επαγωγή των μυών υπερτροφίας με την υπερέκφραση διάφορων παραλλαγών σύνδεσης του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1, με τον αποκλεισμό δράσης της μυοστατίνης.

Ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας IGF-1 παράγεται στο ήπαρ και στους μυς, χαρακτηρίζεται από αναβολική δράση και είναι άμεσα συνδεδεμένος με την συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης GH. Έχει εντοπιστεί ότι ο αυξητικός παράγοντας IGF-1, όταν χορηγείται το γονίδιο με ένεση, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μυϊκού όγκου. Ακόμα μεγαλύτερη υπερτροφία των μυών παρατηρείται με το συνδυασμό προπόνησης αντίστασης και υπερέκφρασης του IGF-1. Η επέκταση λοιπόν αυτής της θεραπείας στους αθλητές αντανακλάται σε ενισχυμένη ενδυνάμωση των μυών ενός παίκτη τένις ή των δικεφάλων ενός πυγμάχου. Επίσης ο περαιτέρω συνδυασμός του IGF-1 με άλλους αυξητικούς παράγοντες ή με ενισχυμένα σε δύναμη προγράμματα προπόνησης θα οδηγούσαν σε ακόμα μεγαλύτερη μυϊκή υπερτροφία. Τέλος η μεταφορά γονιδίων στους μύες με τη βοήθεια ιογενών φορέων εξαλείφει την ηλικιακά σχετιζόμενη μυϊκή ατροφία και παράλληλα παρέχει προσθετικά αποτελέσματα όσο αφορά την μυϊκή ατροφία. Δηλαδή υπάρχει η δυνατότητα ενίσχυσης της δύναμης των αθλητών μέσω της αυξημένης έκφρασης διαφόρων παραλλαγών του IGF-1.

Η μυοστατίνη αν και παράγεται από τον ίδιο μυ, δρα είτε με αυτοκρινή είτε με παρακρινή τρόπο, πάντα ως αρνητικός ρυθμιστής της μυϊκής μάζας και του μυϊκού σχηματισμού. Έρευνες σε ποντίκια στα οποία το γονίδιο της μυοστατίνης είναι απενεργοποιημένο έχει παρατηρηθεί έντονη μυϊκή υπερτροφία, γεγονός το οποίο παρέχει τη δυνατότητα στους αθλητές για γρήγορη ενίσχυση της μυϊκής τους μάζας με τον αποκλεισμό της μυοστατίνης. Ο αποκλεισμός αυτός επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση ενός ανθρωποποιημένου μονοκλωνικού αντισώματος είτε με την ενίσχυση της έκφρασης της φολλιστατίνης που αποτελεί φυσικό ανταγωνιστή της μυοστατίνης. Η χορήγηση αναστολέων της μυοστατίνης έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία και ευρεία αύξηση της μάζας των σκελετικών μυών εξαιτίας της αύξησης του πάχους των μυϊκών ινών (υπερτροφία) και του αριθμού αυτών (υπερπλασία), οπότε εντοπίζεται και λιγότερο λίπος και συνδετικός ιστός στους μύες. Επομένως η κύρια λειτουργία αυτών των αναστολέων είναι η ενίσχυση του μεγέθους των μυών χωρίς άσκηση και πολύ εύκολα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ως αγωνιστές στο γονιδιακό ντόπινγκ.

Η εισαγωγή ενός πρόσθετου αντιγράφου ενός γονιδίου σε αθλητή με στόχο την ενίσχυση της σύνθεσης της ερυθροπρωτεΐνης, σημαίνει ότι ο αθλητής θα διαθέτει περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια άρα και περισσότερα κύτταρα που είναι μεταφορείς οξυγόνου από τους ιστούς στους πνεύμονες άρα ο αθλητής θα διαθέτει μεγαλύτερη αντοχή. Η ερυθροποιητίνη μπορεί να προσφέρει αυτό που θα ήθελε κάθε αθλητής αντοχής, καθώς δίνει το σήμα στον οργανισμό σύνθεσης νέων ερυθρών αιμοσφαιρίων και οξυγόνωσης των ιστών, οπότε ενισχύεται η αερόβια ικανότητα και η αντοχή του αθλητή. Η χορήγηση της ορμόνης γίνεται είτε με ένεση ως πρωτεΐνη είτε με εισαγωγή του γονιδίου που κωδικοποιεί την ερυθροποιητίνη στα κύτταρα του σώματος.

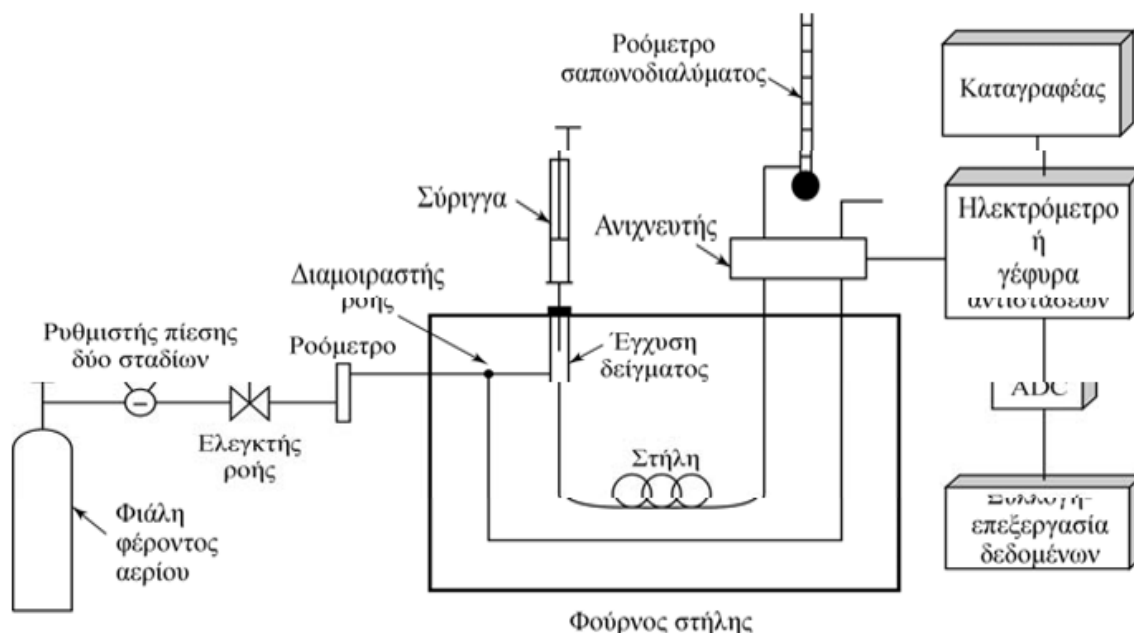
Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF αξιοποιείται για την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση νέων αιμοφόρων αγγείων. Το γονιδιακό ντόπινγκ είναι εφικτό με τη χρήση των φορέων γονιδιακής θεραπείας VEGF. Επομένως η χρήση των θεραπειών αυτών από τους αθλητές θα προσέδιδε στους ιστούς πληθώρα οξυγόνου και άλλων θρεπτικών συστατικών. Δηλαδή η βελτίωση της παραγωγής των αιμοφόρων αγγείων και γενικότερα οι καλύτερες συνθήκες στα αγγεία της καρδιάς, των μυών και άλλων τμημάτων του σώματος συμβάλει στην καθυστέρηση της αίσθησης της εξάντλησης. (23)

4. Βασικές μέθοδοι προσδιορισμού ουσιών doping

4.1 Αέρια Χρωματογραφία GC

Η χρωματογραφία αποτελεί μια βασική μέθοδο διαχωρισμού ουσιών, η οποία στηρίζεται στις διαφορές στις κατανομές των ουσιών ανάμεσα σε μια κινητή φάσης (αέρια ή στερεή) και σε μια στατική φάσης (αέρια ή στερεή). Γενικότερα οι διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές χαρακτηρίζονται είτε από το μέσο που συγκρατεί τη στατική φάση (χαρτί, στήλη ή πλάκα), είτε από την ποσότητα των διαχωριζόμενων ουσιών (αναλυτική ή παρασκευαστική χρωματογραφία) είτε από τον μηχανισμό κατανομής των ουσιών μεταξύ κινητής και στατικής φάσης είτε από τον τύπο της κινητής φάσης (αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό), είτε από τις εκάστοτε ιδιαιτερότητες των χρησιμοποιούμενων τεχνικών.

Η αέρια χρωματογραφία ή διαφορετικά η χρωματογραφία αέριας φάσης αποτελεί το σύνολο των αναλυτικών χρωματογραφικών τεχνικών, όπου η κινητή φάση είναι αέριο. Εδώ λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του εξατμισθέντος δείγματος, ως αποτέλεσμα της κατανομής τους μεταξύ μιας κινητής αέριας φάσης και μιας στερεής ή υγρής στατικής φάσης που υπάρχουν στη στήλη. Δηλαδή η χρωματογραφία στηρίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είτε είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς αερίου είτε στα τοιχώματα ενός τριχοειδούς σωλήνα. Για να πραγματοποιηθεί επομένως ο χρωματογραφικός προσδιορισμός, το δείγμα αρχικά εξατμίζεται και έπειτα εισάγεται στην κεφαλή της χρωματογραφικής στήλης, όπου η έκλυση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο συνιστά την κινητή φάση. Φυσικά δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της κινητής φάσης και των μορίων του αναλύτη, η οποία είναι υπεύθυνη για την διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Τις περισσότερες φορές η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο, ο βασικός ρόλος του οποίου είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Από την άλλη η στατική φάση είναι ένα μικροσκοπικό στρώμα ιξώδους υγρού σε μια επιφάνεια στερεών σωματιδίων σε ένα αδρανές στερεό στήριγμα στο εσωτερικό ενός μεταλλικού ή γυάλινου σωλήνα που αποτελεί την στήλη διαχωρισμού.



Σχήμα 7 Οργανολογία χρωματογράφου GC

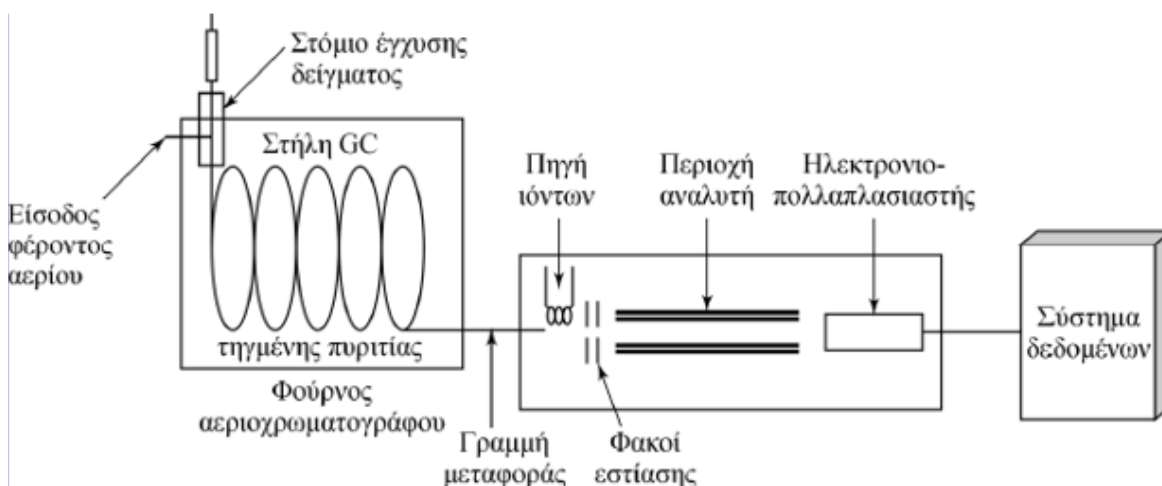
Τα κύρια μέρη του GC (Σχήμα 7) είναι το σύστημα παροχής του φέροντος αερίου, το οποίο είναι χημικά αδρανές και για τη ρύθμιση της ταχύτητας ροής του απαιτούνται ρυθμιστές πίεσης και ταχύτητας. Η ταχύτητα ροής υπολογίζεται με τη βοήθεια του ροόμετρου, όπου οι σύγχρονοι αέριοι χρωματογράφοι διαθέτουν ηλεκτρονικά ροόμετρα, των οποίων οι τιμές παρατηρούνται μέσω υπολογιστή ώστε η παροχή να παραμένει σταθερή στις επιθυμητές τιμές. Ακολουθεί το σύστημα έγχυσης του δείγματος, ο φούρνος με τη βοήθεια του οποίου επιτυγχάνεται ο έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης. Για την επίτευξη του βέλτιστου διαχωρισμού απαιτείται εφαρμογή της ελάχιστης δυνατής θερμοκρασίας. Τέλος σε μια διάταξη GC συναντάμε τη στήλη, διάφορα ηλεκτρονικά και το σύστημα καταγραφής των δεδομένων.

Γενικά έχουν εξετασθεί και χρησιμοποιηθεί πάρα πολλοί ανιχνευτές. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ιδανικός ανιχνευτής ενός αερίου χρωματογράφου χρειάζεται να διαθέτει ικανοποιητική ευαισθησία, γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους, σταθερότητα, αναπαραγωγιμότητα, σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από τη ταχύτητα ροής, μεγάλη ευκολία κατά την χρήση τους, περιοχή λειτουργίας θερμοκρασιών 25-400 °C και τέλος να μην καταστρέφει τον αναλυτή κατά την ανίχνευσή του. Στην πραγματικότητα κανένας από τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται δεν συνδυάζει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και κάποιοι από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους περιγράφονται παρακάτω:

- Ανιχνευτές Ιοντισμού Φλόγας FID, ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος στη GC, όπου το υγρό έκλυσης από τη στήλη κατευθύνεται σε μια φλόγα αέρα-υδρογόνου. Δηλαδή ο ανιχνευτής διαθέτει μια φιάλη υδρογόνου, η οποία αναμειγνύεται με τον αέρα. Έπειτα στη στήλη εισάγεται

αέρα και υδρογόνο και προκύπτει η φλόγα στην οποία εισέρχονται και οι ουσίες του δείγματος. Επομένως παράγονται ηλεκτρόνια, τα οποία ιονίζονται, οπότε έχουμε προσανατολισμένη κίνηση ηλεκτρονίων, δηλαδή ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο υπολογίζεται με τη βοήθεια ηλεκτροδίων. Ο FID δεν λειτουργεί για όλες τις ουσίες και εφαρμόζεται μόνο σε ανηγμένα άτομα.

- Ανιχνευτές Θερμικής Αγωγιμότητας TCD, πρόκειται για ηλεκτρικά θερμαινόμενα στοιχεία των οποίων η θερμοκρασία σε συνθήκες κατανάλωσης σταθερής ισχύος εξαρτάται από τη θερμική αγωγιμότητα του περιβάλλοντος αερίου. Δηλαδή υπολογίζει την μεταβολή της θερμικής αγωγιμότητας R, χωρίς να καταστρέψει το δείγμα. Το σήμα που προκύπτει από τον TCD είναι μια μεταβολή στην ψύξη του ανιχνευτή ως συνάρτηση της οποίας αέριο διέρχεται μέσω του ανιχνευτή από την αναλυτική στήλη ή την παροχή φέροντος αερίου.
- Ανιχνευτές Σύλληψης Ηλεκτρονίων ECD, όπου το έκλουσμα της στήλης διέρχεται πάνω από ένα β-ραδιενεργό υλικό, με αποτέλεσμα ένα ηλεκτρόνιο από τη ραδιενεργό πηγή προκαλεί ιοντισμό του φέροντος αερίου και παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος. Απουσία οργανικής ένωσης παρατηρείται ένα σταθερό ρεύμα μεταξύ του ζεύγους των ηλεκτροδίων. Δηλαδή οι ενώσεις που έλκουν ηλεκτρόνια ελαττώνουν το στάσιμο ρεύμα και δίνουν μετρήσιμη απόκριση. Οι ECD εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τις αλογονούχες ενώσεις.
- Θερμιονικοί Ανιχνευτές TID, είναι εκλεκτικοί ως προς οργανικές ενώσεις με φώσφορο και άζωτο. Κατασκευαστικά οι TID είναι όμοιοι με τους FID, δηλαδή το έκλουσμα της στήλης αναμιγνύεται με υδρογόνο, εισάγεται μέσω ακροφυσίου στην φλόγα και τελικά καίγεται. Τα υψηλά ιοντικά ρεύματα που παράγονται είναι αρκετά χρήσιμα για το προσδιορισμό ενώσεων με άζωτο και φώσφορο.
- Ανιχνευτές Φασματογραφίας μαζών MS, όπου το έκλουσμα του αερίου χρωματογραφήματος εισέρχεται στον φασματογράφο μαζών, στο εσωτερικό του οποίου γίνεται θραύση, ιοντισμός, ανάλυση και ταυτοποίηση των μορίων αυτών. Το σύστημα GC/MS έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση πολυάριθμων φυσικών και βιολογικών συστημάτων, καθώς και για την διαπίστωση ατελών διαχωρισμών συστατικών ενός μίγματος. Με τη φασματομετρία μάζας μας δίνεται η δυνατότητα να προσδιορίσουμε όχι μόνο αν μια κορυφή περιέχει περισσότερα του ενός συστατικά αλλά μπορούμε και να τα ταυτοποιήσουμε. Δηλαδή αν υπάρχει άγνωστο αυτό μπορεί να αναγνωριστεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης, η οποία περιέχει γνωστά φάσματα MS. Μια ακόμη σημαντική δυνατότητα που παρέχεται είναι η εξακρίβωση της καθαρότητας της ουσίας, δηλαδή αν η κορυφή που προκύπτει αντιστοιχεί σε μια μόνο ουσία.



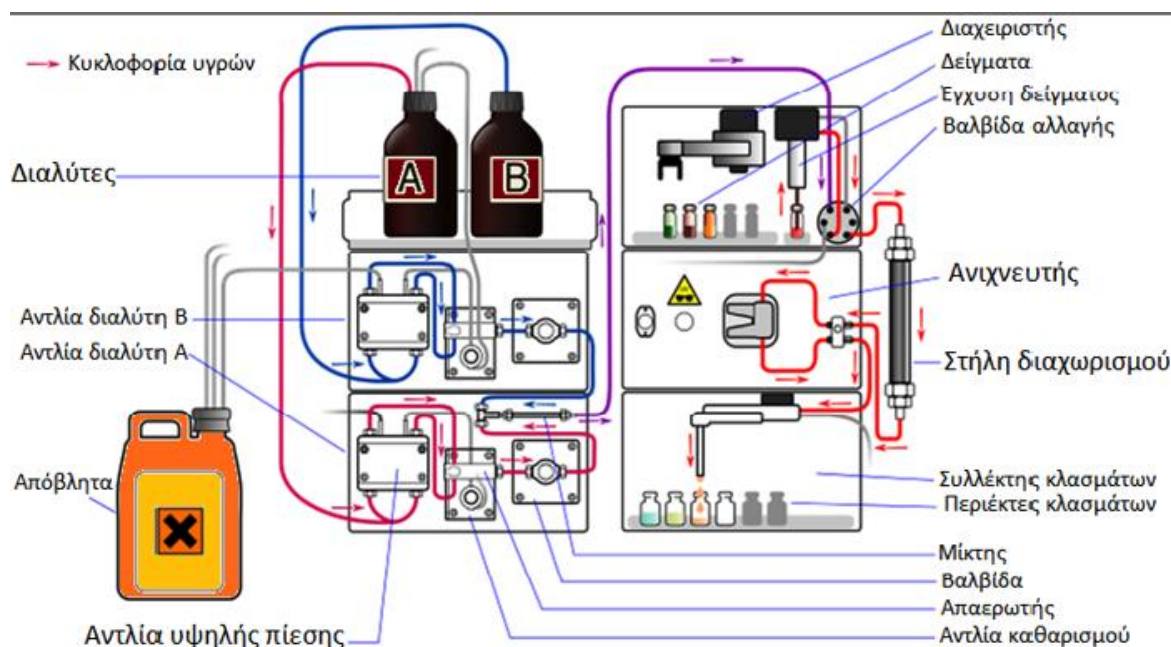
Σχήμα 8 Οργανολογία χρωματογράφου GC/MS

Έτσι λοιπόν στην GC/MS το φασματόμετρο μάζας MS κατέχει τη θέση ανιχνευτή, το οποίο παρακολουθεί το ιοντικό ρεύμα καθορισμένου λόγου ή λόγων m/z προερχόμενων από τα συστατικά του εκλούσματος (Σχήμα 8). Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι τριχοειδείς, καθώς με τις πληρωμένες στήλες ήταν απαραίτητος ο περιορισμός των μεγάλων όγκων του φέροντος αερίου που εξέρχονταν από τον αέριο χρωματογράφο. Απαραίτητη είναι επίσης η ύπαρξη φούρνου, ο οποίος περιλαμβάνει τόσο τη στήλη όσο και το θάλαμο εισαγωγής του δείγματος. Έτσι λύθηκε και το πρόβλημα της θερμικής αποικοδόμησης των συστατικών του δείγματος, καθώς η ελάττωση της θερμοκρασίας μπορεί να ελαχιστοποιήσει την αποικοδόμηση. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές ιόντων στην διάταξη GC/MS είναι οι πηγές ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων και οι πηγές χημικού ιοντισμού. Οι συνηθέστεροι αναλυτές μαζών είναι του τύπου τετραπόλου και παγίδευσης ιόντων αλλά και οι τύπου χρόνου πτήσης. Στη συγκεκριμένη τεχνική το φασματόμετρο μαζών σαρώνει συνεχώς τις μάζες κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Η χρωματογραφία GC/MS έχει επίσης συνδυαστεί με φασματόμετρα μαζών τύπου «σε σειρά» ή αλλιώς με συζευγμένη φασματομετρία μαζών GC/MS/MS. Πρόκειται δηλαδή για ένα σύστημα με συζευγμένους αναλυτές μαζών με στόχο την επίτευξη υψηλής διαχωριστικότητας παραπλήσιων λόγων m/z . (35)

4.2 Υγρή Χρωματογραφία LC & Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC

Στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι ένα υγρό. Δηλαδή η στήλη διαρρέεται από υγρό, όπου κάνουμε έγχυση του υγρού δείγματος και τα μόρια του δείγματος διαθέτουν την ικανότητα να αλληλοεπιδράσουν με τα υγρά στοιχεία της στήλης. Η υγρή χρωματογραφία LC πραγματοποιείται με γυάλινες στήλες διαμέτρου 1-5cm και μήκους 50-500cm, πληρωμένες με στερεά σωματίδια επικαλυμμένα με ένα προσροφημένο υγρό, το οποίο συνιστά τη στατική φάση.

Δηλαδή οι κλασσικές τεχνικές υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιούν πληρωμένες στήλες σχετικά μεγάλης διαμέτρου, οι οποίες είναι πληρωμένες με επίσης μεγάλης διαμέτρου σωματίδια, όπου η ροή που επιτυγχάνεται είναι χαμηλής ταχύτητας και οφείλεται είτε στη βαρύτητα είτε σε αντλίες χαμηλής πίεσης. Επειδή λοιπόν στην LC οι χρόνοι διαχωρισμού είναι μεγάλοι και αρκετές φορές διαρκούν κάποιες ώρες, βελτιώθηκε η αποδοτικότητα της στήλης με μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αναπτυχθούν εξελιγμένα όργανα, τα οποία λειτουργούν υπό υψηλή πίεση και δε λειτουργούν με τη βοήθεια γυάλινων στηλών με βαρυτική ροή, όπως συμβαίνει στη κλασσική υγροχρωματογραφία. Οι σύγχρονες αυτές τεχνικές συνιστούν την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC, στην οποία επιτυγχάνεται η επιθυμητή ροή υπό την εφαρμογή υψηλών πιέσεων και μικρής διαμέτρου σωματιδίων υλικού πλήρωσης, οπότε διατίθεται μεγάλο εμβαδό επιφάνειας για αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη στατική φάση και στα μόρια που ρέουν. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι με την HPLC επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός σε μικρότερο χρόνο. Γενικότερα η HPLC είναι η πιο δημοφιλής από τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού εξαιτίας της ευαισθησίας της, της εύκολης προσαρμογής της σε ακριβείς ποσοτικούς διαχωρισμούς, της δυνατότητας εφαρμογής της σε προσδιορισμούς ουσιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος και της καταλληλότητάς της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών.



Σχήμα 9 Οργανολογία χρωματογράφου HPLC

Η οργανολογία της HPLC (Σχήμα 9) αρχίζει με τα δοχεία κινητής φάσης και τα συστήματα επεξεργασίας διαλυτών. Δηλαδή διάφορα γυάλινα δοχεία καθένα από το οποία

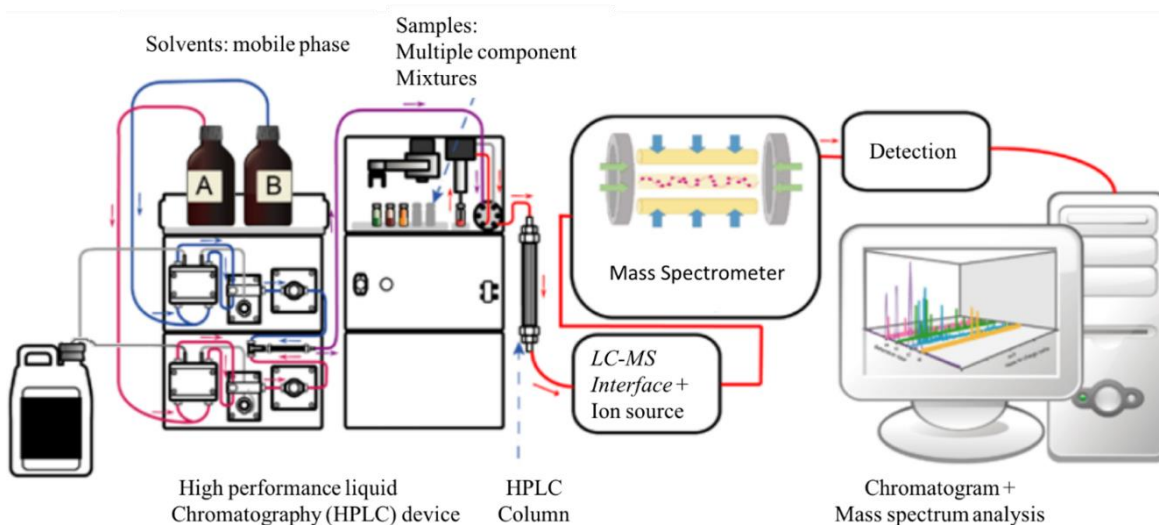
περιέχει διαλύτη και διάφορα μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων και σκόνης από τα υγρά, που είναι υπεύθυνα για τη κακή επαναληψιμότητα στη ταχύτητα ροής και στη διεύρυνση των κορυφών. Εντοπίζουμε επίσης απαερωτές, οι οποίοι αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης, διάφορες διατάξεις που θερμαίνουν και αναδεύουν τους αναλύτες, οπότε επιτυγχάνεται η σωστή επεξεργασία των διαλυτών πριν την εισαγωγή τους στο δοχείο. Δηλαδή τα σύγχρονα συστήματα HPLC διαθέτουν διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δυο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμειξης με διαρκώς μεταβαλλόμενους ρυθμούς. Ακολουθεί το σύστημα άντλησης και το σύστημα έγχυσης του δείγματος, το οποίο συνήθως είναι αυτοματοποιημένο και δεν απαιτεί παρακολούθηση. Στη συνέχεια συναντάμε την αναλυτική στήλη διαχωρισμού, η οποία χαρακτηρίζεται από μικρή διάμετρο, είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα και δεν απαιτεί αυστηρό έλεγχο της θερμοκρασίας της. Τέλος σε ένα σύστημα HPLC συναντάμε τον ανιχνευτή και το ηλεκτρονικό σύστημα καταγραφής του σήματος.

Γενικά οι ανιχνευτές LC αποτελούν παραδοσιακά αναλυτικά όργανα προσαρμοσμένα σε κυψελίδες ροής ώστε να υπολογίζουν χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών σε υγρά ρεύματα. Δηλαδή τα ιδανικά χαρακτηριστικά ενός LC ανιχνευτή είναι ίδια με εκείνα του GC ανιχνευτή, με μοναδική διαφορά ότι δεν απαιτείται να ανταποκρίνεται σε τόσο μεγάλη περιοχή θερμοκρασιών. Ακόμα ένας HPLC ανιχνευτής πρέπει να διαθέτει τον ελάχιστο δυνατό εσωτερικό όγκο με στόχο τον περιορισμό της διεύρυνσης των κορυφών και να συμβαδίζει με ροές υγρών. Η επιλογή του κατάλληλου ανιχνευτή και του κατάλληλου μήκους κύματος είναι απαραίτητα για τη βελτιστοποίηση της ευαισθησίας ανίχνευσης HPLC. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο ανιχνευτής παράγει ένα σήμα, το οποίο σχετίζεται με τη ποσότητα του αναλύτη που εκλύεται από τη στήλη, το οποίο έπειτα μεταφέρεται και καταγράφεται από κάποιο ηλεκτρονικό σύστημα. Στα συστήματα LC χρησιμοποιούνται δυο είδη ανιχνευτών, εκείνοι που ανταποκρίνονται σε μια βασική ιδιότητα της κινητής φάσης (π.χ διηλεκτρική σταθερά, δείκτης διάθλασης, πυκνότητα) και οι τιμές τους επηρεάζονται από την παρουσία των εκλούμενων συστατικών και εκείνοι που ανταποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλούμενου συστατικού (π.χ απορρόφηση στο υπεριώδες, φθορισμός, ρεύμα διάχυσης) και φυσικά η ιδιότητα αυτή πρέπει να απουσιάζει από την κινητή φάση. Η λειτουργία του ανιχνευτή είναι η παραγωγή σήματος σχετιζόμενου με την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που εκλύεται από την στήλη, η οποία τελικά μεταφέρεται και καταγράφεται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Γενικά οι πιο χαρακτηριστικές κατηγορίες ανιχνευτών είναι οι παρακάτω:

- Ανιχνευτές απορρόφησης UV-ορατού, αποτελούν διατάξεις διπλής δέσμης, όπου η μια δέσμη είναι η δεσμίδα αναφοράς και η άλλη διέρχεται από τη δεσμίδα έκλυσης. Ακολουθεί σύγκριση των εντάσεων των δυο δεσμών με τη βοήθεια πανομοιότυπων φωτοηλεκτρικών ανιχνευτών. Δηλαδή το UV/VIS υπολογίζει την ικανότητα των αναλυτών να απορροφούν φως σε δεδομένο μήκος κύματος στη περιοχή UV-ορατού. Αντίστοιχα η φωτοδιόδος

παρακολουθεί την απορρόφηση των αναλυτών σε διάφορα μήκη κύματος και ανιχνεύει όλες εκείνες τις ενώσεις που διαθέτουν απορρόφηση μεγαλύτερη από μηδέν.

- Ανιχνευτές φθορισμού, οι οποίοι κατασκευαστικά είναι όμοιοι με τα φθορισμόμετρα. Στη πλειοψηφία αυτών ο φθορισμός παρατηρείται με φωτοηλεκτρικό ανιχνευτή τοποθετημένο κάθετα συγκριτικά με τη δέσμη διέγερσης. Για τη διέγερση χρησιμοποιούν πηγή υδραργύρου και ένα ή περισσότερα φίλτρα για την απομόνωση μιας ζώνης από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία. Επίσης εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με τους ανιχνευτές UV/VIS και απαιτούν υψηλή ένταση φωτός προκειμένου να ανιχνεύσουν τους αναλύτες.
- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, όπου ο διαλύτης διέρχεται μέσω του ενός μισού της κυψελίδας και το υγρό έκλουσης από το άλλο μισό. Δηλαδή μετρούν τον δείκτη διάθλασης του διαλύτη της στήλης που διέρχεται από την κυψελίδα ροής. Η μεταβολή στο σήμα εξόδου, εξαιτίας της τελικής μετατόπισης της ακτίνας στην φωτοευαίσθητη επιφάνεια του ανιχνευτή, ενισχύεται και τελικά καταγράφεται ως χρωματογράφημα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτού του τύπου ανιχνευτή είναι το γεγονός ότι αποκρίνεται σε όλα σχεδόν τα εκλούόμενα συστατικά, ενώ μειονέκτημα αποτελεί το ότι δεν είναι συμβατός σε μεθόδους βαθμιδωτής έκλουσης.
- Ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών, όπου ομοίως με την αεριοχρωματογραφία G, το φασματόμετρο μαζών συμβάλει δραστικά στην ταυτοποίηση ουσιών καθώς αυτές εκλούνται από την στήλη. Δηλαδή το φασματόμετρο κατέχει τη θέση του ανιχνευτή παρακολουθώντας το ιοντικό ρεύμα καθορισμένου λόγου m/z προερχόμενο από τα συστατικά του εκλούσματος. Η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή των αναλυόμενων ουσιών και συνδυάζει την καλύτερη ευαισθησία με την υψηλότερη ικανότητα αναγνώρισης.



Σχήμα 10 Οργανολογία συστήματος LC/MS

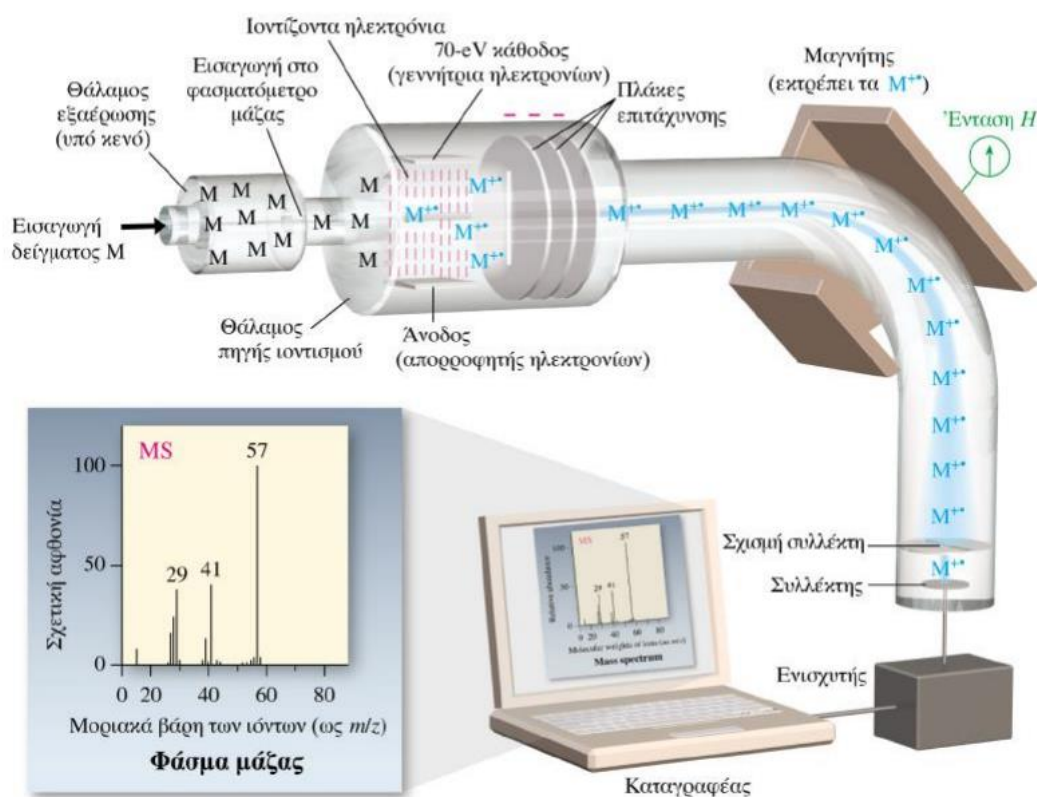
Ο συνδυασμός της HPLC και της φασματομετρίας μαζών παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα, διότι παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης ουσιών με παραπλήσιες χρωματογραφικές κορυφές μέσω της ανίχνευσης ιόντων συγκεκριμένου μοριακού βάρους (Σχήμα 10). Έτσι λοιπόν ο συνδυασμός παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος, τη δομή και δεδομένα ποσοτικής ανάλυσης. Επειδή το φασματόμετρο μαζών απαιτεί αέριο δείγμα και η έξοδος μιας στήλης LC είναι διάλυμα του αναλύτη σε κάποιο διαλύτη, απαιτείται απομάκρυνση του διαλύτη με εξάτμιση. Ύστερα ακολουθεί η διασύνδεση της στήλης με τη βοήθεια κάποια τεχνική ιοντισμού σε χαμηλή ροή υπό ατμοσφαιρική πίεση. Πιο αναλυτικά, γίνεται εισαγωγή υπό ατμοσφαιρική πίεση του εκλούσματος της στήλης LC σε μια πηγή ιοντισμού. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ιοντισμού είναι αυτή του ηλεκτροψεκασμού και του χημικού ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση. Έτσι λοιπόν τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται με τον αναλύτη μαζών και ανιχνεύονται με ανιχνευτή ιόντων. Γίνεται εισαγωγή των ιόντων του αναλύτη στο φασματόμετρο μάζας, όπου οι διαδρομές πτήσης των ιόντων μεταβάλλονται με τη μεταβολή των εφαρμοζόμενων πεδίων, οπότε τα ιόντα διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση τον λόγο m/z . Έπειτα γίνεται συλλογή και ανίχνευση των ιόντων από διάφορους ανιχνευτές μάζας, οπότε τα διαχωριζόμενα ιόντα που προσκρούουν στην επιφάνεια του πολλαπλασιαστή δημιουργούν ροή ηλεκτρονίων και παράγεται ρεύμα. Το παραγόμενο αυτό ρεύμα μετράται και συνδέεται με τις συγκεντρώσεις των ιόντων με τη βοήθεια του φασματόμετρου μαζών κάθε χρονική στιγμή.

Ωστόσο για ορισμένα πολύπλοκα μίγματα ο συνδυασμός LC/MS δεν παρέχει αρκετή αναλυτική ισχύ, οπότε κρίνεται απαραίτητη η ύπαρξη σύνδεσης δυο ή περισσότερων αναλυτών μάζας, οπότε προκύπτουν τα φασματόμετρα μαζών σε σειρά και η τεχνική LC/MS/MS. Πρόκειται συνήθως για τριπλά τετραπολικά συστήματα ή τετραπολικά φασματόμετρα παγίδας ιόντων, όπου προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα ο τελικός αναλυτής μαζών είναι τύπου χρόνου πτήσης TOF. (35)

4.3 Φασματομετρία μάζας MS

Η φασματομετρία μάζας MS έχει ένα αρκετά ευρύ πεδίο εφαρμογών για ταυτοποίηση στοιχείων σε δείγματα και για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αυτών, μέσα από την παραγωγή και τον διαχωρισμό ταχέως κινούμενων ιόντων ως προς τον λόγο μάζα προς φορτίο m/z . Πιο συγκεκριμένα η ανάλυση με φασματομετρία μάζας περιλαμβάνει αρχικά την ατομοποίηση τους δείγματος, ακολουθεί η μετατροπή μέρους των ατόμων του αρχικού σταδίου σε ρεύμα ιόντων, τα οποία έπειτα διαχωρίζονται με βάση το λόγο m/z . Τέλος λαμβάνει χώρα η απαρίθμηση των ιόντων και η μέτρηση του ρεύματος που παράγεται κατά την πρόσκρουση των θετικών ιόντων με ηλεκτρόνια σε κατάλληλο μεταλλάκτη. Δηλαδή στην πηγή ιόντων λαμβάνει

χώρα η μετατροπή των αναλυόμενων υλικών σε ιόντα με τη βοήθεια διάφορων τεχνικών (π.χ βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια) σε συνδυασμό είτε υπό υψηλή θερμοκρασία είτε υπό ηλεκτρικό πεδίο. Στη συνέχεια τα ιόντα αυτά, επιταχύνονται και έλκονται από τον αναλυτή μαζών μέσω της σχισμής του φασματομέτρου μαζών όπου και διαχωρίζονται με βάση τον λόγο m/z . Τέλος, ο ανιχνευτής μετατρέπει τα ιόντα που διαχωρίστηκαν από τον αναλυτή μάζας σε ηλεκτρικό σήμα. Τα δεδομένα αυτά αναλύονται με τη βοήθεια του φάσματος μαζών, δηλαδή του ραβδογράμματος της σχετικής έντασης ως προς τον λόγο m/z (Σχήμα 11). Στα μόρια της ένωσης που αναλύεται γίνεται πρόσκρουση ηλεκτρονίων υψηλής έντασης, τα οποία παράγονται από τη πηγή ιόντων, οπότε αυτά ιοντίζονται και οδηγούμαστε σε θραυσμάτωση της ένωσης. Δηλαδή τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με μερικά από τα μόρια της ένωσης M , οπότε παράγονται θετικά μοριακά ιόντα σύμφωνα με την αντίδραση $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$. Όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ποικιλία ιόντων-θραυσμάτων.



Σχήμα 11 Συνοπτικό διάγραμμα φασματομέτρου μάζας MS

Σε μια ανάλυση με φασματομετρία μαζών το αρχικό στάδιο είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αέριου αναλυτή και αποτελεί καθοριστικό σημείο για τη μέτρηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Το στάδιο λοιπόν αυτό του ιοντισμού λαμβάνει χώρα σε διάφορες πηγές ιόντων μερικές από τις οποίες αναφέρονται στον παρακάτω Πίνακα 1 και χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις πηγές εκρόφησης και τις αέριες φάσης. Στην πρώτη κατηγορία, το δείγμα

βρίσκεται σε στερεή ή υγρή κατάσταση και μετατρέπεται απευθείας σε αεριώδη ιόντα και μπορεί να εφαρμοσθούν σε ενώσεις θερμικά ασταθείς ή μη πτητικές. Το γεγονός αυτό αποτελεί πλεονέκτημα καθώς μπορεί αυτό το είδος πηγών να εφαρμοσθεί σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα. Αντίστοιχα στις πηγές αέριας φάσης, το δείγμα αρχικά εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται, ενώ εφαρμόζεται σε ενώσεις θερμικώς σταθερές με σημείο ζέσεως μικρότερο από 500°C και με μοριακή μάζα μικρότερη από 1.000Da.

Ομάδα	Όνομα και συντομογραφία	Τρόπος ιονισμού
Αέριας φάσης	Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact-EI)	Ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας
Αέριας φάσης	Χημικός ιονισμός (chemical ionization- CI)	Αντιδραστήρια-ιόντα σε αέρια φάση
Αέριας φάσης	Ιονισμός ηλεκτρικού πεδίου (field ionization-FI)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Εκρόφησης	Εκρόφησης πεδίου (field desorption- FD)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Εκρόφησης	Ψεκασμός σε ηλεκτρικό πεδίο (electrospray ionization-ESI)	Ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο
Εκρόφησης	Εκρόφησης πλάσματος (plasma desorption-PD)	Θραύσματα σχάσης ^{252}Cf
Εκρόφησης	Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization-TS)	Υψηλή θερμοκρασία
Εκρόφησης	Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment-FAB)	Δέσμη ατόμων μεγάλης ενέργειας
Εκρόφησης	Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού υποστρώματος (matrix assisted laser desorption ionization-MALDI)	Ακτίνα λέιζερ
Εκρόφησης	Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (secondary ion Mass Spectrometry-SIMS)	Δέσμη ιόντων μεγάλης ενέργειας

Πίνακας 1 Πηγές ιόντων για φασματομετρία μοριακών μαζών

Ο διαχωρισμός των ιόντων με διαφορετικούς λόγους m/z επιτυγχάνεται με την βοήθεια των αναλυτών μαζών, οι οποίοι ιδανικά θα πρέπει να μπορούν να διαχωρίζουν μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Μια πρόσθετη βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι ότι επιτρέπει τη διέλευση πληθώρας ιόντων με σκοπό την παραγωγή άμεσα μετρήσιμου ρεύματος. Μερικές από τις κύριες κατηγορίες αναλυτών μαζών είναι οι εξής:

- Αναλυτές μαγνητικού τομέα ή Φασματόμετρα απλής εστίασης, οι οποίοι διαθέτουν έναν μόνιμο μαγνήτη ή έναν ηλεκτρομαγνήτη, το πεδίο των οποίων αναγκάζει τα ιόντα, αφού εξέλθουν από την πηγή τους, να κινηθούν σε μια κυκλική τροχιά. Η μεταβολή της έντασης του πεδίου του μαγνήτη ή της τάσης επιτάχυνσης μεταξύ των δυο σχισμών συμβάλλει στην επιτυχή σάρωση ιόντων διαφορετικών μαζών στη σχισμή εξόδου. Έτσι λοιπόν η πρόσπτωση των ιόντων που διέρχονται από τη σχισμή εξόδου σε ένα ηλεκτρόδιο

συλλέκτη, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ρεύματος ιόντων το οποίο ενισχύεται και καταγράφεται.

- Φασματομέτρα διπλής εστίασης, όπου οι αποκλίσεις κατευθύνσεων και ενεργειών ενός συνόλου ιόντων ελαχιστοποιούνται ταυτόχρονα. Η διπλή εστίαση επιτυγχάνεται με τη χρήση προσεκτικά επιλεγμένων συνδυασμών ηλεκτροστατικών και μαγνητικών πεδίων. Η διασπορά των κινητικών ενεργειών έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση της δέσμης που καταλήγει στον μεταλλάκτη, άρα και απώλεια διακριτικής ικανότητας. Επομένως για να επιτευχθεί ο ακριβής προσδιορισμός των ατομικών και μοριακών μαζών απαιτείται η διαρκής διόρθωση της κατανομής των ταχυτήτων που εξέρχονται από την πηγή.
- Τετραπολικά φασματομέτρα μαζών, παρέχουν μικρούς χρόνους σάρωσης, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα για σαρώσεις χρωματογραφικών κορυφών σε πραγματικό χρόνο. Συγκριτικά με τους αναλύτες μαγνητικού τομέα έχουν μικρότερο κόστος και μεγαλύτερη ευκολία στη χρήση, γεγονός που τα καθιστά το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αναλύτη μαζών.
- Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης TOF, όπου γίνεται παραγωγή περιοδικά θετικών ιόντων με βομβαρδισμό του δείγματος με σύντομους παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων από λέιζερ. Ακολουθεί επιτάχυνση των παραγόμενων ιόντων με τη βοήθεια ηλεκτρικού παλμού προς έναν ελεύθερο από πεδία σωλήνα. Δηλαδή ο διαχωρισμός των ιόντων ως προς τη μάζα λαμβάνει χώρα κατά την πτήση των ιόντων προς τον ανιχνευτή που εντοπίζεται στο τέλος του σωλήνα. Οι ταχύτητες των ιόντων κατά τη διαδρομή τους στο σωλήνα είναι αντιστρόφως ανάλογες με τη μάζα τους, καθώς όλα τα ιόντα που εισέρχονται στον σωλήνα διαθέτουν ίδια κινητική ενέργεια. Η σταθερότητα, η ευκολία προσέγγισης της πηγής ιόντων, η ευκολία χρήσης και το απεριόριστο εύρος μαζών αποτελούν τα κύρια πλεονεκτήματα έναντι φασματομέτρων μαζών άλλων τύπων. Αντίστοιχα η περιορισμένη διακριτική ικανότητα και ευαισθησία είναι τα κύρια μειονεκτήματα.
- Αναλυτές παγίδας ιόντων, πρόκειται για μια διάταξη στην οποία προκύπτουν ανιόντα ή κατιόντα σε αέρια κατάσταση στην οποία περιορίζονται για αρκετά μεγάλο διάστημα με ένα ηλεκτρικό ή/ και μαγνητικό πεδίο. Η διάταξη αποτελείται από ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο, στο οποίο εφαρμόζεται μεταβλητό δυναμικό ραδιοσυχνότητας και δυο πλευρικά ηλεκτρόδια κάλυπτρα, τα οποία είναι γειωμένα. Επομένως η μεταβολή κάθε φορά του πεδίου κατά βούληση έχει ως αποτέλεσμα την εξαγωγή ενός σωματιδίου ανάλογα με το λόγο m/z . Γίνεται δηλαδή επιλογή των μορίων που θα κατευθυνθούν στον ανιχνευτή. Μερικά από τα πλεονεκτήματά τους είναι το χαμηλό τους κόστος, η

σταθερότητα και η δυνατότητα που διαθέτουν στο να πετύχουν αρκετά χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Οι πληροφορίες που παρέχει η φασματομετρία μάζας αφορούν τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση συνθετικών μιγμάτων, τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα και τέλος τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών. Το φασματόμετρο μαζών αποτελεί το ιδανικό εργαλείο για το προσδιορισμό μοριακού βάρους ενώσεων που παρέχουν μοριακό ιόν. Συνήθως με το προσδιορισμό του μοριακού βάρους μιας ουσίας, τη μελέτη της ισοτοπικής κατανομής της και της σχηματομορφής των θραυσμάτων δίνεται η δυνατότητα οριστικής ταυτοποίησης με σύγκριση μαζών της άγνωστης ουσίας και των καθαρών δειγμάτων των καθαρών ενώσεων. Αυτό στηρίζεται στο ότι η σχηματομορφή θραύσης είναι χαρακτηριστική και ο έλεγχος των πειραματικών συνθηκών είναι τόσο αποτελεσματικός ώστε τα φάσματα που προκύπτουν είναι αναπαραγώγιμα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κορυφών του φάσματος τόσο λιγότερες είναι οι πιθανότητες διαφορετικές ενώσεις να παράγουν το ίδιο φάσμα. Ωστόσο τα φάσματα πρόσκρουσης ηλεκτρονίων είναι αρκετές φορές επαναλήψιμα μεταξύ εργαστηρίων, σε αντίθεση με τα φάσματα από άλλες πηγές ιόντων τα οποία ποικίλλουν. Για το λόγο αυτό προτιμάται η πρόσκρουση ηλεκτρονίων ως μέθοδος ιοντισμού και για σύγκριση φασμάτων και δημιουργία βιβλιοθηκών φασμάτων.

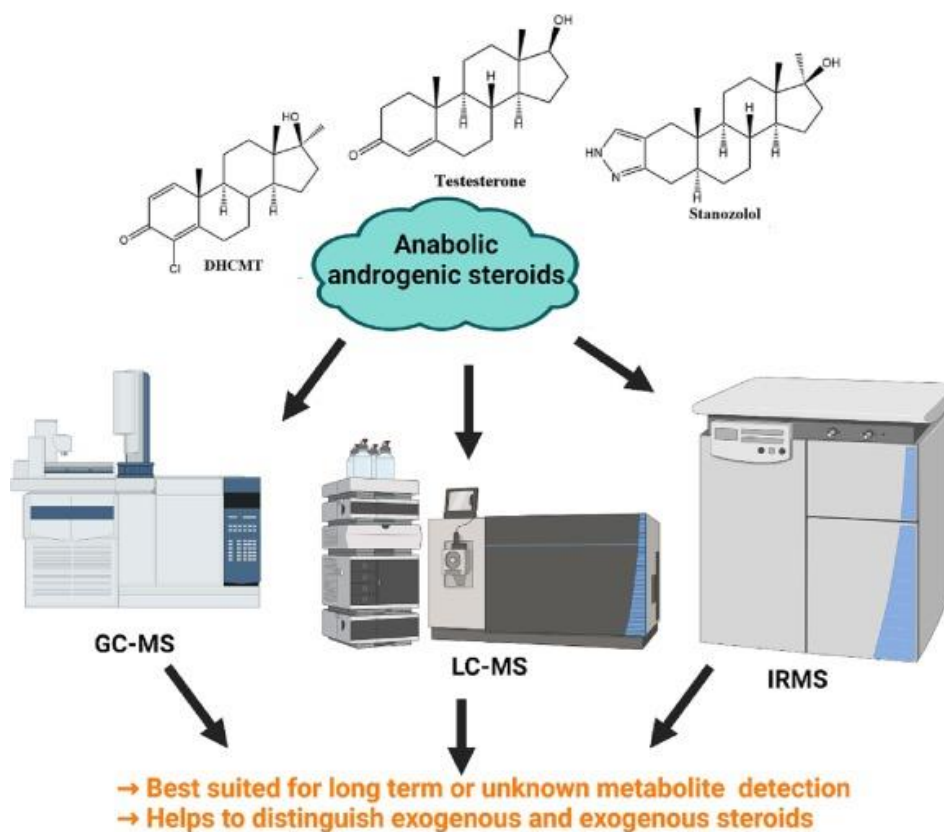
Η φασματομετρία μαζών «σε σειρά» παρέχει τη δυνατότητα λήψης φάσματος μαζών προεπιλεγμένων και ιοντικών θραυσμάτων. Δηλαδή μια μαλακή πηγή παράγει ιόντα και μερικά θραύσματα, τα οποία εισάγονται στον πρώτο αναλυτή μαζών. Εκεί συλλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν, το πρόδρομο ιόν, το οποίο έπειτα κατευθύνεται στην κυψελίδα αλληλεπίδρασης όπου λαμβάνει χώρα η αυθόρμητη διάσπασή του και στη συνέχεια η αλληλεπίδρασή του είτε με δέσμη ακτινοβολίας λέιζερ υψηλής έντασης είτε αντιδρά με αέριο σύγκρουσης οπότε παράγονται θραύσματα που καλούνται προϊόντα ιόντα. Τα συγκεκριμένα ιόντα αναλύονται με δεύτερο αναλυτή μαζών και ανιχνεύονται από ανιχνευτή ιόντων. Ουσιαστικά στον πρώτο αναλυτή μαζών γίνεται η θραυσμάτωση και παίρνω θραύσματα της ουσίας. Στη συνέχεια επιλέγω το θραύσμα και το περνάω από δεύτερο αναλυτή μαζών, από τον οποίο δεν προκύπτουν θραύσματα της ουσίας αλλά ουσιαστικά προκύπτουν θραύσματα του πρώτου θραύσματος. Για την ανάλυση πολύπλοκων οργανικών και βιοχημικών μιγμάτων συχνά χρησιμοποιείται αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας GC/MS, οπότε λαμβάνονται φάσματα από ενώσεις καθώς αυτές εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη. Αντίστοιχα η φασματομετρία μαζών έχει συζευχθεί με την υγρή χρωματογραφία LC/MS με σκοπό την ανάλυση μιγμάτων μη πτητικών συστατικών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο πρόβλημα και των δυο αυτών τεχνικών αποτελεί η μεγάλη αραιώση του δείγματος στην χρωματογραφική στήλη από τον υγρό ή αέριο αντίστοιχα φορέα έκλουσης.

Δηλαδή η απομάκρυνση του διαλύτη πριν την εισαγωγή του δείγματος στο φασματομέτρο μαζών συνιστά την ανάπτυξη επιπλέον μεθόδων. Συνοψίζοντας η φασματομετρία μαζών σε σειρά αν και έχει τα ίδια πλεονεκτήματα με τις LC/MS και GC/MS είναι αρκετά πιο γρήγορη τεχνική αλλά με υψηλό κόστος. Μερικά από τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών έναντι των τεχνικών οπτικής φασματομετρίας είναι τα όρια ανίχνευσης που για αρκετά στοιχεία είναι τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από τα αντίστοιχα όρια των οπτικών μεθόδων, η απλότητα των φασμάτων που παρέχουν εύκολη ερμηνεία και τέλος η δυνατότητα που παρέχει για τη μέτρηση ατομικών ισοτοπικών λόγων. Ορισμένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελεί το αρκετά υψηλό κόστος των οργάνων, η ολίσθηση του οργάνου που αντιστοιχεί στο 5-10% για κάθε ώρα λειτουργίας και τέλος διάφορες παρεμποδίσεις που εμφανίζει. (35)

- **Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή AAS**

Με το πέρασμα του χρόνου οι οργανισμοί αντιντόπινγκ έχουν αναπτύξει όλο και περισσότερες τεχνικές ανίχνευσης των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών AAS. Οι τεχνικές αυτές είναι συνδυασμός υγρής ή αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC/MS ή GC/MS) και χαρακτηρίζονται από αυξημένη ειδικότητα και ευαισθησία για την ανίχνευση τόσο φυσικών όσο και συνθετικών AAS γνωστής δομής. Η διάκριση επίσης των ισοτόπων έδωσε τη δυνατότητα να διαχωρίζονται οι φυσικά ενδογενείς ορμόνες, η τεστοστερόνη και οι πρόδρομες ανδρογόνες ουσίες από τις ουσίες που χορηγούνται για σκοπούς ντόπινγκ.

Ο προσδιορισμός της κατανάλωσης των AAS σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της δομής τους των αντίστοιχων αναλυτών στόχων περιλαμβάνει αρχικά μελέτες διαλογής και μεταβολισμού και ακολουθούν διεργασίες επιβεβαιωτικών δοκιμών για το προφίλ των στεροειδών στον ορό και στα ούρα με φασματομετρία μάζας με αναλογία ισοτόπων. Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός ωστόσο της στεροειδούς φαρμακοφόρου ουσίας είναι δύσκολη εξαιτίας των μεταβολών στην δομή του στεροειδούς. Οι κύριες επομένως μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα εργαστήρια για τη μελέτη των AAS και των μεταβολιτών του είναι η αέρια χρωματογραφία με ηλεκτρονικό ιονισμό συζευγμένη με φασματομετρία μαζών GC-EI-MS/MS και η υγρή χρωματογραφία με ηλεκτροψεκασμό ιονισμού συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-ESI-MS/MS (Σχήμα 12). Και οι δυο παραπάνω μέθοδοι χαρακτηρίζονται από καλή ευαισθησία και ειδικότητα και είναι αποτελεσματικές στον εντοπισμό ενδογενών στεροειδών. Αντίστοιχα τα ενδογενή και μη-συζευγμένα και γλυκουρονιδιωμένα AAS εντοπίζονται από τα εργαστήρια αντιντόπινγκ με την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών GC-MS/MS. Για τον προσδιορισμό ισοτοπικού λόγου άνθρακα των στεροειδών ορμονών των ούρων και την ταυτοποίηση εξωγενούς πηγής χρησιμοποιείται από τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ η φασματομετρία μάζας αναλογίας ισοτόπων IRMS.



Σχήμα 12 Σχηματική απεικόνιση διάφορων αναλυτικών τεχνικών για την ανίχνευση των Αναβολικών Ανδρογόνων Στεροειδών AAS

Η καθιέρωση επίσης του «βιολογικού διαβατηρίου» από τον WADA αποτελεί ένα αρκετά χρήσιμο εργαλείο για την παρατήρηση της εξέλιξης των στεροειδών, των μεταβολιτών τους και άλλων μεταβολικών βιοδεικτών (όπως ορμόνες και οι μεταβολίτες τους) στα ούρα και μη ορμονικούς δείκτες στο αίμα κατά τη διάρκεια του χρόνου. Για να λειτουργήσει το διαβατήριο αυτό καθορίζεται εξ αρχής η «υπογραφή του αθλητή» στην βασική του κατάσταση, χωρίς την υποψία ντόπινγκ και περιλαμβάνει μετρήσεις όλων των παραπάνω δεικτών, οι οποίες οφείλουν να παραμένουν σταθερές με τη πάροδο του χρόνου. Επομένως η διαχρονική παρακολούθηση των ανωτέρω υπογραφών των αθλητών θα επέτρεπε τον εντοπισμό κάθε ύποπτης απόκλισης με πιο εμπειριστατωμένο τρόπο.

Substance	Detection method
Direct	
Synthetic androgens/anabolics	L/GC-MS
Testosterone/natural androgens	L/GC-MS, T/E, CIR-MS
Unknown androgens (designer and nutraceutical)	L/GC-MS (bioassay)
Indirect	
hCG (urinary extracted or recombinant)	hCG immunoassay or LC-MS
hLH (recombinant)	hLH immunoassay or LC-MS
Anti-estrogens	L/GC-MS

L: liquid chromatography; GC: gas chromatography; MS: mass spectrometry; CIR-MS: carbon isotope ratio measured by mass spectrometry.

Πίνακας 2 Κύριες μέθοδοι ανίχνευσης για τον εντοπισμό της άμεσης και έμμεσης τεστοστερόνης και του ντόπινγκ ανδρογόνων

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανίχνευσης, είτε του ντόπινγκ της εξωγενούς τεστοστερόνης είτε στους χρήστες των AAS είτε στους χρήστες ουσιών με στόχο την ενίσχυση της ενδογενούς τεστοστερόνης, αποτελεί ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με υγρή LC-MS ή αέρια GC-MS χρωματογραφία και ακολουθεί η φασματομετρία μάζας MS. Η μέτρηση των ουσιών αυτών γίνεται στα ούρα ή στο αίμα (Πίνακας 2).

Από την εμφάνιση της ατμοσφαιρικής πίεσης διεπαφών API, η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας LC/MS καθώς και η υγρή χρωματογραφία με συζευγμένη φασματομετρία μαζών LC/MS-MS, χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του μειωμένου δείγματος προκατεργασίας ή της δυνατότητας που κατέχουν ανίχνευσης θερμοδιαλυτών ενώσεων AAS μη ανιχνεύσιμων με δοκιμές ελέγχου ντόπινγκ. Επιπλέον με τη χρήση των τεχνικών αυτών ανακαλύφθηκαν νέοι στεροειδείς μεταβολίτες, οι οποίοι βελτιώνουν την ικανότητα ανίχνευσης των αναβολικών στεροειδών στα ούρα. Σύμφωνα με τον WADA τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ θα πρέπει να διαθέτουν ικανότητα ανίχνευσης αυτών των αναλυτών σε συγκεντρώσεις 2-10ng/mL. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αναλυτές μαζών, οι οποίοι εξασφαλίζουν αύξηση της ευαισθησίας σε λειτουργία πλήρους σάρωσης με δυνατότητα ακρίβειας μάζας, όπως για παράδειγμα είναι ο αναλυτής χρόνου πτήσης TOF. Από αυτά τα χρωματογραφήματα αυξάνοντας την ειδικότητα μπορούμε να λάβουμε επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τη δομή του στεροειδούς. Τα χρωματογραφήματα που προκύπτουν διαθέτουν στενές κορυφές (αναλογία m/z μικρότερη από 5mDa ή 10ppm) εξαιτίας της υψηλής ακρίβειας μάζας που διαθέτουν. Οι στενές αυτές αναλογίες m/z ενισχύουν την ευαισθησία της μεθόδου απομακρύνοντας την πλειονότητα των χημικών παρεμβολών στο δείγμα. Οι διαφορετικοί τρόποι σάρωσης που διαθέτει η LC/MS-MS δίνουν τη δυνατότητα εντοπισμού και καταπολέμησης των

AAS με διαφορετικούς τρόπους. Η επικρατέστερη μέθοδος είναι η παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων SRM, εξαιτίας της υψηλής της ευαισθησίας και της ύπαρξης ενδογενών παρεμβολών. Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από τη δομή του στεροειδούς, με αποτέλεσμα οι αναλυτές είτε με έναν αζωτούχο δακτύλιο είτε μια συζευγμένη 3-κετο-ομάδα να εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία από άλλα αναβολικά στεροειδή. Η εμφάνιση λοιπόν απλών εξωγενών αναβολικών στεροειδών θα πρέπει να καταγράφεται ως ανεπιθύμητη ενέργεια, ενώ σε περίπτωση εντοπισμού ενδογενών αναβολικών στεροειδών λαμβάνεται η ακριβής συγκέντρωση και ακολουθεί ανάλυση του δείγματος με ισοτοπική MS. Άρα για την ανίχνευση εξωγενών αναβολικών στεροειδών απαιτούνται ποιοτικές μέθοδοι και αντίστοιχα για την ανίχνευση ενδογενών στεροειδών χρειάζονται ποσοτικές μέθοδοι. Αν και η παρουσία ιοντικής καταστολής δεν αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για την ποιοτική ανάλυση, υπάρχει κίνδυνος να επηρεάσει τις ποσοτικές μεθόδους και γι' αυτό το λόγο συνίσταται η χρήση επισημασμένων εσωτερικών προτύπων. Τέλος, στην ανίχνευση αγνώστων το μεγαλύτερο πρόβλημα αποτελεί ο διαχωρισμός των κορυφών που προέρχονται από τα AAS με εκείνα από τη μήτρα των ούρων. Για το λόγο αυτό κατά τη σάρωση χρησιμοποιείται είτε η μέθοδος απώλειας ουδετερότητας είτε η σάρωση πρόδρομων ιόντων. Ύστερα λοιπόν από την ανίχνευση της κορυφής, ακολουθεί πλήρης σάρωση και το φάσμα των ιόντων του προϊόντος προκειμένου να ληφθούν όλες οι απαραίτητες δομικές πληροφορίες. Επιπρόσθετες πληροφορίες παρέχονται με την αξιοποίηση ακριβών μετρήσεων μάζας, οι οποίες αξιοποιούνται για την πρόταση μιας εφικτής δομής, αν και προτιμώνται η σύγκριση μεταξύ των εντάσεων και των χρόνων κατακράτησης.

Η ανίχνευση των αναβολικών στεροειδών σε βιολογικά δείγματα γίνεται κυρίως με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας GC-MS, διότι η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας LC-MS έχει γίνει συμβατή μέθοδος ελέγχου ντόπινγκ για θερμικά ευπαθή και μεγάλα βιομόρια με μικρότερο χρόνο λειτουργίας του οργάνου και καλύτερη ευαισθησία. Αν και η LC-MS έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον εντοπισμό διάφορων αναβολικών στεροειδών, υπάρχουν ακόμη προβλήματα στην ανίχνευση κορεσμένων υδροξυστεροειδών ή οξοστεροειδών, διότι στον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό ESI εμφανίζουν χαμηλή απόδοση ιονισμού. Έτσι λοιπόν αναπτύχθηκε η ταχείας σάρωσης αέρια χρωματογραφία τριπλού τετραπόλου GC-MS/MS, όπου με τη βοήθεια της παρακολούθησης επιλεκτικών αντιδράσεων SRM, επιτεύχθηκε σημαντική μείωση του χημικού θορύβου. Με την ανάπτυξη λοιπόν της παραπάνω μεθόδου καλύπτεται το κενό που προκύπτει για ανάλυση των αναβολικών στεροειδών, τα οποία είτε εμφανίζουν χαμηλή ευαισθησία με την GC-MS είτε με την LC-MS εμφανίζουν χαμηλή απόδοση ιονισμού υπό ηλεκτροψεκασμό. Η GC-MS/MS χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα για ελευθέρα και συζευγμένα στεροειδή, είναι εύκολα εφαρμόσιμη ως μέθοδος ποιοτικού ελέγχου σε τακτική βάση εξαιτίας της μεγάλης της ακρίβειας

και έχει αμελητέες παρεμβολές της μήτρας. Τέλος, η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης έξι διαγνωστικών στεροειδών δεικτών που είναι χρήσιμοι για την ταυτοποίηση του φύλου και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

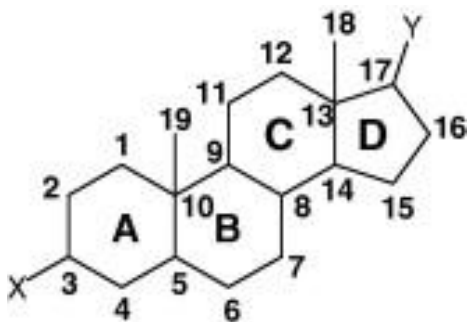
Η ανίχνευση AAS με γνωστή δομή είναι εύκολη είτε με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας LC/MS είτε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας GC/MS. Μάλιστα η ευαισθησία των τεχνικών αυτών παρέχει τη δυνατότητα εντοπισμού κάποιων συνθετικών προϊόντων αρκετό καιρό μετά τη χρήση τους. Όσο αφορά την ανίχνευση AAS άγνωστης δομής είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία διότι αφορά μόρια που παρασκευάζονται και ύστερα κυκλοφορούν στην αγορά από μη εγκεκριμένους παραγωγούς και πωλούνται στην μαύρη αγορά ή σε γυμναστήρια ως συμπληρώματα διατροφής. Τα μη δηλωμένα αναβολικά συστατικά αναλύονται με δείγματα ούρων αθλητών μετά την κατάποση και ακολουθεί η μέθοδος GC-MS/MS για την ταυτόχρονη ανίχνευση 93 αναβολικών στεροειδών. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η βέλτιστη ευαισθησία εφαρμόστηκε η μέθοδος επιλεκτικής παρακολούθησης της αντίδρασης SRM, με όριο ανίχνευσης LOD για στερεά δείγματα 0,5-4 ng/g και για υγρά δείγματα 0,1-0,8 ng/mL και η συνολική διάρκεια της ανάλυσης είναι 23 λεπτά. Όλοι οι αναλύτες απομονώθηκαν μεταξύ τους δίνοντας καλό σχήμα κορυφής, άρα διαπιστώθηκε η εξειδίκευση και η ακρίβεια της μεθόδου. Επιπλέον εφαρμόστηκε και ως μέθοδο ρουτίνας 300 υγρών και στερεών δειγμάτων από συμπληρώματα διατροφής, εκ των οποίων μόνο σε ένα δείγμα εντοπίστηκε τεστοστερόνη. Δηλαδή η μέθοδος συμβάλλει στην βελτίωση της κατανόησης αγοράς προϊόντων υγειονομικής περίθαλψης και στην προάσπιση της δημόσιας και ατομικής υγείας.

Για την ανίχνευση των ανδρογόνων-ντόπινγκ χρησιμοποιείται η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας GC-MS αλλά με διαφορετικά βιολογικά δείγματα, όπως για παράδειγμα είναι τα νύχια, το σάλιο, τα μαλλιά, το δέρμα και η εισπνεόμενη αναπνοή. Σημαντικό προβάδισμα μεταξύ των εναλλακτικών αυτών δειγμάτων έχουν οι τρίχες εξαιτίας της ελάχιστης επεμβατικής δειγματοληψίας σε συνδυασμό με τον απλό τρόπο αποθήκευσης τους χωρίς χρονικό περιορισμό.

Από την άλλη η διάκριση ανάμεσα ενδογενή και εξωγενή στεροειδή είναι απαραίτητη για την ανίχνευση είτε φυσικών ανδρογόνων, όπως είναι η τεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη, είτε πρόδρομων ουσιών τους, όπως είναι τα προ-ανδρογόνα ανδροστενεδιόνης. Η μέτρηση χορηγούμενης εξωγενούς τεστοστερόνης σε δείγματα ούρων θεωρείται μια ευαίσθητη διαδικασία διαλογής μέσω της οποίας πραγματοποιείται ο υπολογισμός του λόγου της τεστοστερόνης προς την επιτεστοστερόνη. Όταν λοιπόν ο λόγος αυτός στα ούρα υπερβεί ένα καθορισμένο όριο, το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη χορήγησης εξωγενούς τεστοστερόνης, η οποία δε μετατρέπεται φυσιολογικά σε επιτεστοστερόνη. Η δοκιμασία αυτή του λόγου στους άνδρες είναι σημαντική καθώς τόσο η τεστοστερόνη όσο και η επιτεστοστερόνη συν εκκρίνονται από τα κύτταρα Leydig

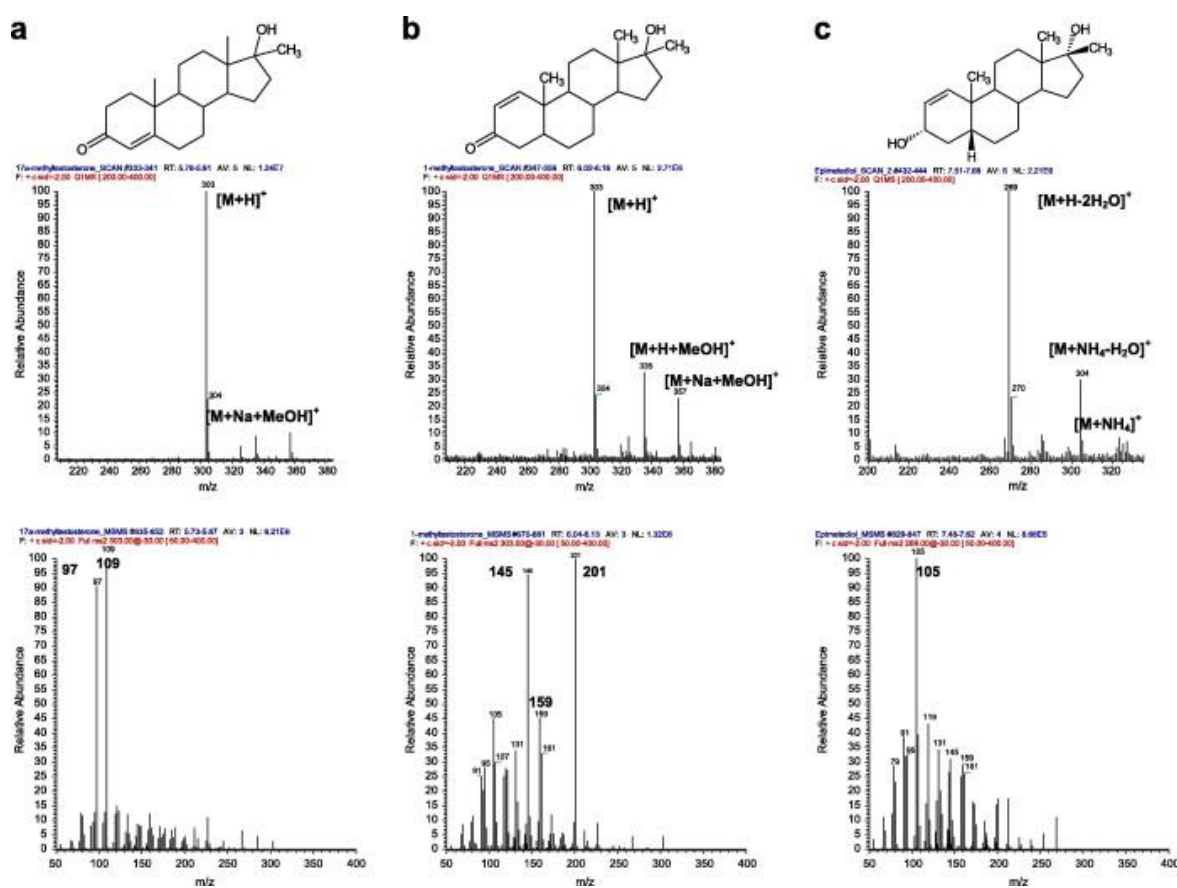
και εν συνεχεία απεκκρίνονται στα ούρα με τρόπο κατά τον οποίο ο λόγος αυτός των δυο ουσιών να διατηρείται σταθερός με τη πάροδο του χρόνου. Ωστόσο η αξιοποίηση του συγκεκριμένου λόγου ως δοκιμασία διαλογής εξωγενούς τεστοστερόνης στις γυναίκες έχει μικρότερη αξία. Ένα τελευταίο μειονέκτημα της συγκεκριμένης δοκιμασίας αποτελεί η απουσία εμπιστοσύνης σχετικά με τη λήψη παράνομων ουσιών και σε άνδρες και σε γυναίκες αθλητές για τον καθορισμό εμπιστευσιμων φυσιολογικών τιμών «προντοπινγκ».

Ένας εναλλακτικός τρόπος εντοπισμού της εξωγενούς τεστοστερόνης αποτελεί η μέτρηση του λόγου των ισοτόπων του άνθρακα C^{13}/C^{12} με φασματομετρία μάζας MS σε δείγματα ούρων. Με την συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται η διάκριση της ενδογενούς από την εξωγενή τεστοστερόνη καθώς επίσης και από άλλα φυσικά ανδρογόνα ή προανδρογόνα. Ο εντοπισμός αρκετά μειωμένης τιμής του λόγου C^{13}/C^{12} στα ανδρογόνα των ούρων σε σύγκριση με τα ενδογενή στεροειδή αναφοράς, αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι η προέλευση των στεροειδών των ούρων είναι εν μέρει από εξωγενείς ενώσεις. (9), (24), (25), (26), (27)



Σχήμα 13 Σχηματική απεικόνιση δομής αναβολικών στεροειδών

Τα αναβολικά στεροειδή συνήθως είτε στη θέση 3 είτε στη θέση 17 (Σχήμα 13) περιέχουν μόνο μια κετονομάδα ως πρωτονική θέση και δεν διαθέτουν κάποιο άλλο όξινο ή βασικό τμήμα στη δομή τους. Επομένως δύσκολος θεωρείται ο ιονισμός αυτών των ουσιών είτε με ηλεκτροψεκασμό ESI είτε με χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση APCI, εξαιτίας της απουσίας του ιόντος $[M+H]^+$ σε ορισμένες ουσίες. Συγκεκριμένα όσο αφορά την δραστική φαρμακευτική ουσία των αναβολικών στεροειδών, η ανίχνευση του συγκεκριμένου ιόντος εξαρτάται από τη χημική τους δομή. Δηλαδή η παρουσία και η σύζευξη ενός ατόμου αζώτου ή/και μιας κετο-λειτουργίας καθορίζει την πρωτονίωση των αναβολικών στεροειδών, με αποτέλεσμα οι ουσίες αυτές με ένα μεγάλο συζευγμένο ηλεκτρονικό σύστημα ή με δακτύλιο αζώτου ιονίζονται ως ιόντα $[M+H]^+$. Βέβαια χαμηλή αφθονία ή ακόμη και μη ανιχνεύσιμα είναι τα ιόντα $[M+H]^+$ σε αυτούς τους αναλύτες χωρίς συζευγμένη κετονομάδα.

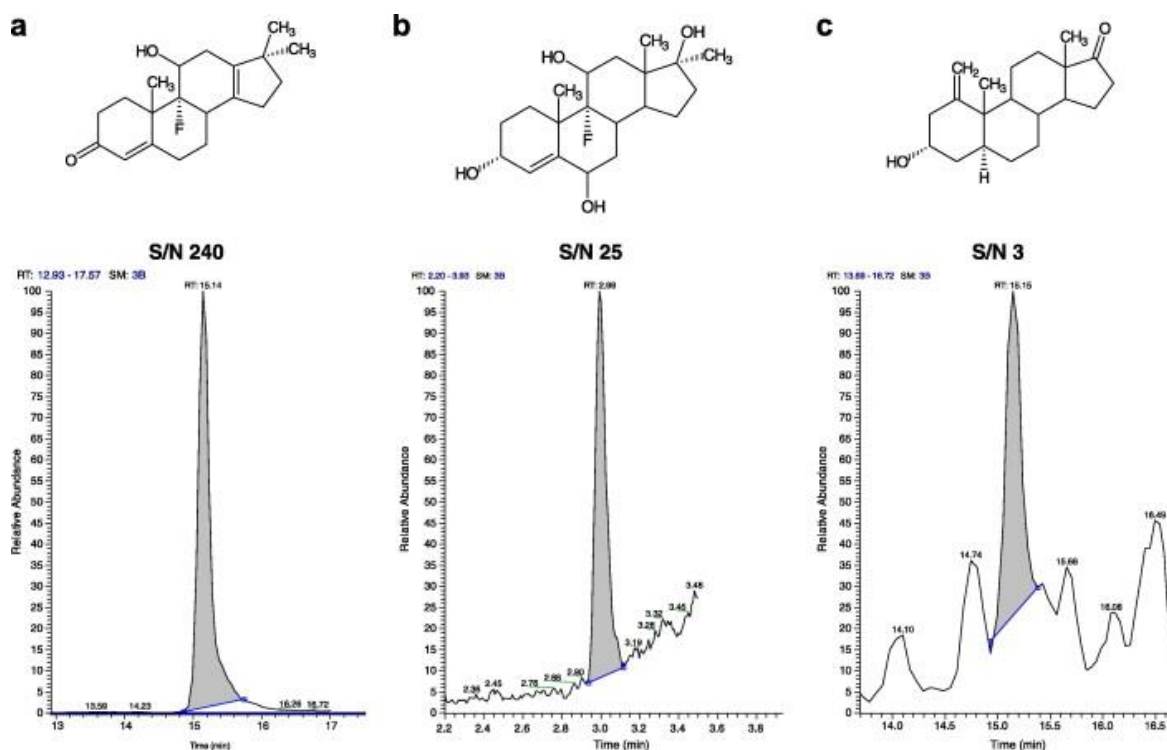


Σχήμα 14 Φάσματα πλήρους σάρωσης (πάνω μέρος) και στα 30eV (κάτω μέρος) για τα 3 αναβολικά στεροειδή α) μεθυλοτεστοστερόνη, β) μεθυλ-1-τεστοστρεόνη και γ) επιμεθενδιόλη

Στο Σχήμα 14 δίνονται τα φάσματα πλήρους σάρωσης για τρία αναβολικά στεροειδή (μεθυλοτεστοστερόνη, μεθυλ-1-τεστοστρεόνη και επιμεθενδιόλη), των οποίων οι δομές διαφέρουν μόνο ως προς την ύπαρξη και τη θέση των διπλών δεσμών και της λειτουργίας κέτο. Από τη μια άφθονο ιόν $[M+H]^+$ εμφανίζουν η μεθυλοτεστοστερόνη και η μεθυλ-1-τεστοστρεόνη, καθώς περιέχουν συζευγμένη κετονομάδα και από την άλλη η επιμεθενδιόλη χαρακτηρίζεται από απουσία του ιόντος $[M+H]^+$, καθώς δεν διαθέτει κετονομάδα. Για τα στεροειδή που δεν διαθέτουν συζευγμένη κετο-λειτουργία για τον ιονισμό με τη δραστική φαρμακευτική ουσία η δημιουργία προσμίξεων αποτελεί μια επιλογή. Κατά καιρούς στη βιβλιογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα προσθετικά και αφυδατωμένα ιόντα για τον ιονισμό των στεροειδών, όπως για παράδειγμα $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, $[M+Na]^+$ και $[M+NH_4]^+$. Η σύσταση της κινητής φάσης και η δομή του στεροειδούς είναι αυτά που καθορίζουν το σχηματισμό του προσδέματος. Μάλιστα όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα, στην επιμεθενδιόλη παρατηρήθηκαν διαφορετικά ιόντα και προσμίξεις, όπως για παράδειγμα $[M+H-2H_2O]^+$, $[M+NH_4-H_2O]^+$, $[M+NH_4-H_2O]^+$ και $[M+NH_4]^+$. Η έλλειψη αφθονίας πρωτονίων καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την επίτευξη της επιθυμητής ευαισθησίας στην ανίχνευση των αναβολικών στεροειδών με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας LC-MS. Μια λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα με σκοπό την βελτίωση

της συγγένειας των πρωτονίων του αναλύτη είναι η παραγωγή με τη χρήση υδραζίνης Girard, η οποία κατάφερε να αυξήσει την ευαισθησία των πρότυπων διαλυμάτων στα 3-κέτοαναβολικά στεροειδή. Η διεπιφάνεια που χρησιμοποιείται αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που επηρεάζει τη συμπεριφορά ιονισμού των αναβολικών στεροειδών. Για τα αναβολικά στεροειδή ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί την ιδανική διεπιφάνεια.

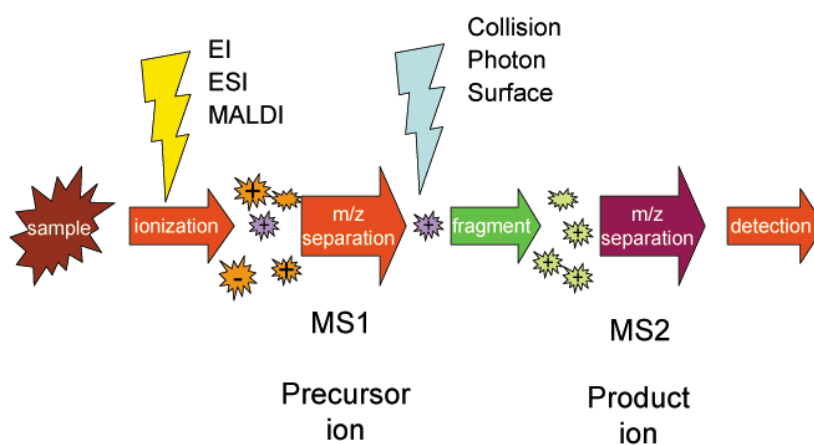
Έτσι λοιπόν οι γνώσεις γύρω από τον κατακερματισμό των αναβολικών στεροειδών μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό άγνωστων αναβολικών παραγόντων ή στεροειδών μεταβολιτών. Δηλαδή αν και τα αναβολικά στεροειδή μοιράζονται κοινό σκελετό, οι οδοί κατακερματισμού δεν είναι καθόλου απλές και διαφέρουν από τη μια ουσία στην άλλη. Επίσης παρά τις μικρές δομικές διαφορές που εμφανίζουν τα τρία αναβολικά στεροειδή στη χημική τους δομή παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στις αφθονίες και στον αριθμό των ιόντων. Η διαπίστωση ύπαρξης συγκεκριμένων ιόντων προϊόντος υποδηλώνει την παρουσία συγκεκριμένης δομής στεροειδούς, γεγονός που αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό άγνωστων στεροειδών.



Σχήμα 15 Η ευαισθησία που επιτυγχάνεται στην ανίχνευση διαφορετικών στεροειδών σε δείγματα ούρων σε 10ng/mL κάνοντας χρήση την πιο άφθονη μετάβαση (α-β μεταβολίτες της φλουοξυμεστερόνης και γ μεταβολίτες της μεθενόλης)

Στο Σχήμα 15, παρουσιάζεται η μέθοδος παρακολούθησης συγκεκριμένων αντιδράσεων SRM, η οποία αποτελεί την ιδανική μέθοδο για την ανίχνευση συγκεκριμένων στεροειδών με αναλυτές τριπλού-τετραπλού εξαιτίας της υψηλής της ευαισθησίας. Υψηλότερη ευαισθησία

εμφανίζουν εκείνα τα στεροειδή, των οποίων οι αναλύτες περιέχουν είτε μια συζευγμένη 3-κετονομάδα είτε έναν αζωτούχο δακτύλιο. Το ελάχιστο επιθυμητό επίπεδο ευαισθησίας είναι 10ng/mL. Εδώ τόσο το πρόδρομο ιόν όσο και το ιόν του προϊόντος είναι προεπιλεγμένα. Στα παραπάνω χρωματογραφήματα SRM για 3 στεροειδή με διαφορετικές δομές, παρατηρείται υψηλή ευαισθησία στα συζευγμένα 3-κετοστεροειδή (α), φτωχότερη ευαισθησία παρατηρείται στις ενώσεις που δεν είναι συζευγμένες (β), ενώ ιδιαίτερα δύσκολη είναι η ανίχνευση στην (γ) είναι πάρα πολύ δύσκολη. Η SRM χρησιμοποιείται στη φασματομετρία μαζών σε σειρά, όπου ένα ιόν συγκεκριμένης μάζας επιλέγεται στο πρώτο στάδιο ενός φασματόμετρου μάζας σε σειρά και ένα προϊόν ιόντος μιας αντίδρασης κατακερματισμού των πρόδρομων ιόντων επιλέγεται στο δεύτερο στάδιο του φασματόμετρου μάζας για ανίχνευση (Σχήμα 16) Δηλαδή το στάδιο επιλογής μάζας MS1 επιλέγει πρόδρομα ιόντα που υφίστανται κατακερματισμό και ακολουθείται από επιλογή ιόντων προϊόντος στο στάδιο MS2. Η SRM έχει αξιοποιηθεί για στοχευμένη ποσοτική πρωτεομική μέσω φασματομετρίας μαζών, όπου για παράδειγμα σε μια πηγή ηλεκτροψεκασμού μετά τον ιονισμό, γίνεται απομόνωση μιας πρόδρομης πεπτιδικής ουσίας ώστε να ληφθεί πληθυσμός ιόντων κατά κύριο λόγο του επιθυμητού είδους. Έπειτα λαμβάνει χώρα ο κατακερματισμός του συγκεκριμένου πληθυσμού ώστε να προκύψουν ιόντα προϊόντος, των οποίων το σήμα σχετίζεται με την αφθονία του πεπτιδίου στο δείγμα. Μια άλλη εφαρμογή της SRM είναι ο προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων ανά κύτταρο ενός φυσικού-ελαφριού πεπτιδίου, άρα και της μητρικής πρωτεΐνης, με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης από ισοτοπική σήμανση με βαριά επισημασμένα πεπτίδια. Πλέον η SRM εμφανίζει τεράστια βελτίωση στη διαγνωστική απόδοση συγκριτικά με άλλες παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους πρωτεϊνικών βιοδεικτών που στηρίζονται στα αντισώματα (π.χ ELISA).



Σχήμα 16 Σχηματική αναπαράσταση SRM

Οι αναβολικοί παράγοντες διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς, με την παρουσία των εξωγενών αναβολικών προϊόντων να θεωρείται ανεπιθύμητη ενέργεια. Για τα ενδογενή στεροειδή

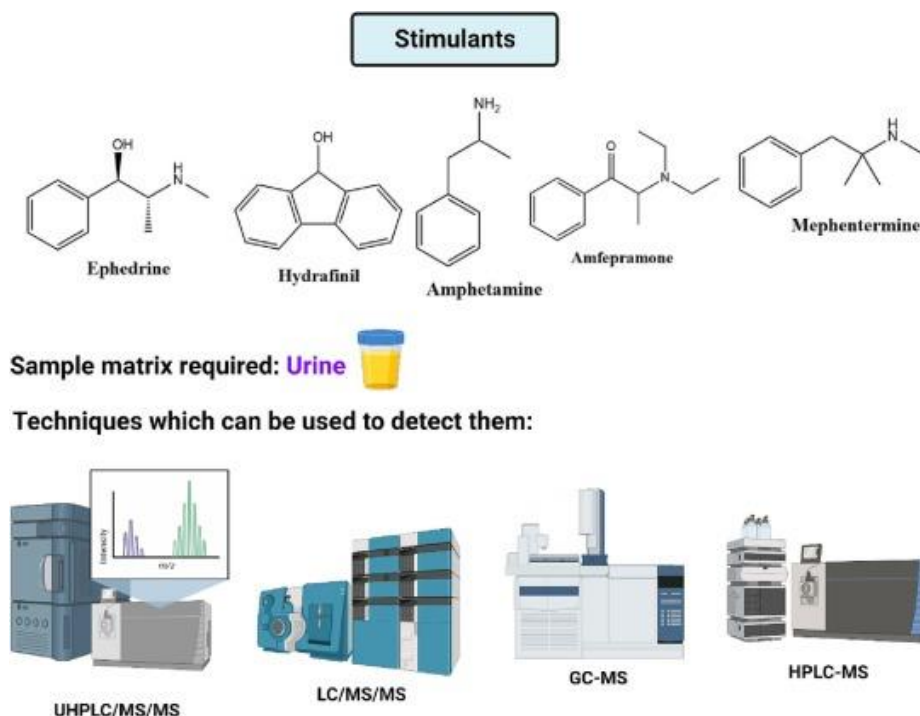
είναι απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος πριν την ανάλυση με ισοτοπική φασματομετρία μάζας IRMS. Άρα ποιοτικές μέθοδοι είναι απαραίτητες για την ανίχνευση των εξωγενών αναβολικών παραγόντων και αντίστοιχα ποσοτικές μέθοδοι απαιτούνται για την ανίχνευση των αντίστοιχων ενδογενών. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον εντοπισμό των εξωγενών αναβολικών στεροειδών με τη βοήθεια της SRM. Μια από αυτές είναι η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας GC-MS και αφορά την ανίχνευση μικρού αριθμού στεροειδών. Από την άλλη η μέθοδος ESI-LC-MS εφαρμόζεται για αναλυτές που περιέχουν είτε μια κέτο-λειτουργία στον άνθρακα 3 είτε έναν δακτύλιο αζώτου. Τέλος η LC-MS εφαρμόζεται για την ανίχνευση 34 αναβολικών στεροειδών και μεταβολιτών. Από την άλλη ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναβολικών στεροειδών στα ανθρώπινα ούρα αφορά κατά κύριο λόγο το προσδιορισμό των γλυκουρονιδίων και των θειικών αλάτων των ενδογενών αναβολικών στεροειδών (π.χ. τεστοστερόνη, επιτεστοστερόνη). Αυτό συμβαίνει διότι τα γλυκουρονίδια των αναβολικών στεροειδών διαθέτουν ικανότητα τόσο θετικού όσο και αρνητικού ιονισμού, οπότε και ακολουθεί μελέτη των οδών κατακερματισμού αυτών. Τέλος η χρήση της SRM είναι απαραίτητη εξαιτίας των χαμηλών ορίων ανίχνευσης που απαιτούν οι συγκεκριμένοι αναλυτές.

(34)

- **Διεγερτικά**

Η χρήση διεγερτικών επιτρέπεται μόνο κατά τη διάρκεια του αγώνα, αν και θεωρείται ότι η λειτουργία τους είναι η ενίσχυση της απόδοσης των αθλητών μέσω μεταβολής των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών νορεπινεφρίνης και ντοπαμίνης. Ωστόσο πρόκληση για τα εργαστήρια αντιντόπινγκ αποτελεί η καθιέρωση μιας ενιαίας στρατηγικής ελέγχου για την ανίχνευση της τεράστιας ποικιλίας διεγερτικών.

ON



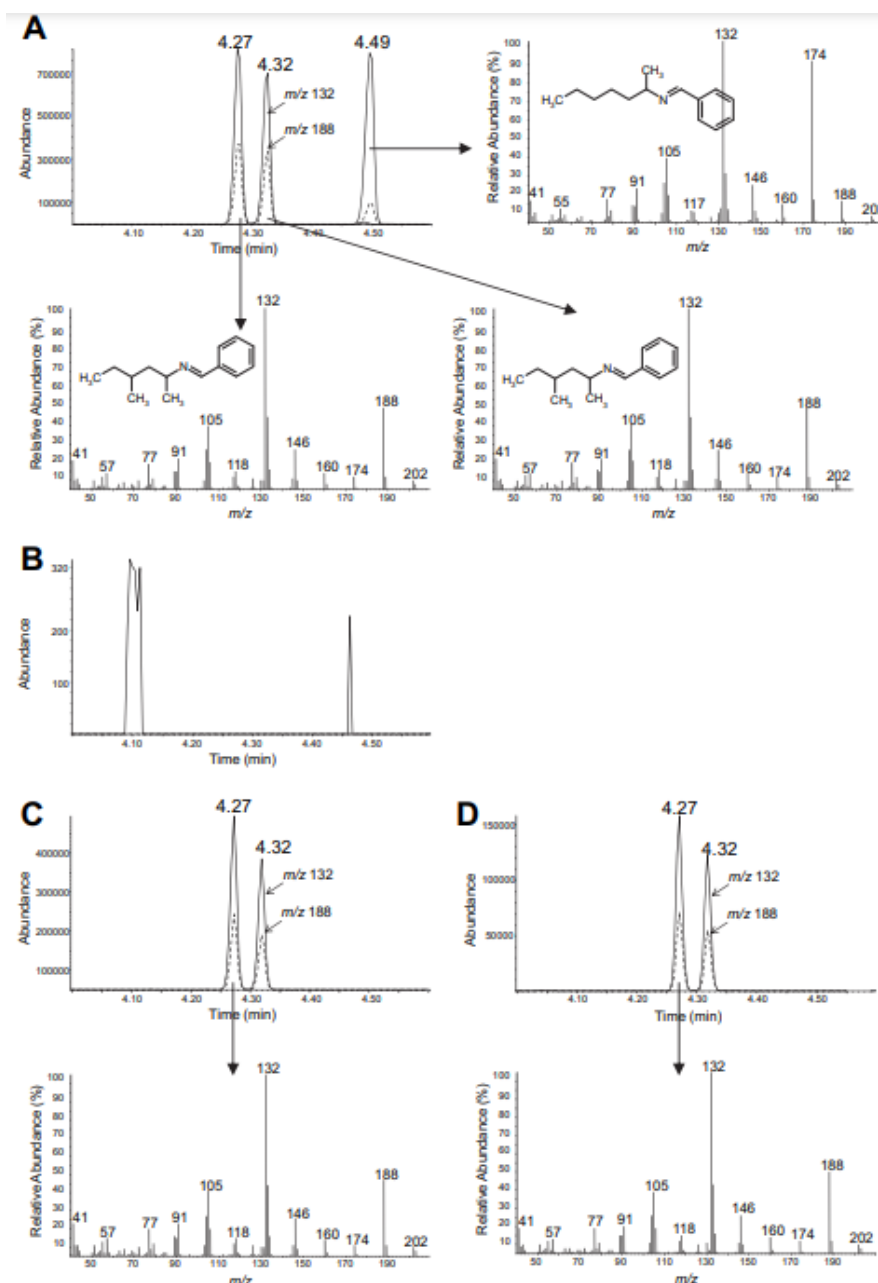
Σχήμα 17 Η δομή ορισμένων ναρκωτικών ουσιών που βελτιώνουν την απόδοση, τα οποία απαγορεύονται στον αθλητισμό και διάφορες τεχνικές ανίχνευσης αυτών των ουσιών στους αθλητές

Για την ανίχνευση των διεγερτικών συνήθως ως δείγμα χρησιμοποιείται εκχύλισμα ούρων (Σχήμα 17). Αυτό συμβαίνει διότι από κάποια υποβαθμισμένα διεγερτικά προκύπτει σε χαμηλή αφθονία μικρός αριθμός διαγνωστικών ιόντων. Αρχικά τα δείγματα ούρων υπόκεινται, είτε σε εκχύλιση στερεάς φάσης είτε σε εκχύλιση υγρού-υγρού, και στη συνέχεια συνήθως χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας LC-MS για τον εντοπισμό μεγάλου εύρους διεγερτικών. Εναλλακτική μέθοδος αποτελεί η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS, η οποία ούτε απαιτεί παραγωγή του δείγματος για επιτυχή διαχωρισμό με χρωματογραφία και διαθέτει περίσσεια ιόντων. Η LC-MS/MS χρησιμοποιείται για πτητικά, πολικά και θερμοδιαλυτά προϊόντα, καθώς αναπτύσσει υψηλής απόδοσης τεχνικών διαλογής, χωρίς να είναι απαραίτητη η φάση συγκέντρωσης ή καθαρισμού του δείγματος. Η ανάλυση με GC-MS και με LC-MS έδωσε τη δυνατότητα ανίχνευσης του άθικτου φαρμάκου της υδραφινίλης, επιπλέον των μεταβολιτών της φάσης I και II, σε δείγματα ούρων ανδρών πριν και 72 ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Η online εκχύλιση στερεάς φάσης SPE και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS, δηλαδή η online-SPE-LC-MS/MS, χρησιμοποιείται επίσης για την ανίχνευση 80 διεγερτικών ουσιών με όριο ανίχνευσης 10-100 ng/mL. Τέλος για τον εντοπισμό πέντε αναλόγων εφεδρίνης εφαρμόστηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών UHPLC-MS/MS με όριο ανίχνευσης μικρότερο από 0,5ng/mL. Για την μέθοδο χρειάστηκε ένας

φασματογράφος μάζας συζευγμένος με πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό σε πολλαπλές αντιδράσεις ανίχνευσης ύστερα από αραίωση ενός σταδίου. (24), (28)

Ο ολοένα και αυξανόμενος αριθμός των θεραπευτικών ουσιών σε συνδυασμό με την πολυπλοκότητα των βιολογικών μητρών καθιστά απαραίτητη την ύπαρξη εξειδικευμένων αναλυτών. Για το λόγο αυτό είναι συχνή η χρήση αέριας χρωματογραφίας GC με ανιχνευτή ιονισμού αζώτου-φωσφόρου NPD μαζί με φασματομετρία μάζας MS, ώστε να αξιοποιούνται τα πλεονεκτήματα όλων των τεχνικών ταυτόχρονα. Για τη παροχή διαφόρων πληροφοριών σχετικά με διαγνωστικά ιόντα και λεπτομέρειες που συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό και τη ταυτοποίηση ενώσεων-στόχων, αξιοποιείται η φασματομετρία μάζας MS με ιονισμό ηλεκτρονίων EI. Έτσι λοιπόν από τον εκτεταμένο κατακερματισμό των αναλυτών προκύπτουν τα διάφορα φάσματα μάζας EI, τα οποία δύσκολα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό βάρος.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφους μάζας LC-MS/MS αξιοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διεγερτικών ουσιών, εξαιτίας της υψηλής συγγενείας των πρωτονίων των αμινών. Οι αμίνες αποτελούν σημαντικό δομικό συστατικό των διεγερτικών ουσιών. Έτσι λοιπόν προκύπτει ιόν $[M+H]^+$ μέσω του ιονισμού των αναλυτών είτε με ηλεκτροψεκασμό ESI είτε χημικά υπό ατμοσφαιρική πίεση. Η ευαίσθητη και ειδική ανάλυση των διαφόρων διεγερτικών ουσιών επιτυγχάνεται από τα φάσματα μάζας του προϊόντος ιόντος, το οποίο προκύπτει από τη διάσπαση λόγω σύγκρουσης του $[M+H]^+$. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εκτός από την καταγραφή των διαγνωστικών ιόντων προϊόντων να καταγράφεται και το άθικτο μοριακό ιόν, χωρίς να είναι απαραίτητο το στάδιο της παραγωγίσιμης. Η συσχέτιση λοιπόν των πρόδρομων ιόντων και του ιόντος προϊόντος, δηλαδή η εξειδίκευση των ιόντων μετάβασης, έχει αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη ταχέων και ευαίσθητων δοκιμασιών ανίχνευσης, οι οποίες συμπληρώνουν την GC-MS/NPD.



Σχήμα 18 Α. Ανάλυση GC-MS μίγματος 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης και τουαμινοεπτανίου παραγωγοποιημένο με βενζαλδεϋδη. Παρατηρούνται δυο στερεοϊσομερή της 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης, τα οποία παρατηρούνται στα 4.27 και 4.32 min, και δίνουν δυο πανομοιότυπα φάσματα EI-MS. Αντίστοιχα το στερεοϊσομερές του τουαμινοεπτανίου παρατηρείται στα 4,49 min. Β. Ανάλυση GC-MS τυφλού δείγματος ούρων μίγματος 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης και τουαμινοεπτανίου. Δεν ανιχνεύονται σήματα. Γ. Ανάλυση GC-MS δείγματος ούρων ελέγχου ντόπινγκ και βρέθηκε θετικό σε 4-μεθυλεξαν-2-αμίνη και προκύπτουν δυο στερεοϊσομερή και δίνει φάσματα EI-MS πανομοιότυπα με εκείνα των ουσιών αναφοράς. Δ. Ανάλυση GC-MS δείγματος ούρων μετά τη χορήγηση συμπληρώματος διατροφής με ένδειξη «περιέχει εκχύλισμα ρίζας γερανιού», όπου ανιχνεύθηκε η 4-μεθυλεξαν-2-αμίνη με τα στερεοϊσομερή της.

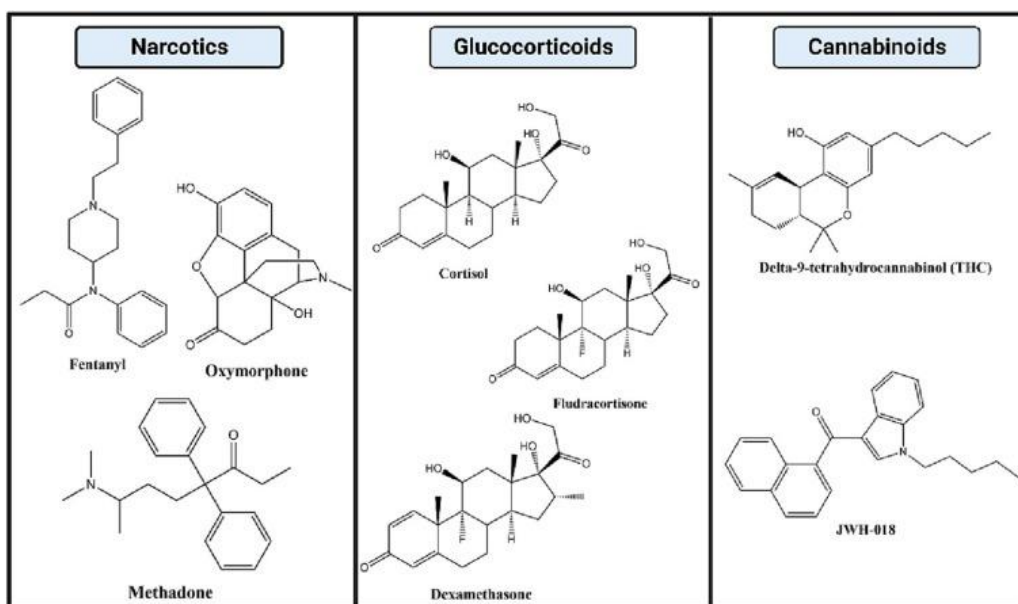
Η 4-μεθυλεξαν-2-αμίνη ή αλλιώς γεραναμίνη αποτελεί ένα φυσικό προϊόν, το οποίο παράγεται σε μικρό ποσοστό από το φυτό γεράνι, το φύλλωμα του οποίου αξιοποιείται στην παραγωγή διαφόρων αρωμάτων, τα οποία προκύπτουν από ένα ελαιώδες απόσταγμα πλούσιο σε διεγερτικά. Το έλαιο αυτό εντοπίζεται επίσης σε ορισμένα συμπληρώματα διατροφής, τα οποία είναι γνωστά και ως εκχυλίσματα γερανιού. Η μειωμένη τοξικότητα και η αυξημένη πτητικότητα αποτελούν τα κύρια πλεονεκτήματα της 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης έναντι της εφεδρίνης, της αμφεταμίνης και του τουαμινοεπτανίου. Αρχικά η ανίχνευση της 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης έγινε με τη βοήθεια της LC-MS/MS, ύστερα από αλκαλική εκχύλιση υγρού-υγρού του αναλύτη στόχου ακολουθούμενη από συμπύκνωση και μέτρηση με τη χρήση των διαγνωστικών ιόντων προϊόντων που προκύπτουν από το πρωτονιωμένο μόριο με λόγο m/z 116. Μάλιστα στη συγκεκριμένη μέθοδο το όριο ανίχνευσης είναι περίπου 50ng/mL, ύστερα από μέτρηση σε δείγματα ούρων που περιείχαν περίπου 15mg/mL της απαγορευμένης ουσίας.

Αρχικά με τη βοήθεια της μεθόδου GC-MS για την ανίχνευση και επιβεβαίωση του τουαμινοεπτανίου σε έλεγχο ντόπινγκ εντοπίστηκε η 4-μεθυλεξαν-2-αμίνη. Δηλαδή οι αναλύτες εκχυλίζονται κάτω από αλκαλικές συνθήκες από τα ούρα σε μεθυλο-τερτ-βουτυλαιθέρα και στη συνέχεια παραγωποποιούνται με τη βοήθεια μεθανολικού διαλύματος βενζαλδεΐδης. Έπειτα γίνεται έγχυση των δειγμάτων σε σύστημα GC-EI/MS/NPD και προκύπτει χρωματογράφημα των ιόντων που προκύπτουν από το μείγμα 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης και τουαμινοεπτανίου καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα μάζας EI (Σχήμα 18Α). Πιο αναλυτικά παρατηρούμε ότι στην 4-μεθυλεξαν-2-αμίνη αντιστοιχούν δυο κορυφές, οι οποίες εκλούνται στα 4,27 και 4,32 λεπτά και στο τουαμινοεπτάνιο αντιστοιχεί μια κορυφή στα 4,49 λεπτά. Καθόλου σήμα δεν παρατηρήθηκε στο τυφλό δείγμα (Σχήμα 18Β), ενώ σε δείγματα ελέγχου ούρων παρατηρήθηκαν δυο κορυφές ισομερών της 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης (Σχήμα 18C). Τέλος, από το φάσμα που προέκυψε από δείγμα ούρων συμπληρώματος διατροφής με την ένδειξη ότι «περιέχει εκχύλισμα ρίζας γερανιού» (Σχήμα 18D) παρατηρήθηκαν πανομοιότυπα στερεοϊσομερή με την ένωση αναφοράς και το δείγμα ελέγχου ούρων. Τέλος τα θραύσματα που αντιστοιχούν σε αναλογίες m/z 160, 174 και 146 ταυτοποιούν την ύπαρξη της 4-μεθυλεξαν-2-αμίνης με βάση το MS (Σχήμα 18C). (9)

- **Κανναβινοειδή, Ναρκωτικά & Γλυκοκορτικοειδή**

Κατά τη διάρκεια του αγώνα απαγορεύεται η λήψη ναρκωτικών ουσιών, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις διεγερτικές ουσίες. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τόσο των διεγερτικών όσο και των ναρκωτικών εξαιτίας της μεγάλης συγγένειας πρωτονίων που διαθέτουν. Αυτό επιτυγχάνεται με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS και με υγρή χρωματογραφία LC. Η υγρή χρωματογραφία

συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS χρησιμοποιείται επίσης στην ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών, καθώς παρέχουν υψηλή αναλυτική ευαισθησία, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με τον διαχωρισμό της φαιτανύλης και των παραγώγων της με όριο ανίχνευσης τα 2ng/mL. Μια ακόμη τεχνική που αξιοποιήθηκε για την ανίχνευση 80 διεγερτικών, ναρκωτικών και άλλων απαγορευμένων ουσιών είναι η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών με ανιχνευτή φωσφόρου-αζώτου GC-NPD/MS. Στην τεχνική αυτή γίνεται έκλουση των ουσιών αυτών σε ελεύθερη μορφή στα ούρα, χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης για όλες τις ουσίες είναι 25-100ng/mL. Για την ανίχνευση ναρκωτικών, πεπτιδικών ορμονών και αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε βιολογικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε η επιφανειακά υποβοηθούμενη φασματομετρία μάζας εκρόφηση με ιονισμό με λέιζερ SALDI-MS με νανοδομημένο πυρίτιο.



Σχήμα 19 Η δομή ορισμένων Κανναβινοειδών, Ναρκωτικών και Γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή, αν και ενδέχεται να είναι επιβλαβή για την υγεία του αθλητή, διαθέτουν την ικανότητα βελτίωσης της απόδοσης του αθλητή, γεγονός που εξαρτάται από τις δόσεις των χρησιμοποιούμενων γλυκοκορτικοειδών και συγκεκριμένους αθλητικούς παράγοντες. Έτσι λοιπόν έχουν ανιχνευτεί ταχείες και ευαίσθητες τεχνικές σε δείγματα σάλιου για το προσδιορισμό των επιπέδων τεστοστερόνης και κορτιζόλης (Σχήμα 19). Επίσης για την αξιολόγηση κορτικοειδών (δεξαμεθανόζη, βουδεσονίδη) στο πλαίσιο ελέγχων ντόπινγκ έχουν αναπτυχθεί διάφορες ποιοτικές και ποσοτικές μέθοδοι. Απαραίτητη είναι επίσης η περαιτέρω διερεύνηση τεχνικών ανίχνευσης πρόσθετων γλυκοκορτικοειδών σε δείγματα αίματος με τη συμβολή του ελέγχου πολλαπλών αναλυτών.

Απαγορευμένη κατά τη διάρκεια των αγώνων είναι η χρήση των συνθετικών κανναβινοειδών, όπως είναι η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη Δ9-THC. Μάλιστα δυσμενές αναλυτικό εύρημα για την Δ9-THC εκδίδεται μόνο όταν ο πρωτογενής της μεταβολίτης (11-νορ-9-καρβοξυ-ετραϋδροκανναβινόλη THCCOOH) ξεπεράσει το όριο των 150ng/mL. Επίσης δυνατή είναι η ανίχνευση μιας ποικιλίας συνθετικά παραγόμενων κανναβινοειδών από δείγματα στοματικών υγρών για σκοπούς τοξικών αλλά και εγκληματολογικών ερευνών. Χρησιμοποιώντας λοιπόν ως μήτρα στοματικό υγρό αντί για ούρα ή αίμα αλλά και με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS με αναλυτές τριπλού τετραπόλου QqQ επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης μικρότερο από 1 ng/mL. Παρόλο που τα μέχρι στιγμής δημοσιευμένα αποτελέσματα αφορούν την τετραϋδροκανναβινόλη και το JWH-018, η μέθοδος των αποξηραμένων κηλίδων αίματος DBs έχει καταστεί αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου ντόπινγκ. Η ανίχνευση του JWH-018 και των μεταβολιτών αυτού μπορεί να πραγματοποιηθεί συνδυάζοντας ηλεκτροψεκασμό σε σειρά με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας, με ενζυματική υδρόλυση καθώς επίσης και εκχύλιση υγρού-υγρού. Η πραγματοποίηση αυτής της μεθόδου ελέγχου ντόπινγκ σε περισσότερα από 7500 δείγματα ούρων, είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη του JWH-018 καθώς και επιβεβαίωσε την ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου στα ούρα των αθλητών. Παρολαυτά η διεξαγωγή επιπρόσθετων ερευνών σχετικά με τη συνθετική κάνναβη είναι απαραίτητη. Επίσης για την ταυτοποίηση συνθετικά παραγόμενων κανναβινοειδών έχει αξιοποιηθεί η ογκομετρική απορροφητική μικροδειγματοληψία VAMS σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS. (11), (20), (24), (28), (29)

• **Αυξητικοί Παράγοντες**

Μεγάλη σημασία στον έλεγχο ντόπινγκ αποτελεί η ευαίσθητη και ενδεδειγμένη εξέταση των δραστικών εκκρινών της αυξητικής ορμόνης GHS καθώς και των πεπτιδίων απελευθέρωσης αυτών των ορμονών GHRPs, τα οποία λαμβάνονται δια του στόματος και κυκλοφορούν στις μάρκες αγορές. Γενικά οι φασματοσκοπικές μέθοδοι αξιοποιούνται σε δείγματα ούρων και αίματος με σκοπό την ανάλυση πεπτιδίων κατά τον έλεγχο ντόπινγκ, όπου οι μεταβολίτες ή/και οι καταβολίτες των ουσιών αυτών αντικατοπτρίζουν καλύτερα τους αναλυτές στόχους. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ανταγωνιστική δοκιμασία δέσμευσης υποδοχέα, διάρκειας περίπου 4,5 ωρών, που βασίστηκε στην μέτρηση του πεπτιδίου GHRP-2, το οποίο απελευθερώνει την αυξητική ορμόνη σε δείγματα ούρων μετά τη χορήγηση. Η ταυτοποίηση επομένως μιας ένωσης από την κατηγορία των αυξητικών ορμονών GHS πραγματοποιείται με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS. Μια ακόμη τεχνική για την ταυτοποίηση του GHRP-2 και του πρωτογενούς του μεταβολίτη στα ανθρώπινα ούρα, περιλαμβάνει έκθεση του δείγματος σε εκχύλιση στερεάς φάσης SPE και ύστερα ανάλυση του δείγματος με υγρή χρωματογραφία

συζευγμένη με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS. Η χρήση εσωτερικού προτύπου σημασμένου με ισότοπα GHRP-2 καθώς και η προετοιμασία δείγματος εξασφαλίζουν τις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης, με την οποία επιτυγχάνεται όριο ανίχνευσης 20-50 pg/mL και η άθικτη GHRP-2 μπορεί να ανιχνευθεί για έως και 13 ώρες. Η ανίχνευση ιπαμορελίνης σε αποξηραμένες κηλίδες αίματος DBs πραγματοποιείται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φασματοσκοπία υψηλής ανάλυσης UHPLC-HRMS. Πιο αναλυτικά η ιπαμορελίνη απομονώνεται από τις αποξηραμένες κηλίδες αίματος μέσω υγρής εκχύλισης και υπερήχων και τελικά ταυτοποιείται με φάσματα θραυσματοποίησης υψηλής ανάλυσης. Τα πρόδρομα και θραυσματικά ιόντα ήταν μικρότερα από 5ppm και όριο ανίχνευσης 2,5g/nL. Ικανοποιητική θεωρείται η απόκριση της μεθόδου ως προς την ακρίβεια, την ευαισθησία, την γραμμικότητα, την ανάκτηση και τα αποτελέσματα καταστολής-ενίσχυσης ιόντων. Επομένως όταν οι αναλυτές στόχοι είναι μη αναγνωρισμένα συνθετικά πεπτίδια για στοχευμένη ανάλυση στη κλινική παρακολούθηση και μη-στοχευμένη ανάλυση στον έλεγχο αθλητικών φαρμάκων. Δηλαδή ο συνδυασμός των αποξηραμένων κηλίδων αίματος με τη φασματομετρία μάζας υψηλής απόδοσης αποτελεί μια αποτελεσματική και βιώσιμη τεχνολογία για την ανίχνευση χαμηλών επιπέδων μικρών πεπτιδίων στο αίμα. Η υγρή χρωματογραφία με φασματοσκοπία υψηλής ανάλυσης LC-HRMS χρησιμοποιείται για την μέτρηση του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης IGF-1. Η συγκεκριμένη ανάλυση αναπτύχθηκε από 25 λίτρα ανθρώπινου ορού, με τη προσθήκη 0,1% μυρμηκικού οξέος σε μεθανόλη και 0,1% υδατικής ουσίας μυρμηκικού οξέος (διαλύτης Α) ως βαθμίδα έκλουσης, έπειτα ο ορός υποβλήθηκε σε καταβύθιση πρωτεϊνών και σε υπερφυγοκέντρωση. Ακολουθεί φόρτωση του κατακρατούμενου προϊόντος σε αναλυτική στήλη C-18 (διαλύτης Β). Η συνολική διάρκεια της ανάλυσης είναι λιγότερο από 10 λεπτά και το όριο ποσοτικοποίησης αυτής είναι 20ng/mL. Η συγκεκριμένη ανάλυση δοκιμάστηκε σε 209 δείγματα αίματος και αποδείχθηκε αξιόπιστη με $r=0.85$ που είναι καλή συσχέτιση αν συγκριθεί με ανοσο-ακτινομετρική ανάλυση. Επίσης διάφοροι τροποποιημένοι έλεγχοι ρουτίνας αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση του μηχανικού αυξητικού παράγοντα MGF, η προέλευση του οποίου είναι από τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης IGF-1. Ωστόσο η αλληλουχία του διαφέρει από τον IGF-1, εκφράζεται από μηχανικά υπερφορτωμένους μύες και συμβάλλει στην αποκατάσταση και προσαρμογή των ιστών. Οι έλεγχοι ντοπαρίσματος για τον MGF περιλαμβάνουν διαχωρισμό με βάση την ανοσοσυγγένεια, την υπερδιήθηση και την φασματομετρία υψηλής απόδοσης και υψηλής ακρίβειας με νανο-υγρή χρωματογραφία. (24), (30)

- **β-αναστολείς**

Οι β-αναστολείς ανήκουν στα αντιυπερτασικά φάρμακα και συμβάλλουν στη διαχείριση των καρδιακών αρρυθμιών, στην υπέρταση και στην προστασία της καρδιάς μετά από έμφραγμα. Ωστόσο ορισμένα από τα φάρμακα της κατηγορίας αυτής απαγορεύονται σε διάφορα αθλήματα, διότι βελτιώνουν την απόδοση του αθλητή μέσα από τη μείωση του καρδιακού ρυθμού και του

τρέμουλου. Επομένως αντιλαμβανόμαστε ότι η ανάλυση ούρων με σκοπό την ανίχνευση των β-αναστολέων αποτελεί υποχρεωτική δράση στους ελέγχους ντόπινγκ. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, ο φωσφορισμός, ο φθορισμός, η αέρια χρωματογραφία GC, η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας GC-MS, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC με UV/φθορισμό/φωτοδιοδική συστοιχία ανίχνευσης, η υγρή χρωματογραφία – ηλεκτροψεκασμός ιονισμού με φασματομετρία μάζας LC-ESI-MS, η φασματομετρία μάζας με αναλυτή πτήσης χρόνου με υγρή χρωματογραφία LC-TOF-MS, η υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας SFC-MS/MS και η φασματομετρία μάζας εκρόφησης/ιονισμού λείζερ υποβοηθούμενη από μήτρα MALDI-MS αποτελούν μερικές από τις αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό β-αναστολέων σε μήτρες. Σήμερα οι τεχνικές οι οποίες αξιοποιούν τη μάζα ως ανιχνευτή έχουν ευρεία χρήση εξαιτίας της υψηλής τους ευαισθησίας και εκλεκτικότητας, κάτι το οποίο είναι απαραίτητο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των β-αναστολέων σε βιολογικά δείγματα. (24), (31)

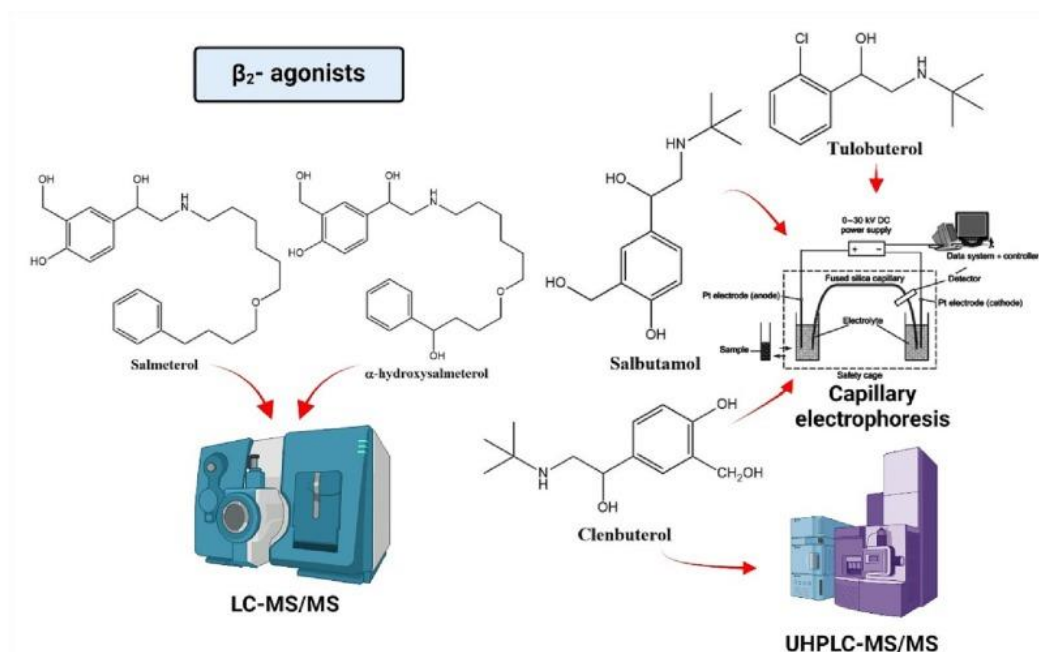
- **Διουρητικά**

Τόσο τα διουρητικά όσο και οι παράγοντες συγκάλυψης είναι απαγορευμένα από τον WADA καθώς χρησιμοποιούνται καταχρηστικά είτε με σκοπό τη διούρηση για να χάσουν βάρος είτε για την συγκάλυψη κατάποσης παράνομων ουσιών. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ταυτοποίησης των διουρητικών είναι η εκχύλιση και ο συνδυασμός αραίωσης – πυροδότησης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής απόδοσης HRMS, η υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου LC-TQMS. Η επίδραση της μήτρας και ο βραδύς χρόνος κατακράτησης αποτελούν τα μειονεκτήματα του συνδυασμού της αραίωσης-πυροδότησης, με την εξοικονόμηση εργασίας και χρόνου να αποτελούν τα κύρια πλεονεκτήματα από την άλλη. Έτσι λοιπόν ο WADA καθιέρωσε για τα διουρητικά το ενιαίο απόλυτο ελάχιστο επίπεδο απόδοσης MRPL στα 200 ng/mL. Επίσης για τον προσδιορισμό μη-χειρόμορφων ενεργών φαρμακευτικών συστατικών και σχετιζόμενων με αυτές ενώσεων εφαρμόζονται τεχνικές ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς ζώνης, ενώ για εναντιοεκλεκτικούς διαχωρισμούς και δοκιμές οπτικής καθαρότητας εφαρμόστηκαν τεχνικές μικροκυτταρικής ηλεκτροκινητικής χρωματογραφίας EKC. Τέλος η αραίωση των ούρων και ύστερα η άμεση έγχυση αυτών παρείχε τη δυνατότητα της ανταγωνιστικής ανίχνευσης 34 χημικών-ουσιών σε περιοχές ανίχνευσης 10-250 ng-mL. (24)

- **β2-αγωνιστές**

Κατά καιρούς έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες για την ανίχνευση των αθλητών που ενισχύουν την απόδοσή τους με β2-αγωνιστές. Αρχικά έγινε μια εστιασμένη δοκιμή με τη χρήση εφάπαξ εισπνεόμενων δόσεων 200 και 400μg, καθώς και για επτά διαδοχικές μέρες

δόθηκαν ημερήσιες εισπνεόμενες δόσεις 200μg σε 11 υγιή και εκπαιδευμένα άτομα. Η συλλογή των δειγμάτων ούρων και αίματος πραγματοποιήθηκε εκ των προτέρων και για έως και 24 ώρες μετά την χορήγηση των φαρμάκων. Έτσι λοιπόν για τον προσδιορισμό σε δείγματα ούρων των επιπέδων της σαλμετερόλης και του πρωτογενούς υδροξυλωμένου μεταβολίτη της εφαρμόστηκε εκχύλιση στερεάς φάσης, έπειτα ανάλυση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών LC-MS/MS και ενζυματική υδρόλυση (Σχήμα 20). Ακολουθεί η τοποθέτηση των εκχυλισμάτων των δειγμάτων σε στήλη C18 με διαβαθμισμένη εκχύλιση με ακετονιτρίλιο με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI, η οποία χρησιμοποιεί φορμικό αμμώνιο σε διάλυμα 0,1% υδατικού μυρμηκικού οξέος (διαλύτης A) και μυρμηκικό οξύ (διαλύτης B). Ύστερα από τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχου σε δείγματα ούρων, το όριο ποσοτικοποίησης για την σαλμετερόλη ήταν 0,025ng/mL και για την α-υδροξυσαλμετερόλη ήταν 0,05ng/mL. Σύμφωνα με τους συμβατούς κανόνες αντιντόπινγκ η μέση μέγιστη συγκέντρωση σαλμετερόλης 2,1-2,2ng/mL για δόση 200g, εφάπαξ κάθε 24 ώρες, ενώ για την υπερθεραπευτική δόση των 400g η μέση παραγωγή στα ούρα ήταν 4,0ng/mL. Αντίστοιχα η α-υδροξυσαλμετερόλη ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις 5,7-6,5ng/mL και 11,6ng/mL. Με αφορμή λοιπόν αυτές τις μετρήσεις προτάθηκε ένας συνδυασμός των δυο ορίων στα 3,3ng/mL, το οποίο είναι αποδεκτό και για τη σαλμετερόλη και για τον μεταβολίτη της. Σε περίπτωση λοιπόν που στα δείγματα ελέγχου ντόπινγκ εντοπιστούν και οι δυο αυτοί αναλυτές στόχοι σε ποσότητα μεγαλύτερη από 3,3ng/mL, τότε πρόκειται για δοκιμή ανεπιθύμητων αναλυτικών ευρημάτων και έτσι αποκλείεται και η χρήση ναρκωτικών που είναι σύμφωνη με τους κανόνες. Επίσης για τον διαχωρισμό μεταξύ των από του στόματος χορηγούμενων (απαγορευμένων) και της εισπνοής (επιτρεπόμενων) των R- και S- μορφών σαλβουταμόλης εφαρμόστηκε η φθοριομετρική ανίχνευση και εναντιοεκλεκτική χρωματογραφία. Η ανίχνευση ακούσιου ντόπινγκ με κλενβουτερόλη σε αθλητικούς χώρους σε λουκάνικα βοδινού κρέατος έγινε με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών UHPLC-MS/MS (Σχήμα 20).



Σχήμα 20 Σχηματική αναπαράσταση αναλυτικών τεχνικών για την ανίχνευση β_2 -αγωνιστών

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα με γρήγορους χρόνους χρωματογραφικής εκτέλεσης. Για τον χειρόμορφο διαχωρισμό των διάφορων παράνομων β_2 -αγωνιστών εφαρμόστηκε η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση, η οποία δεν ήταν πάντα προσβάσιμη σε όλες τις διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ, κάτι το οποίο φυσικά δεν ισχύει με τις αναλυτικές μεθόδους υγρής και αέριας χρωματογραφίες συζευγμένες με τη φασματομετρία μαζών. (21), (24)

• Γονιδιακό ντόπινγκ

Ως πιθανοί στόχοι του γονιδιακού ντόπινγκ έχουν χαρακτηριστεί διάφορες πρωτεΐνες, όπως η ερυθροποιητίνη, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη, η μυοστατίνη, η ενδορφίνη και η μυοστατίνη. Αρχικά λαμβάνει χώρα η αφαίρεση των κυττάρων από το σώμα του, η τροποποίησή τους *in vitro* στο εργαστήριο και εν συνεχεία η απευθείας μεταμόσχευσή τους στον αθλητή. Μια αρνητική επίδραση που θα μπορούσε να προκληθεί από το γονιδιακό ντόπινγκ είναι μια ανοσολογική αντίδραση, είτε από ίο είτε από την ίδια τη πρωτεΐνη, που θα οδηγούσε σε καταστροφή της ενδογενούς πρωτεΐνης. Ο κίνδυνος αύξησης εμφάνισης καρκίνου είναι μια ακόμη παράμετρος, καθώς ο ιός ενδέχεται να ενσωματωθεί κατά τρόπο τέτοιο που θα προκαλέσει αύξηση της σύνθεσης των πρωτο-ογκονιδίων. Κίνδυνος υπάρχει ακόμη στο να επηρεάσει το γονιδιακό ντόπινγκ τα γεννητικά κύτταρα προκαλώντας είτε προγραμματισμένες είτε μη αναμενόμενες συνέπειες. Επιπλέον η έκφραση του γονιδίου και η υπερέκφραση αυτού ενδέχεται να δημιουργήσει περίσσεια πρωτεΐνης με κίνδυνο εμφάνισης επικίνδυνων παρενεργειών λόγω των τεράστιων ποσοτήτων.

Τον Ιανουάριο του 2021 ανακοινώθηκε από τον WADA ότι οι συστάσεις των εργαστηρίων για ελέγχους ταυτοποίησης γονιδιακού ντόπινγκ περιλαμβάνουν αλυσιδωτή αντίδραση PCR. Μια ακόμη μέθοδος γονιδιακής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε είναι οι συγκεντρωμένες ανά τακτά διαστήματα σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις με τη συμβολή του ενζύμου CAS, CRISPR-CAS. Το συγκεκριμένο ένζυμο κόβει συγκεκριμένες θέσεις στο DNA. Το σύστημα CRISPR-CAS συμβάλλει στην μεγάλη προσαρμοστικότητα στη τροποποίηση γονιδιωματικών πληροφοριών καθώς και στη διαμόρφωση της δραστηριότητας του γονιδίου μέσω της χρήσης των καταλυτικά ανενεργών ενζύμων CAS. Τέλος για την ανίχνευση αυτών των πρωτεϊνών CAS αξιοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης UHPLC-HRMS/MS. (23), (24)

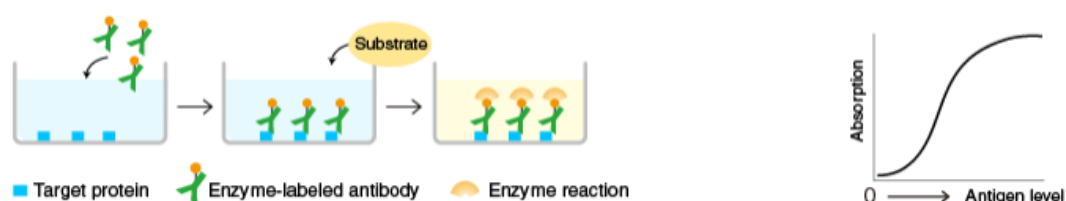
4.4 Ανοσοδοκιμασίες

Κάθε είδους αναλυτικού προσδιορισμού, κατά τον οποίο χρησιμοποιούνται αντισώματα της προσδιοριζόμενης ουσίας συγκαταλέγεται στις ανοσοδοκιμασίες. Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί συνδυάζουν διάφορες τεχνολογίες χημείας και ανοσολογίας, κάνοντας χρήση αντισωμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών, καθώς τα αντισώματα συνδέονται μόνο με πρωτεΐνες. Οι ανοσοχημικοί αναλύτες υπολογίζουν με τη βοήθεια ειδικού ανιχνευτή, το σήμα που παράγεται από κάποια χημική αντίδραση, η οποία ενεργοποιείται μέσα από την ένωση της πρωτεΐνης με το αντίσωμα, οπότε προκύπτει ένα ανοσοσύμπλεγμα. Γενικά ποικίλλουν τα είδη των ανοσοχημικών τεχνικών και εξαρτώνται από το σήμα που μετριέται από τις συγκεκριμένες τεχνικές (χρωματική αντίδραση - κρούσεις ραδιοϊσοτόπων - ένταση παραγόμενου φωτός - ραδιοανοσολογικές μέθοδοι - χημειοφωταύγεια - ανοσοενζυμικές μέθοδοι), από τον αριθμό των αντισωμάτων που παίρνουν μέρος στις χημικές αντιδράσεις (1 αντίσωμα - 2 αντισώματα - ανταγωνιστικές μέθοδοι - μη ανταγωνιστικές μέθοδοι) καθώς επίσης και από τον διαχωρισμό των ανοσοσυμπλόκων, τη σύνδεση δηλαδή αντιγόνων-αντισωμάτων, από τα υπόλοιπα τμήματα του διαλύματος (ακινητοποιημένο ανοσοσύμπλοκο - διαλυτό ανοσοσύμπλοκο - ετερογενείς μέθοδοι - ομογενείς μέθοδοι). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η μετατροπή απορρόφησης σε συγκέντρωση στις ανοσοχημικές μεθόδους δεν είναι εξίσου απλές με τις αντίστοιχες φωτομετρικές. Αυτό συμβαίνει διότι οι καμπύλες βαθμονόμησης των ανοσοχημικών μεθόδων δεν είναι πάντα ευθείες γραμμές, οπότε δεν ισχύει πάντα η απλή μέθοδος των τριών που ισχύει στις αντίστοιχες φωτομετρικές μεθόδους.

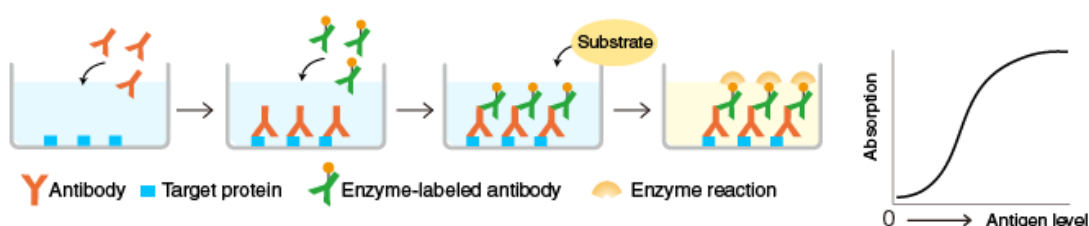
Η ELISA ή αλλιώς ενζυματικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική από τις ετερογενείς ανοσοχημικές μεθόδους και μάλιστα την πιο συχνή από τις δια χειρός μεθόδους. Στις ετερογενείς μεθόδους τα αντισώματα εντοπίζονται

προσκολλημένα πάνω σε μια στερεή επιφάνεια, όπως είναι ο πλαστικός πυθμένας των πηγαδίων μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης ή η επιφάνεια σφαιριδίων latex ή μαγνητικών σφαιριδίων ή ο πυθμένας γυάλινων ή πλαστικών σωληνάρων. Σε αυτή την κατηγορία των μεθόδων επιλέγονται αντιγόνα με παρόμοια χημική συμπεριφορά είτε είναι ενωμένα με αντισώματα είτε δεν είναι. Αντίστοιχα στις ομογενείς ανοσοχημικές μεθόδους, τα συνδεδεμένα με τα αντισώματα αντιγόνα διαθέτουν διαφορετική συμπεριφορά από τα μη συνδεδεμένα και τα ανοσοσύμπλοκα παραμένουν σε διαλυτή μορφή εντός του διαλύματος της αντίδρασης. Έτσι λοιπόν παρέχεται η δυνατότητα υπολογισμούς τους χωρίς να απαιτείται η απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων. Το γεγονός αυτό καθιστά τις ομογενείς μεθόδους εύκολα αυτοματοποιήσιμες, χωρίς όμως να μην ισχύει κάτι αντίστοιχο και για τις ετερογενείς μεθόδους. Η ELISA χρησιμοποιείται για μετρήσεις βιολογικών μεγαλομορίων, όπως πρωτεΐνες και ανοσοσφαιρίνες, καθώς επίσης και για τη μέτρηση απτενίων. Πρόκειται δηλαδή για υψηλής ευαισθησίας βιολογικά τεστ που έχουν ως στόχο τον προσδιορισμό της ύπαρξης ενός συγκεκριμένου συστατικού μέσα σε ένα υγρό δείγμα. Ουσιαστικά με τη βοήθεια της σύνδεσης αντιγόνων του δείγματος με τα ειδικά για τα συγκεκριμένα αντισώματα και την ενεργοποίηση από το σύμπλοκο αυτό κάποιου παράγοντα, ο οποίος πιστοποιεί την παρουσία του συγκεκριμένου αντιγόνου. Οι διάφορες τεχνικές ELISA χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες οι οποίες σχετίζονται με το συνδυασμό αντιγόνου-αντισώματος (άμεση, έμμεση, ανταγωνιστική ή sandwich ELISA) (Σχήμα 21).

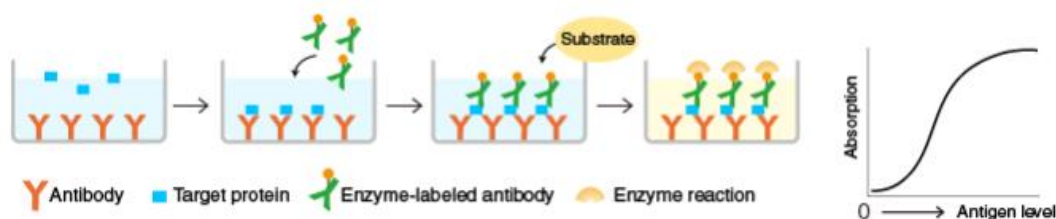
Direct ELISA



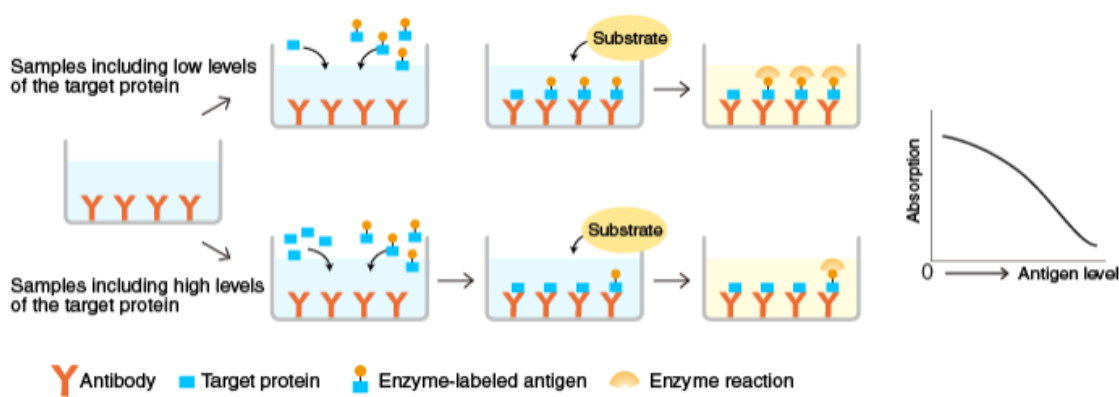
Indirect ELISA



Sandwich ELISA



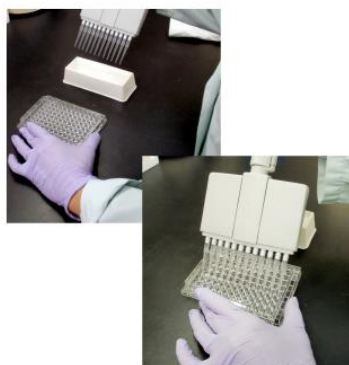
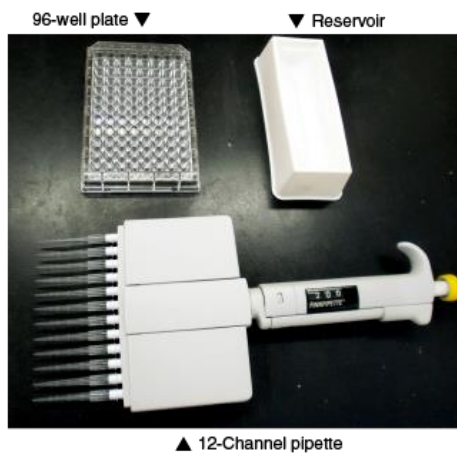
Competitive ELISA

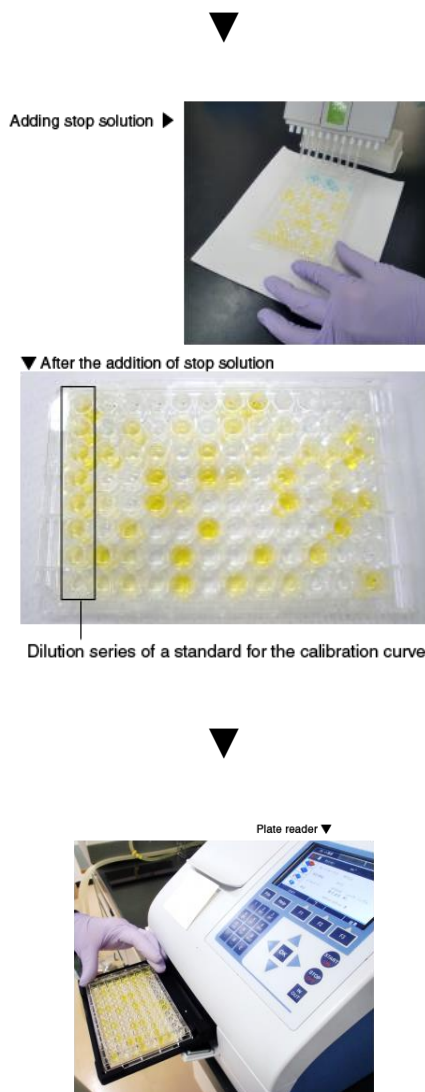


Σχήμα 21 Συνοπτικό διάγραμμα διαφορετικών τύπων ELISA

Ανεξάρτητα από το είδος της ELISA, αρχικά λαμβάνει χώρα η ανοσοπροσρόφηση, δηλαδή η πρόσδεση και η ακινητοποίηση του αντιγόνου σε στερεή επιφάνεια. Ακολουθεί η χρήση ανοσοσυζευγμένου αντισώματος και έπειτα η χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, με τη βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται ο σχηματισμός ενός διαλυτού και έγχρωμου προϊόντος (είτε με χρώμα είτε με φθορισμό). Έτσι λοιπόν παρέχεται η δυνατότητα ποσοτικοποίησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Στην ELISA χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί αντιγόνου-αντισώματος, στους οποίους πάντα υπάρχει ένα ενζυμικά επισημασμένο αντιγόνο ή αντίσωμα και η ενζυμική δραστηριότητα υπολογίζεται χρωματομετρικά. Δηλαδή υπολογίζεται με τη βοήθεια υποστρώματος, του οποίου το χρώμα μεταβάλλεται κάθε φορά που τροποποιείται από το ένζυμο. Έτσι λοιπόν υπολογίζεται η απορρόφηση του φωτός του σχηματιζόμενου προϊόντος ύστερα από την προσθήκη του υποστρώματος. Στην άμεση ELISA, η πρωτεΐνη στόχος ακινητοποιείται στην επιφάνεια των πηγαδιών μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης και επωάζεται με ένα ενζυμικά επισημασμένο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης-στόχου. Ακολουθεί η πλύση και ο υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου που είναι συνδεδεμένο στα πηγαδάκια. Αντίστοιχα στην έμμεση ELISA, η πρωτεΐνη-στόχος ακινητοποιείται στην επιφάνεια των πηγαδιών και

επωάζεται μαζί με ένα αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης-στόχου, το πρωτογενές αντίσωμα, ακολουθούμενο από ένα δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς αντισώματος. Ακολουθεί η πλύση και ο υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου που είναι συνδεδεμένο στα πηγαδάκια. Αν και διαθέτει περισσότερα βήματα από την αντίστοιχη άμεση μέθοδο, η έμμεση ELISA διατίθενται στο εμπόριο με σημασμένα δευτερογενή αντισώματα, οπότε δεν υπάρχει ανάγκη σήμανσης του πρωτογενούς αντισώματος. Στη περίπτωση της sandwich ELISA, έχουμε αρχικά την σύνδεση του αντιγόνου σε επιφάνεια μέσω ήδη ακινητοποιημένου σε αυτήν αντισώματος αβιδίνης, το οποίο είναι εξειδικευμένο στο αντιγόνο. Στη συνέχεια προστίθεται περίσσεια εξειδικευμένου αντισώματος συζευγμένο με το ένζυμο και γίνεται έκπλυση της επιφάνειας και ετερογενής κατάλυση της υποστρωματικής αντίδρασης από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Δηλαδή ένα αντίσωμα ειδικό για μια πρωτεΐνη-στόχο ακινητοποιείται στην επιφάνεια των πηγαδιών και επωάζεται αρχικά με την πρωτεΐνη-στόχο και έπειτα με ένα άλλο αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο, το οποίο επισημαίνεται με ένα ένζυμο. Τέλος λαμβάνει χώρα η μέτρηση του προϊόντος (απορροφούσα, φθορίζουσα ή χημειοφωταυγάζουσα ουσία) που είναι συνδεδεμένο στα πηγαδάκια της πλάκας και σχετίζεται η ποσότητά του με τη ποσότητα αντιγόνου του δείγματος. Το ακινητοποιημένο-πορτοκαλί αντίσωμα και το επισημασμένο με ένζυμο πράσινο-αντίσωμα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επίτοπους της πρωτεΐνης-στόχου. Τέλος, στην ανταγωνιστικού τύπου ELISA, ένα αντίσωμα ειδικό για μια πρωτεΐνη-στόχο ακινητοποιείται στην επιφάνεια των πηγαδιών της πλάκας και επωάζεται με δείγματα που περιέχουν την πρωτεΐνη-στόχο και μια γνωστή ποσότητα πρωτεΐνης-στόχου επισημασμένη με ένζυμο. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση ακολουθεί ο υπολογισμός της δραστηριότητας του ενζύμου που είναι συνδεδεμένο στα πηγαδάκια της πλάκας. Όταν το χρώμα είναι ανοιχτό και λιγότερο έντονο, τότε το επίπεδο του αντιγόνου στο δείγμα είναι υψηλό και το επίπεδο του συνδεδεμένου με το ένζυμο αντιγόνου που έχει επισημανθεί από αντίσωμα είναι χαμηλότερο. Αντίστοιχα όταν το χρώμα είναι πιο σκούρο και εντονότερο, τότε το επίπεδο του συνδεδεμένου με το ένζυμο-σημασμένου με αντίσωμα αντιγόνου είναι υψηλότερο. Γενικά η sandwich ELISA εφαρμόζεται για χρήσεις που απαιτούν υψηλή ακρίβεια, καθώς σε σύγκριση με την άμεση ELISA, επειδή συνδυάζει αντισώματα σε δυο διαφορετικούς επίτοπους της πρωτεΐνης-στόχου χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ειδικότητα. Από την άλλη όταν το αντιγόνο-στόχος είναι ένα μικρό μόριο, τότε δεν υπάρχει η δυνατότητα στην sandwich ELISA ταυτόχρονης σύνδεσης δυο αντισωμάτων με το αντιγόνο και για το λόγο αυτό για τη μέτρηση στόχων μικρού μοριακού βάρους χρησιμοποιείται η ELISA ανταγωνιστικού τύπου.





Σχήμα 22 Συνοπτικό διάγραμμα σταδίων ανάλυσης sandwich ELISA

Η διαδικασία της ακινητοποίησης του αντισώματος/αντιγόνου στα πηγαδάκια της πλάκας λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια υδρόφοβης αλληλεπίδρασης ή ομοιοπολικών δεσμών. Στο εμπόριο οι πλάκες που διατίθενται είναι προ-ενεργοποιημένες για διάφορες μεθόδους ακινητοποίησης, η επιλογή της οποίας εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης που πρόκειται να ακινητοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα για μικρά μόρια (π.χ πεπτίδια) προτιμάται ο ομοιοπολικός δεσμός, ενώ για μεγαλύτερα μόρια (π.χ πρωτεΐνες) προτιμάται η υδρόφοβη αλληλεπίδραση/φυσική προσρόφηση. Τέλος επειδή στο εμπόριο διατίθενται αρκετοί τύποι πλακών ELISA είναι κομβικής σημασίας να επιλέγεται ο σωστός τύπος πλάκας κάθε φορά για την εκάστοτε προβλεπόμενη χρήση. Στο Σχήμα 22 περιγράφονται εν συντομία τα βασικά βήματα που ακολουθούνται σε μια ELISA και συγκεκριμένα σε μια sandwich ELISA. Αρχικά προετοιμάζονται τα αντιδραστήρια και ο

εξοπλισμός. Ακολουθεί η ακινητοποίηση του αντισώματος με την προσθήκη αραιωμένου αντισώματος σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας 96 πηγαδιών, το οποίο έπειτα σφραγίζεται και επωάζεται στους 4°C για 15-18 ώρες ώστε να ακινητοποιηθεί το αντίσωμα. Μετά το πέρας αυτών των ωρών, αφαιρείται το αραιωμένο αντίσωμα και γίνονται τρεις πλύσεις με το διάλυμα πλύσης. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού σε κάθε πηγαδάκι και ακολουθεί 1 ώρα επώαση στους 37 °C με σκοπό το περιορισμό της μη-ειδικής πρόσδεσης της πρωτεΐνης-στόχου στο πηγαδάκι. Μετά τη 1 ώρα αφαιρείται το ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού και γίνονται τρεις εκπλύσεις με διάλυμα πλύσης. Ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων, τα οποία αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης και έπειτα προστίθενται 100μL από κάθε δείγμα στο κάθε πηγαδάκι. Μάλιστα για τη κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης απαιτείται η προετοιμασία μιας σειράς αραιώσεων του προτύπου στην ίδια πλάκα και γίνεται ακολούθως επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Αντιστοίχως μετά αφαιρούνται τα δείγματα με 5 εκπλύσεις από το διάλυμα πλύσης. Ύστερα προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης, το οποίο αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης και προστίθενται 100μL από αυτό στο κάθε πηγαδάκι και γίνεται ακολούθως επώαση για 1 ώρα στους 37 °C. Μετά την αντίδραση απομακρύνεται το αντίσωμα ανίχνευσης με 5 εκπλύσεις από το διάλυμα πλύσης. Γίνεται προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος επισημασμένου με ένζυμο με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δείγματος και προσθήκη από 100μL από αυτό σε κάθε πηγαδάκι. Μετά την αντίδραση απομακρύνεται το δευτερογενές αντίσωμα με 5 εκπλύσεις από το διάλυμα πλύσης. Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος και αφού ακολουθήσει επώαση παρατηρείται η ανάπτυξη χρώματος. Μόλις το χρώμα αναπτυχθεί επαρκώς, προστίθενται ένα διάλυμα διακοπής της αντίδρασης και στο τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm με τη βοήθεια συσκευής ανάγνωσης πλακών. (35), (36)

- **Αυξητικοί Παράγοντες**

Διάφορες ανοσοδοκιμασίες και φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρύτατα στον έλεγχο ντόπινγκ για γοναδοτροπίνες. Η ωχρινότροπος ορμόνη LH προσδιορίζεται με ανοσοδοκιμασία, χωρίς όμως να έχουν δημοσιευτεί όλα τα χαρακτηριστικά της ανάλυσης. Σήμερα οι εμπορικοί ανοσοπροσδιορισμοί της LH στηρίζονται στην τεχνική sandwich ELISA, όπου αξιοποιούνται δυο μονοκλωνικά ή και κάποιες φορές ένα μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης και ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνευτή. Η απέκκριση της LH στα ούρα πραγματοποιείται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις με εκείνες του ορού και ακόμη ένα σημαντικό μέρος της LH αποικοδομείται κατά τη διέλευση από τους νεφρούς. Το θραύσμα λοιπόν αυτό ανιχνεύεται από κάποιες και όχι από όλες τις ανοσοδοκιμασίες. Επίσης στις γυναίκες με έμμηνο ρήση το όριο της LH ανοσοαντιδραστικότητας στα ούρα κάνει την εμφάνισή του συνήθως 2-3 μέρες μετά την LH στον ορό, κάτι το οποίο προκαλείται εξαιτίας της καθυστερημένης απέκκρισης του παραπάνω

θραύσματος. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γνωρίζουμε την ειδικότητα των δοκιμασιών LH που εφαρμόζονται στους ελέγχους ντόπινγκ. (30)

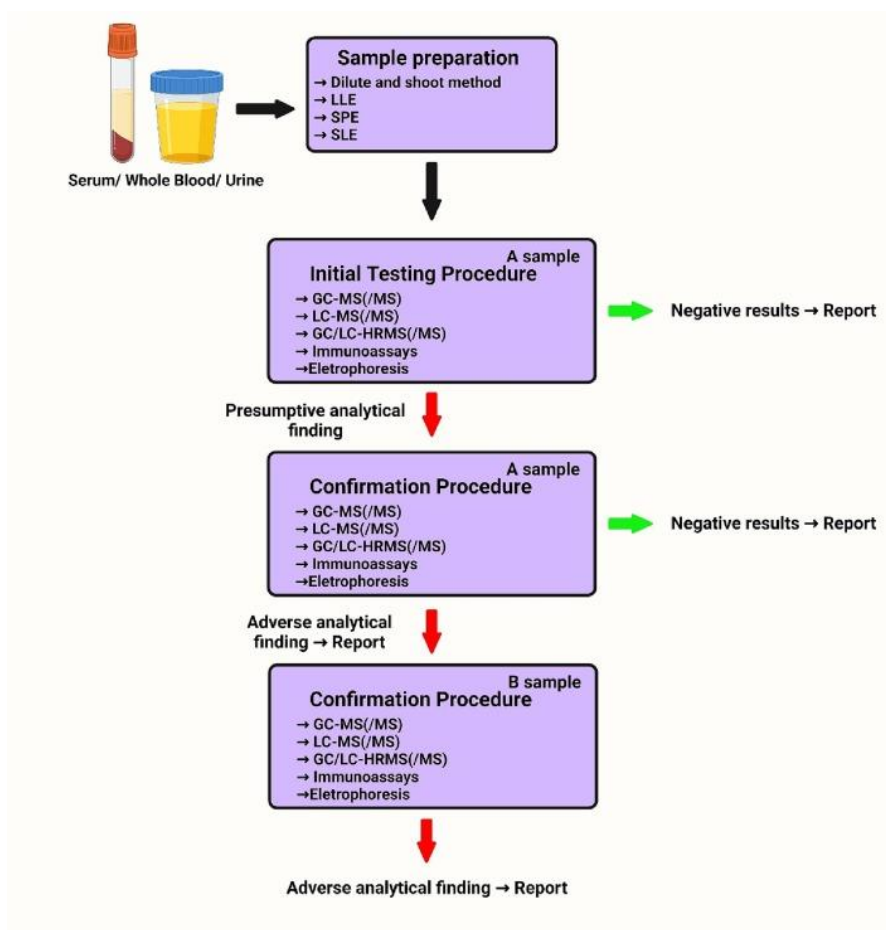
- **Ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη**

Η εφάπαξ χορήγηση ενδοφλέβιας δόσης ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης rhEPO δεν έχει καμία επίδραση στην βραχυπρόθεσμη αποτελεσματικότητα της αερόβιας άσκησης, ωστόσο η βελτίωση των υφιστάμενων δοκιμών είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η ανίχνευση της EPO σε δείγματα αίματος είναι δυνατή ωστόσο η ύπαρξη παρεμβολών εξαιτίας της ύπαρξης τεράστιας ποικιλίας πρωτεϊνών καθιστούν αρκετά δύσκολο τον εντοπισμό της. Μια προτεινόμενη μέθοδος είναι η νανο-υγρή χρωματογραφία σε σειρά με φασματομετρία μάζας nanoLC-MS που περιλαμβάνει εκχύλιση ανοσοσυγγένειας ως επιλεκτική μέθοδος προετοιμασίας δείγματος. Επίσης η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα τροποποιημένου σαρκοσουλικού πολυακρυλαμιδίου με σχέση δομής-δραστικότητας SAR-PAGE διπλασίασε το παράθυρο του χρόνου παρατήρησης συγκριτικά με άλλες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί.

Διάφοροι βιοδείκτες έχουν αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό των επιδράσεων μικροδοσολογιών Repo. Για παράδειγμα τα επίπεδα mRNA της 5'-αμινολεβουλινική συνθάση 2 χρησιμοποιούν το αιματολογικό προφίλ από βιολογικό διαβατήριο του αθλητή, ώστε να αναπτυχθούν ευαίσθητοι και μοναδικοί δείκτες μεταγραφώματος με σκοπό την ανίχνευση μικροποσοτήτων rhEPO. Η συγκεκριμένη λοιπόν μέθοδος αξιοποιεί την μέθοδο των αποξηραμένων κηλίδων αίματος DBS και εφαρμόζεται σε ελέγχους αντιντόπινγκ. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της EPO έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ο ενζυματικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός ELISA, ο οποίος ακολουθείται εν συνεχεία από ηλεκτροφόρηση ως επιβεβαιωτική τεχνική. Για την ανίχνευση αγωνιστών του υποδοχέα της ερυθροποιητίνης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα δείγματος οι αποξηραμένες κηλίδες αίματος DBS. Ωστόσο τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτές παρουσίαζαν λιγότερες διακυμάνσεις συγκριτικά με τα δείγματα από ούρα ή από φλέβες. Τέλος, για την παρακολούθηση των ενώσεων οι οποίες ενεργοποιούν τον παράγοντα που επάγεται από υποξία HIF έχει αναπτυχθεί μια πολύπλοκη και αυτοματοποιημένη μέθοδος online εκχύλισης στερεάς φάσης με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών online-SPE-LC-MS/MS. Οι απομονωμένοι αναλύτες μεταφέρονται για βαθμιδωτή έκλυση σε μια αναλυτική στήλη C-8, όπου η ταυτοποίηση πραγματοποιείται σε διάστημα 6,5 λεπτών με όριο ανίχνευσης 0,1-4 ng/mL. (22). (24)

5. Συμπεράσματα

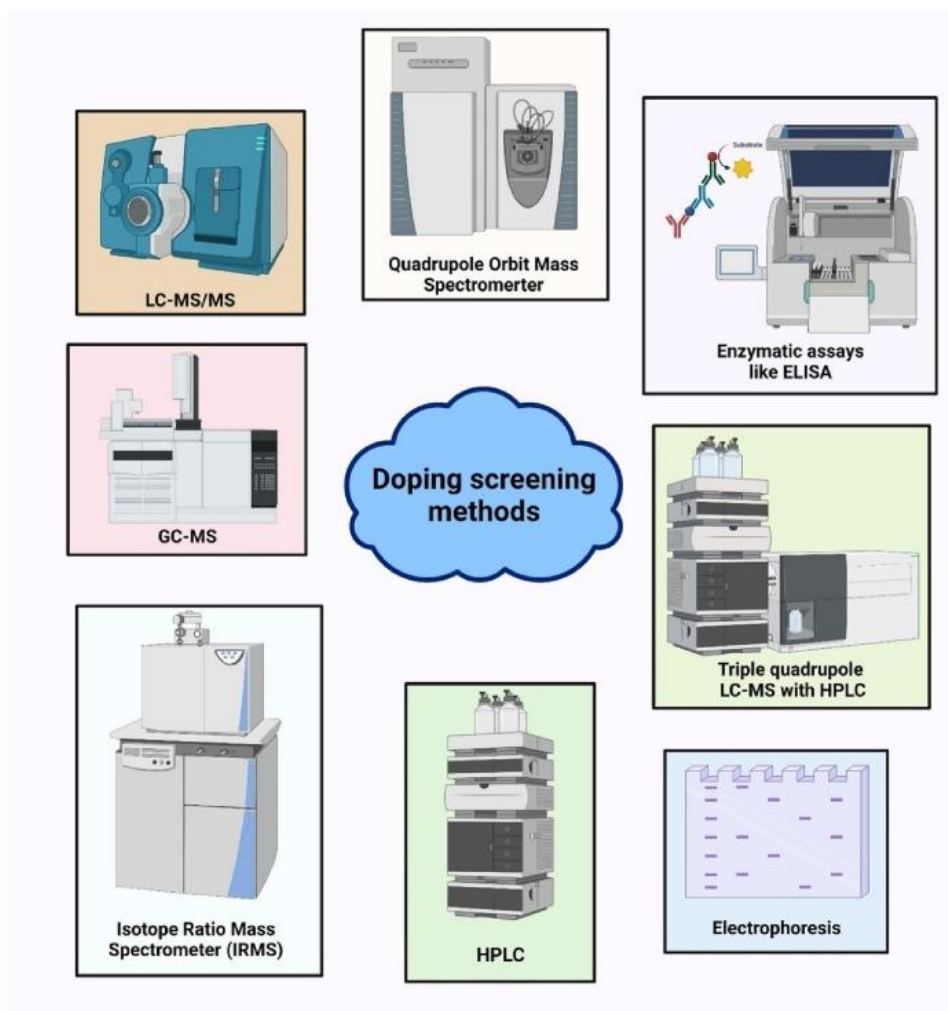
Στις αναλύσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω διαπιστώθηκε ότι έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές εξελίξεις σε διάφορες αναλυτικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται σε τεχνικές φασματομετρίας μάζας και φασματοσκοπίας και αφορούν δοκιμές ντόπινγκ αθλητικών φαρμάκων (Σχήμα 23). Σημαντικές εξελίξεις έχουν επίσης αναπτυχθεί στις αναλύσεις αντιντόπινγκ εξαιτίας της συνεργασίας πολλών ερευνητικών κέντρων με στόχο τη παροχή επικαιροποιημένων γνώσεων ως προς τις πρωτοεμφανιζόμενες κατηγορίες φαρμάκων, την βελτίωση στην ερμηνεία του μεταβολισμού των φαρμάκων, την πρόταση για νέες μεθόδους προκατεργασίας και συλλογής δειγμάτων. Οι αθλητές μπορούν να υποβληθούν σε έλεγχο οποιαδήποτε στιγμή και να γίνει λήψη δείγματος είτε ούρων είτε αίματος είτε αποξηραμένων κηλίδων αίματος DBS είτε μαλλιών. Η ανάλυση της τρίχας περιλαμβάνει εύκολη δειγματοληψία και παρόλο που ενέχει διάφορα επιστημονικά ερωτήματα γύρω από την επίδραση των προϊόντων που χρησιμοποιούνται για τα μαλλιά, οι αναλύσεις με δείγματα τρίχας θεωρούνται χρήσιμες συμπληρωματικά με τις αναλύσεις ντόπινγκ. Από την άλλη τα δείγματα αίματος περιλαμβάνουν άλλα μειονεκτήματα, όπως υψηλό κόστος δειγματοληψίας, παρεμβατική μέθοδος, αναγκαία η ύπαρξη ιατρικού προσωπικού και ο όγκος αίματος που συλλέγεται είναι αρκετά μικρότερος συγκριτικά με τα ούρα. Βέβαια τα δείγματα αίματος είναι αρκετά δύσκολο να παραποιηθούν. Αντίστοιχα τα δείγματα πλάσματος είναι ολοένα και πιο συχνά χρησιμοποιούμενα οι βιοδραστικές ενώσεις εντοπίζονται μη τροποποιημένες. Στους ελέγχους αντιντόπινγκ γενικά προτιμώνται τα ούρα έναντι του αίματος, εξαιτίας της εύκολης πρόσβασης τους σε μεγάλους όγκους μητρών δείγματος και της μη επεμβατικής τους συλλογής. Ένας ακόμη λόγος είναι το γεγονός ότι τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή AAS έχουν βραδύτερο ρυθμό μεταβολισμού στα ούρα, επομένως εδώ είναι πιο συγκεντρωμένα συγκριτικά με τις άλλες μήτρες. Ακόμα στη βιβλιογραφία εντοπίζεται μέθοδος για ταυτόχρονο έλεγχο 20 αναβολικών στεροειδών AAS με HPLC-MS με ανιχνευτή ESI σε δείγματα ούρων προέκυψε όριο ανίχνευσης LOD 0,1-1ng/mL και αντίστοιχα με ανιχνευτή APCI σε δείγματα τρίχας το LOD ήταν 0,01-0,1ng/mL. Αντίστοιχα υπάρχει μέθοδος με δυνατότητα ταυτόχρονου εντοπισμού περισσότερα από 44 αναβολικά στεροειδή AAS με LC-τριπλο τετραπολικό MS/MS με πηγή ESI σε δείγματα ούρων, η οποία δίνει LOD 0,2-10 ng/mL. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι τα δείγματα αίματος παρέχουν τη δυνατότητα εντοπισμού μεγαλύτερου εύρους ουσιών, συγκριτικά με τα δείγματα τρίχας, τα οποία έχουν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Για όλους τους παραπάνω λόγους, προκύπτει ότι τα ούρα αποτελούν τη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μήτρα για ελέγχους ντόπινγκ. Όλα τα ευρήματα απαριθμούνται σε διάφορα επιστημονικά άρθρα και το βιολογικό διαβατήριο του αθλητή.



Σχήμα 23 Σχηματική απεικόνιση της ροής εργασιών κατά την ανάλυση ντόπινγκ

Σε ένα έλεγχο ντόπινγκ η μέθοδος που θα εφαρμοστεί θα πρέπει να περιλαμβάνει ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως το να είναι απλή, να απαιτεί μικρούς χρόνους ανάλυσης δείγματος, να μπορεί να καλύψει μεγάλο εύρος ουσιών που μπορεί να προσδιορίσει και να διαθέτει τη δυνατότητα εντοπισμού των ουσιών ντόπινγκ σε πολύ μικρές ποσότητες. Γενικότερα για τον έλεγχο του ντόπινγκ έχουν διερευνηθεί η αέρια GC και η υγρή LC χρωματογραφία, μέθοδοι ηλεκτροφόρησης, διάφορες ανοσοδοκιμασίες καθώς και τα τελευταία χρόνια χρωματογραφικές μέθοδοι συζευγμένες με φασματομετρία μαζών, όπως LC-MS/MS και GC-MS/MS (Σχήμα 24). Αν και η GC/MS και η LC/MS παρέχουν τα ίδια πλεονεκτήματα με την συζευγμένη φασματομετρία μαζών, αυτή είναι αρκετά ταχύτερη τεχνική. Δηλαδή οι διαχωρισμοί σε μια χρωματογραφική στήλη, αν και είναι εξίσου αποτελεσματικοί, λαμβάνουν χώρα από μερικά λεπτά έως και ολόκληρες ώρες σε αντίθεση με τη φασματομετρία μαζών σε σειρά όπου οι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται σε μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών έναντι στις συζευγμένες χρωματογραφικές τεχνικές είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία και ο μικρότερος θόρυβος που σχετίζεται με τη χρήση της. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι χρωματογραφικές τεχνικές απαιτούν αραίωση του

δείγματος με μεγάλη περίσσεια κινητής φάσης, οπότε και ενισχύονται οι πιθανότητες μόλυνσης του δείγματος. Μάλιστα το κυριότερο μειονέκτημα της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών έναντι των χρωματογραφικών τεχνικών αποτελεί το υψηλό κόστος του εξοπλισμού. Επιπλέον ορισμένοι από τους ανιχνευτές χρησιμοποιούνται αρκετά πιο συχνά συγκριτικά με τους υπόλοιπους, ένας εκ των οποίων είναι ο ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι είναι όλο και πιο συχνή η εφαρμογή της τετραπολικής φασματομετρίας μάζας QMS και των τετραπολικών φασματόμετρων παγίδας ιόντων, εξαιτίας της ανάγκης για επίτευξη καλύτερης ευαισθησίας είτε για τον εντοπισμό άλλων ουσιών. Για την ύπαρξη λοιπόν βέβαιων και αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι αναγκαία η ύπαρξη ποικιλίας δειγμάτων, καθώς επίσης αναγκαία θεωρείται και η ύπαρξη της φασματομετρίας μάζας, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που έχουμε επιλέξει να χρησιμοποιήσουμε. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι η κύρια αναλυτική μέθοδος που εφαρμόζεται στα εργαστήρια ντόπινγκ είναι η φασματομετρία μάζας MS, η οποία ανάλογα με τη περίπτωση είναι συνδεδεμένη με διαφορετικά αναλυτικά όργανα.



Σχήμα 24 Συνοπτική σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων ανίχνευσης για τον έλεγχο ντόπινγκ

Στο πλαίσιο της υποστήριξης των προσπαθειών που γίνονται διεθνώς για την καταπολέμηση του ντόπινγκ η έρευνα που πραγματοποιήθηκε ως προς του βιομετασχηματισμούς ήταν η αφορμή για την ανακάλυψη μιας σειράς νέων μεταβολιτών. Στην ανακάλυψη αυτή σημαντική ήταν και η συμβολή της φασματομετρίας μάζας, της πιο συχνά χρησιμοποιούμενης τεχνικής εντοπισμού και ταυτοποίησης των μεταβολιτών αυτών σε αναλύσεις ρουτίνας. Νέες μελέτες που στηρίζονται σε διάφορους δείκτες, βιολογικούς και μη, έχουν αναπτυχθεί και σταδιακά υλοποιούνται. Στον έλεγχο του ντόπινγκ χρησιμοποιούνται επίσης ανοσοδοκιμασίες ή τεχνικές ηλεκτροφόρησης. Οι οποίες απαιτούν συχνή επικαιροποίηση, δηλαδή παρακολουθούνται πρόσθετες ουσίες με υποσχόμενες επιδόσεις και συστατικά ενώσεων που έχουν ήδη ανακαλυφθεί με εκτεταμένα πλαίσια ανίχνευσης. Αυτό συμβαίνει διότι πρόκειται για μεθόδους άμεσου ελέγχου και επαλήθευσης αλλά και την ανάγκη ανάπτυξης εξελιγμένων στρατηγικών ντόπινγκ. Μια σημαντική πρόκληση για τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ, θα παραμείνει ο ολοένα και αυξανόμενος αριθμός τόσο ναρκωτικών ουσιών όσο και φαρμάκων, τα οποία διαθέτουν μια τεράστια ποικιλία φυσικοχημικών ιδιοτήτων με πιθανότητα κατάχρησης στο χώρο του αθλητισμού. Επίσης αναγκαία είναι η ύπαρξη ενός ευρέος φάσματος διαδικασιών προετοιμασίας δείγματος, οι οποίες θα χαρακτηρίζονται από ταχύτητα και αυτοματοποιημένες κινήσεις, καθώς είναι απαραίτητη αρκετή ποσότητα δείγματος ούρων ή άλλων βιολογικών δειγμάτων κάθε φορά. Παραδείγματα αυτών των τεχνικών αποτελούν η εκχύλιση στερεάς φάσης, η εκχύλιση υγρής φάσης, καθώς και η αραίωση (Σχήμα 23). Μάλιστα η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος, διότι είναι γρήγορη, απλή, παρέχει δυνατότητα πλήρους προσρόφησης της αναλυόμενης ουσίας και προτιμάται για την εκχύλιση περισσότερων του ενός συστατικών από μείγμα συστατικών. Ένα ακόμα σημαντικό εργαλείο στον αγώνα κατά του ντόπινγκ αποτελούν οι κηλίδες αποξηραμένου αίματος DBS, καθώς αποτελούν σημαντικό υποκατάστατο της κλασσικής μεθόδου συλλογής φλεβικού αίματος. Τέλος ιδανική λύση στα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ είναι ο συνδυασμός αναλυτικών μεθόδων, ωστόσο αυτό αποτελεί μια αρκετά δαπανηρή λύση και προϋποθέτει την ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού. (24), (33)

Βιβλιογραφία

1. Willick SE, Miller GD, Eichner D. The Anti-Doping Movement. PM R. 2016 Mar;8(3 Suppl):S125-32. doi: 10.1016/j.pmrj.2015.12.001. PMID: 26972261.
2. Catlin DH, Fitch KD, Ljungqvist A. Medicine and science in the fight against doping in sport. J Intern Med. 2008 Aug;264(2):99-114. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01993.x. PMID: 18702750.
3. Morente-Sánchez J, Zabala M. Doping in sport: a review of elite athletes' attitudes, beliefs, and knowledge. Sports Med. 2013 Jun;43(6):395-411. doi: 10.1007/s40279-013-0037-x. PMID: 23532595.
4. Barnes KP, Rainbow CR. Update on banned substances 2013. Sports Health. 2013 Sep;5(5):442-7. doi: 10.1177/1941738113478546. PMID: 24427415; PMCID: PMC3752189.
5. Birzniece V. Doping in sport: effects, harm and misconceptions. Intern Med J. 2015 Mar;45(3):239-48. doi: 10.1111/imj.12629. PMID: 25369881.
6. Bond P, Smit DL, de Ronde W. Anabolic-androgenic steroids: How do they work and what are the risks? Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Dec 19;13:1059473. doi: 10.3389/fendo.2022.1059473. PMID: 36644692; PMCID: PMC9837614.
7. Young J. Doping with testosterone and androgenic/anabolic steroids: Impact on health, screening tools and medical care. Ann Endocrinol (Paris). 2023 May;84(3):401-405. doi: 10.1016/j.ando.2023.03.025. Epub 2023 Mar 28. PMID: 36990315.
8. Zhang Y, Wu X, Wang W, Huo J, Luo J, Xu Y, Lu J. Simultaneous detection of 93 anabolic androgenic steroids in dietary supplements using gas chromatography tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2022 Mar 20;211:114619. doi: 10.1016/j.jpba.2022.114619. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35123332.
9. Thevis M, Sigmund G, Geyer H, Schänzer W. Stimulants and doping in sport. Endocrinol Metab Clin North Am. 2010 Mar;39(1):89-105, ix. doi: 10.1016/j.ecl.2009.10.011. PMID: 20122452.
10. Pesta DH, Angadi SS, Burtcher M, Roberts CK. The effects of caffeine, nicotine, ethanol, and tetrahydrocannabinol on exercise performance. Nutr Metab (Lond). 2013 Dec 13;10(1):71. doi: 10.1186/1743-7075-10-71. PMID: 24330705; PMCID: PMC3878772.

11. Chayasirisobhon S. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. Perm J. 2020 Dec;25:1-3. doi: 10.7812/TPP/19.200. PMID: 33635755; PMCID: PMC8803256.
12. Rojas-Valverde D. Potential Role of Cannabidiol on Sports Recovery: A Narrative Review. Front Physiol. 2021 Aug 3;12:722550. doi: 10.3389/fphys.2021.722550. PMID: 34413793; PMCID: PMC8369499.
13. Bailes J, Soloviev M. Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and Its Monitoring in Medical Diagnostic and in Sports. Biomolecules. 2021 Feb 4;11(2):217. doi: 10.3390/biom11020217. PMID: 33557137; PMCID: PMC7913862.
14. Kraemer WJ, Ratamess NA, Hymer WC, Nindl BC, Fragala MS. Growth Hormone(s), Testosterone, Insulin-Like Growth Factors, and Cortisol: Roles and Integration for Cellular Development and Growth With Exercise. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Feb 25;11:33. doi: 10.3389/fendo.2020.00033. PMID: 32158429; PMCID: PMC7052063.
15. Lobie PE, Zhu T, Graichen R, Goh EL. Growth hormone, insulin-like growth factor I and the CNS: localization, function and mechanism of action. Growth Horm IGF Res. 2000 Apr;10 Suppl B:S51-6. doi: 10.1016/s1096-6374(00)80010-6. PMID: 10984254.
16. Oliver E, Mayor F Jr, D'Ocon P. Beta-blockers: Historical Perspective and Mechanisms of Action. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2019 Oct;72(10):853-862. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rec.2019.04.006. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31178382.
17. Roush GC, Kaur R, Ernst ME. Diuretics: a review and update. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2014 Jan;19(1):5-13. doi: 10.1177/1074248413497257. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24243991.
18. Möykkynen T, Korpi ER. Acute effects of ethanol on glutamate receptors. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2012 Jul;111(1):4-13. doi: 10.1111/j.1742-7843.2012.00879.x. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22429661.
19. Shirreffs SM, Maughan RJ. The effect of alcohol on athletic performance. Curr Sports Med Rep. 2006 Jun;5(4):192-6. doi: 10.1097/01.csmr.0000306506.55858.e5. PMID: 16822341.
20. Stenman UH, Hotakainen K, Alfthan H. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use. Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):569-83. doi: 10.1038/bjp.2008.102. Epub 2008 Apr 14. PMID: 18414398; PMCID: PMC2439513.

21. Davis E, Loiacono R, Summers RJ. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the beta-adrenergic system. Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):584-97. doi: 10.1038/bjp.2008.164. PMID: 18500380; PMCID: PMC2439523.
22. Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):529-41. doi: 10.1038/bjp.2008.89. Epub 2008 Mar 24. PMID: 18362898; PMCID: PMC2439521.
23. Wells DJ. Gene doping: the hype and the reality. Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):623-31. doi: 10.1038/bjp.2008.144. Epub 2008 Apr 21. PMID: 18500383; PMCID: PMC2439520.
24. Abhishek Wahi, Riya Nagpal, Surajpal Verma, Akshay Narula, Rajiv Kumar Tonk, Suresh Kumar, A comprehensive review on current analytical approaches used for the control of drug abuse in sports, Microchemical Journal, Volume 191, 2023, 108834, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108834>.
25. Huml L, Tauchen J, Rimpelová S, Holubová B, Lapčík O, Jurášek M. Advances in the Determination of Anabolic-Androgenic Steroids: From Standard Practices to Tailor-Designed Multidisciplinary Approaches. Sensors (Basel). 2021 Dec 21;22(1):4. doi: 10.3390/s22010004. PMID: 35009549; PMCID: PMC8747103.
26. Young J. Doping with testosterone and androgenic/anabolic steroids: Impact on health, screening tools and medical care. Ann Endocrinol (Paris). 2023 May;84(3):401-405. doi: 10.1016/j.ando.2023.03.025. Epub 2023 Mar 28. PMID: 36990315.
27. Wong ASY, Leung GNW, Leung DKK, Wan TSM. Doping control analysis of anabolic steroids in equine urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Drug Test Anal. 2017 Sep;9(9):1320-1327. doi: 10.1002/dta.2090. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27607540.
28. Ahrens BD, Kucherova Y, Butch AW. Detection of Stimulants and Narcotics by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Sports Doping Control. Methods Mol Biol. 2016;1383:247-63. doi: 10.1007/978-1-4939-3252-8_26. PMID: 26660193.
29. Pomara C, Cassano T, D'Errico S, Bello S, Romano AD, Riezzo I, Serviddio G. Data available on the extent of cocaine use and dependence: biochemistry, pharmacologic effects and global burden of disease of cocaine abusers. Curr Med Chem. 2012;19(33):5647-57. doi: 10.2174/092986712803988811. PMID: 22856655.

30. Holt RI, Sönksen PH. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. Br J Pharmacol. 2008 Jun;154(3):542-56. doi: 10.1038/bjp.2008.99. Epub 2008 Mar 31. PMID: 18376417; PMCID: PMC2439509.
31. Shrivastav PS, Buha SM, Sanyal M. Detection and quantitation of β -blockers in plasma and urine. Bioanalysis. 2010 Feb;2(2):263-76. doi: 10.4155/bio.09.184. PMID: 21083309.
32. Pottgiesser T, Schumacher YO. Current strategies of blood doping detection. Anal Bioanal Chem. 2013 Dec;405(30):9625-39. doi: 10.1007/s00216-013-7270-x. Epub 2013 Aug 10. PMID: 23934350.
33. Thevis M. Anti-doping analysis. Anal Bioanal Chem. 2011 Aug;401(2):387-8. doi: 10.1007/s00216-011-5115-z. PMID: 21626186.
34. Oscar J. Pozo, Peter Van Eenoo, Koen Deventer, Frans T. Delbeke, Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 27, Issue 8, 2008, Pages 657-671, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.06.003>.
35. A.Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η έκδοση.
36. <https://www.mblbio.com/bio/g/support/method/elisa.html>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.