



«ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ»

«ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»

Διπλωματική Εργασία

«Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης
των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης στον έλεγχο
ντόπινγκ»

Γούλα Όλγα, Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής: Χριστόπουλος Θεόδωρος

Πάτρα, Ιούνιος 2026

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.

«Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης
των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης στον έλεγχο
ντόπινγκ»

Γούλα Όλγα, Χημικός

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Θεόδωρος Χριστόπουλος

Ευάγγελος Μπακέας

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Πατρών

Πάτρα, Ιούνιος 2026

«Στη Μητέρα μου»

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κύριο Θεόδωρο Χριστόπουλο για την επιλογή του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας και την κατανόησή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε 'Δημόκριτος' και θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιστημονικό Υπεύθυνο του εργαστηρίου Δρ. Δημήτρη Κλέτσα για τη διάθεση των απαραίτητων μέσων που χρειάστηκαν για την ολοκλήρωσή της.

Ένα μεγάλο 'Ευχαριστώ' από καρδιάς στον Δρ. Ιωάννη Αγγελή, για τη στήριξη, τη γενναιοδωρία του, την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες γνώσεις που έχω αποκτήσει δίπλα του τα χρόνια που εργαζόμαστε μαζί.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως το Δρ. Παναγιώτη Σακελλαρίου για τα χρόνια που εργαστήκαμε μαζί, αλλά κυρίως για τη βαθιά και καθοριστική Φιλία με την οποία με τιμά τα τελευταία χρόνια.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για την στήριξή τους σε κάθε μικρό ή μεγάλο βήμα της ζωής μου και κυρίως τη Μητέρα μου που πολύ θα ήθελα να είναι εδώ και σε αυτή τη στιγμή μου...

Περίληψη

Οι θεικοί μεταβολίτες της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης έχουν καθιερωθεί ως μακροπρόθεσμοι βιοδείκτες της χρήσης μεθυλοτεστοστερόνης για σκοπούς ντόπινγκ και μπορούν να ανιχνευθούν σε άθικτη μορφή με LC-MS/(MS). Ωστόσο, η ταυτοποίησή τους σύμφωνα με τις προδιαγραφές του τεχνικού εγγράφου του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ, WADA TD2023IDCR, παραμένει μια αναλυτική πρόκληση, λόγω του ανεπαρκούς φάσματος ιόντων υπό συνθήκες διάσπασης που προκαλείται από σύγκρουση (CID) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Στην παρούσα μελέτη, έξι από τους οκτώ πιθανούς θεικούς μεταβολίτες της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης συντέθηκαν σε μικροκλίμακα προκειμένου να διευκολυνθεί τόσο η δομική τους αποσαφήνιση, όσο και η ανάπτυξη μεθόδων άμεσης ταυτοποίησης. Η ταυτοποίησή τους βασίστηκε στην ανάλυσή τους με GC-MS/(MS) μετά από παραγωγοποίηση με TMS ή στην ανάλυση με LC-HRMS/(MS) μετά από παραγωγοποίηση της ελεύθερης 17β-υδροξυλομάδας με καρβονυλοδιιμιδαζόλη (CDI), οδηγώντας σε παράγωγα 17β-OH-ιμιδαζολικών καρβαμιδικών ενώσεων. Τα παράγωγα που προέκυψαν, μπορούσαν να ανιχνευθούν ως είδη M-H σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού και ως είδη $[M-H_2SO_3-CDI+H]$ σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Το φάσμα ιόντων που προέκυψε σε αρνητική λειτουργία έδειξε δύο χαρακτηριστικά ιόντα: ένα εξαιρετικά πλούσιο σε πληροφορίες που προέκυψε από την απομάκρυνση της ομάδας παραγωγοποίησης, μετά τον σχηματισμό της αφυδατωμένης δομής στεροειδούς, διατηρώντας τη θεική σύζευξη και ένα δεύτερο ιόν που προέρχεται από το θεικό τμήμα του μορίου. Στη λειτουργία θετικού ιονισμού, τα φάσματα ήταν εξίσου χρήσιμα και χαρακτηριστικά των στεροειδών. Δείγματα ούρων από δυο μεταβολικές μελέτες απέκκρισης της 17α-μεθυλοτεστοστερόνης αναλύθηκαν με τις παραπάνω μεθόδους. Τα παράθυρα ανίχνευσης και ταυτοποίησης των αέραιων θεικών μεταβολιτών εκτιμήθηκαν βάσει του τεχνικού εγγράφου TD2023IDCR και συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση με GC-MS/(MS) του γλυκουρονιδικού κλάσματος, έπειτα από ενζυμική υδρόλυση. Συνολικά, η συνεισφορά των θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης επεκτείνει σημαντικά το παράθυρο του χρόνου ανίχνευσης για την κατάχρηση της μεθυλοτεστοστερόνης. Παρόλα αυτά, το καθορισμένο παράθυρο χρόνου ταυτοποίησης ήταν παρόμοιο ή μικρότερο από εκείνο που προέκυψε από την ανάλυση του γλυκουρονιδικού κλάσματος.

Λέξεις – Κλειδιά

17α-μεθυλοτεστοστερόνη, αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή, έλεγχος ντόπινγκ, θεικοί μεταβολίτες, ανίχνευση, ταυτοποίηση

«Evaluation of Different Detection and Identification Methods of Intact Tetrahydro-Methyltestosterone Sulfate Metabolites in Doping Control»

Olga Goula, Chemist

Abstract

Tetrahydro sulfate metabolites are established long-term biomarkers of methyltestosterone use and can be detected intact by LC-MS/MS. However, their identification under the provisions of the WADA TD2023IDCR remains an analytical challenge, due to their poor product ion spectra under collision-induced dissociation conditions in negative ion mode. In this study, six out of eight potential tetrahydro-methyltestosterone sulfate metabolites were microscale-synthesized and used for method development for their identification, based on GC-MS/(MS) after TMS derivatization or LC-HRMS/MS after derivatization of the free 17 β -hydroxy group with carbonyldiimidazole (CDI), producing 17 β -OH-imidazole carbamate derivatives. Imidazole carbamate derivatives were detected as M-H species in negative ion mode and as [M-H₂SO₃-CDI+H] species in positive ion mode. Negative mode product ion spectra showed two product ions; one highly informative resulting from the elimination of the derivatization group, following the formation of the dehydrated steroid moiety, which preserves the sulfate conjugation, and a second ion derived from the sulfate moiety. In positive mode, spectra were highly informative and characteristic of steroids. Urine samples from two 17 α -methyltestosterone excretion studies were analyzed using these methods, and detection/identification windows of intact sulfate metabolites were estimated under TD2023IDCR and compared with those obtained from GC-MS/(MS) analysis of the glucuronide fraction after hydrolysis. Overall, the inclusion of the tetrahydro-methyltestosterone sulfate metabolites significantly extends the detection time window for methyltestosterone abuse. Still, the established identification time window was similar to, or shorter than, that derived from the glucuronide fraction analysis.

Keywords

17 α -methyltestosterone, anabolic androgenic steroids, doping control, sulfate metabolites, identification

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Abstract	4
Κατάλογος Σχημάτων / Εικόνων	9
Κατάλογος Πινάκων	13
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή στον έλεγχο ντόπινγκ	16
1.1 Ορισμός Ντόπινγκ	16
1.2 Ετυμολογική προέλευση του όρου	18
1.3 Ιστορική αναδρομή	18
1.3.1 «Ντόπινγκ» και Αρχαίοι Λαοί	18
1.3.2. Από την Αρχαιότητα στο σύγχρονο Ντόπινγκ με τη «βοήθεια» της Επιστήμης	20
1.3.3. 20ος Αιώνας: Το «Ντόπινγκ» στους σύγχρονους Ολυμπιακούς Αγώνες και κρατικά σκάνδαλα	22
1.3.4. 21ος Αιώνας: Νέα σκάνδαλα και «Αστέρες» του αθλητισμού στη δίνη του ντόπινγκ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η Εξέλιξη του Αντιντόπινγκ και των αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης ουσιών	29
2.1 Από τις πρώτες αναλυτικές τεχνικές έως τον κομβικό ρόλο της χρωματογραφίας στην εξέλιξη του αντιντόπινγκ	29
2.2 Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές: Η Μετάβαση στα τριπλά τετράπολα	31
2.2.1 Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας - Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας: Thermo Scientific TSQ 9610	32
2.2.2 Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας: Thermo Scientific Orbitrap	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Οι κατευθυντήριες γραμμές του WADA, το πλαίσιο λειτουργίας των εργαστηρίων, διαδικασίες ελέγχου και κατηγοριοποίηση των απαγορευμένων ουσιών αλλά και των μεθόδων ανάλυσης	36

3.1 Ο θεσμικός ρόλος του WADA, το Πρότυπο ISL και η διαδικασία Διαπίστευσης των Εργαστηρίων Ντόπινγκ	36
3.2 Κανονιστικό Πλαίσιο: Η Διεθνής Λίστα Απαγορευμένων Ουσιών και η Σημασία των Τεχνικών Εγγράφων (Technical Documents)	38
3.2.1. Αναλυτική ταξινόμηση απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων	40
3.2.2. Βιολογικό Διαβατήριο του Αθλητή (ABP)	44
3.3. Διαδικασία ελέγχου: Από τη δειγματοληψία έως τα τελικά αποτελέσματα	45
3.3.1 Η Διαδικασία της Δειγματοληψίας και ο Ρόλος του ΕΟΚΑΝ	45
3.3.2. Δομή, Λειτουργία και Εργαστηριακή Ανάλυση των Δειγμάτων.....	47
3.4. Αναβολικά στεροειδή και μεταβολισμός	48
3.4.1 Αναβολικά στεροειδή: Δομή και Δράστικότητα	48
3.4.2. Ανδρογόνα Αναβολικά στεροειδή	49
3.4.3. Μεταβολισμός στεροειδων και αναλυτική πρόκληση στον έλεγχο ντόπινγκ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης στον έλεγχο ντόπινγκ.....	54
4.1. Εισαγωγή.....	54
4.2. Πειραματικό Μέρος	56
4.2.1. Χημικά και αντιδραστήρια	56
4.2.2.Σύνθεση αναλυτικών προτύπων.....	57
4.3.Μελέτη χορήγησης σε ανθρώπους	58
4.4. Προετοιμασία δειγμάτων	59
4.4.1.Παρασκευαστική πορεία δειγμάτων για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης (ελεύθερων και γλυκουρονιδικών).....	59
4.4.2. Προετοιμασία δειγμάτων για την εκχύλιση των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης	59
4.4.2.1. Ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες	59
4.4.2.2. TMS παράγωγα των ακέραιων θεικων μεταβολιτών	60
4.4.2.3. CDI παράγωγα των ακέραιων θεικών μεταβολιτών	60
4.5. Οργανολογία	60

4.5.1. LC-HRMS/(MS).....	60
4.5.2. GC-MS/(MS)	62
4.6. Αποτελέσματα και συζήτηση	62
4.6.1.Σύνθεση μικροκλίμακας των θειικών μεταβολιτών της MT	62
4.6.2.Ανάλυση LC-HRMS/(MS) των ακέραιων θειικών μεταβολιτών της MT	68
4.6.3. Ανάλυση LC-HRMS/(MS) των CDI παραγώγων των ακέραιων θειικών μεταβολιτών της MT	74
4.6.4.Ανάλυση GC-MS/(MS) των TMS παραγώγων των ακέραιων θειικών μεταβολιτών της MT	80
4.7.Συμπεράσματα.....	86

Κατάλογος Σχημάτων / Εικόνων

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Κύριες μεταβολικές οδοί της 17α-μεθυλοτεστοστερόνης.....	54
Σχήμα 2. Γενική πορεία σύνθεσης των θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο- μεθυλοτεστοστερόνης.....	63
Σχήμα 3. Επικαλυπτόμενα ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης σε m/z 385.2049 > 96.9588 των συντεθειμένων: 3β-θεική-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3β,17β-διόλη (M1_S_I, κορυφή 1), 3α-θεική-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3α,17β-διόλη (M2_S_I, κορυφή 2), 3α-θεική-17α-μεθυλο-5β-ανδροστανική-3α,17β-διόλη (M3_S_I, κορυφή 3), 3β-θεική-17β-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3β,17α-διόλη (M4_S_I, κορυφή 4), 3α-θεική- 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3α,17α-διόλη (M5_S_I, κορυφή 5) και 3α-θεική-17β- μεθυλο-5β-ανδροστανική-3α,17α-διόλη (M6_S_I, κορυφή 6).....	64
Σχήμα 4. Φάσμα ιόντων της συνθετικής 3α-θεικής-17α-μεθυλο-5β-ανδροστανικής- 3α,17β-διόλης (M3_S_I).....	65
Σχήμα 5. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης σε m/z 367.1943 > 96.9588 των συνθετικών Α) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_I) και Β) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7_S_I). C) Φάσμα ιόντων του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_I).....	66
Σχήμα 6. Ιοντικά χρωματογραφήματα για το m/z 255 των συνθετικών προτύπων Α) 3α- θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7_S_TMS) και Β) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_TMS). Φάσματα ιόντων πλήρους σάρωσης με αφαίρεση υποβάθρου των συνθετικών C) M7_S_TMS (χρόνος κατακράτησης 5.75 min) και D) M8_S_TMS (χρόνος κατακράτησης 5.25 min).....	67
Σχήμα 7. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3α- θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M3-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση και C) συνθετικό πρότυπο.....	70
Σχήμα 8. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3α- θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M3-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση και C) συνθετικό πρότυπο.....	71

- Σχήμα 9.** Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3β-θεικής-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανικής-3β,17β-διόλης (M1-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση και Γ) συνθετικό πρότυπο.....72
- Σχήμα 10.** Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3α-θεικής-17β-μεθυλο-5α-ανδροστανικής-3α,17α-διόλης (M5-S-I) και 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανικής-3α,17α-διόλης (M6-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση, Γ) συνθετικό πρότυπο του M5-S-I και Δ) συνθετικό πρότυπο του M6-S-I.....73
- Σχήμα 11.** Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 367.1943 > 96.9588 του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7-S-I) και 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση, Γ) συνθετικό πρότυπο του M7-S-I και Δ) συνθετικό πρότυπο του M8-S-I.....74
- Σχήμα 12.** Α) Ιοντικά χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης ενός μείγματος προτύπων καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M2_S_CDI) και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) με m/z 271.2426 σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Β) Μερικό χρωματογράφημα πλήρους σάρωσης των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Γ) Φάσμα ιόντων της M3_S_CDI σε λειτουργία θετικού ιονισμού.....77
- Σχήμα 13.** Α) Ιοντικά χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης ενός μείγματος προτύπων καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M2_S_CDI) και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) με m/z 479.2216 σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού Β) Φάσμα πλήρους σάρωσης των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Γ) Φάσμα ιόντων των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού.....78
- Σχήμα 14.** Ιοντικά χρωματογραφήματα των καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανό-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) για τις ιοντικές μεταπτώσεις m/z 271.2426 > 161.1328 και m/z 271.2426 > 175.1464 Α) τυφλού δείγματος, Β) δείγματος 24 ωρών μετά τη χορήγηση, Γ) τελευταίου επιβεβαιωμένου δείγματος 9 ημέρες μετά τη χορήγηση και Δ) εμβολιασμένου δείγματος με 3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανό-3α,17β-διόλη (M3_S_CDI) σε λειτουργία θετικού ιονισμού.....79

Σχήμα 15. Ιοντικά χρωματογραφήματα των καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) για τις ιοντικές μεταπτώσεις m/z 479.2216 > 367.1943 και m/z 479.2216 > 96.9588 A) τυφλού δείγματος, B) δείγματος 24 ωρών μετά τη χορήγηση, C) τελευταίου επιβεβαιωμένου δείγματος 9 ημέρες μετά τη χορήγηση και D) εμβολιασμένου δείγματος με 3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη (M3_S_CDI) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού.....80

Σχήμα 16. A) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης-TMS (M2_S_TMS) B) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M2_S_TMS. C) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης-TMS (M5_S_TMS) D) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M5_S_TMS.....81

Σχήμα 17. A) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης-TMS (M3_S_TMS) B) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M3_S_TMS. C) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλης-TMS (M6_S_TMS) D) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M6_S_TMS.....81

Σχήμα 18. Αντιπροσωπευτικά ιοντικά χρωματογραφήματα από ανάλυση με GC-MS/(MS), δειγμάτων μετά από χορήγηση για A) 3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη-TMS (M3_S_TMS) σε A1) τυφλό δείγμα, A2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, A3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και A4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 11 ημέρες μετά τη χορήγηση B) 3α-θεική 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλη-TMS (M5_S_TMS) σε B1) τυφλό δείγμα, B2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, B3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και B4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 11 ημέρες μετά τη χορήγηση C) 3α-θεικό 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ένιο-TMS (M7_S_TMS) σε C1) τυφλό δείγμα, C2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, C3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και C4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 11 ημέρες μετά τη χορήγηση και D) θεική 16z-υδροξυ-τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνη-TMS (M9_S_TMS) σε D1) τυφλό δείγμα, D2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, D3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και D4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 10 ημέρες μετά τη χορήγηση.....84

Σχήμα 19. Παράθυρα χρόνου Ανίχνευσης (ανοιχτές γραμμές) και Ταυτοποίησης (σκούρες γραμμές) για τους κύριους μεταβολίτες της MT της σειράς I (A) και της σειράς II (B) των δειγμάτων μετά από χορήγηση που αναλύθηκαν με LC-HRMS/(MS) ως άθικτοι θεικοί μεταβολίτες (μπλε χρώμα), με GC-MS/(MS) ως αποθειωμένα μόρια των άθικτων θεικών μεταβολιτών μετά από παραγωγοποίηση TMS (κόκκινο χρώμα), με LC-HRMS/(MS) μετά από CDI παραγωγοποίηση των άθικτων θεικών μεταβολιτών (γκρι χρώμα) και με GC-MS/(MS) ως μεταβολίτες των ελεύθερων και γλυκουρονιδικών κλασμάτων έπειτα από υδρόλυση (πράσινο χρώμα).....86

Εικόνα 1: Δομή Αναβολικού Στεροειδούς.....49

Εικόνα 2: Πιθανές αντιδράσεις μεταβολισμού της τεστοστερόνης.....53

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Εξεταζόμενοι ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες της MT με LC-HRMS/(MS).....	68
Πίνακας 2. Εξεταζόμενοι ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες της MT ως CDI παράγωγα με LC-HRMS/(MS) σε λειτουργία (a) θετικού και (b) αρνητικού ιονισμού.....	76
Πίνακας 3. Εξεταζόμενοι ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες της MT, ως αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα μετά από παραγωγοποίηση TMS με GC-MS/(MS).....	83

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

WADA	World Anti-Doping Agency (Παγκόσμιος Οργανισμός Αντιντόπινγκ)
TD2023IDCR	Technical Document 2023 Identification Criteria
CID	Collision-Induced Dissociation (Διάσπαση Προκαλούμενη από Σύγκρουση)
CDI	Carbonyldiimidazole (καρβονυλοδιμιδαζόλιο)
TMS	Τριμεθυλοσιλυλοομάδα
EPO	Ερυθροποιητίνη
ΔΟΕ	Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή
USADA	Υπηρεσία Αντιντόπινγκ των ΗΠΑ
THG	Τετραϋδρογεστρινόνη
ABP	Athlete Biological Passport-Βιολογικό Διαβατήριο Αθλητή
RUSADA	Εθνικός Οργανισμός Αντιντόπινγκ της Ρωσίας
RIA	RadioImmunoAssay (Ραδιοανοσολογική Ανάλυση)
ISL	International Standard for Laboratories (Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια)
GC-MS/(MS)	Αέρια Χρωματογραφία-Συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας
LC-MS/MS	Υγρή χρωματογραφία-συζευγμένη με Φασματομετρία μάζας
LC-HRMS/MS	Υγρή χρωματογραφία-υψηλής ανάλυσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας
AAS	Anabolic Androgenic Steroids (Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή)
EAAS	Endogenous Anabolic Androgenic Steroids (Ενδογενή Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή)
AEI	Advanced Electron Ionization
HESI	Heated Electrospray Ionization
MeOH	Μεθανόλη
DMAP	Dimethylaminopyridine
SPE	Solid Phase Extraction
MRM	Multiple Reaction Monitoring (Παρακολούθηση Πολλαπλών Αντιδράσεων)

SRM	Selected reaction Monitoring (Παρακολούθηση Επιλεγμένων Αντιδράσεων)
ITP	Initial Testing Procedure (Αρχική Διαδικασία Ελέγχου)
EQAS	External Quality Assessment Scheme
TDs	Technical Documents (Τεχνικά Έγγραφα)
MRPL	Minimum Required Performance Levels
LOD	Limit of Detection (Όριο ανίχνευσης)
SARMs	Selective Androgen Receptor Modulators
SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulators
EOKAN	Εθνικός Οργανισμός Καταπολέμησης του Ντόπινγκ
NADOs	National Anti-Doping Organizations (Εθνικοί Οργανισμοί Αντιντόπινγκ)
ADAMS	Anti-Doping Administration & Management System

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή στον έλεγχο ντόπινγκ

1.1 Ορισμός Ντόπινγκ

Η έννοια του ντόπινγκ στα Ελληνικά αποδίδεται με τον όρο ‘φαρμακοδιέγερση’, όμως έχει καθιερωθεί ο αγγλικός όρος ώστε να συμπεριλαμβάνονται όλες οι μορφές πέραν της κατάχρησης φαρμάκων (**Backhouse et al., 2007; WADA, 2021**). Από αρχαιωτάτων χρόνων οι άνθρωποι έψαχναν τρόπους να βελτιστοποιήσουν τη σωματική τους απόδοση ώστε να επικρατήσουν έναντι των αντιπάλων τους σε πολέμους ή σε αγώνες (**Lippi et al., 2008**). Ιστορικά, έχουν δοθεί αρκετοί ορισμοί για το ντόπινγκ (**Backhouse et al., 2007**).

Το 1963, το Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Εξωσχολική Εκπαίδευση, υιοθέτησε τον πρώτο ορισμό στον αθλητισμό, ο οποίος μεταξύ άλλων αναφέρει ότι ως ντόπινγκ ορίζεται η χρήση από ένα υγιές άτομο οποιασδήποτε ουσίας ή παράγοντα που φυσιολογικά δεν εντοπίζεται στον οργανισμό, ή η χρήση οποιασδήποτε φυσιολογικής ουσίας ή φυσιολογικού παράγοντα σε αντικανονικές ποσότητες ή/και μέσω αντικανονικής οδού ή/και με αντικανονικό τρόπο, με αποτέλεσμα την τεχνητή και με αθέμιτο τρόπο ενίσχυση της απόδοσης του ατόμου κατά τη διάρκεια ενός αγώνα (**Council of Europe, 1963; WADA, 2021**).

Από το 1999 και την ίδρυση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA), ο ορισμός απέκτησε νομική και κανονιστική υπόσταση. Σύμφωνα με τον καθιερωμένο πλέον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ του WADA, ο οποίος ανανεώνεται ετησίως, ως ντόπινγκ ορίζεται η παραβίαση ενός ή περισσότερων κανονισμών αντι-ντόπινγκ και ως παραβίαση των κανονισμών ορίζονται τα παρακάτω (**WADA, 2021; EOKAN, 2024**):

- Η παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών ή δεικτών της σε δείγμα αθλητή, εκτός αν έχει οριστεί συγκεκριμένο ποσοτικό όριο για την ουσία αυτή, με τον αθλητή να είναι αποκλειστικά υπεύθυνος για την ύπαρξη οποιασδήποτε ουσίας στο δείγμα του. Ειδικά κριτήρια έχουν οριστεί για ουσίες που παράγονται ενδογενώς
- Η χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή που στοιχειοθετείται με τρόπους όπως η παραδοχή εκ μέρους του αθλητή, καταθέσεις μαρτύρων, έγγραφες αποδείξεις, δεδομένα από μακροχρόνια μελέτη

συμπεριφοράς (π.χ Βιολογικό Διαβατήριο του Αθλητή) κ.ά. Η αποτυχία χρήσης ουσίας ή μεθόδου δεν αποτελεί ουσιώδες στοιχείο

- Η αποφυγή, άρνηση ή μη υποβολή σε δειγματοληψία μετά από ειδοποίηση χωρίς επαρκή αιτιολόγηση, σύμφωνα με τους κανόνες
- Η παραβίαση των κανονισμών που ισχύουν βάσει του Διεθνούς Προτύπου Ελέγχων και Ερευνών, ως προς τη διαθεσιμότητα των αθλητών για έλεγχο εκτός αγώνων, όπως αποτυχία υποβολής ορθών πληροφοριών διαμονής ή μη εμφάνιση για έλεγχο. Αν εντός 18 μηνών, υπάρξουν τρεις αποτυχίες ελέγχου, τότε αυτό θεωρείται παραβίαση από τον αθλητή
- Η υπονόμευση με οποιονδήποτε τρόπο, καθώς και οποιαδήποτε αλλοίωση ή προσπάθεια αλλοίωσης στοιχείων της διαδικασίας ελέγχου. Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν η παραποίηση στοιχείων κάποιου εντύπου του ελέγχου, καταστροφή του δοχείου του Β δείγματος, αλλοίωση του δείγματος κ.ά
- Η εύρεση του αθλητή ή κάποιου μέλους της ομάδας υποστήριξής του, να κατέχουν εντός ή εκτός αγώνα, οποιαδήποτε απαγορευμένη ουσία εντός ή εκτός αγώνα, αντίστοιχα, υπό την αίρεση ότι αποδεικνύεται δικαίωμα κατοχής για θεραπευτικούς σκοπούς
- Η διακίνηση απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου
- Η χορήγηση ή προσπάθεια χορήγησης προς αθλητή εντός ή εκτός αγώνα, ουσίας ή μεθόδου που απαγορεύεται εντός ή εκτός αγώνα, αντίστοιχα
- Κάθε μορφή εκούσιας συνέργειας (προτροπή, συγκαλύψη, βοήθεια κ.ά) που συνιστά παραβίαση κάποιου κανονισμού
- Η συνεργασία αθλητή ή άλλου προσώπου το οποίο υπόκειται στη δικαιοδοσία ενός οργανισμού αντιντόπινγκ, σε επαγγελματικό ή αθλητικό επίπεδο, με οποιοδήποτε μέλος ομάδας υποστήριξης του αθλητή, το οποίο τελεί υπό αποκλεισμό ή έχει καταδικαστεί ποινικά ή του έχει επιβληθεί οποιαδήποτε ποινή σχετική με παραβίαση κανονισμού αντιντόπινγκ

1.2 Ετυμολογική προέλευση του όρου

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή, η χρήση ουσιών για τη βελτίωση της απόδοσης και της αντοχής, εντοπίζεται από την αρχαιότητα, όμως ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η γλωσσολογική προέλευση της λέξης, με διάφορες ερμηνείες να έχουν δοθεί (**Lippi et al., 2008**). Η επικρατέστερη θεωρία αποδίδει την προέλευση του όρου ‘doping’ στην αφρικανική λέξη ‘dop’, η οποία στη διάλεκτο της φυλής των Ζουλού της Νοτιοανατολικής Αφρικής, προσδιόριζε ένα τοπικό, διεγερτικό αλκοολούχο υγρό, το οποίο παρασκευαζόταν από φλούδες σταφυλιών και αφέψημα cola (**Yesalis & Bahrke, 2002; Lippi et al., 2008**). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, οι πολεμιστές της φυλής κατανάλωναν το συγκεκριμένο υγρό στη διάρκεια τελετουργικών χορών, με σκοπό να υπερνικήσουν το αίσθημα της κόπωσης, αλλά και την ενίσχυση της δύναμής τους πριν τις μάχες (**Lippi et al., 2008; EOKAN, 2024**). Η επόμενη ερμηνεία χρονολογείται τον 17ο αιώνα, σύμφωνα με την οποία, οι Ολλανδοί έποικοι (Boers) στη Νότια Αφρική, μετέτρεψαν τη λέξη στο ολλανδικό ρήμα ‘doopen’, που σήμαινε ‘βουτάω’ ή ‘αναμειγνύω’ και χρησιμοποιήθηκε γενικότερα για την περιγραφή οποιουδήποτε παχύρρευστου υγρού, χυμού ή μίγματος ουσιών κυρίως οπιούχων (**Yesalis & Bahrke, 2002; EOKAN, 2024**).

Το 1889, ο όρος καταγράφηκε επίσημα για πρώτη φορά στην Αγγλική γλώσσα, δεν αφορούσε όμως στον ανθρώπινο αθλητισμό, αλλά στον ιππόδρομο (**Lippi et al., 2008**). Η λέξη λοιπόν που συμπεριλήφθηκε σε αγγλικό λεξικό, σήμαινε την παράνομη χορήγηση σε άλογα, μίγματος ναρκωτικών και διεγερτικών, όπως όπιο, στρυχνίνη ή μορφίνη, στοχεύοντας είτε στην αύξηση της ταχύτητάς τους υπερτερώντας έναντι των υπολοίπων, είτε στη σκόπιμη μείωση της απόδοσής τους λόγω στοιχηματικής απάτης (**Yesalis & Bahrke, 2002; Backhouse et al., 2007**).

1.3 Ιστορική αναδρομή

1.3.1 «Ντόπινγκ» και Αρχαίοι Λαοί

Όπως ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως, το ντόπινγκ ως πρακτική απαντάται από την αρχαιότητα, καθώς τότε η ίδια η νίκη αλλά και η δόξα αποτελούσαν ισχυρότατα κίνητρα, που οδηγούσαν τους αθλητές στην αναζήτηση εξωγενών παραγόντων, οι οποίοι θα ενίσχυαν την απόδοσή τους με τεχνητό τρόπο (**Møller, 2010**).

Παρόλο που οι Αρχαίοι Ολυμπιακοί Αγώνες θεσμοθετήθηκαν τον 8ο αιώνα π.Χ., μαρτυρίες για συστηματική χρήση ενισχυτικών παραγόντων χρονολογούνται από τον 3ο αιώνα π.Χ. (Møller, 2010; Dimeo, 2007). Τότε, οι αρχαίοι Έλληνες ακολουθούσαν ειδική διατροφή και ειδικότερα οι δρομείς κατανάλωναν ροφήματα από είδη μανιταριών που περιείχαν παραισθησιογόνες ή διεγερτικές ουσίες, ενώ οι παλαιστές και οι ρίπτες κατανάλωναν κρέας τάυρου ή ελαφιού, θεωρώντας ότι θα έχουν ταχύτητα και απόδοση όμοιά τους (Dimeo, 2007; Yesalis & Bahrke, 2002).

Παράλληλα, ο Φλάβιος Φιλόστρατος και ο Γαληνός, γράφοντας κατά τον 2ο και 3ο αιώνα μ.Χ., διασώζουν πολύτιμες πληροφορίες για τη χρήση διεγερτικών ουσιών στην ύστερη αρχαιότητα, όπως το εκχύλισμα από τον φλοιό της στρατιωτικής στρυχνίνης και διάφορα είδη οπίου (Yesalis & Bahrke, 2002; Møller, 2010). Ο Γαληνός με την ιδιότητά του ως Ιατρού, κατέκρινε τέτοιου είδους πρακτικές και επεσήμαινε τις επιπτώσεις στην υγεία των αθλητών (Yesalis & Bahrke, 2002).

Παρ' όλα αυτά στην αρχαιότητα δεν υπήρχε απαγόρευση ηθική ή νομική και μάλιστα η χρήση τέτοιων ουσιών ως προετοιμασία του σώματος, θεωρείτο ειδική τεχνογνωσία των ιατρών και των προπονητών. Εκτός από τους αρχαίους Έλληνες, οι Ρωμαίοι μονομάχοι (gladiators), φέρεται να κατέφευγαν σε κατανάλωση αφεψημάτων βοτάνων και διεγερτικών αλκοολούχων μιγμάτων, με σκοπό να έχουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στον πόνο, αλλά και να ξεπερνούν το φόβο του θανάτου, καθώς και να είναι πιο επιθετικοί στη μάχη. Οι αρματοδρομίες στο Circus Maximus, φαίνεται να αποτελούν την αρχή του ντόπινγκ αλόγων, καθώς αναφέρεται πως κατά τη διάρκειά τους, χορηγούνταν στα άλογα μίγματα υδρόμελου και άλλων ουσιών.

Χρήση φυσικών διεγερτικών καταγράφεται και σε άλλους λαούς, όπως στους Bersekers, πολεμιστές των Βίκινγκς, οι οποίοι κατανάλωναν Amanita muscaria, ένα είδος μανιταριού με παραισθησιογόνες και διεγερτικές ουσίες, βοηθώντας τους έτσι να φτάσουν σε έκσταση και να αντέχουν περισσότερο στις μάχες. Για παρόμοιους λόγους, οι θεραπευτές της αρχαίας Κίνας χρησιμοποιούσαν το φυτό Ma Huang, που περιείχε εφεδρίνη (Yesalis & Bahrke, 2002; Dimeo, 2007; Møller, 2010).

1.3.2. Από την Αρχαιότητα στο σύγχρονο Ντόπινγκ με τη «βοήθεια» της Επιστήμης

Κατά τη διάρκεια του 19ου αιώνα, τα πρώτα επαγγελματικά αθλήματα έκαναν την εμφάνισή τους και παράλληλα με την εκβιομηχάνιση της κοινωνίας, ο αθλητισμός από ψυχαγωγική δραστηριότητα, άρχισε να αποκτά χαρακτηριστικά εμπορευματοποίησης και ανθρώπινης επίδειξης. Δε θα μπορούσε λοιπόν το ντόπινγκ να μείνει έξω από αυτή την εξέλιξη, καθώς ο στόχος του κέρδους οδήγησε στην ανάγκη των αθλητών να επιδεικνύουν αντοχή και δύναμη πέραν των ανθρώπινων δυνατοτήτων, οπότε η χρήση τεχνικών ενίσχυσης έγινε επιτακτική (**Hoberman, 2001**). Σε πρώτη φάση οι τεχνικές αυτές περιελάμβαναν χημικά μείγματα «κοκτέιλ» που ονομάζονταν με το γενικό όρο «τονωτικά» και τα οποία δημιουργούνταν από τους προπονητές των αθλητών και σκοπό είχαν την αυξημένη αντοχή στην κούραση, την άμεση αντιμετώπιση των έντονων πόνων, αλλά και το ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων αθλητών. Ελλείψει νομικών αλλά και ηθικών περιορισμών, καθώς δεν υπήρχε ακόμα κανονιστικό πλαίσιο για την αντιμετώπιση τέτοιων φαινομένων, αλλά και μην έχοντας το ντόπινγκ αρνητικό πρόσημο έως τότε, η χρήση αυτών των βοηθημάτων ήταν ανεξέλεγκτη και χωρίς να λαμβάνονται υπόψη πιθανές σοβαρές, ακόμα και θανατηφόρες για τους αθλητές παρενέργειες (**WADA, 2021; EOKAN, 2024**).

Το διάστημα μεταξύ 1860 και 1890, άκμαζαν τα αγωνίσματα υπεραντοχής στη Βρετανία και την Αμερική, όπως μεγάλης διάρκειας βάδισμα, εξαήμεροι ποδηλατικοί μαραθώνιοι κ.ά, οπότε και προέκυψαν τα πρώτα κρούσματα μαζικής χρήσης ουσιών. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1870, όπου οι αγώνες βαδίσματος ήταν ευρέως διαδεδομένοι, η χρήση διεγερτικών ήταν συχνό φαινόμενο. Ιδιαίτερα το 1878, στους αγώνες για το κύπελλο Άστλεϊ, οι βαδιστές κατανάλωναν φύλλα κόκας ή καθαρή κοκαΐνη, ώστε να αντέχουν την αϋπνία αλλά και την πείνα. Κατέφευγαν επίσης στην κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αλκοόλ, κυρίως μπράντι και σαμπάνιας για την αντιμετώπιση των πόνων στα πόδια στη διάρκεια των αγώνων. Το άθλημα της ποδηλασίας ήταν αυτό που κυρίως σήμανε την αρχή και ανάπτυξη του οργανωμένου ντόπινγκ. Το 1878, στο Μπέρμιγχαμ της Αγγλίας πραγματοποιήθηκαν για πρώτη φορά οι εξαήμεροι αγώνες και μεταφέρθηκαν στη Νέα Υόρκη το 1891, γνωρίζοντας μεγάλη εμπορική επιτυχία (**Hoberman, 2001; Lippi et al., 2008**). Οι αγώνες αυτοί απαιτούσαν τεράστια αποθέματα αντοχής, καθώς οι αναβάτες

αγωνίζονταν ολόκληρα 24ωρα, οπότε οι προπονητές και οι φροντιστές τους χορηγούσαν μείγματα καφεΐνης, στρυχνίνης και μορφίνης.

Ο Γάλλος Χημικός Angelo Mariani, δημιούργησε το 1863 ένα τονωτικό κρασί με εκχύλισμα φύλλων κόκας, το οποίο έγινε αμέσως διάσημο και χρησιμοποιήθηκε ευρέως από ποδηλάτες και αθλητές του στίβου στη Γαλλία και την Αγγλία, σε διεθνείς αγώνες της δεκαετίας του 1880. Οι αθλητές δήλωναν πως το κρασί αυτό τους δημιουργούσε άμεση πνευματική διαύγεια, ευφορία αλλά και αξιοσημείωτη ενέργεια και αντοχή, καταπολεμώντας έτσι τη σωματική κόπωση. Το τονωτικό αυτό κρασί έγινε ιδιαίτερος δημοφιλής και αναγνωρισμένο και μάλιστα αποτέλεσε τη βάση για την αρχική έκδοση της Coca-Cola το 1885.

Ο πρώτος γνωστός θάνατος από χρήση ουσιών στην ιστορία του αθλητισμού, ήταν αυτός του Ουαλού ποδηλάτη Arthur Linton. Ο θάνατος αυτός συνδέεται με τη δράση ενός Άγγλου προπονητή ποδηλασίας, του James ‘Choppy’ Warburton, που έμεινε στην ιστορία για τις ακραίες μεθόδους του στα τέλη του 19ου αιώνα και έγινε η πιο σκοτεινή μορφή στο χώρο του ντόπινγκ την εποχή εκείνη. Την πενταετία 1892 έως 1897, ο συγκεκριμένος προπονητής ήταν πάντα εφοδιασμένος με ένα μικρό μαύρο μπουκάλι, το οποίο περιείχε μια άγνωστη και άκρως επικίνδυνη συνταγή διεγερτικών, η οποία δε δημοσιεύθηκε ποτέ. Παρ’ όλα αυτά είναι μάλλον σίγουρο ότι ήταν ένα μείγμα στρυχνίνης, κοκαΐνης, αρσενικού και αιθανόλης. Ο Warburton εφοδίαζε τους ποδηλάτες με το εν λόγω μείγμα, καθιστώντας τους έτσι υπεραθλητές που κατέρριπταν τα ρεκόρ συνεχόμενα. Συμπτώματα από την κατανάλωση του σκευάσματος αυτού παρουσίαζαν συχνά και κατά τη διάρκεια των αγώνων. Παιραισθήσεις, αποπροσανατολισμός, μυϊκοί σπασμοί, ήταν μερικά μόνο από τα συμπτώματα αυτά, απόρροια της τοξικότητας της στρυχνίνης και της κοκαΐνης. Ένας από τους αθλητές που βρέθηκαν στο δρόμο της δράσης του Warburton, ήταν ο Arthur Linton, μεγάλο αστέρι της ομάδας, ο οποίος πήρε μέρος στον εξαντλητικό αγώνα 600 χιλιομέτρων Μπορντώ-Παρίσι στις 19 Μαΐου 1896, καταναλώνοντας έτσι μεγάλες ποσότητες του σκευάσματος (Hoberman, 2001; Lippi et al., 2008). Ο προπονητής του μάλιστα δεν πτοήθηκε ούτε από την αιμορραγία αλλά και τη σύγχυση που παρουσίασε στη διάρκεια του αγώνα, πιέζοντάς τον να συνεχίσει. Ο Linton τερμάτισε, αλλά είχε ήδη υποστεί μη αναστρέψιμες βλάβες, χάνοντας τη ζωή του λίγες μέρες αργότερα, στις 23 Ιουνίου 1896. Φυσικά ως επίσημη αιτία θανάτου του Linton, καταγράφηκε ο τυφοειδής πυρετός και όχι η

υπερβολική δόση του σκευάσματος, παρόλο που η αθλητική κοινωνία κατηγόρησε ευθέως τον Warburton για δηλητηρίαση του αθλητή. Μάλιστα την ίδια περίοδο έχασαν τη ζωή τους κάτω από αδιευκρίνιστες συνθήκες, ο αδελφός του Arthur Linton, Tom, αλλά και ο συναθλητής του Jimmy Michael, αποδεικνύοντας την επικινδυνότητα αυτών των πρακτικών.

Εκτός από τον αθλητισμό, οι πρακτικές αυτές άρχισαν να βρίσκουν εφαρμογή και στην κοινωνική ζωή, καθώς η ανάγκη του ανθρώπου για βελτίωση της εικόνας του, άρχισε να γίνεται ζητούμενο. Έτσι λοιπόν στο ‘παιχνίδι’ αυτό μπήκε και η ιατρική κοινότητα, φτάνοντας στην 1η Ιουνίου 1889, όπου ο καταξιωμένος φυσιολόγος Charles-Édouard Brown-Séquard προκάλεσε αίσθηση στην επιστημονική κοινότητα του Παρισιού, ανακοινώνοντας ότι πραγματοποίησε στον εαυτό του ενέσεις με ένα «ελιξίριο νεότητας», αποτελούμενο από εκχυλίσματα όρχεων ινδικών χοιριδίων και σκύλων. Μετά τον ισχυρισμό του πως το σκεύασμα αυτό αύξησε δραματικά τη δύναμη αλλά και την αντοχή του, οι επιστήμονες Oskar Zoth και Fritz Pregl, ξεκίνησαν πειραματικά το 1894, τη χορήγηση παρόμοιων εκχυλισμάτων σε αρσιβαρίστες, μετρώντας την απόδοσή τους μετά τη χορήγηση με ειδικά μηχανήματα.

Αυτή ήταν και η πρώτη απόπειρα του λεγόμενου ορμονικού ντόπινγκ αν και σε πολύ πρώιμο στάδιο και άνοιξαν και το δρόμο επίσης, για τη μαζική χρήση αναβολικών στεροειδών του επόμενου αιώνα. Έτσι λοιπόν οι πρώτες αυτές μορφές οργανωμένου ντόπινγκ, μέχρι τα τέλη του 19ου αιώνα έγιναν αναπόσπαστο κομμάτι του αθλητισμού, που δε σταμάτησε φυσικά και τον επόμενο αιώνα, αλλά εξελίχθηκε και μεταφέρθηκε και στους πρώτους σύγχρονους Ολυμπιακούς Αγώνες. (Hoberman, 2001; Lippi et al., 2008)

1.3.3. 20ος Αιώνας: Το «Ντόπινγκ» στους σύγχρονους Ολυμπιακούς Αγώνες και κρατικά σκάνδαλα

Οι σύγχρονοι Ολυμπιακοί Αγώνες δε θα μπορούσαν να μείνουν αλώβητοι από τη μάλιστα του οργανωμένου ντόπινγκ, με το πρώτο καταγεγραμμένο περιστατικό να συμβαίνει στο Σεντ Λούις στις 30 Αυγούστου 1904. Εκεί, ο Αμερικανός δρομέας Thomas Hicks, κατέρρευσε κατά τη διάρκεια του Μαραθώνιου λόγω εξάντλησης από τις πολύ υψηλές θερμοκρασίες, με τους προπονητές του να του χορηγούν ένα σκεύασμα αποτελούμενο από θεική στρυχνίνη, ασπράδια αυγών και μπράντι. Αμέσως μετά τον αγώνα και την κατάκτηση

του χρυσού μεταλλίου, μεταφέρθηκε στο νοσοκομείο, όπου οι γιατροί διέγνωσαν δηλητηρίαση η οποία οριακά δεν του στοίχισε την ίδια του τη ζωή. Το περιστατικό αυτό απέδειξε πως οι αθλητές και οι προπονητές τοποθετούσαν την αξία της νίκης πάνω από την αξία της ζωής.

Στη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, έκαναν την εμφάνισή τους οι περίφημες αμφεταμίνες, που θα αποδεικνύονταν καταστροφικές. Η χρήση τους επεκτάθηκε φυσικά και στο χώρο του αθλητισμού, εφόσον αποδεδειγμένα προσέφερε στους στρατιώτες ενέργεια και αντοχή στην αϋπνία και το φόβο. Οι ποδηλάτες και οι δρομείς έκαναν κυρίως χρήση αυτών, καταγράφοντας μερικά από τα πιο σοκαριστικά περιστατικά στον αθλητισμό παγκοσμίως. Στα 100 χιλιόμετρα ποδηλασίας στους Ολυμπιακούς της Ρώμης στις 26 Αυγούστου 1960, ο ποδηλάτης από τη Δανία Knud Enemark Jensen, έχασε τη ζωή του λόγω θερμοπληξίας, με τη νεκροψία βέβαια να αποδεικνύει κατανάλωση συνδυασμού αμφεταμινών με διεγερτική ουσία.

Ο θάνατος του Tom Simpson, Βρετανού παγκόσμιου πρωταθλητή ποδηλασίας, στις 13 Ιουλίου 1967, συνέβη σε παγκόσμια τηλεοπτική μετάδοση στη διάρκεια του Γύρου της Γαλλίας και όπως προέκυψε από τις εξετάσεις, προήλθε από το θανατηφόρο συνδυασμό αμφεταμινών, αφυδάτωσης και έντονης σωματικής κόπωσης.

Τα δύο αυτά τραγικά περιστατικά ανάγκασαν τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή (ΔΟΕ), να μην κάτσει άλλο με σταυρωμένα τα χέρια και να λάβει τα πρώτα πρώιμα μέτρα αντιμετώπισης τέτοιων φαινομένων. Οι πρώτοι έλεγχοι αντιντόπινγκ λοιπόν, εισήχθησαν το 1968 στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικό.

Παρά την εισαγωγή των πρώτων αυτών ελέγχων, η Ανατολική Γερμανία πρωταγωνίστησε τη δεκαετία του 1970 στο πιο σκοτεινό και κρατικά οργανωμένο σκάνδαλο ντόπινγκ, με την ονομασία «State Plan 14.25». Το πρόγραμμα αυτό, το οποίο είχε και τη σφραγίδα της κρατικής μυστικής υπηρεσίας (Stasi), ανάγκαζε τους αθλητές και τις αθλήτριες να κάνουν χρήση ενός πολύ ισχυρού αναβολικού ανδρογόνου στεροειδούς σε μορφή χαπιού, της 4-χλωροδεϋδρομεθυλοτεστοστερόνης (Oral-Turinabol), ισχυριζόμενοι βέβαια πως επρόκειτο για βιταμίνες. Η χρήση αυτής της ουσίας απέφερε πολλά μετάλλια για τη χώρα, αλλά και πολλά προβλήματα υγείας για τους αθλητές, από στειρότητα μέχρι καρκίνο. Η πτώση του Τείχους το 1989, έριξε φως στην υπόθεση αυτή, η οποία μετέπειτα, κατέληξε σε ιστορικές καταδίκες γιατρών και προπονητών. (WADA, 2021; Hoberman, 2001; Lippi et al., 2008)

Παρ' όλα αυτά, το πιο περιβόητο και διάσημο σκάνδαλο Ολυμπιακών Αγώνων, συνέβη στους Αγώνες της Σεούλ, το 1988. Το αναβολικό στεροειδές στανοζολόλη ανιχνεύθηκε στο δείγμα του Καναδού αθλητή Ben Johnson στις 27 Σεπτεμβρίου, τρεις μέρες μετά την κατάκτηση του χρυσού μεταλλίου στα 100 μέτρα και την κατάρριψη του παγκόσμιου ρεκόρ με χρόνο 9,79 δευτερόλεπτα. Μετά την ανακοίνωση της ΔΟΕ για το θετικό δείγμα ούρων του αθλητή, το ρεκόρ ακυρώθηκε και του αφαιρέθηκε το μετάλλιο, αποδεικνύοντας τη χρησιμότητα των ελέγχων. **(WADA, 2021; IOC, 2023)**

Ωστόσο, το ξακουστό σκάνδαλο Festina το 1998, κατά τη διάρκεια του Γύρου της Γαλλίας, έγινε η απόλυτη αφορμή για να αλλάξει εντελώς η έννοια του αντιντόπινγκ. Η κορυφαία ομάδα ποδηλασίας Festina πρωταγωνίστησε με αρνητικό τρόπο, καθώς στις 8 Ιουλίου 1998, λίγες μέρες πριν τον αγώνα, συνελήφθη από τη γαλλική Αστυνομία ο μασέρ της ομάδας, για κατοχή στο αυτοκίνητό του μεγάλης ποσότητας απαγορευμένων ουσιών. Στη λίστα των ευρημάτων περιλαμβάνονταν αναβολικά στεροειδή, αμφεταμίνες, καλυπτικοί παράγοντες, αλλά και τεράστιες ποσότητες ερυθροποιητίνης (EPO) και αυξητικής ορμόνης. **(BBC, 2018; UNESCO, 2020)**

Μετά τη σύλληψη, ακολούθησε ντόμινο εξελίξεων με εφόδους στα καταλύματα των ομάδων, συλλήψεις αθλητών, αποχωρήσεις ομάδων και φυσικά τον αποκλεισμό της ομάδας Festina, με το διευθυντή της να ομολογεί πως δεν επρόκειτο για μεμονωμένα περιστατικά, αλλά για οργανωμένο, χρηματοδοτούμενο και καθοδηγούμενο από γιατρούς πρόγραμμα ντόπινγκ σε όλη την ομάδα. **(Kayser & Smith, 2008)** Καθόλου τυχαία δεν ήταν και η επιλογή της ερυθροποιητίνης στο συγκεκριμένο πρόγραμμα, λόγω έλλειψης αξιόπιστης μεθόδου ανίχνευσης από τα εργαστήρια έως τότε. Πρόκειται για μια ορμόνη που ενισχύει την αύξηση της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων αλλά και την οξυγόνωση των μυών. **(Kayser & Smith, 2008; Ljungqvist, 2014)**

Το συγκεκριμένο σκάνδαλο ανέδειξε τη θλιβερή πραγματικότητα πως το ντόπινγκ δεν αποτελεί ατομική υπόθεση, αλλά ένα παγκόσμιο οργανωμένο φαινόμενο στο οποίο εμπλέκονται από προπονητές και γιατρούς, μέχρι βιομηχανίες φαρμάκων και ομοσπονδίες. Αναδείχθηκε λοιπόν και η υποχρέωση των θεσμών να λάβουν ακόμα περισσότερα και αυστηρά μέτρα διεθνώς, σε ένα πολύ καλά οργανωμένο πλαίσιο, ώστε να αντιμετωπιστεί αποφασιστικά το φαινόμενο που είχε πάρει πλέον ανεξέλεγκτες διαστάσεις.

Αυτή η πλήρης θεσμική ανικανότητα γέννησε την άμεση και επιτακτική ανάγκη για τη δημιουργία ενός ανεξάρτητου, παγκόσμιου και κεντρικού φορέα που θα αναλάμβανε αποκλειστικά την καταπολέμηση του φαινομένου, μακριά από πολιτικά και οικονομικά συμφέροντα. Έτσι λοιπόν, λίγους μήνες αργότερα και συγκεκριμένα στις 4 Φεβρουαρίου 1999, διοργανώθηκε από τη ΔΟΕ η πρώτη Παγκόσμια Διάσκεψη για το Ντόπινγκ στον αθλητισμό. Η Διάσκεψη αυτή πραγματοποιήθηκε στη Λωζάνη, οδηγώντας στην υπογραφή της ομώνυμης διακήρυξης της Λωζάνης. Ημερομηνία ορόσημο αποτελεί και η 10η Νοεμβρίου 1999, ημέρα ίδρυσης του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Agency, WADA), γεγονός που συνέβαλε ουσιαστικά στη δημιουργία ενιαίου πλαισίου κανόνων ελέγχου για όλες τις χώρες και όλα τα αθλήματα, μέσω του Παγκόσμιου Κώδικα Αντιντόπινγκ. **(WADA, 2021)** Παράλληλα δόθηκε και γενναία χρηματοδότηση σε εργαστήρια ανάλυσης ώστε να επικεντρωθούν στην ανίχνευση τέτοιων ουσιών, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη μάχη ενάντια στο ντόπινγκ. **(UNESCO, 2020; IOC, 2023; Ljungqvist, 2014)**

1.3.4. 21ος Αιώνας: Νέα σκάνδαλα και «Αστέρες» του αθλητισμού στη δίνη του ντόπινγκ

Η ίδρυση του WADA που οδήγησε στην οργάνωση και αυστηροποίηση των κανονισμών, αλλά και η εξέλιξη των μεθόδων ανίχνευσης παράνομων ουσιών, είχε ως επακόλουθο και την ανάγκη εξέλιξης του ίδιου του ντόπινγκ, ώστε να καταστεί ακόμα πιο δύσκολη η διαδικασία των ελέγχων. Αναδύθηκε έτσι στις αρχές του 21ου αιώνα το λεγόμενο «designer» ντόπινγκ, δηλαδή τροποποιημένα δομικά μόρια ουσιών **(WADA, 2021)**. Αυτό προφανώς απαιτούσε και παράνομη λειτουργία ειδικών εργαστηρίων στα οποία θα γινόταν η σύνθεσή τους, άρα και ένα πολύ καλά οργανωμένο κύκλωμα.

Το πρώτο μεγάλο σκάνδαλο του 21ου αιώνα είχε την ονομασία BALCO (Bay Area Laboratory Co-operative), από μια εταιρεία συμπληρωμάτων διατροφής στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α, η οποία ιδρύθηκε από τον Victor Conte. Η εταιρεία αυτή λειτουργούσε ήδη από το 1990, παρασκευάζοντας και διανέμοντας σε κορυφαίους αθλητές, αναβολικά στεροειδή δύσκολα ανιχνεύσιμα. **(New York Times, 2004)** Η παράνομη δράση της εταιρείας αποκαλύφθηκε το 2003, όταν ένας ανώνυμος προπονητής παρέδωσε στην Υπηρεσία Αντιντόπινγκ των Η.Π.Α (USADA), μια σύριγγα με υπολείμματα μιας άγνωστης έως τότε

ουσίας. (USADA, 2004) Η σύριγγα στάλθηκε για ανάλυση στο εργαστήριο του Λος Άντζελες, όπου ο διακεκριμένος Χημικός Don Catlin, απομόνωσε την περιεχόμενη ουσία, ταυτοποίησε τη χημική της δομή και ανέπτυξε την πρώτη μέθοδο ανίχνευσής της. (Catlin et al., 2004) Επρόκειτο για την ουσία τετραϋδρογεστρινόνη (tetrahydrogestrinone, THG), ένα αναβολικό στεροειδές με ισχυρή δράση, το οποίο αυξάνει ταχέως τη μυϊκή μάζα, ενισχύει τη δύναμη και επιταχύνει την αποκατάσταση, γνωστό στην αθλητική κοινότητα με την ονομασία «το καθαρό» (the clear), λόγω της έως τότε αδυναμίας ανίχνευσής της από τα εργαστήρια. Είχε σχεδιαστεί και συντεθεί σε εργαστήριο από το Χημικό Patrick Arnold, ακριβώς για να παρακάμπτει τα τεστ ούρων. (New York Times, 2004; USADA, 2004)

Όπως είναι προφανές, κορυφαίοι αθλητές που ακολούθησαν το δρόμο του ντόπινγκ, ειδικά μετά το σκάνδαλο αυτό αλλά και την εξέλιξη του αντιντόπινγκ, είχαν αρνητικές επιπτώσεις στην καριέρα τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ήταν η εμβληματική αθλήτρια στίβου, Marion Jones, με αμέτρητες επιτυχίες στο ενεργητικό της, η οποία έπειτα από την κατάκτηση πέντε μεταλλίων στους Ολυμπιακούς του Σίδνεϊ το 2000, ομολόγησε 7 χρόνια μετά πως είχε κάνει χρήση της THG. Η ομολογία αυτή την οδήγησε μέχρι και στη φυλακή με την κατηγορία της ψευδορκίας, ενώ της αφαιρέθηκαν όλα της τα μετάλλια και ακυρώθηκαν και τα ρεκόρ της. (BBC, 2007; USADA, 2007) Αυτό το σκάνδαλο απέδειξε περίτρανα ότι πλέον το ντόπινγκ ήταν μια υπόθεση ανάμεσα στα παράνομα και τα επίσημα εργαστήρια.

Δυστυχώς τα περιστατικά οργανωμένων κυκλωμάτων ντόπινγκ δεν περιορίστηκαν μετά την αυστηροποίηση του κανονιστικού πλαισίου, φτάνοντας το 2012 σε ακόμα ένα συγκλονιστικό γεγονός, με πρωταγωνιστή έναν από τους καλύτερους αθλητές ποδηλασίας, τον Lance Armstrong. Ο συγκεκριμένος αθλητής εκτός από τις επιδόσεις του έχοντας κατακτήσει επτά συνεχόμενους τίτλους στο Γύρο της Γαλλίας από το 1999 έως το 2005, αποτελεί και σύμβολο έχοντας καταφέρει να ξεπεράσει την περιπέτειά του με τον καρκίνο. Εκείνη τη χρονιά, τον Οκτώβριο του 2012, έπειτα από μεγάλη έρευνα της USADA και μαρτυρίες πολλών συναθλητών του, αποκαλύφθηκε πως εντός της ομάδας του, διακινούνταν συστηματικά απαγορευμένες ουσίες, με τους περισσότερους αθλητές να κάνουν χρήση κυρίως ερυθροποιητίνης, αυξητικής ορμόνης και κορτιζόνης. Εκτός από χρήση αυτών των ουσιών, τότε εμφανίστηκε στο προσκήνιο και μια νέα μέθοδος ντόπινγκ, αυτή της αυτόλογης μετάγγισης αίματος. (USADA, 2012; WADA, 2021)

Με τη μέθοδο αυτή, οι αθλητές αφαιρούσαν ποσότητα από το δικό τους αίμα κάποιους μήνες πριν τους αγώνες, το αποθήκευαν σε κατάλληλες συνθήκες και το επαναμετάγγιζαν λίγο πριν τον αγώνα, αυξάνοντας με τεχνητό τρόπο τα ερυθρά αιμοσφαίρια και ενισχύοντας την οξυγόνωση των μυών, αποφεύγοντας έτσι τους ελέγχους ούρων. Τα μετάλλια του Armstrong αφαιρέθηκαν, αποκλείστηκε ισόβια από όλες τις διοργανώσεις και τελικά ομολόγησε και ο ίδιος τις πράξεις του σε συνέντευξη που έδωσε το 2013. **(IOC, 2023; BBC, 2013)**

Το ντόμινο σκανδάλων δε σταμάτησε, φτάνοντας στο 2014 και το ίσως σοβαρότερο έως σήμερα περιστατικό κρατικού σκανδάλου, με πρωταγωνιστή το ίδιο το Ρωσικό κράτος. Η αποκάλυψη ξεκίνησε το 2014 από ένα τηλεοπτικό γερμανικό ντοκιμαντέρ, έως το 2016 όπου ήρθε η πλήρης επιβεβαίωση από την Έκθεση ΜακΛάρεν. Από την έρευνα προέκυψε πως το ρωσικό Υπουργείο Αθλητισμού με τη συνδρομή των μυστικών υπηρεσιών, είχαν στήσει ένα πρωτοφανές σύστημα συγκάλυψης των ελέγχων ντόπινγκ, το οποίο κορυφώθηκε στους Χειμερινούς Ολυμπιακούς Αγώνες του Σότσι το 2014. **(ARD, 2014; McLaren, 2016)**

Η κυριότερη μαρτυρία ήταν εκείνη του πρώην διευθυντή του εργαστηρίου αντιντόπινγκ της Μόσχας Dr. Grigory Rodchenkov, ο οποίος ομολόγησε πως είχε αναπτύξει ένα μείγμα τριών διαφορετικών αναβολικών στεροειδών διαλυμένων σε αλκοόλ για ταχύτερη απορρόφηση και μείωση του χρόνου ανίχνευσης. Το πιο συγκλονιστικό βέβαια στοιχείο της έρευνας, ήταν πως μέσω μιας κρυφής διαδρομής εντός του εργαστηρίου, κατά τη διάρκεια της νύχτας, πράκτορες των μυστικών υπηρεσιών εισέρχονταν και αντικαθιστούσαν τα θετικά δείγματα των Ρώσων αθλητών με «καθαρά» που ήταν ήδη από καιρό αποθηκευμένα, ανοίγοντας τα σφραγισμένα μπουκάλια ασφαλείας χωρίς να αφήνουν ίχνη. **(Rodchenkov, 2016; McLaren, 2016)**

Μετά από αυτή την αποκάλυψη, ακολούθησαν μαζικοί αποκλεισμοί Ρώσων αθλητών και υποχρέωση της χώρας να αγωνίζεται χωρίς τη σημαία και τον Εθνικό της Ύμνο στις επόμενες διοργανώσεις. **(IOC, 2017)**. Προφανώς δεν έμεινε εκτός τιμωρίας το ίδιο το εργαστήριο αντιντόπινγκ αλλά και ο Εθνικός Οργανισμός Αντιντόπινγκ της Ρωσίας (RUSADA). Στις 9 Νοεμβρίου 2015, η WADA έπαυσε τη λειτουργία του εργαστηρίου, με την οριστική άρση της διαπίστευσης να αποφασίζεται στις 15 Απριλίου 2016. Λίγους μήνες αργότερα, στις 18 Νοεμβρίου 2015 ανεστάλη και η λειτουργία της RUSADA.

Η αποκάλυψη όλων αυτών των θλιβερών σκανδάλων, απέδειξε πως το ντόπινγκ αποτελούσε σημαντική απειλή για τον αθλητισμό και την υγεία των αθλητών και αναδείχθηκε η ανάγκη για συνεχή ανάπτυξη και εξέλιξη του αντιντόπινγκ και των μεθόδων ανάλυσης και ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών. **(WADA, 2015; UNESCO, 2020)**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Η Εξέλιξη του Αντιντόπινγκ και των αναλυτικών μεθόδων ανίχνευσης ουσιών

2.1 Από τις πρώτες αναλυτικές τεχνικές έως τον κομβικό ρόλο της χρωματογραφίας στην εξέλιξη του αντιντόπινγκ

Οι πρώτες απόπειρες για έλεγχο απαγορευμένων ουσιών όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, δεν αφορούσαν στον ανθρώπινο αθλητισμό, αλλά στις ιπποδρομίες, καθώς τα τεράστια οικονομικά συμφέροντα μέσω του στοιχηματισμού, είχαν οδηγήσει σε ανεξέλεγκτα φαινόμενα ντόπινγκ στα άλογα (Yesalis & Bahrke, 2002).

Οι πρώτες καταγεγραμμένες προσπάθειες για την ανάπτυξη τεχνικών ελέγχου χρονολογούνται γύρω στο 1910 στη Ρωσία, από τον χημικό Bukovsky. Ο Bukovsky χρησιμοποίησε πρωτόγονες μεθόδους της υγρής χημείας, οι οποίες βασίζονταν σε αντιδράσεις καθίζησης και αλλαγής χρώματος μέσω ειδικών αντιδραστηρίων, προκειμένου να απομονώσει και να ταυτοποιήσει αλκαλοειδή (όπως η μορφίνη, η ηρωίνη και η κοκαΐνη) στο σίελο των αλόγων (Dimeo, 2007).

Η μεθοδολογία αυτή επεκτάθηκε σημαντικά κατά τη δεκαετία του 1930 στην Αυστρία από τον καθηγητή Reichel, ο οποίος κατάφερε να συστηματοποιήσει τους ελέγχους στα ούρα των αλόγων, αποδεικνύοντας ότι οι χημικές ουσίες μεταβολίζονται και εκκρίνονται από τον οργανισμό, αφήνοντας ανιχνεύσιμα ίχνη (Dimeo, 2007). Αυτές οι πρώιμες δοκιμές χρώματος, αν και είχαν χαμηλή ευαισθησία και παρουσίαζαν συχνά ψευδώς θετικά αποτελέσματα, αποτέλεσαν το πρώτο ιστορικό θεμέλιο της επιστήμης του αντιντόπινγκ, αποδεικνύοντας ότι η εργαστηριακή ανάλυση μπορεί να αποκαλύψει την απάτη (Yesalis & Bahrke, 2002).

Η μετάβαση αυτών των τεχνικών στον ανθρώπινο αθλητισμό καθυστέρησε αρκετές δεκαετίες και έγινε επιτακτική μόνο μετά τις τραγωδίες του 1960 και του 1967 με τους θανάτους από αμφεταμίνες (Kayser & Smith, 2008; Ljungqvist, 2014). Ο άνθρωπος που άλλαξε ριζικά το τοπίο και θεωρείται ο πατέρας του σύγχρονου εργαστηριακού ελέγχου αντιντόπινγκ ήταν ο καθηγητής Arnold Beckett στο Πανεπιστήμιο του Λονδίνου κατά τη δεκαετία του 1960. Ο Beckett συνειδητοποίησε ότι οι απλές χημικές αντιδράσεις του παρελθόντος ήταν ανίκανες να ανιχνεύσουν τις μικρές συγκεντρώσεις των αμφεταμινών στα ούρα των αθλητών.

Για τον σκοπό αυτό, εισήγαγε για πρώτη φορά στην υπηρεσία του αθλητισμού την τεχνική της πρώιμης Αέριας Χρωματογραφίας (Gas Chromatography – GC) (**Ljungqvist, 2014**). Η μέθοδος αυτή επέτρεπε τον διαχωρισμό των πτητικών χημικών ενώσεων ενός δείγματος καθώς αυτές περνούσαν μέσα από μια ειδική στήλη, με βάση το σημείο βρασμού και τη συγγενειά τους με τη στατική φάση (**Skoog et al., 2005**).

Το έργο του Beckett ήταν τόσο αποτελεσματικό που η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή βασίστηκε εξολοκλήρου στις δικές του αναλυτικές προδιαγραφές για να διενεργήσει τους πρώτους επίσημους ελέγχους αντιντόπινγκ στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικό το 1968, όπου η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διεγερτικών και ναρκωτικών (**International Olympic Committee, 2023; Ljungqvist, 2014**).

Ωστόσο, καθώς η δεκαετία του 1970 έφερε τη μάλιστα των αναβολικών στεροειδών, η αέρια χρωματογραφία από μόνη της δεν ήταν πλέον αρκετή. Τα στεροειδή εκκρίνονταν σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις και οι τότε ανιχνευτές δεν μπορούσαν να τα διακρίνουν από τις φυσικές ορμόνες του σώματος (**Thevis, 2010**). Η πρώτη λύση σε αυτό το πρόβλημα δόθηκε με την εισαγωγή της Ραδιοανοσολογικής Ανάλυσης (Radioimmunoassay – RIA) κατά τους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μόντρεαλ το 1976.

Η RIA, μια τεχνική που βασιζόταν στη χρήση ραδιενεργά επισημασμένων αντιγόνων και ειδικών αντισωμάτων, προσέφερε για πρώτη φορά την απαραίτητη ευαισθησία για να ανιχνεύσει την παρουσία των αναβολικών στεροειδών (**Ljungqvist, 2014**). Παρά την υψηλή της ευαισθησία όμως, η RIA είχε ένα σημαντικό μειονέκτημα: μπορούσε να δείξει στην αρχική ανάλυση ότι κάποιο στεροειδές υπήρχε στο δείγμα, αλλά δεν είχε την ικανότητα να προσδιορίσει με απόλυτη χημική ακρίβεια την ταυτότητα του μορίου (**Thevis, 2010**).

Η απόλυτη επιστημονική επανάσταση που διαμορφώθηκε τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ μέχρι και σήμερα συντελέστηκε στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Λος Άντζελες το 1984 (**Ljungqvist, 2014**). Στη διοργάνωση αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά μαζικά ο συνδυασμός της Αέριας Χρωματογραφίας με Φασματομετρία Μάζας (GC–MS) (**Thevis, 2010**). Η τεχνική αυτή ένωσε τη διαχωριστική ισχύ της χρωματογραφίας με την ικανότητα του φασματόμετρου μάζας να βομβαρδίζει τα μόρια με ηλεκτρόνια, να τα σπάει σε μικρότερα φορτισμένα θραύσματα και να μετρά τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) (**Skoog et al., 2005; Watson & Sparkman, 2007**).

Το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία ενός μοναδικού «χημικού αποτυπώματος» για κάθε ουσία (Smith, 2004). Η μέθοδος GC-MS έλυσε το πρόβλημα της ταυτοποίησης, καθώς επέτρεπε στους επιστήμονες να αποδείξουν στο δικαστήριο, πέραν πάσης αμφιβολίας, την ακριβή μοριακή δομή του αναβολικού στεροειδούς που είχε καταναλώσει ο αθλητής. Αυτή η ιστορική εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών έδειξε ότι η καταπολέμηση του ντόπινγκ εξαρτάται άμεσα από την ικανότητα της τεχνολογίας να βλέπει όλο και πιο βαθιά στη χημική δομή των δειγμάτων, θέτοντας τα θεμέλια για τα σύγχρονα πρωτόκολλα ανίχνευσης (WADA, 2021; Thevis, 2010).

2.2 Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές: Η Μετάβαση στα τριπλά τετράπολα

Στην εποχή της σύγχρονης Βιομοριακής Ανάλυσης, η απλή ταυτοποίηση μιας απαγορευμένης ουσίας, έχει αντικατασταθεί από την ανάγκη ανίχνευσης εξαιρετικά χαμηλών ιχνοποσοτήτων (σε επίπεδα ng/mL ή pg/mL) σε ιδιαίτερα πολύπλοκα βιολογικά υποστρώματα, όπως τα ούρα και το αίμα. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, τα διαπιστευμένα εργαστήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ (WADA) βασίζονται πλέον σε συζευγμένες τεχνικές διπλού σταδίου (tandem mass spectrometry) και σε συστήματα φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (Badoud et al., 2011; Thevis, 2010).

Η τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας σε συνδυασμό με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (GC-MS/(MS)), με τη χρήση αναλυτών τριπλού τετραπόλου (Triple Quadrupole - QqQ), αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ανίχνευση πτητικών και θερμικά σταθερών ενώσεων, όπως τα κλασικά αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (Thevis & Schanzer, 2007).

Η εισαγωγή του MS/MS έλυσε οριστικά το πρόβλημα του υψηλού χημικού θορύβου υποβάθρου που προκαλούν τα ενδογενή συστατικά των ούρων. Μέσω του προγραμματισμού επιλεγμένης παρακολούθησης αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring - SRM), ένα συγκεκριμένο μητρικό ιόν (precursor ion) απομονώνεται στο πρώτο τετράπολο, διασπάται μέσω διάσπασης επαγόμενης από σύγκρουση (Collision-Induced Dissociation - CID) στο δεύτερο τετράπολο (κελί σύγκρουσης) και τα προκύπτοντα χαρακτηριστικά ιόντα (product ions) φιλτράρονται στο τρίτο τετράπολο (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Αυτή η διαδικασία προσφέρει σημαντική εκλεκτικότητα, εξαλείφει τις

παρεμβολές και επιτρέπει την επίτευξη εξαιρετικά χαμηλών ορίων ανίχνευσης (LOD) (Χατζηπιερής et al., 2024).

Παράλληλα, η Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (LC-HRMS/(MS)), με τη χρήση εξελιγμένων αναλυτών τύπου Orbitrap ή Χρόνου Πτήσης (Time-of-Flight - Q-TOF), έχει αναδιαμορφώσει ριζικά την Αρχική Διαδικασία Ελέγχου (Initial Testing Procedure, ITP) ή αλλιώς screening στον χώρο του αντιντόπινγκ (Badoud et al., 2011). Το LC-HRMS/(MS) επιτρέπει την άμεση ανάλυση μη πτητικών, πολικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων χωρίς την ανάγκη πρόδρομης θερμικής διάσπασης. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η ικανότητα μέτρησης της ακριβούς μάζας (exact mass) των ιόντων με ακρίβεια μικρότερη από 5 ppm (parts per million) (Badoud et al., 2011). Αυτό επιτρέπει τον προσδιορισμό του στοιχειακού μοριακού τύπου μιας άγνωστης ουσίας ή ενός νέου μεταβολίτη με απόλυτη βεβαιότητα, καθιστώντας το LC-HRMS/(MS) το πιο ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση νέων σχεδιασμένων στεροειδών (designer steroids) και συζευγμένων μεταβολιτών Φάσης II (Χατζηπιερής et al., 2024; Badoud et al., 2011).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο αυτές τεχνικές και συγκεκριμένα ένα Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας - Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας: Thermo Scientific TSQ 9610 και ένα Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας: Thermo Scientific Orbitrap.

2.2.1 Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας - Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας: Thermo Scientific TSQ 9610

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός πτητικών και θερμικά σταθερών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, με κύριο παράδειγμα τα κλασικά αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (AAS), πραγματοποιείται μέσω του συστήματος αέριας χρωματογραφίας τριπλού τετραπόλου TSQ 9610 GC-MS/(MS) της εταιρείας Thermo Scientific (Χατζηπιερής et al., 2024). Η συγκεκριμένη πλατφόρμα έχει σχεδιαστεί για να παρέχει μέγιστο χρόνο λειτουργίας και ιδιαίτερη ευαισθησία, επιτρέποντας την ανίχνευση εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων.

Η αρχιτεκτονική του TSQ 9610 ενσωματώνει την προηγμένη πηγή ιονισμού Advanced Electron Ionization (AEI). Η πηγή AEI χρησιμοποιεί ένα εξαιρετικά εστιασμένο πεδίο

ηλεκτρονίων που μεγιστοποιεί την απόδοση του ιονισμού, δημιουργώντας μια εξαιρετικά πυκνή δέσμη ιόντων. Αυτή η τεχνολογία προσφέρει δραματική βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο (Signal to Noise, S/N), επιτρέποντας στον αναλυτή να εντοπίσει μεταβολίτες μακράς ανίχνευσης (long-term metabolites) των στεροειδών, οι οποίοι εκκρίνονται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις για εβδομάδες μετά την τελευταία χορήγηση απαγορευμένης ουσίας (Thevis, 2010).

Ο αναλυτής μάζας του συστήματος αποτελείται από ένα τριπλό τετράπολο που λειτουργεί κατά κύριο λόγο σε κατάσταση Επιλεγμένης Παρακολούθησης Αντιδράσεων (Selected Reaction Monitoring - SRM). Στο πρώτο τετράπολο (Q1), το οποίο λειτουργεί ως φίλτρο μάζας, απομονώνεται το συγκεκριμένο μητρικό ιόν (precursor ion) της απαγορευμένης ουσίας. Στο δεύτερο τετράπολο (q2), το οποίο αποτελεί το κελί σύγκρουσης, εισάγεται αέριο αργό και πραγματοποιείται η Διάσπαση επαγόμενη από Σύγκρουση (Collision-Induced Dissociation - CID). Τα προκύπτοντα χαρακτηριστικά ιόντα (product ions), φιλτράρονται στη συνέχεια στο τρίτο τετράπολο (Q3). Αυτός ο διπλός διαχωρισμός εξαλείφει πλήρως τον χημικό θόρυβο υποβάθρου από το πολύπλοκο βιολογικό υπόστρωμα των ούρων, προσφέροντας μεγάλη εκλεκτικότητα (Χατζηπιερής et al., 2024).

Ένα από τα σημαντικότερα τεχνικά χαρακτηριστικά του οργάνου είναι ο ανιχνευτής XLXR, ένα προηγμένο ηλεκτρονικό σύστημα πολλαπλασιαστή ιόντων που επεκτείνει το εύρος γραμμικότητας (linearity range) της ανάλυσης. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τη χρονικά ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση ενώσεων που παρουσιάζουν τεράστιες αποκλίσεις στις συγκεντρώσεις τους μέσα στο ίδιο δείγμα, χωρίς την ανάγκη για συνεχόμενες αραιώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ενώσεων αποτελούν τα ενδογενή αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (Endogenous Anabolic Androgenic Steroids, EAAS).

Για τη διασφάλιση της συνεχούς ροής των δειγμάτων, το σύστημα ενσωματώνει την τεχνολογία NeverVent. Μέσω ενός εξελιγμένου συστήματος βαλβίδων απομόνωσης (vacuum interlock), ο αναλυτής επιτρέπει στον χρήστη να αντικαταστήσει τη χρωματογραφική στήλη ή να αφαιρέσει και να καθαρίσει την πηγή ιονισμού χωρίς να απαιτείται η διακοπή του κενού (venting) του φασματόμετρου (Χατζηπιερής et al., 2024).

2.2.2 Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας Υψηλής

Διακριτικής Ικανότητας: Thermo Scientific Orbitrap

Για τον έλεγχο screening και την επιβεβαίωση μη πτητικών, πολικών, θερμικά ασταθών ενώσεων, καθώς και μεγάλων βιομορίων, η τεχνολογία αναφοράς είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (LC-HRMS) μέσω της πλατφόρμας Orbitrap της Thermo Scientific (**Badoud et al., 2011**). Η εισαγωγή του Orbitrap αναδιαμόρφωσε ριζικά το αντιντόπινγκ, καθώς επέτρεψε τη μετάβαση από τη στοχευμένη ανάλυση στην καθολική σάρωση δειγμάτων με απίστευτη ακρίβεια.

Η εισαγωγή των ιόντων από την υγρή φάση στο κενό του φασματόμετρου πραγματοποιείται μέσω της πηγής ιονισμού Heated Electrospray Ionization (HESI). Η πηγή αυτή, μέσω της εφαρμογής θερμαινόμενου αζώτου, επιτυγχάνει βέλτιστη αποδιαλυτοποίηση (desolvation) των σταγονιδίων, αυξάνοντας δραματικά την ευαισθησία για πολικές ενώσεις, όπως οι συζευγμένοι μεταβολίτες Φάσης II των αναβολικών στεροειδών (γλυκουρονίδια και θειικά άλατα) και τα συνθετικά κορτικοστεροειδή (**Χατζηπιερής et al., 2024**).

Η λειτουργία του αναλυτή Orbitrap βασίζεται στην παγίδευση των ιόντων σε ηλεκτροστατικό πεδίο γύρω από ένα κεντρικό, ατρακτοειδές ηλεκτρόδιο, όπου εκτελούν σύνθετες αρμονικές ταλαντώσεις. Η συχνότητα αυτών των αξονικών ταλαντώσεων εξαρτάται αποκλειστικά από τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Το σήμα που παράγεται ανιχνεύεται ως ρεύμα ειδώλου (image current) και μετατρέπεται μέσω Μαθηματικού Μετασχηματισμού Fourier (FT) σε ένα εξαιρετικά ακριβές φάσμα μαζών (**Χατζηπιερής et al., 2024**).

Η πλατφόρμα Orbitrap προσφέρει κορυφαία Διακριτική Ικανότητα (Resolution) που μπορεί να φτάσει ή να ξεπεράσει τις 240.000 (στο m/z 200) και Ακρίβεια Μάζας (Mass Accuracy) μικρότερη από 1-3 ppm. Μέσω της χρήσης εσωτερικών προτύπων αναφοράς στην πηγή (internal lock mass), το όργανο αποτρέπει τις μετατοπίσεις των κορυφών στα χρωματογραφήματα, επιτρέποντας τη μέτρηση της ακριβούς μάζας (exact mass) των ιόντων μέχρι το τέταρτο δεκαδικό ψηφίο. Αυτό καθιστά δυνατό τον άμεσο διαχωρισμό των απαγορευμένων ουσιών από ισοβαρείς ενδογενείς ενώσεις ή παρεμβολές του υποστρώματος των ούρων (matrix effects) που έχουν την ίδια ονομαστική μάζα, εξαλείφοντας τον κίνδυνο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (**Badoud et al., 2011**).

Στο πεδίο του αντιντόπινγκ, το Orbitrap χρησιμοποιείται κυρίως σε κατάσταση πλήρους σάρωσης (Full Scan) υψηλής διακριτικής ικανότητας, συχνά σε συνδυασμό με τεχνικές λήψης δεδομένων MS/MS, όπως η Data-Dependent Acquisition (DDA). Το κορυφαίο πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι η δυνατότητα Ψηφιακής Αρχειοθέτησης Δειγμάτων (Digital Sample Archiving). Επειδή το όργανο καταγράφει αδιάκριτα όλα τα ιόντα που υπάρχουν στο δείγμα χωρίς προκαθορισμένες επιλογές, τα ψηφιακά αρχεία των δεδομένων αποθηκεύονται σε βάσεις δεδομένων.

Εάν στο μέλλον εμφανιστεί μια νέα, άγνωστη έως τότε σχεδιασμένη ουσία (designer drug) ή ένας νέος μεταβολίτης, οι επιστήμονες μπορούν να ανατρέξουν στα αποθηκευμένα ψηφιακά δεδομένα και να εκτελέσουν αναδρομική ανάλυση (retrospective data analysis) **(Χατζηπιερής et al., 2024)**. Με αυτόν τον τρόπο, αποδεικνύεται η χρήση μιας ουσίας μήνες ή και χρόνια μετά τη δειγματοληψία, χωρίς να απαιτείται η φυσική ύπαρξη του βιολογικού δείγματος ή η εκ νέου χημική του προετοιμασία στο εργαστήριο, αποτελώντας ένα από τα πιο ισχυρά αποτρεπτικά εργαλεία στη σύγχρονη μάχη κατά του ντόπινγκ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Οι κατευθυντήριες γραμμές του WADA, το πλαίσιο λειτουργίας των εργαστηρίων, διαδικασίες ελέγχου και κατηγοριοποίηση των απαγορευμένων ουσιών αλλά και των μεθόδων ανάλυσης

3.1 Ο θεσμικός ρόλος του WADA, το Πρότυπο ISL και η διαδικασία Διαπίστευσης των Εργαστηρίων Ντόπινγκ

Όπως ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως, η εξέλιξη και εξάπλωση του φαινομένου του ντόπινγκ στον επαγγελματικό αθλητισμό, γέννησε την ανάγκη της δημιουργίας ενός θεσμικού κανονιστικού πλαισίου για την αποτελεσματική αντιμετώπισή του. Από την ανάγκη αυτή προέκυψε η ίδρυση του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντιντόπινγκ το 1999, ο οποίος ανέλαβε το ρόλο του συντονιστή και καθοδηγητή για την εναρμόνιση των κανονισμών διεθνώς, τη λειτουργία των εργαστηρίων και των πρωτοκόλλων που θα ακολουθούνται, αμβλύνοντας τις υπάρχουσες διαφορές μεταξύ των χωρών αλλά και των ομοσπονδιών (WADA, 2019).

Επιπλέον, ο WADA ανέλαβε τον έλεγχο της τήρησης των κανονισμών, τη χρηματοδότηση της έρευνας για ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης και τη διασφάλιση ότι όλοι οι αθλητές όλων των εθνικοτήτων και αθλημάτων θα ελέγχονται με τις ίδιες προδιαγραφές. Το νομικό κείμενο στο οποίο υπαγορεύονται όλοι αυτοί οι κανονισμοί και οι προδιαγραφές είναι ο Παγκόσμιος Κώδικας Αντιντόπινγκ (World Anti-Doping Code, Code) (WADA, 2021).

Όπως γίνεται αντιληπτό, εκτός από τη διασφάλιση της τήρησης των κανονισμών, εξίσου σημαντική είναι και η διασφάλιση της αξιοπιστίας των αναλύσεων και της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, ώστε αφενός να προστατευθούν οι αθλητές από ενδεχόμενο στιγματισμό και διακινδύνευση της καριέρας τους και αφετέρου να μην υπάρξει περίπτωση διαφυγής από έλεγχο οποιουδήποτε παραβάτη. Για όλους αυτούς τους λόγους, ο WADA δημιούργησε και κυκλοφόρησε το Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (International Standard for Laboratories, ISL), ένα κείμενο στο οποίο αναγράφονται ρητά και με κάθε λεπτομέρεια οι κανόνες και οι προϋποθέσεις λειτουργίας των διαπιστευμένων εργαστηρίων ανά τον κόσμο (WADA, 2021). Τα εργαστήρια είναι υποχρεωμένα να τηρούν απαρέγκλιτα τις οδηγίες του

Προτύπου, το οποίο ρυθμίζει όλο το πλαίσιο εργαστηριακής πρακτικής, από τα πρωτόκολλα ασφαλείας στη διαδικασία παραλαβής και αποσφράγισης των δειγμάτων (chain of custody), τη διαχείριση του προσωπικού, την ιχνηλασιμότητα όλων των βημάτων κάθε διαδικασίας (traceability), έως και τις διαδικασίες έκδοσης των τελικών αποτελεσμάτων.

Η διαδικασία απόκτησης διαπίστευσης από ένα εργαστήριο αντντόπινγκ είναι αυστηρή και απαιτητική. Πρώτα απ' όλα το εργαστήριο πρέπει υποχρεωτικά να έχει διαπίστευση σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο ISO/IEC 17025, δηλαδή να ικανοποιεί τις απαιτήσεις δοκιμών και διακριβώσεων για τα εργαστήρια και να διατηρεί ένα σύστημα διαχείρισης ποιότητας, ώστε να διασφαλίζεται η τεχνική επάρκεια και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (ISO/IEC, 2017). Επιπλέον, πρέπει να είναι συμμορφούμενο με το σύνολο των ειδικών και αυστηρότερων απαιτήσεων που ορίζονται από τον WADA και το ISL.

Στη διαδικασία αυτή της διαπίστευσης περιλαμβάνονται επιτόπιες επιθεωρήσεις από πιστοποιημένους φορείς, αξιολογήσεις του συστήματος διαχείρισης ποιότητας και λεπτομερής έλεγχος των υποδομών και του εξοπλισμού, ώστε να διασφαλίζεται ότι ένα εργαστήριο διαθέτει την κατάλληλη και σύγχρονη οργανολογία για να καλύπτει τις απαιτήσεις της εποχής και της εξέλιξης των μεθόδων ντόπινγκ (WADA, 2021).

Η πιο κρίσιμη και διαρκής δοκιμασία για τα διαπιστευμένα εργαστήρια είναι η υποχρεωτική συμμετοχή τους στο Πρόγραμμα Εξωτερικής Αξιολόγησης Ποιότητας (External Quality Assessment Scheme - EQAS) του WADA. Στο πλαίσιο αυτού του προγράμματος, ο WADA αποστέλλει καθ' όλη τη διάρκεια του έτους «τυφλά» δείγματα (blind samples) στα εργαστήρια, χωρίς αυτά να γνωρίζουν αν πρόκειται για πραγματικά δείγματα αθλητών ή για δείγματα ελέγχου ποιότητας. Τα δείγματα αυτά μπορεί να είναι καθαρά, να περιέχουν μία ή περισσότερες απαγορευμένες ουσίες σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ή να περιέχουν δύσκολους και σπάνιους μεταβολίτες. Το εργαστήριο υποχρεούται να εκτελέσει την ανάλυση και να εκδώσει το αποτέλεσμα εντός αυστηρών χρονικών ορίων (WADA, 2021).

Η αποτυχία στο πρόγραμμα EQAS επιφέρει βαρύτατες κυρώσεις. Εάν ένα εργαστήριο αποτύχει να ανιχνεύσει μια απαγορευμένη ουσία (ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα - False Negative) ή ακόμα χειρότερα, εάν αναφέρει την ύπαρξη μιας ουσίας που δεν υπήρχε στο δείγμα (ψευδώς θετικό αποτέλεσμα - False Positive), ο WADA ενεργοποιεί άμεσα τις διαδικασίες επιβολής ποινών. Αυτές οι ποινές ξεκινούν από την προσωρινή αναστολή της

διαπίστευσης για μερικούς μήνες, κατά τη διάρκεια των οποίων το εργαστήριο απαγορεύεται να διενεργεί ελέγχους και υποχρεούται να διορθώσει τα τεχνικά του σφάλματα και φτάνουν μέχρι την οριστική άρση της διαπίστευσης, γεγονός που οδηγεί στο κλείσιμο του εργαστηρίου, όπως έχει συμβεί ιστορικά σε μεγάλα εργαστήρια παγκοσμίως. Αυτό το σύστημα ελέγχου διασφαλίζει ότι τα αποτελέσματα των εργαστηρίων είναι αδιάσειστα επιστημονικά και νομικά, προστατεύοντας τα δικαιώματα των αθλητών που δεν έχουν παραβιάσει κάποιο κανονισμό (WADA, 2021).

3.2 Κανονιστικό Πλαίσιο: Η Διεθνής Λίστα Απαγορευμένων Ουσιών και η Σημασία των Τεχνικών Εγγράφων (Technical Documents)

Η καθημερινή πρακτική και η επιχειρησιακή στρατηγική των διαπιστευμένων εργαστηρίων αντιντόπινγκ, καθοδηγούνται από δύο βασικούς πυλώνες του κανονιστικού πλαισίου του WADA: τη Διεθνή Λίστα Απαγορευμένων Ουσιών και Μεθόδων (Prohibited List) και τα Τεχνικά Έγγραφα (Technical Documents). Η Λίστα Απαγορευμένων Ουσιών αποτελεί ένα δυναμικό, διεθνές πρότυπο το οποίο αναθεωρείται υποχρεωτικά τουλάχιστον μία φορά ετησίως και τίθεται σε ισχύ την 1η Ιανουαρίου κάθε έτους, ενσωματώνοντας όλες τις τελευταίες εξελίξεις της φαρμακευτικής έρευνας και της αγοράς των παράνομων σκευασμάτων.

Η δομή της Λίστας είναι αυστηρά κατηγοριοποιημένη προκειμένου να διευκολύνεται ο νομικός και εργαστηριακός έλεγχος. Οι ουσίες διαχωρίζονται σε αυτές που απαγορεύονται ανά πάσα στιγμή (εντός και εκτός αγώνα, κατηγορίες S0 έως S5), σε αυτές που απαγορεύονται αποκλειστικά εντός αγώνα (κατηγορίες S6 έως S9) και σε ουσίες που απαγορεύονται σε συγκεκριμένα αθλήματα (WADA, 2021). Παράλληλα, οι απαγορευμένες μέθοδοι (κατηγορίες M1 έως M3) καλύπτουν πρακτικές όπως η χειραγωγή του αίματος και των συστατικών του, η χημική και φυσική χειραγωγή των δειγμάτων, καθώς και το ντόπινγκ γονιδίων και κυττάρων (WAD, 2021; WADA, 2015). Αυτή η κατηγοριοποίηση επιβάλλει στα εργαστήρια την ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες θα ελέγχουν ταυτόχρονα πολλές ουσίες ανάλογα με τη δυνατότητα των αναλύσεων, καθώς ένα μόνο βιολογικό δείγμα πρέπει να ελεγχθεί για εκατοντάδες χημικές δομές με εντελώς διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (TheRichest, 2013; Wikipedia contributors, 2026).

Ενώ η Λίστα καθορίζει τι απαγορεύεται, τα Τεχνικά Έγγραφα (Technical Documents - TDs) του WADA καθορίζουν με απόλυτη ακρίβεια το πώς θα ανιχνευθεί. Τα TDs αποτελούν υποχρεωτικά τεχνικά πρότυπα, τα οποία εκδίδονται από την Εκτελεστική Επιτροπή του WADA και εξειδικεύουν τις απαιτήσεις του Προτύπου ISL για συγκεκριμένα αναλυτικά ζητήματα. Η σημασία τους για τα εργαστήρια είναι καθοριστική, καθώς η μη συμμόρφωση με ένα Τεχνικό Έγγραφο ισοδυναμεί με παραβίαση του ISL και μπορεί να οδηγήσει σε ακύρωση των αποτελεσμάτων ή σε αναστολή της διαπίστευσης του εργαστηρίου. Τα TDs ρυθμίζουν κρίσιμες παραμέτρους, όπως τα κριτήρια ταυτοποίησης ουσιών με φασματομετρία μάζας, τις διαδικασίες για τη μέτρηση των ενδογενών στεροειδών, τα ελάχιστα επίπεδα απόδοσης των οργάνων κ.ά.

Ένα από τα κυριότερα τεχνικά έγγραφα είναι το TDMRPL (Minimum Required Performance Levels), το οποίο καθορίζει τα Ελάχιστα Απαιτούμενα Επίπεδα Απόδοσης που πρέπει υποχρεωτικά να επιτυγχάνουν οι εργαστηριακές μέθοδοι για κάθε απαγορευμένη ουσία. Το MRPL δεν πρέπει να συγχέεται με το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)· αποτελεί μια συγκέντρωση την οποία όλα τα διαπιστευμένα εργαστήρια παγκοσμίως πρέπει να είναι σε θέση να ανιχνεύσουν και να ταυτοποιήσουν με απόλυτη βεβαιότητα σε κάθε δείγμα ρουτίνας, ενώ το LOD είναι η ελάχιστη συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνεύσει μια μέθοδος.

Ένα άλλο εξαιρετικά κρίσιμο έγγραφο για τα εργαστήρια, είναι το TDIDCR (Identification Criteria), το οποίο ορίζει τα κριτήρια που εφαρμόζονται για την επιβεβαίωση της ταυτότητας μιας ουσίας μέσω χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS/(MS) ή LC-HRMS). Το έγγραφο αυτό καθορίζει τον ελάχιστο αριθμό των διαγνωστικών ιόντων ή μεταπτώσεων μάζας που πρέπει να παρακολουθούνται, τους κανόνες για τους αποδεκτούς λόγους των σχετικών εντάσεων των ιόντων (ion abundance ratios) και τις μέγιστες επιτρεπτές αποκλίσεις για τους χρόνους κατακράτησης (retention times) (**TheRichest, 2013; Technische Universität München, n.d.**). Αυτό το πλέγμα TDs διασφαλίζει ότι ένα ύποπτο δείγμα είναι όντως θετικό ή καταρρίπτει την υποψία που προέκυψε από τον έλεγχο screening, ώστε να εξαλείφεται κάθε πιθανότητα για ψευδές αποτέλεσμα. Διασφαλίζεται επίσης ότι σε όποιο διαπιστευμένο εργαστήριο αναλυθεί το ίδιο δείγμα, θα προκύψει το ίδιο αποτέλεσμα και θα είναι εξίσου έγκυρο (**Technische Universität München, n.d.**).

Η Λίστα λοιπόν καθορίζει την κατηγοριοποίηση των ουσιών και των μεθόδων και είναι υποχρεωτική για όλα τα διαπιστευμένα εργαστήρια. Όλα τα εργαστήρια πρέπει απαραίτητα να έχουν επικυρωμένες μεθόδους και επικυρωμένες όλες τις ουσίες της λίστας, δηλαδή να έχουν κατάλληλες μεθόδους (fit-for-purpose), οι οποίες πληρούν τις προδιαγραφές που έχει θέσει το αντίστοιχο τεχνικό έγγραφο για την ανίχνευση και επιβεβαίωση μιας ουσίας.

3.2.1. Αναλυτική ταξινόμηση απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων

Για να συμπεριληφθεί μια ουσία ή μέθοδος στη λίστα, πρέπει να πληροί τουλάχιστον δύο από τα ακόλουθα τρία κριτήρια: (α) να έχει τη δυνατότητα να βελτιώσει την αθλητική απόδοση, (β) να αντιπροσωπεύει πραγματικό ή δυνητικό κίνδυνο για την υγεία του αθλητή, και (γ) να παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού (**Backhouse et al., 2007**). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η λίστα επικαιροποιείται ετησίως και διαρθρώνεται βάσει τεσσάρων κριτηρίων (**WADA, 2021**).

1. Ουσίες Απαγορευμένες Ανά Πάσα Στιγμή (Εντός και Εκτός Αγώνα)

- *S0. Μη Εγκεκριμένες Ουσίες (Non-Approved Substances):*

Η κατηγορία αυτή λειτουργεί ως γενική κατηγορία προστασίας για τη δημόσια υγεία και την ασφάλεια των αθλητών. Περιλαμβάνει κάθε φαρμακολογικό παράγοντα που δεν καλύπτεται από άλλες ενότητες και δεν έχει λάβει επίσημη έγκριση από κρατικούς φορείς υγείας για ανθρώπινη θεραπευτική χρήση. Εδώ κατατάσσονται φάρμακα υπό προκλινική ή κλινική δοκιμή, ουσίες που έχουν αποσυρθεί από την αγορά, designer drugs (συνθετικές ουσίες τροποποιημένες στο εργαστήριο) καθώς και κτηνιατρικά σκευάσματα.

- *S1. Αναβολικοί Παράγοντες (Anabolic Agents):*

Αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες ντόπινγκ. Διακρίνεται στα Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή (AAS), τα οποία είναι συνθετικά παράγωγα της φυσικής ορμόνης τεστοστερόνης (π.χ. νανδρολόνη, στανοζολόλη, μεθενολόνη) και σε άλλους αναβολικούς παράγοντες (S.1.2), όπως η κλενβουτερόλη και οι εκλεκτικοί διαμορφωτές των υποδοχέων ανδρογόνων (SARMs). Η δράση τους επικεντρώνεται στην επιτάχυνση της πρωτεϊνοσύνθεσης, τη μεγάλη αύξηση της μυϊκής μάζας, την ενίσχυση της μυϊκής ισχύος και τη δραστική μείωση του χρόνου αποκατάστασης μετά από έντονη σωματική καταπόνηση.

- *S2. Πεπτιδικές Ορμόνες, Αυξητικοί Παράγοντες και Συναφείς Ουσίες:*

Οι ουσίες αυτές δρουν ως ενδογενείς ρυθμιστές του ανθρώπινου συστήματος και η εξωγενής χορήγησή τους αλλοιώνει τις φυσιολογικές λειτουργίες. Κυρίαρχο παράδειγμα αποτελεί η ερυθροποιητίνη (EPO) και οι παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση, οι οποίοι αυξάνουν τη μάζα των ερυθρών αιμοσφαιρίων και κατ' επέκταση την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στους μύες, προσφέροντας τεράστιο πλεονέκτημα σε αθλήματα αντοχής. Επίσης, περιλαμβάνονται η αυξητική ορμόνη (GH), οι αυξητικοί παράγοντες (όπως ο IGF-1) και οι γοναδοτροπίνες, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των ιστών και την αποκατάσταση των τραυματισμών.

- *S3. Βήτα-2 Αγωνιστές (Beta-2 Agonists):*

Πρόκειται για φαρμακευτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική ιατρική για τη διαχείριση του άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (π.χ. σαλβουταμόλη, φορμοτερόλη, σαλμετερόλη). Οι ουσίες αυτές προκαλούν βρογχοδιαστολή, διευκολύνοντας την αναπνοή. Ωστόσο, όταν χορηγούνται συστηματικά ή σε υψηλές δόσεις που υπερβαίνουν τα επιτρεπόμενα θεραπευτικά όρια, εμφανίζουν ισχυρή αναβολική δράση, αυξάνουν τη μυϊκή ισχύ και μεταβάλλουν τη σύσταση του σώματος.

- *S4. Ορμονικοί και Μεταβολικοί Ρυθμιστές (Hormone and Metabolic Modulators):*

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει ουσίες που τροποποιούν τις επιδράσεις των ορμονών ή επεμβαίνουν σε βασικές μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού. Περιλαμβάνει τους αναστολείς αρωματάσης και τους εκλεκτικούς διαμορφωτές των υποδοχέων οιστρογόνων (SERMs) όπως το ταμοξιφαίνιο, τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά από χρήστες αναβολικών για να αποτρέψουν διάφορες παρενέργειες. Επίσης, περιλαμβάνονται μεταβολικοί ρυθμιστές όπως η ινσουλίνη και το μελδόνιο (meldonium), το οποίο τροποποιεί τον κυτταρικό μεταβολισμό της ενέργειας, ενισχύοντας την αντοχή του μυοκαρδίου κάτω από συνθήκες ισχαιμίας και έντονης κόπωσης.

- *S5. Διουρητικά και Άλλοι Παράγοντες Συγκάλυψης (Diuretics and Masking Agents):*

Η χρήση αυτών των ουσιών (π.χ. φουροσεμίδα, υδροχλωροθειαζίδα, σπιρονολακτόνη) αποσκοπεί στην αλλοίωση των αποτελεσμάτων του ελέγχου αντιντόπινγκ. Τα διουρητικά προκαλούν ταχεία αποβολή νερού και ηλεκτρολυτών μέσω των ούρων. Στον αθλητισμό χρησιμοποιούνται για δύο λόγους: πρώτον, για τη γρήγορη απώλεια βάρους σε αθλήματα που χωρίζονται με βάση κατηγορίες βάρους (π.χ. πολεμικές τέχνες, άρση βαρών) και

δεύτερον, για την αραίωση των ούρων, η οποία μειώνει τη συγκέντρωση άλλων απαγορευμένων ουσιών στο δείγμα, καθιστώντας την ανίχνευσή τους εξαιρετικά δύσκολη.

2. Ουσίες Απαγορευμένες Μόνο Εντός Αγώνα

- *S6. Διεγερτικά (Stimulants):*

Τα διεγερτικά (π.χ. αμφεταμίνες, κοκαΐνη, εφεδρίνη) δρουν απευθείας στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Η χορήγησή τους κατά τη διάρκεια του αγώνα αποσκοπεί στην αύξηση της εγρήγορσης, της αυτοπεποίθησης και της επιθετικότητας του αθλητή. Παράλληλα, μειώνουν το αίσθημα της κόπωσης, βελτιώνουν τον χρόνο αντίδρασης στα ερεθίσματα και αυξάνουν τον καρδιακό ρυθμό και την αιματική ροή προς τους μύες, βελτιώνοντας βραχυπρόθεσμα την εκρηκτικότητα.

- *S7. Ναρκωτικά (Narcotics):*

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ισχυρά αναλγητικά φάρμακα, όπως η μορφίνη, η ηρωίνη, η φαιτανύλη, η οξυκωδόνη και η τραμαδόλη. Η χρήση τους απαγορεύεται αυστηρά εντός αγώνα διότι μειώνουν ή εξαλείφουν πλήρως το αίσθημα του φυσικού πόνου που προκαλείται από τραυματισμούς ή ακραία σωματική κόπωση. Αυτό επιτρέπει στον αθλητή να συνεχίσει να αγωνίζεται ξεπερνώντας τα φυσιολογικά όρια του σώματός του.

- *S8. Κανναβινοειδή (Cannabinoids):*

Απαγορεύονται οι φυσικές και συνθετικές δραστικές ουσίες της κάνναβης, όπως η τετραϋδροκανναβινόλη (THC) και τα μαριχουάνα/χασίς, αποκλειστικά κατά τη διάρκεια των αγώνων. Η απαγόρευση βασίζεται κυρίως στο ότι η χρήση τους παραβιάζει το πνεύμα του αθλητισμού και μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ασφάλεια του ίδιου του αθλητή ή των συναθλητών του λόγω αλλοίωσης της αντίληψης του χώρου και του χρόνου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κανναβιδιόλη (CBD) έχει εξαιρεθεί από την απαγόρευση.

- *S9. Γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids):*

Πρόκειται για ισχυρά στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (π.χ. κορτιζόνη, πρεδνιζολόνη, δεξαμεθαζόνη) που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική για τη θεραπεία φλεγμονών, αλλεργιών και άσθματος. Εντός αγώνα, η χορήγησή τους από το στόμα, από το ορθό ή μέσω ενδομυϊκών και ενδοφλέβιων ενέσεων απαγορεύεται. Ο λόγος είναι ότι πέρα από τη μείωση του πόνου και της φλεγμονής, μπορούν να προκαλέσουν αίσθημα ευφορίας, να επηρεάσουν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων και να αυξήσουν την ανθεκτικότητα στην κόπωση.

3. Ουσίες Απαγορευμένες σε Συγκεκριμένα Αθλήματα

- *P1. Βήτα-Αποκλειστές (Beta-Blockers):*

Οι βήτα-αποκλειστές (π.χ. προπρανολόλη, ατενολόλη) είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση της υπέρτασης και των καρδιακών αρρυθμιών. Η δράση τους επικεντρώνεται στη μείωση του καρδιακού ρυθμού, τον περιορισμό της αρτηριακής πίεσης και τη σταθεροποίηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Λόγω της ικανότητάς τους να εξαλείφουν τον μυϊκό τρόμο (τρέμουλο των χεριών) και το άγχος, απαγορεύονται σε αθλήματα σταθερότητας και ακριβείας, όπως η τοξοβολία, η σκοποβολή, το γκολφ, τα μηχανοκίνητα αθλήματα και ορισμένα αθλήματα του υγρού στίβου (π.χ. καταδύσεις).

4. Απαγορευμένες Μέθοδοι (Ανά Πάσα Στιγμή)

- *M1. Χειραγώγηση Αίματος και Συστατικών του Αίματος:*

Η μέθοδος αυτή στοχεύει στην τεχνητή αύξηση της παροχής οξυγόνου στους ιστούς. Περιλαμβάνει το παραδοσιακό "ντόπινγκ αίματος" μέσω αυτόλογης (χρήση του ίδιου του αίματος του αθλητή που έχει αποθηκευτεί νωρίτερα) ή ομόλογης μετάγγισης (αίμα από συμβατό δότη). Επίσης, περιλαμβάνει τη χρήση προϊόντων τεχνητών φορέων οξυγόνου ή τροποποιητών αιμοσφαιρίνης. Στους σύγχρονους κανονισμούς περιλαμβάνεται και η ρητή απαγόρευση της εισπνοής ή χορήγησης μονοξειδίου του άνθρακα (CO) για μη διαγνωστικούς σκοπούς, καθώς χρησιμοποιείται τεχνητά για την πρόκληση αντισταθμιστικής αύξησης της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων (**Wikipedia contributors, 2026**).

- *M2. Χημική και Φυσική Χειραγώγηση:*

Περιλαμβάνει οποιαδήποτε ενέργεια ή απόπειρα αλλοίωσης της ακεραιότητας και της εγκυρότητας των δειγμάτων που συλλέγονται κατά τη διάρκεια των ελέγχων ντόπινγκ. Στις μεθόδους αυτές κατατάσσονται η αντικατάσταση των ούρων (π.χ. με χρήση καθετήρων ή ξένων δειγμάτων), η νόθευση του δείγματος με χημικές ουσίες ή ένζυμα (π.χ. πρωτεάσες) που καταστρέφουν τα ίχνη των απαγορευμένων ουσιών, καθώς και οι ενδοφλέβιες εγχύσεις ή/και εγχύσεις άνω των 100 mL ανά περίοδο 12 ωρών, εκτός αν λαμβάνονται νόμιμα στο πλαίσιο νοσοκομειακής περίθαλψης.

- *M3. Γονιδιακό και Κυτταρικό Ντόπινγκ:*

Αποτελεί την πιο σύγχρονη και τεχνολογικά προηγμένη απειλή για τον καθαρό αθλητισμό. Ορίζεται ως η μεταφορά πολυνουκλεοτιδικών αλληλουχιών (DNA/RNA) ή η χρήση

γενετικά τροποποιημένων κυττάρων με σκοπό την αλλοίωση της γονιδιακής έκφρασης του αθλητή. Στόχος είναι η εσωτερική, μόνιμη παραγωγή ουσιών που βελτιώνουν την απόδοση (π.χ. τεχνητή ενεργοποίηση του γονιδίου της EPO για αντοχή ή καταστολή του γονιδίου της μυοστατίνης για ακραία μυϊκή ανάπτυξη). Η κατηγορία απαγορεύει επίσης τη χρήση φυσικών ή άθικτων κυττάρων και κυτταρικών συστατικών (π.χ. μιτοχόνδρια) για τη βελτίωση της ενεργειακής απόδοσης.

3.2.2. Βιολογικό Διαβατήριο του Αθλητή (ABP)

Η συνεχής εξέλιξη του ντόπινγκ (micro-dosing, γρήγορα μεταβολιζόμενες ουσίες, ανασυνδυασμένες ορμόνες που προσομοιάζουν τις ενδογενείς κ.λ.π) και η δύσκολη πραγματικότητα που ισχύει στο χώρο του αντιντόπινγκ πως οι μέθοδοι ανίχνευσης έπονται των νέων μεθόδων και ουσιών ντόπινγκ, ανέδειξε την ανάγκη ήδη από το 2000 για έμμεσους τρόπους ελέγχου. Αυτή η ανάγκη οδήγησε στην έμμεση ανίχνευση ντόπινγκ, μέσω του Βιολογικού Διαβατηρίου του Αθλητή (Athlete Biological Passport, ABP). Η βασική φιλοσοφία του ABP δεν είναι η αναζήτηση της ίδιας της ουσίας, αλλά η διαχρονική παρακολούθηση επιλεγμένων βιολογικών δεικτών του αθλητή. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργείται ένα εξατομικευμένο προφίλ αναφοράς και οποιαδήποτε μη φυσιολογική διακύμανση εκτός των προβλεπόμενων στατιστικών ορίων χτυπά «καμπανάκι» για πιθανή αλλοίωση, λειτουργώντας είτε ως τεκμήριο παράβασης είτε ως οδηγός για στοχευμένους ελέγχους.

Η επίσημη θεσμοθέτηση του προγράμματος από τον WADA πραγματοποιήθηκε το 2009. Η ανάγκη αυτή επιταχύνθηκε μετά από μεγάλα σκάνδαλα της εποχής Η Διεθνής Ένωση Ομοσπονδιών Κλασικού Αθλητισμού (IAAF, νυν World Athletics) και η Διεθνής Ένωση Ποδηλασίας (UCI) υπήρξαν πρωτοπόροι στην εφαρμογή του, αποδεικνύοντας γρήγορα την αποτελεσματικότητα του μέτρου, καθώς οδήγησε στον αποκλεισμό κορυφαίων αθλητών χωρίς να έχει βρεθεί θετικό δείγμα με την παραδοσιακή έννοια.

Η σύγχρονη δομή του Βιολογικού Διαβατηρίου βασίζεται σε τρεις άξονες παρακολούθησης:

- Αιματολογικός Άξονας (Hematological Module)

Εγκρίθηκε το 2009 και στοχεύει στον εντοπισμό κάθε μορφής ντόπινγκ αίματος. Μέσα από τη μέτρηση δεικτών όπως η αιμοσφαιρίνη και τα δικτυοερυθροκύτταρα (νεαρά ερυθρά

αιμοσφαίρια), το σύστημα υπολογίζει το λεγόμενο *OFF-Score*. Έτσι, ανιχνεύεται η χρήση ερυθροποιητίνης (EPO), οι μεταγίσεις (ομόλογες ή αυτόλογες) και οι τεχνητοί φορείς οξυγόνου.

- Στεροειδικός Άξονας (Steroidal Module)

Εντάχθηκε επίσημα το 2014 και εξετάζει το προφίλ των ενδογενών αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών, κυρίως μέσω δειγμάτων ούρων (και πλέον και αίματος). Παρακολουθεί τις συγκεντρώσεις και τις αναλογίες ορμονών όπως η τεστοστερόνη και η επιτεστοστερόνη (λόγος T/E), καθιστώντας άμεσα ορατή την εξωτερική χορήγηση ουσιών που φυσιολογικά παράγει ο οργανισμός.

- Ενδοκρινικός Άξονας (Endocrine Module)

Αποτελεί την πιο πρόσφατη προσθήκη, καθώς ενσωματώθηκε πλήρως στις επίσημες κατευθυντήριες γραμμές του WADA τον Αύγουστο του 2023. Ο άξονας αυτός σχεδιάστηκε για να αντιμετωπίσει το διαχρονικό πρόβλημα της κατάχρησης της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH) και των αυξητικών παραγόντων, αναλύοντας συγκεκριμένους βιοδείκτες στο αίμα που επηρεάζονται άμεσα από τη λήψη τέτοιων ουσιών.

3.3. Διαδικασία ελέγχου: Από τη δειγματοληψία έως τα τελικά αποτελέσματα

3.3.1 Η Διαδικασία της Δειγματοληψίας και ο Ρόλος του EOKAN

Εξίσου αυστηρές κατευθυντήριες γραμμές έχουν δοθεί από τον WADA και για τη διαδικασία της συλλογής των δειγμάτων, την ασφαλή μεταφορά τους σε διαπιστευμένο εργαστήριο, τα χρονικά και τοπικά κριτήρια της δειγματοληψίας και το φορέα που θα είναι υπεύθυνος για την αυστηρή τήρηση των κανονισμών. Η διαδικασία του ελέγχου ντόπινγκ (Doping Control), είναι μια αυστηρά τυποποιημένη διαδικασία και υπεύθυνος φορέας για την τήρησή της είναι ο Εθνικός Οργανισμός Αντιντόπινγκ κάθε χώρας (**EOKAN, 2024**).

Οι Εθνικοί Οργανισμοί Αντιντόπινγκ (National Anti-Doping Organizations - NADOs) αποτελούν τις θεσμοθετημένες αρχές που φέρουν την πρωτογενή ευθύνη για τον σχεδιασμό και την εφαρμογή των προγραμμάτων αντιντόπινγκ σε εθνικό επίπεδο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντιντόπινγκ, η αποτελεσματικότητα των NADOs βασίζεται στην αρχή της επιχειρησιακής και λειτουργικής τους ανεξαρτησίας (operational independence)

(WADA, 2021). Η ανεξαρτησία αυτή δεν αφορά μόνο στην πλήρη αποστασιοποίησή τους από αθλητικές ομοσπονδίες και κυβερνητικές πιέσεις για την αποφυγή σύγκρουσης συμφερόντων (conflict of interest), αλλά επεκτείνεται και στη σχέση τους με το εκάστοτε εθνικό εργαστήριο ελέγχου αντιντόπινγκ, εφόσον αυτό υπάρχει στη χώρα. Κάθε χώρα υποχρεούται να έχει Εθνικό Οργανισμό Αντιντόπινγκ, αλλά δεν είναι υποχρεωτικό να έχει αντίστοιχο εργαστήριο ελέγχου.

Συγκεκριμένα, το Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (ISL) του WADA επιβάλλει τον πλήρη διαχωρισμό μεταξύ της αρχής που διατάσσει τον έλεγχο (NADO) και του επιστημονικού φορέα που τον εκτελεί (Εργαστήριο) (WADA, 2021). Το εθνικό εργαστήριο πρέπει να λειτουργεί με απόλυτη διοικητική, οικονομική και επιχειρησιακή αυτονομία από τον NADO. Αυτό είναι αναγκαίο για τη διασφάλιση της αντικειμενικότητας: ο NADO δεν επιτρέπεται να παρεμβαίνει στις επιστημονικές μεθόδους, τη στελέχωση ή τη λήψη αποφάσεων του εργαστηρίου, ενώ το εργαστήριο οφείλει να αναλύει τα δείγματα με τυφλές διαδικασίες (ανωνυμία κωδικών), χωρίς καμία γνώση της ταυτότητας των αθλητών ή των στρατηγικών στόχευσης του NADO. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η ακεραιότητα των αποτελεσμάτων και η ίση μεταχείριση των αθλητών.

Στην Ελλάδα, ο αποκλειστικός υπεύθυνος φορέας για τον σχεδιασμό, τον συντονισμό και την υλοποίηση αυτών των ελέγχων είναι ο Εθνικός Οργανισμός Καταπολέμησης του Ντόπινγκ (EOKAN). Ο EOKAN, εναρμονισμένος πλήρως με τα Διεθνή Πρότυπα του WADA, εφαρμόζει ελέγχους τόσο εντός αγώνων (in-competition) όσο και εκτός αγώνων (out-of-competition), επιστρατεύοντας πιστοποιημένους Υπαλλήλους Ελέγχου Ντόπινγκ (Doping Control Officers, DCO) (EOKAN, 2024).

Η διαδικασία της δειγματοληψίας ακολουθείται με βάση ένα αυστηρό πρωτόκολλο για τη διασφάλιση των δικαιωμάτων του αθλητή και της εγκυρότητας του δείγματος. Αρχικά, ο αθλητής επιλέγεται είτε τυχαία είτε βάσει στοχευμένης στρατηγικής και ειδοποιείται επίσημα από τον συνοδό (chaperone). Από τη στιγμή της ειδοποίησης μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ο αθλητής βρίσκεται υπό συνεχή οπτική επαφή. Στη συνέχεια, οδηγείται στο Σταθμό Ελέγχου Ντόπινγκ (Doping Control Station), όπου επιλέγει ο ίδιος ένα σφραγισμένο κιτ συλλογής.

Κατά τη φάση της παροχής του δείγματος (ούρων ή/και αίματος), ο DCO του ίδιου φύλου, επιβλέπει απευθείας τη ροή για να αποκλειστεί οποιαδήποτε προσπάθεια νόθευσης ή

αντικατάστασης. Ακολούθως, ο ίδιος ο αθλητής διαχωρίζει το δείγμα σε δύο φιάλες: τη φιάλη Α (που θα αναλυθεί αρχικά) και τη φιάλη Β (που θα σφραγιστεί ως δείγμα ασφαλείας για τυχόν επανέλεγχο). Ο DCO μετρά το ειδικό βάρος των ούρων για να διασφαλίσει ότι το δείγμα δεν είναι υπερβολικά αραιωμένο. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη συμπλήρωση του Εντύπου Ελέγχου Ντόπινγκ, όπου καταγράφονται τυχόν φάρμακα ή συμπληρώματα που έλαβε ο αθλητής τις τελευταίες επτά ημέρες. Τα σφραγισμένα μπουκάλια, τα οποία φέρουν μόνο έναν επταψήφιο κωδικό για τη διασφάλιση της ανωνυμίας, τοποθετούνται σε ειδικά ψυγεία μεταφοράς και αποστέλλονται άμεσα, μέσω ασφαλούς αλυσίδας φύλαξης, σε κάποιο διαπιστευμένο από τον WADA εργαστήριο.

3.3.2. Δομή, Λειτουργία και Εργαστηριακή Ανάλυση των Δειγμάτων

Το διαπιστευμένο εργαστήριο αντιντόπινγκ αποτελεί το επιστημονικό κομμάτι του συστήματος, λειτουργώντας υπό αυστηρά καθορισμένα μέτρα ασφαλείας και απόλυτη ανεξαρτησία. Η δομή του περιλαμβάνει εξειδικευμένες πτέρυγες υποδοχής, καταμερισμού των δειγμάτων (aliquoting), αποθήκευσης (μακροχρόνιας κατάψυξης) και φυσικά, τις μονάδες προηγμένης αναλυτικής χημείας. Η λειτουργία του βασίζεται στο Διεθνές Πρότυπο για τα Εργαστήρια (ISL) του WADA. **(WADA, 2021)**

Η διαδικασία εντός του εργαστηρίου ξεκινά με την παραλαβή και τον έλεγχο ακεραιότητας του δείγματος. Οι υπεύθυνοι του εργαστηρίου ελέγχουν αν οι εξωτερικές συσκευασίες και οι ταινίες ασφαλείας των φιαλών Α και Β είναι άθικτες, καθώς και αν οι κωδικοί συμπίπτουν με τα έγγραφα αποστολής. Οποιαδήποτε ένδειξη παραβίασης ακυρώνει τη διαδικασία. Στη συνέχεια, η φιάλη Β αποθηκεύεται με ασφάλεια σε βαθιά κατάψυξη, ενώ η φιάλη Α αποσφραγίζεται για να ξεκινήσει η διαδικασία της ανάλυσης.

Η εργαστηριακή ανάλυση χωρίζεται σε δύο βασικά στάδια:

- Η Διαλογή (Screening) ή αλλιώς Αρχική Διαδικασία Ελέγχου (Initial Testing Procedure, ITP):

Το δείγμα υποβάλλεται σε μια σειρά βασικών δοκιμών για την ανίχνευση ευρέος φάσματος απαγορευμένων ουσιών. Χρησιμοποιούνται τεχνικές αιχμής, όπως η Αέρια και Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS, LC-MS/MS), ανοσοδοκιμασίες κ.ά. οι οποίες μπορούν να εντοπίσουν ουσίες σε πολύ χαμηλά επίπεδα

συγκεντρώσεων. (Badoud et al., 2011; Χατζηπιερής et al., 2024) Αν στο screening δεν υπάρξει κάποια ένδειξη/υποψία, το δείγμα καταχωρείται ως αρνητικό.

- Η Επιβεβαίωση (Confirmation):

Εάν στο πρώτο στάδιο προκύψει ύποπτη ένδειξη, το εργαστήριο προχωρά σε μια δεύτερη, ακόμα πιο εξειδικευμένη και στοχευμένη ανάλυση σε νέο aliquot από τη φιάλη Α για να ταυτοποιήσει με απόλυτη ακρίβεια την ουσία. (Thevis, 2010).

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, το εργαστήριο εκδίδει το τελικό αποτέλεσμα. Αυτό εισάγεται απευθείας στο ασφαλές σύστημα ADAMS (Anti-Doping Administration & Management System) του WADA. Το εργαστήριο ενημερώνει ταυτόχρονα τον ΕΟΚΑΝ (ή τη διεθνή ομοσπονδία που ζήτησε τον έλεγχο) και τον WADA, αποστέλλοντας μόνο τον κωδικό του δείγματος, χωρίς να γνωρίζει ποτέ το όνομα του αθλητή, διασφαλίζοντας έτσι την πλήρη αντικειμενικότητα της διαδικασίας.

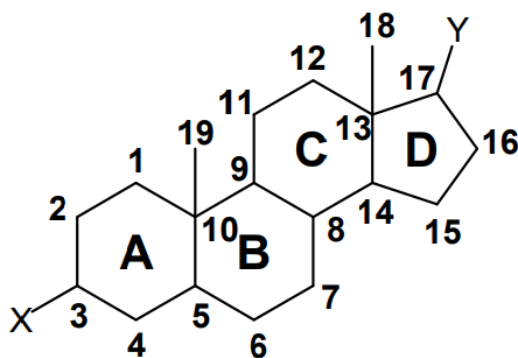
3.4. Αναβολικά στεροειδή και μεταβολισμός

3.4.1 Αναβολικά στεροειδή: Δομή και Δραστητικότητα

Στεροειδή ονομάζονται τα παράγωγα του κυκλοπεντανοϋπερυδροφαινανθρενίου (Skoog et al., 2005). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των στεροειδών είναι ο σκελετός, ο οποίος αποτελείται από τρεις εξαμελείς δακτυλίους (αναφέρονται ως Α, Β, C) και έναν κυκλοπεντανικό δακτύλιο (D) (Χατζηγιάννου & Κουμπάρη, 2010). Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ο στεροειδής σκελετός, που αποτελείται από τους τρεις εξαμελείς δακτυλίους (οι οποίοι δηλώνονται με τα γράμματα Α, Β και C), στους οποίους συμπτυκνώνεται ένας κυκλοπεντανικός δακτύλιος, (δηλώνεται ως D) (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Ως πρώτος δακτύλιος θεωρείται ο Α ξεκινώντας από τα αριστερά προς τα δεξιά (Watson & Sparkman, 2007). Τα άτομα άνθρακα λαμβάνουν αρίθμηση ξεκινώντας από τον πρώτο δακτύλιο Α (Carlson, 2013). Οι δακτύλιοι Α, Β και C, έχουν διαμόρφωση ανακλίντρου (Smith, 2004). Τα στεροειδή είναι σχετικά επίπεδα μόρια και οι υποκαταστάτες σε όλες τις θέσεις συμβολίζονται με τα ελληνικά μικρά γράμματα α και β, ανάλογα με τη θέση υποκατάστασης, α για κάτω και β για πάνω από το επίπεδο του μορίου (Skoog et al., 2005). Η στερεοχημεία των στεροειδών μπορεί να είναι cis ή trans εκεί που ενώνονται οι δακτύλιοι Α και Β (Smith, 2004). Στις υπόλοιπες θέσεις ένωσης, η στερεοχημεία είναι κυρίως trans. Τα στεροειδή μπορούν να έχουν είτε τη cis είτε την trans

στεreoχημεία στα σημεία συνένωσης των δακτυλίων Α και Β, ενώ στα σημεία ένωσης των υπολοίπων δακτυλίων (Β-Γ, Γ-Δ) η stereoχημεία είναι συνήθως trans (**Thevis, 2010**). Στα στεροειδή τύπου trans Α-Β, το υδρογόνο που βρίσκεται στη θέση C5 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του μορίου (προσανατολισμός α), ενώ το μεθύλιο του C19 έχει κατεύθυνση προς τα πάνω (προσανατολισμός β) (**Carlson, 2013**). Αντίθετα, στα cis Α-Β στεροειδή και το υδρογόνο του C5 και το σκελετικό μεθύλιο του C19 κατευθύνονται πάνω από το επίπεδο του μορίου (προσανατολισμός β) (**Thevis, 2010**). Η stereoχημεία 5α ή 5β του υποκαταστάτη του C5 σημειώνεται στο όνομα της ένωσης εκτός εάν υπάρχει διπλός δεσμός στη συγκεκριμένη θέση (**Carlson, 2013**).

Η δομή και η αρίθμηση ενός στεροειδούς φαίνεται στην εικόνα 1 που ακολουθεί:



Εικόνα 1: Δομή Αναβολικού Στεροειδούς

Οι κύριες βιολογικές λειτουργίες των στεροειδών είναι οι εξής:

α) Είναι σημαντικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης, μεταβάλλοντας τη ρευστότητά της (χοληστερόλη). (**Carlson, 2013**)

β) Ενεργοποιούν υποδοχείς ανδρογόνων.

Στους ανθρώπους, τα περισσότερα στεροειδή λειτουργούν ως ορμόνες, δηλαδή ως ‘χημικοί αγγελιοφόροι’ που εκκρίνονται από τους αδένες και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρονται σε συγκεκριμένους ιστούς. (**Yesalis & Bahrke, 2002**).

3.4.2. Ανδρογόνα Αναβολικά στεροειδή

Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (Anabolic Androgenic Steroids, AAS) περιλαμβάνουν τις ενδογενώς παραγόμενες, τεστοστερόνη (testosterone) και διυδροτεστοστερόνη (dehydrotestosterone, DHT), αλλά και τους μεταβολίτες τους (**Yesalis & Bahrke, 2002**).

Επίσης υπάρχουν τα εξωγενή αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή, τα οποία είναι συνθετικά παράγωγα της τεστοστερόνης (**Dimeo, 2007**). Η τεστοστερόνη είναι το φυσικό αναβολικό στεροειδές που δημιούργησε η φύση για τον άνθρωπο (**Carlson, 2013**). Η σύνθεσή της γίνεται από τη χοληστερόλη στα κύτταρα Leydig των όρχεων, ενώ μικρές ποσότητες εκκρίνονται επίσης από τις ωοθήκες και τα επινεφρίδια (**Carlson, 2013**). Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι ενδογενείς αυτές ορμόνες ρυθμίζουν δύο βασικές λειτουργίες μέσω της σύνδεσής τους με τους ανδρογονικούς υποδοχείς των κυττάρων: την ανδρογόνο δράση, η οποία ευθύνεται για την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών του ανδρικού φύλου, και την αναβολική δράση, η οποία διεγείρει την πρωτεϊνσύνθεση, οδηγώντας σε αύξηση της μυϊκής μάζας, της οστικής πυκνότητας και της παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων (**Yesalis & Bahrke, 2002**).

Λόγω της ιδιότητάς τους να επιταχύνουν τη μυϊκή αποκατάσταση και να αυξάνουν τη δύναμη, τα ΑΑΣ αποτελούν διαχρονικά την πιο συχνά ανιχνεύσιμη κατηγορία απαγορευμένων ουσιών στους ελέγχους αντιντόπινγκ παγκοσμίως (**WADA, 2019**). Ωστόσο, η θεραπευτική χρήση της φυσικής τεστοστερόνης παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς, καθώς όταν λαμβάνεται από το στόματος διασπάται ταχύτατα από το ήπαρ πριν προλάβει να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος (μεταβολισμός πρώτης φάσης) (**Thevis, 2010**).

Για το λόγο αυτό η σύγχρονη φαρμακολογία προχώρησε στη δημιουργία συνθετικών αναλογικών μορίων, τροποποιώντας το βασικό στεροειδικό δακτύλιο της τεστοστερόνης (**Dimeo, 2007**). Οι τροποποιήσεις αυτές αποσκοπούσαν είτε στην παράταση της διάρκειας δράσης της ουσίας, είτε στον διαχωρισμό της αναβολικής από την ανδρογόνο δράση, είτε στη διασφάλιση της σταθερότητάς της κατά την από του στόματος λήψη (**Yesalis & Bahrke, 2002**).

Η πλέον κλασική και ιστορική παρέμβαση σε αυτή την κατεύθυνση υπήρξε η 17α-αλκυλίωση (17a-alkylation). Με την προσθήκη μιας αλκυλομάδας, συνήθως μεθυλομάδας, στον άνθρακα 17 του στεροειδικού σκελετού, το μόριο αποκτά προστασία έναντι της ηπατικής ενζυμικής οξείδωσης. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι και η 17α-μεθυλοτεστοστερόνη (17a-methyltestosterone) (**Thevis, 2010**).

Η συγκεκριμένη ουσία αποτέλεσε ένα από τα πρώτα συνθετικά στεροειδή που κυκλοφόρησαν στην αγορά με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα για λήψη από του στόματος

(Dimeo, 2007). Παρά το γεγονός ότι η 17α-μεθυλοτεστοστερόνη εμφανίζει έντονη ηπατοτοξικότητα λόγω της δομής της, η ευκολία στη χρήση της και τα άμεσα αναβολικά της αποτελέσματα την κατέστησαν μια από τις πιο διαδεδομένες ουσίες κατάχρησης στον αθλητικό χώρο, αλλά και μια βασική ουσία-μοντέλο για τη μελέτη των μεταβολικών μονοπατιών των στεροειδών στα εργαστήρια αντιντόπινγκ (Yesalis & Bahrke, 2002). Η ανάγκη για την ακριβή ανίχνευση τέτοιων συνθετικών ουσιών και των μεταβολιτών τους αποτελεί το έναυσμα για την πρακτική και πειραματική προσέγγιση, μεταφέροντας το ενδιαφέρον της παρούσας εργασίας από τη θεωρητική ανασκόπηση στην εφαρμοσμένη ερευνητική μεθοδολογία.

3.4.3. Μεταβολισμός στεροειδών και αναλυτική πρόκληση στον έλεγχο ντόπινγκ

Η ανίχνευση των Αναβολικών Ανδρογόνων Στεροειδών (ΑΑΣ) στα εργαστήρια αντιντόπινγκ βασίζεται σχεδόν εξολοκλήρου στη μελέτη του μεταβολισμού τους. Όταν ένας αθλητής κάνει χρήση ενός στεροειδούς, η αρχική ουσία που εισέρχεται στον οργανισμό ονομάζεται μητρική ουσία (parent compound) (Thevis, 2010). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μητρική ουσία μεταβολίζεται τόσο γρήγορα από το ήπαρ, ώστε η συγκέντρωσή της στα ούρα μειώνεται δραματικά ή εκμηδενίζεται μέσα σε ελάχιστες ώρες (Thevis & Schanzer, 2007).

Για τον λόγο αυτό, οι έλεγχοι αντιντόπινγκ δεν στοχεύουν στην ανίχνευση της ίδιας της μητρικής ουσίας. Αντίθετα, οι επιστήμονες αναζητούν τους μεταβολίτες, δηλαδή τα χημικά προϊόντα που προκύπτουν από τη διάσπαση και την τροποποίηση της μητρικής ουσίας από τον οργανισμό. Οι μεταβολίτες αυτοί παραμένουν στο σώμα και εκκρίνονται στα ούρα για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (παράθυρο ανίχνευσης), το οποίο μπορεί να διαρκέσει από αρκετές ημέρες έως και εβδομάδες (Thevis, 2010). Η γνώση του ακριβούς μεταβολικού προφίλ κάθε ουσίας επιτρέπει στα εργαστήρια να επιλέξουν τους κατάλληλους «μεταβολίτες-στόχους» για να αποδείξουν αδιαμφισβήτητα τη χρήση της απαγορευμένης ουσίας, ακόμη και αν η μητρική ένωση έχει εξαφανιστεί πλήρως από το δείγμα (Thevis & Schanzer, 2007).

Ο μεταβολισμός των ΑΑΣ από τον οργανισμό πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ μέσω δύο διαδοχικών και διακριτών βιοχημικών σταδίων:

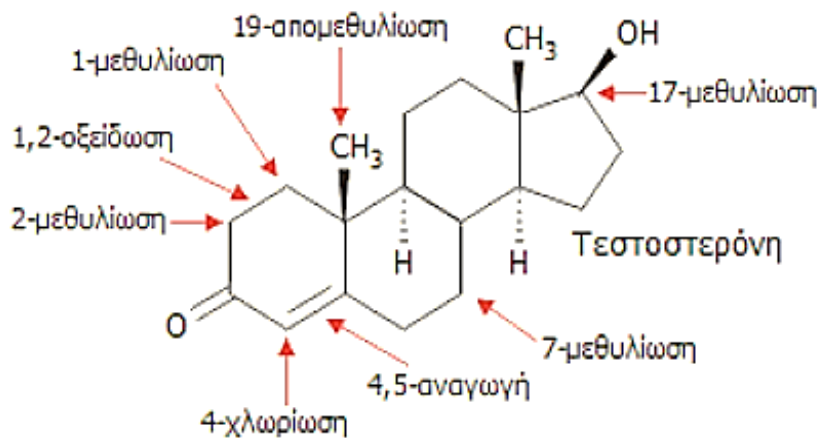
- **Φάση I (Λειτουργικότητα / Modification):** Στο στάδιο αυτό, η μητρική ουσία υφίσταται δομικές αλλαγές με σκοπό την εισαγωγή ή την αποκάλυψη πολικών λειτουργικών ομάδων (όπως οι ομάδες υδροξυλίου, -OH). Οι κυριότερες αντιδράσεις περιλαμβάνουν την οξείδωση, την υδροξυλίωση και την αναγωγή, οι οποίες καταλύονται από ένζυμα. Στα ΑΑΣ, η πιο συχνή αντίδραση είναι η αναγωγή του διπλού δεσμού στον δακτύλιο A του στεροειδικού σκελετού και η μετατροπή των κετο-ομάδων σε υδροξύλια. Οι αλλαγές αυτές προετοιμάζουν το μόριο για το επόμενο στάδιο. **(Thevis & Schanzer, 2007)**
- **Φάση II (Σύζευξη / Conjugation):** Επειδή οι μεταβολίτες της Φάσης I παραμένουν συχνά αρκετά λιπόφιλοι για να αποβληθούν αποτελεσματικά, ο οργανισμός επιστρατεύει τη Φάση II. Εδώ, οι μεταβολίτες συνδέονται χημικά με πολύ πολικά, υδατοδιαλυτά ενδογενή μόρια. Η πιο κυρίαρχη αντίδραση στα στεροειδή είναι η γλυκουρονιδίωση (σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ) και σε μικρότερο βαθμό η σύζευξη με θειικό οξύ. Η σύζευξη αυτή αυξάνει κατακόρυφα την υδατοδιαλυτότητα των μεταβολιτών, επιτρέποντας στα νεφρά να τους αποβάλουν μέσω των ούρων. **(Thevis, 2010).**

Η πολικότητα και η υδατοδιαλυτότητα των μεταβολιτών της Φάσης II καθορίζουν την στρατηγική που θα ακολουθήσει το διαπιστευμένο εργαστήριο, ανάλογα με την τεχνολογία που διαθέτει. **(Mareck et al., 2011)** Επειδή η Αέρια Χρωματογραφία απαιτεί πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις, τα συζευγμένα μόρια δεν μπορούν να εισαχθούν απευθείας στο σύστημα. Στην περίπτωση αυτή, η ενζυμική υδρόλυση (με το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση) είναι υποχρεωτική για να «σπάσει» ο δεσμός της σύζευξης και να ελευθερωθούν οι μεταβολίτες της Φάσης I, οι οποίοι στη συνέχεια υφίστανται χημική παραγωγοποίηση ακριβώς για να γίνουν πτητικοί και θερμικά σταθεροί, ώστε να μπορούν να διαχωριστούν και να ταυτοποιηθούν με ακρίβεια από τον φασματογράφο μάζας. **(Thevis, 2010; Ventura et al., 2009).**

Αντίθετα, η τεχνική LC-MS/MS, επιτρέπει την απευθείας ανίχνευση των άθικτων συζευγμένων μεταβολιτών, παρακάμπτοντας πλήρως το στάδιο της υδρόλυσης. **(Badoud et al., 2011).**

Συνεπώς, στα σύγχρονα εργαστήρια αντιντόπινγκ, οι δύο τεχνικές λειτουργούν συμπληρωματικά.

Στην επόμενη εικόνα (Εικόνα 2) παρουσιάζονται οι πιθανές αντιδράσεις μεταβολισμού των στεροειδών και συγκεκριμένα της τεστοστερόνης:



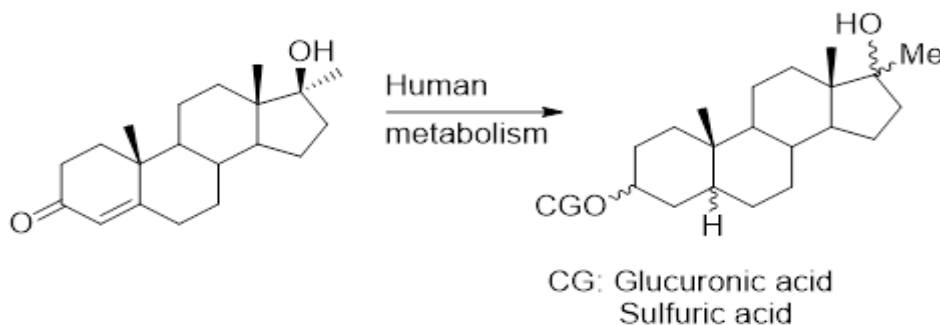
Εικόνα 2: Πιθανές αντιδράσεις μεταβολισμού της τεστοστερόνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης στον έλεγχο ντόπινγκ

4.1. Εισαγωγή

Η 17α-μεθυλοτεστοστερόνη (MT) αποτελεί το πρωτότυπο μιας σειράς 17α-αλκυλιωμένων στεροειδών που αναπτύχθηκαν για να αυξήσουν την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα των αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών. Συντέθηκε για πρώτη φορά το 1935 (Ruzicka et al., 1935) και εισήχθη στην κλινική πράξη λίγο αργότερα για ιατρικές καταστάσεις που σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα ανδρογόνων. (Ebadi, 2007) Επειδή η MT έχει και αναβολική αλλά και ανδρογόνο δράση, αυξάνει τη μυϊκή μάζα και τη δύναμη (Walpurgis et al., 2022), οπότε συχνά γίνεται κατάχρησή στην αθλητική βιομηχανία (WADA, 2023) και έχει απαγορευτεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντιντόπινγκ (WADA). (WADA, 2022)

Η MT μεταβολίζεται εκτενώς στο ανθρώπινο σώμα και οι μεταβολικές της οδοί έχουν διερευνηθεί και ταυτοποιηθεί σε αρκετές περιπτώσεις. (Schänzer & Donike, 1993; Angelis et al., 2023a) Έχει επίσης παρουσιαστεί ένα ολοκληρωμένο μεταβολικό προφίλ της (Albertsdóttir et al., 2023a; Angelis et al., 2023a). Οι κύριες μεταβολικές οδοί περιλαμβάνουν την αναγωγή του δακτυλίου A του στεροειδούς σκελετού, οδηγώντας στους τετραϋδρο-στεροειδείς μεταβολίτες 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλη και 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη. Η περαιτέρω σύζευξη αυτών των μεταβολιτών της φάσης I με γλυκουρονικό ή/και θεικό οξύ οδηγεί στους αναλύτες-στόχους για την ανάλυση ελέγχου στον αθλητισμό, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Κύριες μεταβολικές οδοί της 17α-μεθυλοτεστοστερόνης

Τα διαπιστευμένα από τον WADA εργαστήρια ελέγχου, συνήθως παρακολουθούν τη μεθυλοτεστοστερόνη στα ανθρώπινα ούρα μέσω της ανίχνευσης των κύριων μεταβολιτών της, της 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης και της 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης, χρησιμοποιώντας Αέρια Χρωματογραφία-Συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS/(MS)) μετά από υδρόλυση με β-γλυκουρονιδάση των γλυκουρονικών συζευγμάτων τους και TMS παραγωγοποίηση. Ωστόσο, η ανάλυση των ακέραιων μεταβολιτών φάσης II με Υγρή Χρωματογραφία-Συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/(MS)), αποκάλυψε την παρουσία επιμερών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης και ειδικότερα του 3α-θεικού παραγώγου του μεταβολίτη 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλη της μεθυλοτεστοστερόνης, το οποίο παρατείνει σημαντικά το παράθυρο χρόνου ανίχνευσης για τη μεθυλοτεστοστερόνη (**Albertsdóttir et al., 2023a; Gómez et al., 2013**)

Αυτοί οι επιμερείς μεταβολίτες παράγονται μέσω επιμερισμού της 17β-θεικής ομάδας ως μέρος του μεταβολισμού φάσης II (**Schänzer et al., 1992**). Ο δομικός προσδιορισμός για αυτούς τους σημαντικούς μεταβολίτες έγινε έμμεσα, έπειτα από αποσύζευξη της θεικής ομάδας και ανάλυση με GC-MS/(MS) (**Gómez et al., 2013**). Πρόσφατα, αναφέρθηκε η σύνθεση του κύριου μεταβολίτη της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης (**Sun et al., 2024**), ενώ η άμεση ανάλυσή του σε δείγματα μετά από χορήγηση επιβεβαίωσε την υποθετική δομή που είχε ήδη προταθεί από τους Gomez et al. (**Gómez et al., 2013**).

Οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν επίσης ότι ένας δευτερεύων μεταβολίτης, ο οποίος χαρακτηρίστηκε έμμεσα ως το 3α-θεικό παράγωγο της επιμερούς 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης της μεθυλοτεστοστερόνης (**Gómez et al., 2013**), εμφανίζει την υψηλότερη αναδρομικότητα (**Gómez et al., 2013; Angelis et al., 2023a**). Ωστόσο, δεν υπάρχει μέχρι σήμερα άμεση πειραματική απόδειξη που να οδηγεί στην αποσαφήνιση της δομής αυτού του μεταβολίτη. Επιπλέον, η ταυτοποίηση αυτών των μεταβολιτών στην περίπτωση ύποπτων δειγμάτων, είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω των φτωχών φασμάτων μάζας των προϊόντων ιόντων (product ion mass spectrum) που προκύπτουν από επαγόμενη θραύση του μητρικού ιόντος των μεταβολιτών αυτών, παρέχοντας περιορισμένες δομικές πληροφορίες (**Gómez et al., 2013; Albertsdóttir et al., 2023a; Kiouisi et al., 2021**). Μια άμεση μέθοδος για την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίησή τους, παραμένει μια αναλυτική πρόκληση. Πρόσφατα, αναφέρθηκε η ανάλυση με GC-MS των ακέραιων θεικών

μεταβολιτών της MT, στην οποία ανιχνεύονται σαν αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα (artifacts) (Polet et al., 2019; Albertsdóttir et al., 2021) και εξ όσων γνωρίζουμε, είναι η μόνη διαθέσιμη μέθοδος ταυτοποίησης στην οποία η επιβεβαίωση αυτών των μεταβολιτών, βασίζεται σε ιοντικές μεταπτώσεις που σχετίζονται με το στεροειδές τμήμα και όχι με τη συζευγμένη ομάδα.

Μια εναλλακτική στρατηγική έχει προταθεί για την ταυτοποίηση των θεικών μεταβολιτών των οξο-στεροειδών, όπου τα φάσματα μάζας των προϊόντων ιόντων, θα μπορούσαν να τροποποιηθούν σημαντικά μετά από παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο Girard T (Kiousi et al., 2021; Angelis et al., 2023b). Αυτή η παραγωγοποίηση επιτρέπει την ταυτοποίησή τους μέσω υγρής χρωματογραφίας-υψηλής ανάλυσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-HRMS/(MS)), σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η επέκταση της στρατηγικής παραγωγοποίησης για την ταυτοποίηση των ακέραιων θεικών και πλήρως κορεσμένων μεταβολιτών της 17α-μεθυλοτεστοστερόνης, στοχεύοντας την ελεύθερη 17-υδροξυλομάδα των στεροειδών ως θέση παραγωγοποίησης. Τα πλεονεκτήματα και οι παγίδες αυτής της μεθοδολογίας μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τόσο τα πρότυπα που έχουν συντεθεί όσο και δείγματα μετά από χορήγηση της ουσίας μεθυλοτεστοστερόνη σε δύο διαφορετικές μελέτες απέκκρισης. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που προέκυψαν από την ταυτοποίηση των ίδιων μεταβολιτών στα ίδια δείγματα που αναλύθηκαν ως αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα με GC-MS/(MS), καθώς και με τα αποτελέσματα από την τυπική ανάλυση του κλάσματος των γλυκουρονιδίων με GC-MS/(MS) μετά από αποσύζευξη με β-γλυκουρονιδάση από E. Coli.

4.2. Πειραματικό Μέρος

4.2.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Το νατριούχο άλας της θεικής ανδροστερόνης, το νατριούχο άλας της θεικής ετιοχολανολόνης και το νατριούχο άλας της θεικής επιανδροστερόνης, αγοράστηκαν από την LGC standards (Middlesex, Ηνωμένο Βασίλειο). Η ανδροστερόνη, η ετιοχολανολόνη, η 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη, η 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλη, η 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλη και το γλυκουρονίδιο της D4-19-νορανδροστερόνης, αγοράστηκαν από το Εθνικό Ινστιτούτο Μέτρησης (NMI, Καμπέρα,

Αυστραλία). Η επανδροστερόνη αγοράστηκε από την Steraloids Inc. (Newport, ΗΠΑ). Η μεθυλοτεστοστερόνη, το ιωδιούχο αμμώνιο (NH_4I), η 2-προπανοθειόλη (2-PrSH), το μεθυλομαγνησιοβρωμίδιο 3M σε διαιθυλέθερα, το σύμπλοκο τριοξειδίου του θείου-πυριδίνης, το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), το 1,4-διοξάνιο, το καρβονυλοδιμιδαζόλιο (CDI), το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και η DMAP (4-διμεθυλαμινοπυριδίνη), ήταν αναλυτικής καθαρότητας και προήλθαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία). Ο διαιθυλαιθέρας, το n-πεντάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, το διχλωρομεθάνιο και η μεθανόλη (MeOH), ήταν αναλυτικής καθαρότητας και λήφθηκαν από την Labscan (Δουβλίνο, Ιρλανδία). Η β-γλυκουρονιδάση από E.Coli λήφθηκε από την Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Γερμανία). Το όξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4), το δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), το ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), το όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3), το άνυδρο θεικό νάτριο (Na_2SO_4), το υδροχλωρικό οξύ 37% (HCl), το παγόμορφο (glacial) οξικό οξύ και το ακετονιτρίλιο (ACN), ήταν αναλυτικής καθαρότητας και αγοράστηκαν από την Panreac (Βαρκελώνη, Ισπανία). Το υπερκάθαρο νερό λήφθηκε με τη χρήση συστήματος καθαρισμού Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, ΗΠΑ). Σηλάκια SPE (Solid Phase Extraction) C18, 500 mg, 6 ml αγοράστηκαν από την Agilent Technologies. Το N-μεθυλο-N-τριμεθυλοσιλυλοτριφθοροακεταμίδιο (MSTFA), αγοράστηκε από την Chemische Fabrik Karl Bücher GmbH (Waldstetten, Γερμανία)

4.2.2.Σύνθεση αναλυτικών προτύπων

Η σύνθεση των αναλυτικών προτύπων των διολών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης, συζευγμένων στην 3-υδροξομάδα του δακτυλίου A του στεροειδούς με θεικό οξύ, με σαφώς προκαθορισμένη στερεοχημεία στις θέσεις 3, 5 και 17 του στεροειδούς σκελετού, πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης Grignard του μεθυλομαγνησιοβρωμιδίου, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα τα αντίστοιχα 17-κετοστεροειδή. (Sakellariou et al., 2020; Steff et al., 2022)

Συγκεκριμένα, 100 μL διαλυμάτων θεικής ανδροστερόνης, θεικής ετιοχολανολόνης και θεικής επανδροστερόνης, σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε MeOH , μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και ανασυστάθηκαν σε 0,5 ml 1,4 διοξανίου. Στη συνέχεια, 0,2 ml μεθυλομαγνησιοβρωμιδίου 3M σε διαιθυλαιθέρα, προστέθηκαν στάγδην υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Με την ολοκλήρωση της προσθήκης, προστέθηκαν αμέσως στάγδην 0,2 ml NaOH 0,1N υπό ανάδευση. Αφού

σταμάτησε η έκλυση υδρογόνου, προστέθηκαν 5 ml νερού και το προκύπτον λευκό γαλάκτωμα οξινίστηκε με 0,2 ml παγόμορφου οξικού οξέος. Το μείγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε τρεις φορές με n-πεντάνιο και τα εκχυλίσματα απορρίφθηκαν. Τα προϊόντα της αντίδρασης απομονώθηκαν με εκχύλιση στερεής φάσης σε προκατεργασμένα στηλάκια C18 μετά από έκλυση με 5 mL MeOH.

Για τη σύνθεση των αναλυτικών προτύπων της 17,17-διμεθυλο-18-νορ- Δ_{13} -τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης, τα προαναφερθέντα προϊόντα αντίδρασης εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και ανασυστάθηκαν σε 0,2 ml ACN. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,3 ml διαλύματος HCl 3M σε νερό και το μείγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 80°C για 30 λεπτά. Τα προϊόντα της αντίδρασης απομονώθηκαν με εκχύλιση στερεής φάσης σε προκατεργασμένα στηλάκια C18 μετά από έκλυση με 5 mL MeOH.

4.3.Μελέτη χορήγησης σε ανθρώπους

Δείγματα ούρων συλλέχθηκαν μετά από τη χορήγηση εφάπαξ δόσης Teston® σε δύο υγιείς άνδρες εθελοντές. (Σειρά I: Καυκάσιος, 40 ετών, 90 κιλά, 1 κάψουλα $\times$ 25 mg μεθυλοτεστοστερόνης. Σειρά II: Καυκάσιος, 53 ετών, 101 κιλά, 1/2 κάψουλα $\times$ 25 mg μεθυλοτεστοστερόνης). Δείγματα ούρων συλλέχθηκαν πριν (0 ώρες) και έως 403 ώρες μετά τη χορήγηση για τη Σειρά I. Στην Σειρά II, τα δείγματα συλλέχθηκαν πριν (0 ώρες) και έως 493 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα ακριβή χρονικά διαστήματα (ώρες) είχαν ως εξής:

Σειρά I: 0, 1, 8.5, 17.5, 23, 26, 41.5, 47.5, 53, 65.5, 72, 103, 127, 144, 170, 194, 215, 313, 360 και 403.

Σειρά II: 0, 1, 3.5, 7, 14.5, 19.5, 24.5, 36.5, 41.5, 48, 63, 66, 89.5, 115.5, 138.5, 201, 226, 248, 273, 294, 319, 345, 362, 369, 385, 390, 413, 436, 472 και 493.

Όλα τα συλλεχθέντα δείγματα διατηρήθηκαν κατεψυγμένα στους -20°C μέχρι την ανάλυση. Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος», Αθήνα, Ελλάδα, με κωδικό έγκρισης: 240/2022-1612/92-19-12-2022.

4.4. Προετοιμασία δειγμάτων

4.4.1. Παρασκευαστική πορεία δειγμάτων για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης (ελεύθερων και γλυκουρονιδικών)

Για την εκχύλιση των ελεύθερων και γλυκουρονιδικών στεροειδών, προστέθηκαν 20 μL διαλύματος γλυκουρονιδίου της D4-19-νορανδροστερόνης, συγκέντρωσης 1,25 $\mu\text{g/mL}$ σε δείγματα ούρων όγκου 3 mL, ως εσωτερικό πρότυπο (ISTD), σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Το pH ρυθμίστηκε στο 7,0 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 1M και τα δείγματα ούρων επώαστηκαν για 1,5 ώρα στους 55°C μετά την προσθήκη 100 μL β -γλυκουρονιδάσης από E. coli. Μετά την υδρόλυση, το pH των ούρων ρυθμίστηκε στο 9,5 με στερεό ρυθμιστικό μείγμα $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1, κ.β.) και τα ελεύθερα στεροειδή εκχυλίστηκαν δύο φορές με 5 mL n-πεντανίου και ανακίνηση για 10 λεπτά. Σε κάθε στάδιο εκχύλισης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν, η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους σωλήνες και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου στους 50 °C. Τα TMS παράγωγα προετοιμάστηκαν με την προσθήκη 50 μL MSTFA/ NH_4I /2-PrSH (1.000:4:3, κ.ό./κ.β./κ.ό.) στο ξηρό υπόλειμμα. Το μείγμα επώαστηκε στους 80 °C για 30 λεπτά. Μετά την επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια (vials) με γυάλινα ένθετα (inserts) και 2 μL εγχύθηκαν στη συνέχεια απευθείας στο GC-MS/(MS).

4.4.2. Προετοιμασία δειγμάτων για την εκχύλιση των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης

Τα εναπομείναντα υπολείμματα ούρων από το στάδιο 4.4.1 εκχυλίστηκαν δύο φορές με 5 mL οξικού αιθυλεστέρα μέσω ανακίνησης για 10 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε κάθε στάδιο και η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε γυάλινους σωλήνες και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου στους 60 °C.

4.4.2.1. Ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες

Για την ανάλυση των μη παραγωγοποιημένων ακέραιων θεικών μεταβολιτών με LC-HRMS/(MS), τα δείγματα ανασυστάθηκαν με 120 μL ACN/ H_2O (20/80, κ.ό.). Τα ανασυσταμένα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 10.000 rpm. Στη συνέχεια, 100 μL του υπερκείμενου

υγρού μεταφέρθηκαν σε vials με inserts. Ποσότητα 10 μL εγχύθηκε στο όργανο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

4.4.2.2. TMS παράγωγα των ακέραιων θεικών μεταβολιτών

Η TMS-παραγωγοποίηση για GC-MS/(MS) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 50 μL MSTFA/ $\text{NH}_4\text{I}/2\text{-PrSH}$ (1.000:4:3, κ.ό./κ.β./κ.ό.) στο ξηρό υπόλειμμα. Το μείγμα επώαστηκε στους 80 °C για 30 λεπτά. Μετά την επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε vials με inserts και 2 μL του διαλύματος εγχύθηκαν στη συνέχεια απευθείας στο GC-MS/(MS).

4.4.2.3. CDI παράγωγα των ακέραιων θεικών μεταβολιτών

Για τα CDI παράγωγα, προστέθηκαν 100 μL ενός φρεσκοπαρασκευασμένου διαλύματος CDI (0,1M σε ξηρό διχλωρομεθάνιο), που περιείχε 0,5% (κ.β.) DMAP και 0,5% (κ.ό.) πυριδίνη, στα ξηρά υπολείμματα των δειγμάτων. Το μείγμα παραγωγοποίησης επώαστηκε στους 70 °C για 30 λεπτά. Μετά την επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα ανασυστάθηκαν σε 80 μL ACN και μεταφέρθηκαν σε vials με inserts. Ποσότητα 10 μL του διαλύματος εγχύθηκε στη συνέχεια απευθείας στο LC-HRMS/(MS).

4.5. Οργανολογία

4.5.1. LC-HRMS/(MS)

Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα Dionex UHPLC (Thermo Scientific, Βρέμη, Γερμανία). Το σύστημα αποτελούνταν από έναν απαερωτή κενού, μια δυαδική αντλία υψηλής πίεσης, έναν αυτόματο δειγματολήπτη με ελεγχόμενη θερμοκρασία δίσκου δειγμάτων, ρυθμισμένη στους 15°C και έναν φούρνο στήλης ρυθμισμένο στους 30°C. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε στους 30°C με τη χρήση μιας στήλης Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2,1 mm εσωτερική διάμετρος, μέγεθος σωματιδίων 1,8 μm Agilent Technologies). Η κινητή φάση αποτελούνταν από 5mM φορμικού αμμωνίου σε 0,02% φορμικό οξύ (Διαλύτης A) και ένα μείγμα ακετονιτριλίου:νερού (90:10, κ.ό.) που περιείχε 5 mM φορμικού αμμωνίου και 0,02% φορμικού οξέος (Διαλύτης B). Για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των διαφορετικών

ισομερών αναλυτών των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης, εφαρμόστηκε μια βαθμίδωση που ενσωμάτωνε ένα διπλό πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης, με τον Διαλύτη Β να ξεκινά από το 30% για 13 λεπτά, μετά να αυξάνεται στο 41% στα 13,5 λεπτά, όπου διατηρήθηκε σταθερός έως το 21ο λεπτό και στη συνέχεια αυξήθηκε στο 60% στα 26 λεπτά και στο 100% στα 28 λεπτά, όπου παρέμεινε έως το 31ο λεπτό. Ο Διαλύτης Β επανήλθε στο 30% στα 31,5 λεπτά και εξισορροπήθηκε για 3,5 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ και ο συνολικός χρωματογραφικός χρόνος ήταν 35 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL . Η βαλβίδα εκτροπής προγραμματίστηκε να στέλνει το έκλουσμα της LC στα απόβλητα για τα πρώτα 5 λεπτά. Το χρωματογραφικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των CDI παραγωγοποιημένων ακέραιων θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης ξεκίνησε με τον Διαλύτη Β στο 65%, αυξανόμενος στο 70% στα 4 λεπτά, στη συνέχεια στο 80% στα 8 λεπτά και στο 100% στα 11 λεπτά, όπου διατηρήθηκε σταθερός έως το 16ο λεπτό. Η βαθμίδωση επανήλθε στο 65% στα 16,5 λεπτά και εξισορροπήθηκε για 3,5 λεπτά. Ο ρυθμός ροής ήταν και πάλι $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ και ο συνολικός χρωματογραφικός χρόνος ήταν 20 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL . Η βαλβίδα εκτροπής προγραμματίστηκε να στέλνει το έκλουσμα της LC στα απόβλητα για τα πρώτα 5 λεπτά.

Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ένα επιτραπέζιο φασματόμετρο μάζας QExactive βασισμένο σε τεχνολογία Orbitrap (Thermo Scientific, Βρέμη, Γερμανία), το οποίο λειτούργησε σε κατάσταση αρνητικών ιονισμού και ήταν εξοπλισμένο με πηγή θερμαινόμενου ηλεκτροψεκασμού (HESI). Οι παράμετροι της πηγής ήταν: ρυθμός ροής αερίου περιβλήματος (άζωτο), ρυθμός ροής βοηθητικού αερίου (άζωτο) και ρυθμός ροής αερίου σάρωσης, 40, 10 και 1 αυθαίρετες μονάδες αντίστοιχα και θερμοκρασία τριχοειδούς 30°C , θερμοκρασία θερμαντήρα ESI 30°C , τάση ψεκασμού 4,0 kV. Τα πειράματα πλήρους σάρωσης (full scan) διεξήχθησαν σε εύρος m/z 50–750 με ανάλυση 17.500 πλήρους εύρους στο μισό του μέγιστου (FWHM) και χρόνο έγχυσης 100 ms. Επιπλέον πειράματα MS/MS διεξήχθησαν με ανάλυση 17.500 FWHM και χρόνο έγχυσης 100 ms σε λειτουργία παρακολούθησης παράλληλων αντιδράσεων (PRM). Ο αυτόματος έλεγχος ενίσχυσης (AGC) ρυθμίστηκε στα $3e^6$ ιόντα. Για την ανίχνευση των ακέραιων θεικών μεταβολιτών, τα δείγματα αναλύθηκαν σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Τα πρόδρομα ιόντα στα m/z 385.2049 και 367.1943 απομονώθηκαν με παράθυρο απομόνωσης $m/z = 1$. Για την

ανίχνευση των CDI παραγώγων των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης, τα δείγματα αναλύθηκαν σε δύο διαδοχικές σειρές (runs)· η πρώτη σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού όπου τα πρόδρομα ιόντα στα m/z 479.2216 και 367.1943 απομονώθηκαν με παράθυρο απομόνωσης $m/z = 1$ και η δεύτερη σειρά σε λειτουργία θετικού ιονισμού, όπου το πρόδρομο ιόν στα m/z 271.2426 απομονώθηκε με παράθυρο απομόνωσης $m/z = 1$. Η βαθμονόμηση μάζας (mass calibration) του Orbitrap αξιολογούνταν τόσο σε θετική όσο και σε αρνητική λειτουργία εβδομαδιαίως και η εξωτερική βαθμονόμηση πραγματοποιούνταν πριν από τη χρήση σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

4.5.2. GC-MS/(MS)

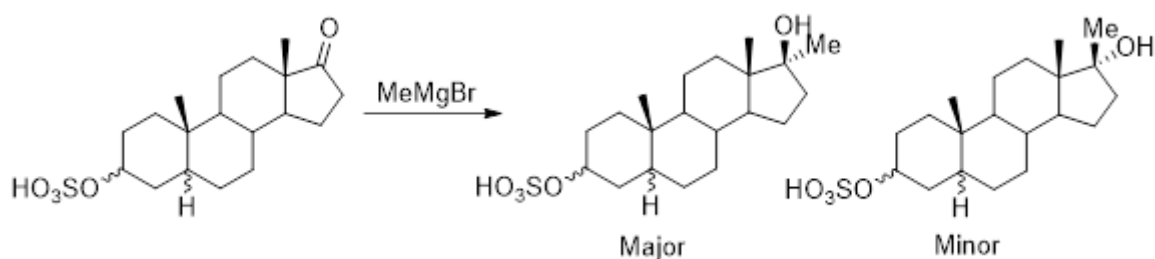
Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα Trace 1610 GC (Thermo Scientific, Βρέμη, Γερμανία), σε συνδυασμό με έναν επιλεκτικό ανιχνευτή μάζας τριπλού τετραπόλου TSQ9610 (Thermo Scientific, Βρέμη, Γερμανία), εξοπλισμένο με προηγμένη πηγή ιονισμού ηλεκτρονίων. Το σύστημα ήταν εξοπλισμένο με στήλη SGE BPX5 (μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρος 0,25 mm, πάχος φιλμ 0,1 μm). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο με σταθερό ρυθμό ροής 1,65 mL min^{-1} . Ποσότητα 2 μL του δείγματος εγχύθηκε με διαχωρισμό ροής (split mode, 10:1). Οι θερμοκρασίες της θύρας έγχυσης και της διεπαφής (interface) ρυθμίστηκαν στους 280°C. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίστηκε στους 160°C, αυξήθηκε με ρυθμό 10°C min^{-1} έως τους 200°C, στη συνέχεια με 2°C έως τους 220°C, με 6°C min^{-1} έως τους 263°C και τελικά με 50°C min^{-1} έως τους 310°C, όπου διατηρήθηκε για 1,6 λεπτά. Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε αργό σε πίεση 4 bar. Ο φασματογράφος μάζας (MS) προγραμματίστηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM).

4.6. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.6.1. Σύνθεση μικροκλίμακας των θεικών μεταβολιτών της MT

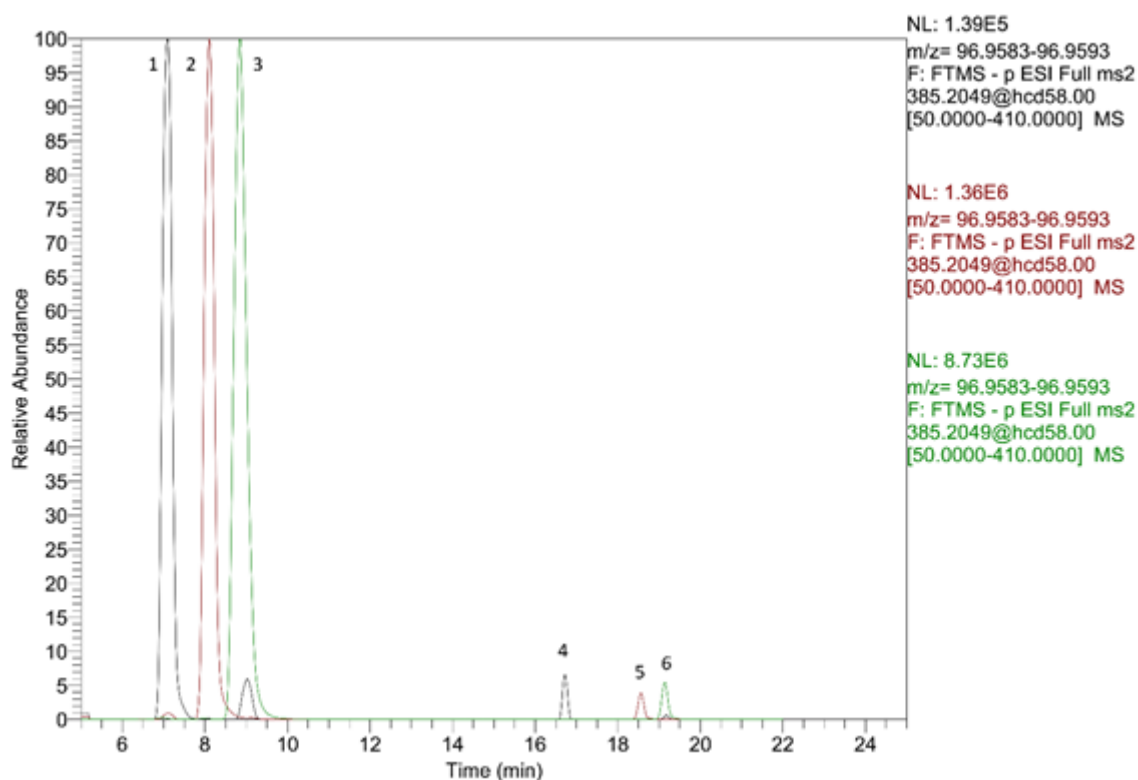
Η ανάλυση των ελεύθερων και γλυκουρονιδικών κλασμάτων δειγμάτων μετά από χορήγηση από μελέτες απέκκρισης της MT (Angelis et al., 2023a) αποκάλυψε την παρουσία της επιμερούς 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης και της 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλης, καθώς και των 17,17-διμεθυλο-18-νορ-ανδροστ-13-ενικών αναλόγων τους, επιπλέον των γνωστών μεταβολιτών 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-

διόλης και 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης. Τα θεικά ανάλογα αυτών των επιμερών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης έχουν αναφερθεί στο θεικό κλάσμα και θεωρούνται μακροχρόνιοι μεταβολίτες για την παρακολούθηση της κατάχρησης μεθυλοτεστοστερόνης στο πλαίσιο του ελέγχου αντιντόπινγκ στον αθλητισμό (Gómez et al., 2013). Με βάση τη μακροχρόνια ανιχνευσιμότητα αυτών των μεταβολιτών (Gómez et al., 2013) και τον μηχανισμό αντίδρασης που οδηγεί ταυτόχρονα στην επιμερείωση των 17-υδροξυ-17μεθυλο ομάδων των στεροειδών και στα προϊόντα μετάθεσης Wagner-Meerwein που οδηγούν στους 17,17-διμεθυλο-18-νορ-ανδροστ-13-ενικούς μεταβολίτες (Schänzer et al., 1992), η στοχευμένη διερεύνηση δειγμάτων μετά από χορήγηση διεξήχθη περαιτέρω στο θεικό κλάσμα για αυτούς τους μεταβολίτες. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σύνθεση σε μικροκλίμακα των θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης μέσω αντίδρασης Grignard της θεικής ανδροστερόνης, της θεικής ετιοχολανολόνης και της θεικής επιανδροστερόνης με μεθυλομαγνησιοβρωμίδιο, χρησιμοποιώντας ένα προηγουμένως αναπτυγμένο πρωτόκολλο (Sakellariou et al., 2020; Steff et al., 2022). Η αντίδραση προχώρησε σε όλες τις περιπτώσεις με υψηλή εκλεκτικότητα, αποδίδοντας πάνω από 95% για το 17α-μεθυλο ισομερές, ενώ το υπόλοιπο προϊόν ήταν το 17β-μεθυλο στεροειδές. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα, όπου το μεθυλομαγνησιοβρωμίδιο προστέθηκε υπό προσεκτικά ελεγχόμενες άνυδρες συνθήκες σε χαμηλή θερμοκρασία και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθούνταν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), τα προϊόντα της αντίδρασης που ανακτήθηκαν ήταν αποκλειστικά οι ελεύθερες μορφές των αντίστοιχων 17-μεθυλιωμένων στεροειδών.



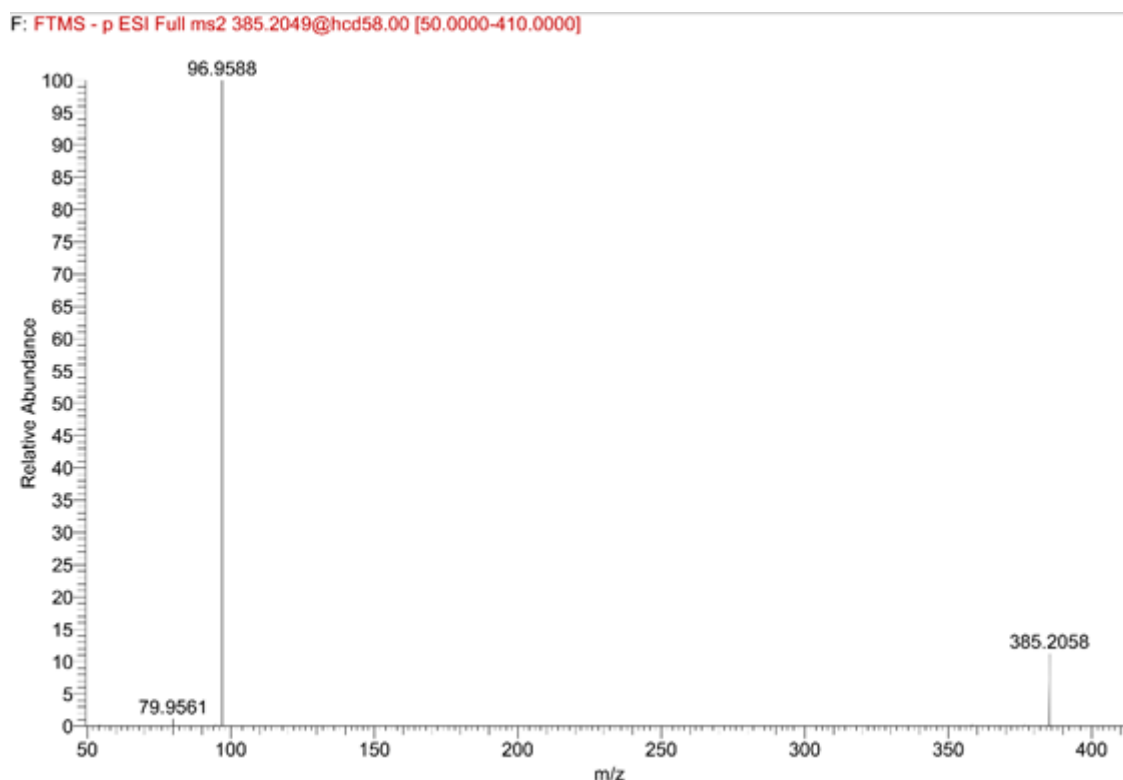
Σχήμα 2. Γενική πορεία σύνθεσης των θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης.

Η σύνθεση των επιθυμητών προϊόντων επιτεύχθηκε με τη γρήγορη προσθήκη του αντιδραστηρίου Grignard σε θερμοκρασία δωματίου, η οποία διακόπηκε αμέσως με την προσθήκη στάγδην, διαλύματος NaOH 0,1M, προσομοιώνοντας συνθήκες τιτλοδότησης. Υπό αυτές τις συνθήκες, ανακτήθηκαν οι ελεύθερες και οι συζευγμένες θεικές μορφές των 17-μεθυλιωμένων-ανδροστανικών διολών, καθώς και μικρές ποσότητες κετο-στεροειδών που δεν αντέδρασαν. Τα ελεύθερα στεροειδή εκχυλίστηκαν με n-πεντάνιο και απορρίφθηκαν, ενώ το μείγμα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα παραχθέντα μείγματα θεικής 3 α -υδροξυ-17-μεθυλο-τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης-3 α , αναλύθηκαν με LC-HRMS σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα εξαγόμενων ιόντων παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.



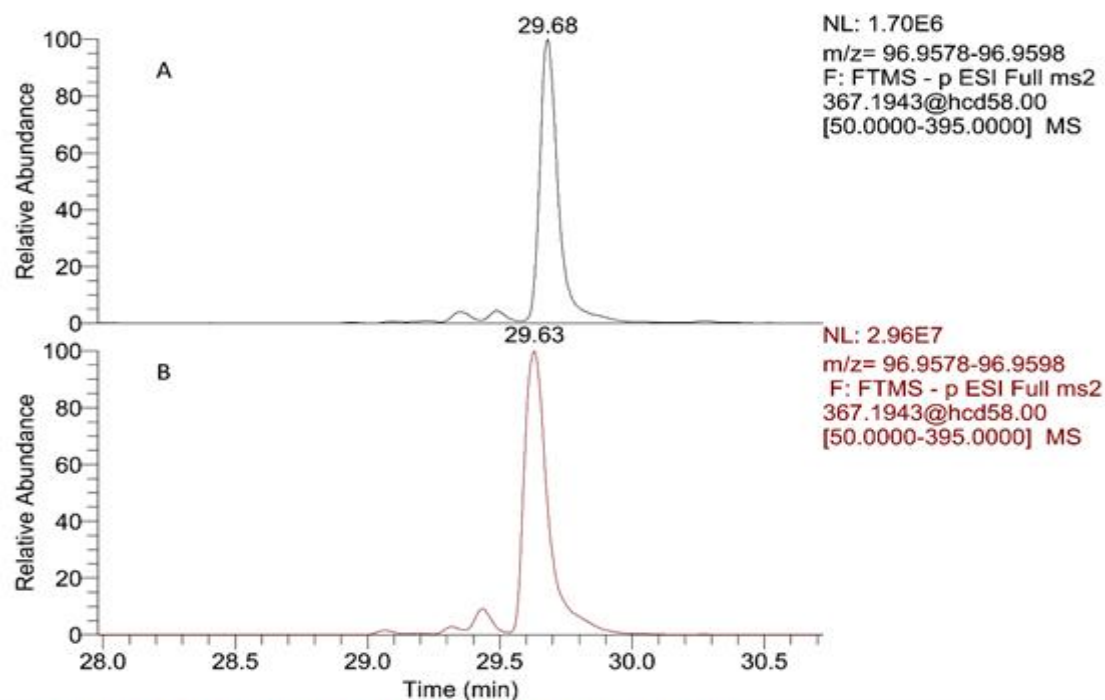
Σχήμα 3. Επικαλυπτόμενα ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης σε m/z 385.2049 > 96.9588 των συντεθειμένων: 3 β -θειική-17 α -μεθυλο-5 α -ανδροστανική-3 β ,17 β -διόλη (M1_S_I, κορυφή 1), 3 α -θειική-17 α -μεθυλο-5 α -ανδροστανική-3 α ,17 β -διόλη (M2_S_I, κορυφή 2), 3 α -θειική-17 α -μεθυλο-5 β -ανδροστανική-3 α ,17 β -διόλη (M3_S_I, κορυφή 3), 3 β -θειική-17 β -μεθυλο-5 α -ανδροστανική-3 β ,17 α -διόλη (M4_S_I, κορυφή 4), 3 α -θειική-17 β -μεθυλο-5 α -ανδροστανική-3 α ,17 α -διόλη (M5_S_I, κορυφή 5) και 3 α -θειική-17 β -μεθυλο-5 β -ανδροστανική-3 α ,17 α -διόλη (M6_S_I, κορυφή 6).

Τα δεδομένα της πλήρους σάρωσης (full scan) και των φασμάτων μάζας των ιόντων τους σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού, ήταν πανομοιότυπα για όλους τους έξι πιθανούς μεταβολίτες της MT υπό συνθήκες διάσπασης προκαλούμενης από σύγκρουση (CID) για την επιλεγμένη ενέργεια σύγκρουσης. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.

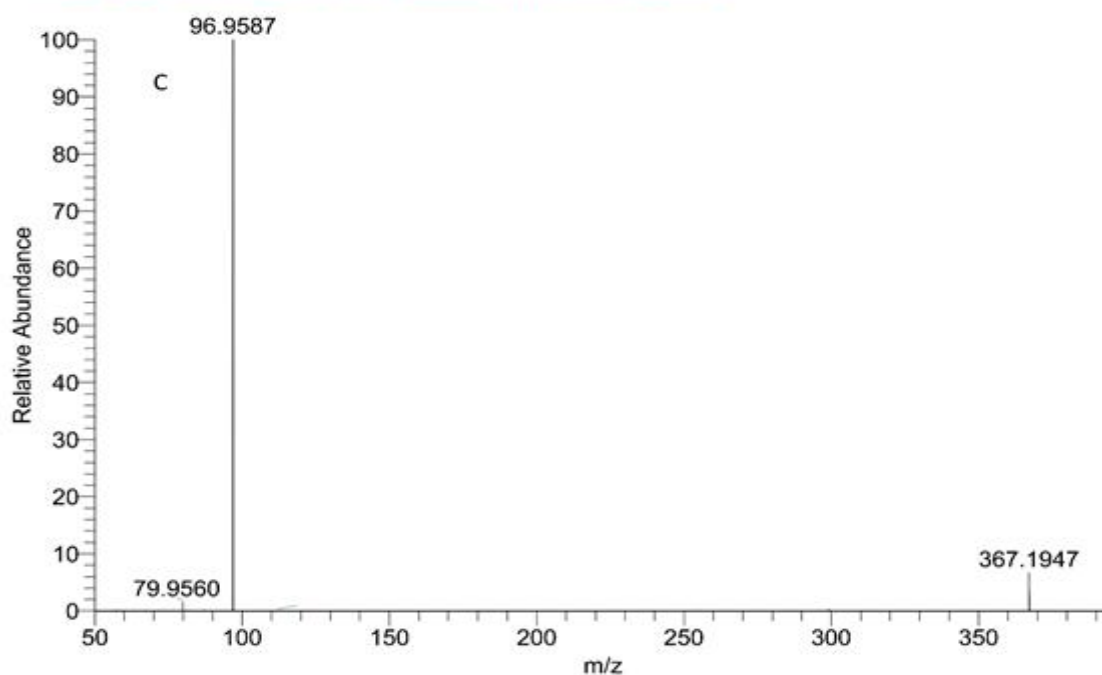


Σχήμα 4. Φάσμα ιόντων της συνθετικής 3α-θεικής-17α-μεθυλο-5β-ανδροστανικής-3α,17β-διόλης (M3_S_I).

Τα προϊόντα μετάθεσης Wagner-Meerwein παρήχθησαν μέσω όξινης κατεργασίας των ανωτέρω ενώσεων, όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2. Η χρωματογραφική ανάλυση του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7_S_I) και του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_I) ήταν ανεπαρκής, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5, μετά από ανάλυση με τη χρωματογραφική βαθμίδωση. Τα παραγόμενα φάσματα ιόντων αυτών των ισομερών ήταν επίσης σχεδόν πανομοιότυπα και το αντιπροσωπευτικό φάσμα του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_I) παρουσιάζεται στο Σχήμα 5C.

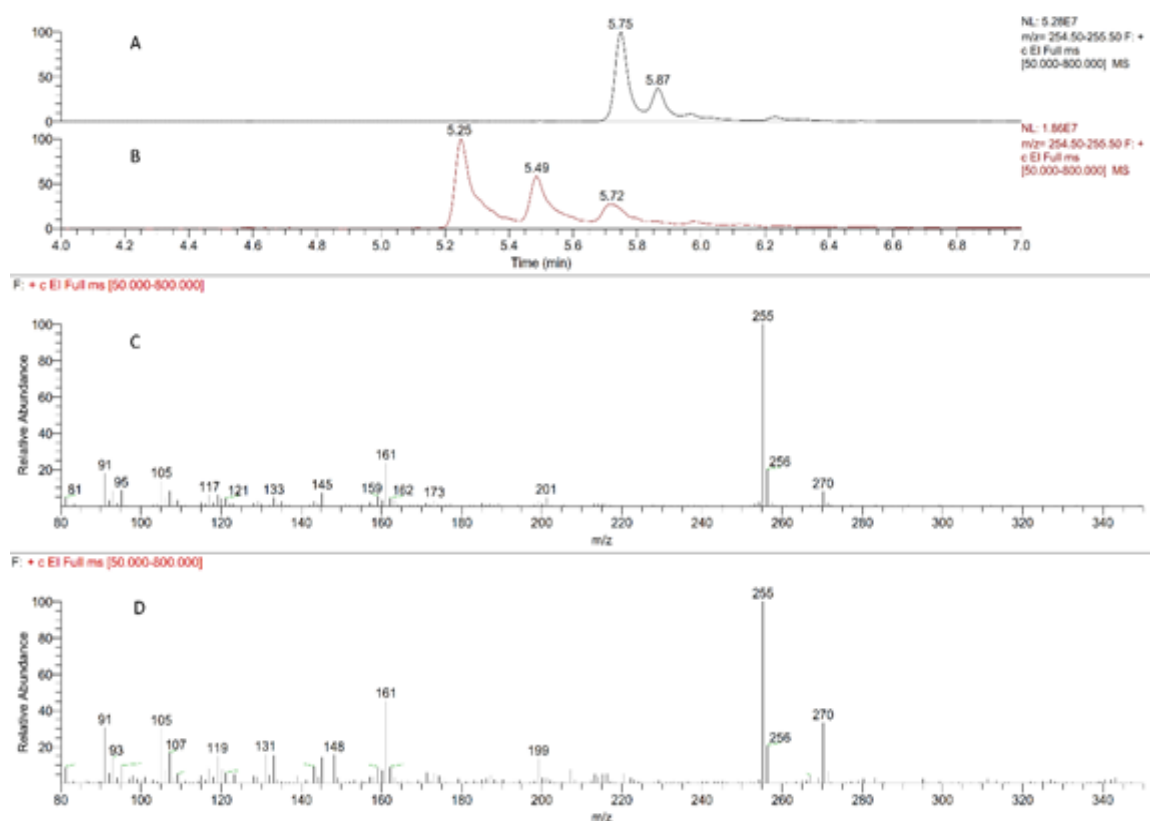


F: FTMS - p ESI Full ms2 367.1943@hcd58.00 [50.0000-395.0000]



Σχήμα 5. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης σε m/z 367.1943 > 96.9588 των συνθετικών Α) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_I) και Β) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7_S_I). C) Φάσμα ιόντων του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_I).

Ο δομικός προσδιορισμός των αντίστοιχων μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα μετά από χορήγηση (παρακαλώ δείτε 3.2, 3.4), βασίστηκε στη συμπεριφορά τους στο GC-MS/(MS), όπου το αποθειωμένο τεχνικό προϊόν του 5α ισομερούς, παράγει μια διπλή κορυφή (double peak), ενώ το 5β ισομερές παράγει πολλαπλές κορυφές (multiple peaks). Τα ιοντικά χρωματογραφήματα για το m/z 255 αυτών των συνθετικών προτύπων, μαζί με τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσής τους, παρουσιάζονται στο Σχήμα 6. Τόσο ο αριθμός των παραγόμενων κορυφών όσο και η σειρά έκλουσής τους ήταν σε συμφωνία με τα μη αφυδατωμένα ανάλογά τους. (Albertsdóttir et al., 2023a; Albertsdóttir et al., 2023b)

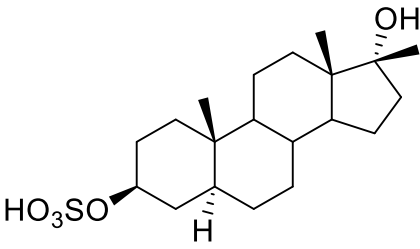
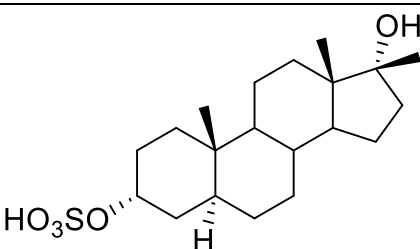
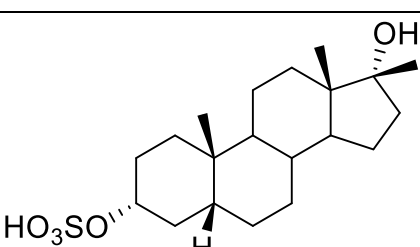
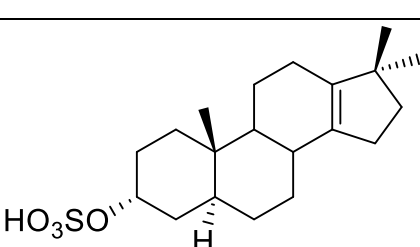
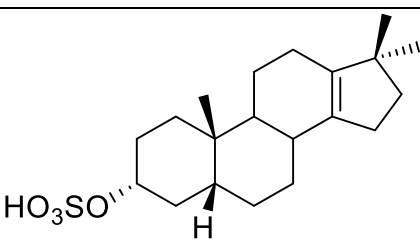


Σχήμα 6. Ιοντικά Χρωματογραφήματα για το m/z 255 των συνθετικών προτύπων Α) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7_S_TMS) και Β) 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8_S_TMS). Φάσματα ιόντων πλήρους σάρωσης με αφαίρεση υποβάθρου των συνθετικών C) M7_S_TMS (χρόνος κατακράτησης 5.75 min) και D) M8_S_TMS (χρόνος κατακράτησης 5.25 min).

4.6.2.Ανάλυση LC-HRMS/(MS) των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της MT

Όλα τα δείγματα από τις δύο διαφορετικές μελέτες απέκκρισης αναλύθηκαν στοχευμένα για τους συνθετικούς πιθανούς ακέραιους θεικούς μεταβολίτες της MT με LC-HRMS/(MS) σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan) και PRM αρνητικών ιόντων (**Angelis et al., 2023a**). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαίωσαν προηγουμένως δημοσιευμένα αποτελέσματα και παρείχαν άμεση πειραματική απόδειξη για τον δομικό προσδιορισμό των θεικών μεταβολιτών της MT (**Gómez et al., 2013**). Οι υπό εξέταση μεταβολίτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η κωδικοποίηση των μεταβολιτών ακολουθεί τη σειρά έκλουσής τους στο LC-HRMS/(MS), όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3 (**Albertsdóttir et al., 2023a**).

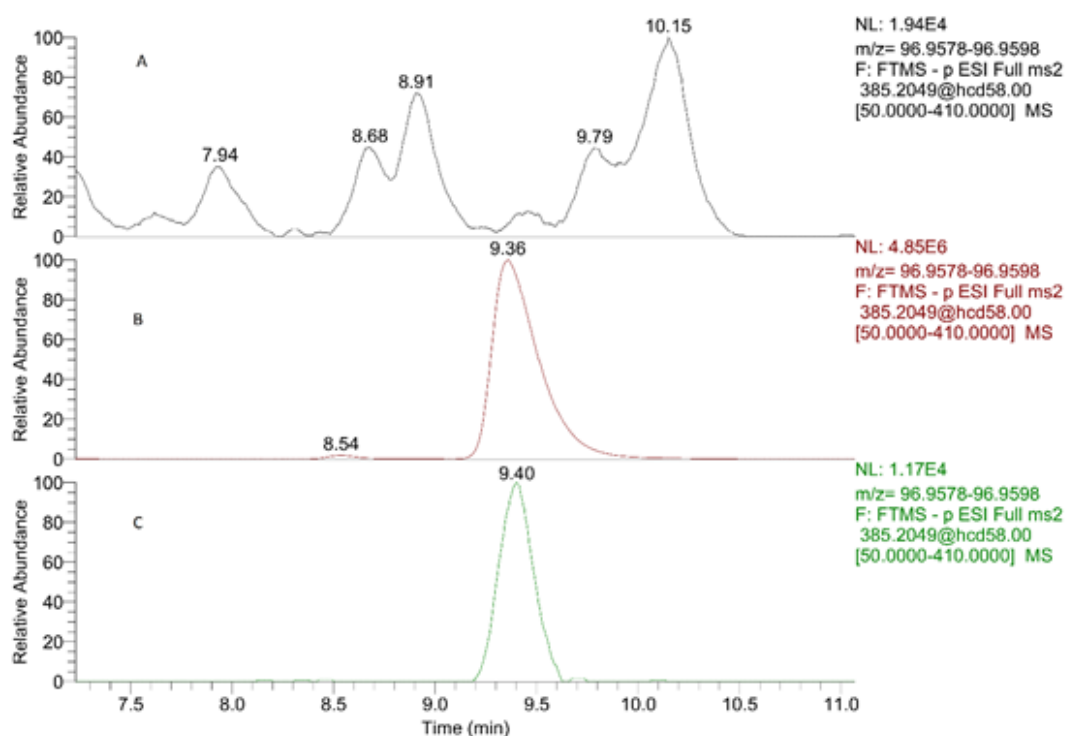
Ουσία	Δομή	Rt* (min)	[M-H] ⁻ (m/z)
3β-θεική-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3β,17β-διόλη (M1_S_I)		6.93	385.2049
3α-θεική-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3α,17β-διόλη (M2_S_I)		8.56	385.2049
3α-θεική-17α-μεθυλο-5β-ανδροστανική-3α,17β-διόλη (M3_S_I)		9.40	385.2049

3β-θεική-17β- μεθυλο-5α- ανδροστανική- 3β,17α-διόλη (M4_S_I)		18.1	385.2049
3α-θεική-17β- μεθυλο-5α- ανδροστανική- 3α,17α-διόλη (M5_S_I)		20.7	385.2049
3α-θεική-17β- μεθυλο-5β- ανδροστανική- 3α,17α-διόλη (M6_S_I)		21.3	385.2049
3α-θεικό 17,17- διμεθυλο-18-νορ- 5α-ανδροστ-13- ένιο (M7_S_I)		29.63	367.1943
3α-θεικό 17,17- διμεθυλο-18-νορ- 5β-ανδροστ-13- ένιο (M8_S_I)		29.68	367.1943

Πίνακας 1. Εξεταζόμενοι ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες της MT με LC-HRMS/(MS)

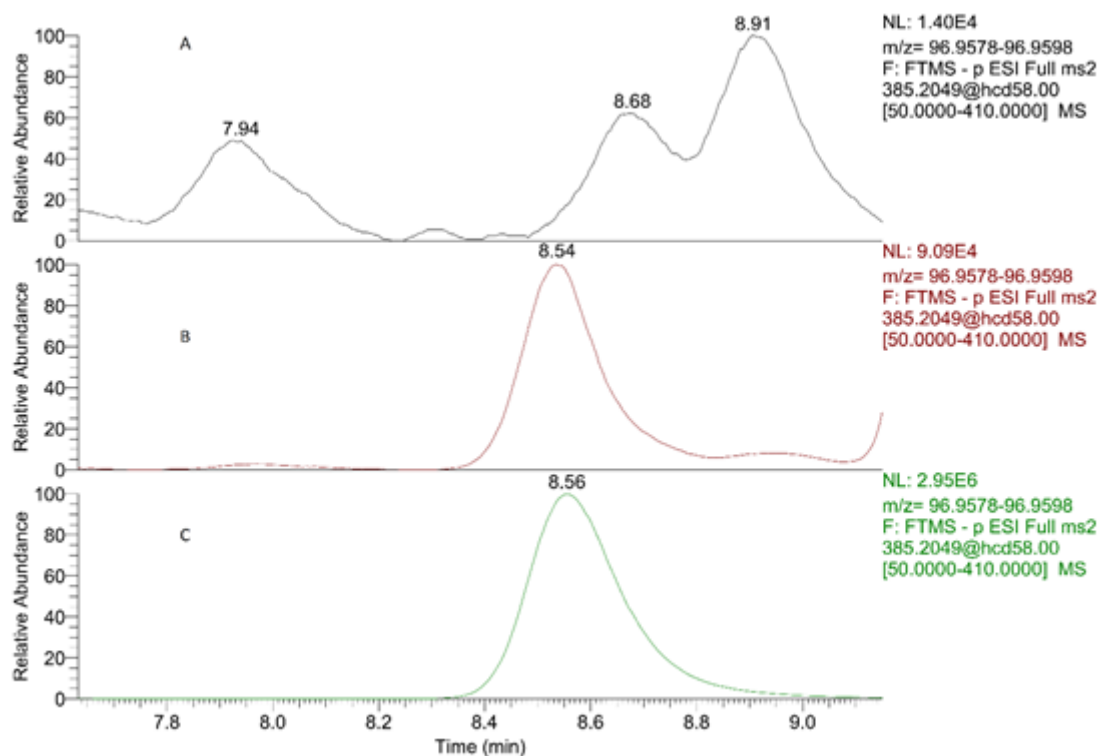
*Παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση των χρόνων κατακράτησης (Rt) σε σύγκριση με εκείνους που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Πειράματα συνέγχυσης (co-injection) επιβεβαίωσαν τη σωστή αντιστοίχιση των κορυφών που ανιχνεύθηκαν.

Πιο αναλυτικά, η 3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη (M3_S_I) ανιχνεύθηκε ως ο πιο άφθονος μεταβολίτης στο θεικό κλάσμα και στις δύο μεταβολικές μελέτες, σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα (Gómez et al., 2013; Sun et al., 2024) και ευρήματα στο κλάσμα των γλυκουρονιδίων (Angelis et al., 2023a). Αντιπροσωπευτικά ιοντικά χρωματογραφήματα, παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.



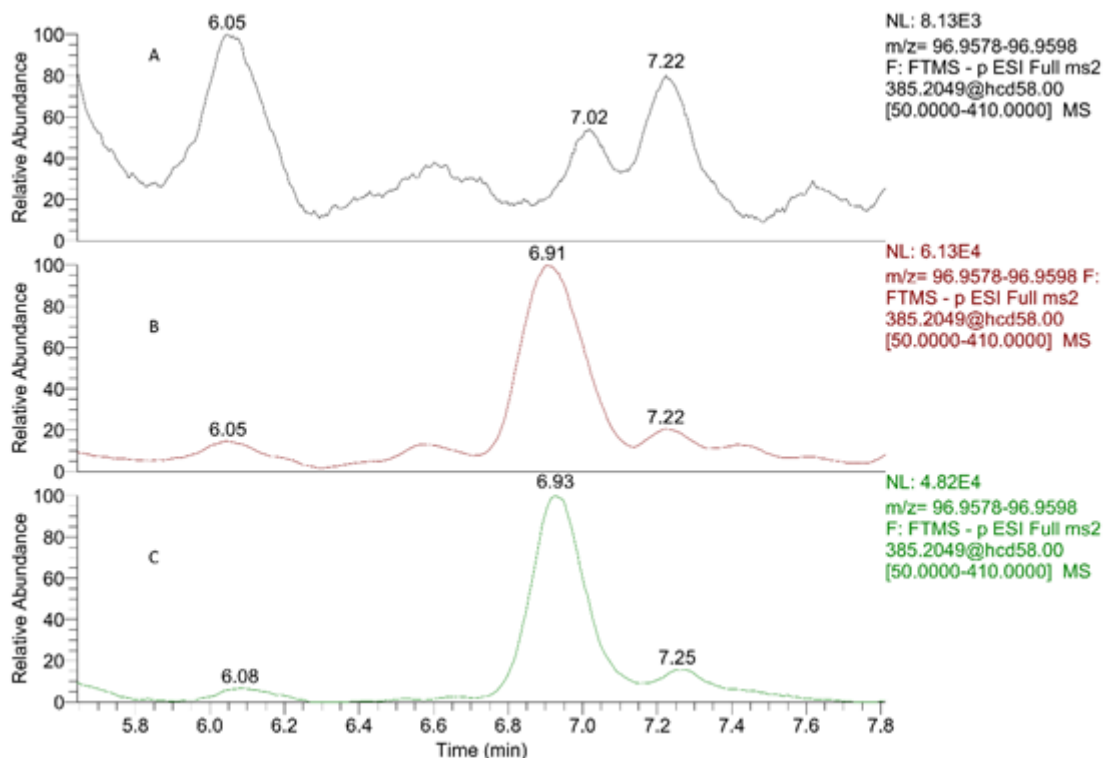
Σχήμα 7. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση και C) συνθετικό πρότυπο.

Η 3α-θεική 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3α,17β-διόλη (M2-S-I), ανιχνεύθηκε επίσης στα δείγματα μετά από χορήγηση και από τις δύο μελέτες απέκκρισης, αλλά σε πολύ χαμηλότερες ποσότητες, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.



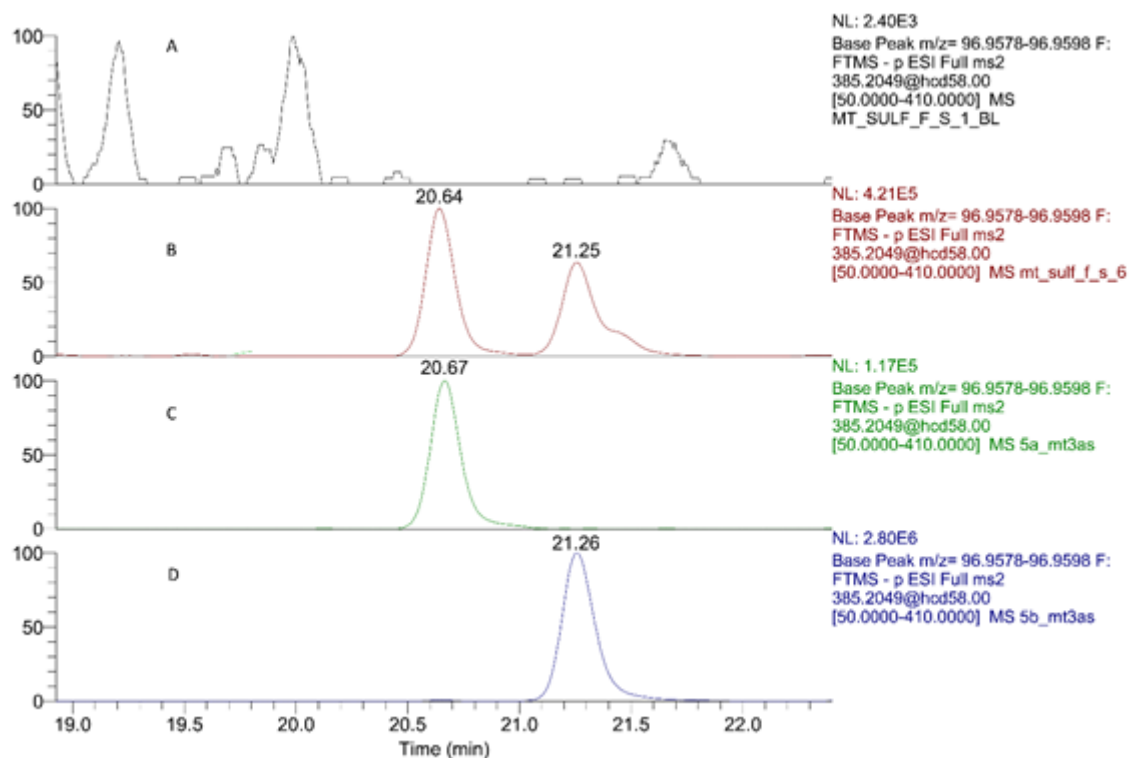
Σχήμα 8. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M2-S-I) σε Α) τυφλό δείγμα, Β) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση και C) συνθετικό πρότυπο.

Η 3β-θεική-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3β,17β-διόλη (M1-S-I) ανιχνεύθηκε επίσης σε χαμηλές ποσότητες, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 9. Εξ όσων γνωρίζουμε, η ανίχνευσή του στο θεικό κλάσμα της MT παρουσιάζεται για πρώτη φορά.



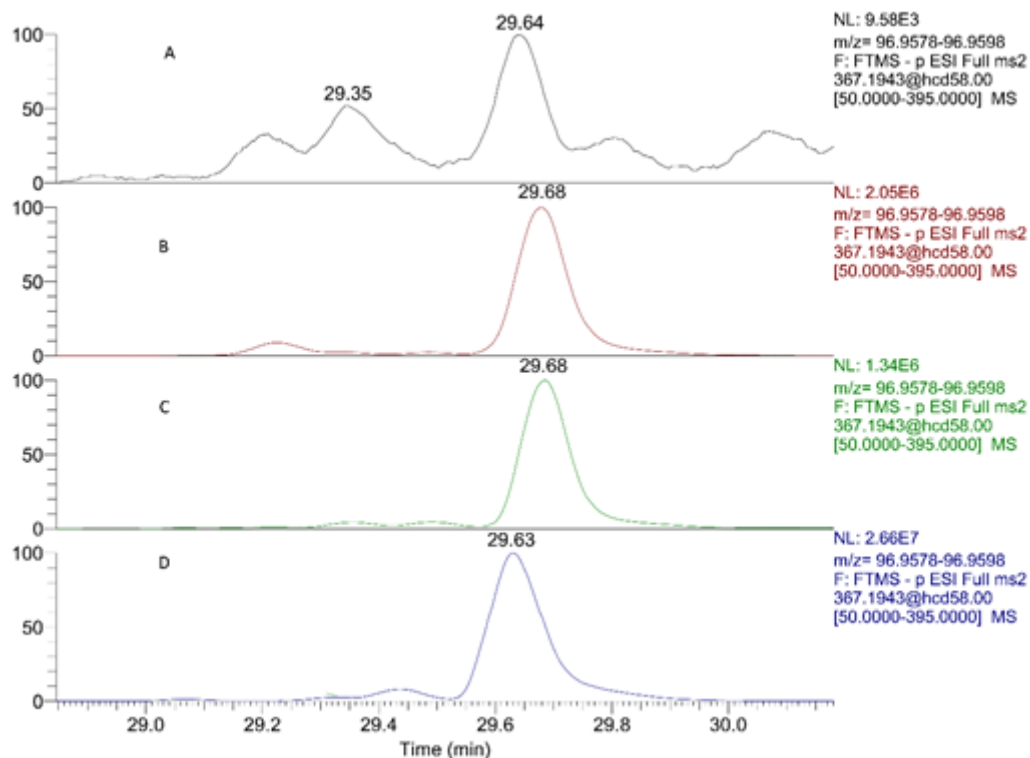
Σχήμα 9. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3β-θεικής-17α-μεθυλο-5α-ανδροστανικής-3β,17β-διόλης (M1-S-I) σε A) τυφλό δείγμα, B) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση και C) συνθετικό πρότυπο.

Οι επιμερείς μεταβολίτες 3α-θεική-17β-μεθυλο-5α-ανδροστανική-3α,17α-διόλη (M5-S-I) και 3α-θεική-17β-μεθυλο-5β-ανδροστανική-3α,17α-διόλη (M6-S-I) ανιχνεύθηκαν, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 10, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα των Gomez et al. (Gómez et al., 2013).



Σχήμα 10. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 385.2049 > 96.9588 της 3α-θεικής-17β-μεθυλο-5α-ανδροστανικής-3α,17α-διόλης (M5-S-I) και 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανικής-3α,17α-διόλης (M6-S-I) σε A) τυφλό δείγμα, B) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση, C) συνθετικό πρότυπο του M5-S-I και D) συνθετικό πρότυπο του M6-S-I.

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 11, ανιχνεύθηκαν επίσης μεταβολίτες με δομή 17,17-διμεθυλο-18-νορ-Δ13 (M7-S-I ή M8-S-I). Ωστόσο, η παρουσία μιας μικρής ενδογενούς παρεμβολής και ο φτωχός χρωματογραφικός διαχωρισμός μεταξύ των 5α και 5β μεταβολιτών, δεν επέτρεψαν τη χωρίς αμφιβολία αντιστοίχιση των εκκρινόμενων μεταβολιτών αποκλειστικά μέσω της ανάλυσης LC- HRMS/(MS), καθώς τα πειράματα συνέγχυσης (co-injection) κατέληξαν σε μια ενιαία κορυφή και στις δύο περιπτώσεις.



Σχήμα 11. Ιοντικά χρωματογραφήματα της μετάπτωσης m/z 367.1943 $\rightarrow$ 96.9588 του 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ενίου (M7-S-I) και 3α-θεικού 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5β-ανδροστ-13-ενίου (M8-S-I) σε A) τυφλό δείγμα, B) δείγμα που συλλέχθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση, C) συνθετικό πρότυπο του M7-S-I και D) συνθετικό πρότυπο του M8-S-I.

Όσον αφορά στα παράθυρα ανίχνευσης, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των Gomez et al., με την 3α-θεική 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλη (M5-S-I) και την 3α-θεική 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλη (M6-S-I), να είναι ανιχνεύσιμες μέχρι το τελικό συλλεχθέν δείγμα και στις δύο μελέτες απέκκρισης. Ωστόσο, ο λόγος σήματος προς θόρυβο ήταν σημαντικά υψηλότερος για την πρώτη.

4.6.3. Ανάλυση LC-HRMS/(MS) των CDI παραγώγων των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της MT

Η ανάλυση των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της MT με LC-MS/(MS) αποδείχθηκε ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης (M5-S-I) και σε μικρότερο βαθμό, του 5β αντίστοιχου της (M6-S-I), μέχρι το τέλος και των δύο μελετών απέκκρισης. Ωστόσο, τα φάσματα ιόντων αυτών των

στεροειδών είναι φτωχά και παρέχουν περιορισμένες πληροφορίες για τη δομή του στεροειδούς, καθώς τα ιόντα αυτά σχετίζονται συνήθως αποκλειστικά με τη σύζευξη της θεικής ομάδας, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3 (Gómez et al., 2013; Albertsdóttir et al., 2023a; Kiouisi et al., 2021). Κατά συνέπεια, η ταυτοποίηση αυτών των στεροειδών μεταβολιτών βασίζεται επί του παρόντος κυρίως στο GC-MS/(MS) (Gómez et al., 2013). Για την ταυτοποίηση ορισμένων θεικών μεταβολιτών οξο-στεροειδών με LC-MS/(HRMS) σε λειτουργία θετικού ιονισμού, η χημική παραγωγοποίηση με το αντιδραστήριο Girard T αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματική (Kiouisi et al., 2021; Angelis et al., 2023b). Ως εκ τούτου, σχεδιάστηκε η επέκταση της στρατηγικής της χημικής παραγωγοποίησης στον πλήρως κορεσμένο θεικό μεταβολίτη της 17α-μεθυλοτεστοστερόνης. Η παραγωγοποίηση σε αυτή την περίπτωση μπορεί να εφαρμοστεί μόνο στην ελεύθερη 17-υδροξυλομάδα του στεροειδούς, η οποία είναι μια στερεοχημικά παρεμποδισμένη θέση (Athanasiadou et al., 2013; Wong et al., 2012). Υιοθετήθηκε μια τροποποίηση του πρωτοκόλλου παραγωγοποίησης που εφαρμόζεται για υδροξυλιωμένα ελεύθερα στεροειδή με το αντιδραστήριο καρβονυλοδιιμιδαζολίου CDI, το οποίο μετατρέπει τις υδροξυλομάδες σε παράγωγα καρβαμιδικής ιμιδαζόλης (Fragkaki et al., 2020; Velosa et al., 2022; Guo et al., 2019). Αυτή η διαδικασία παραγωγοποίησης είναι απλή, ενισχύει σημαντικά την αποτελεσματικότητα ιονισμού ενώσεων χαμηλού ιονισμού, όπως τα στεροειδή σε λειτουργία θετικού ιονισμού και παρουσιάζει πλούσια φάσματα ιόντων υψηλής διαγνωστικής αξίας (Fragkaki et al., 2020; Velosa et al., 2022).

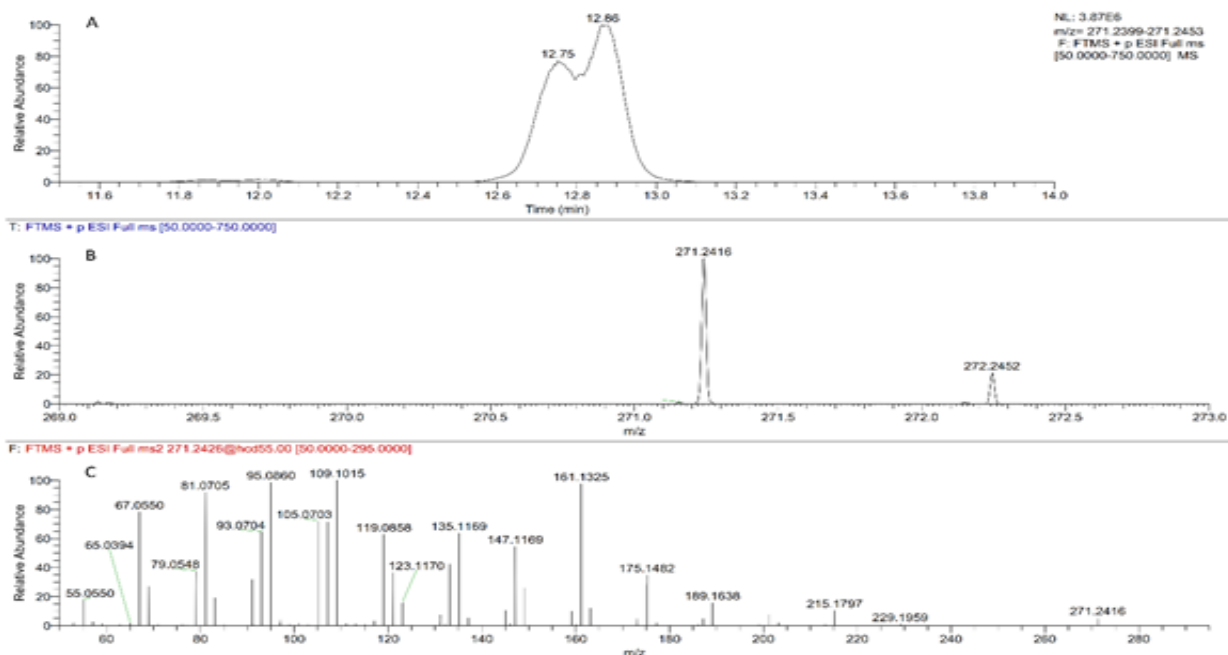
Πιο συγκεκριμένα, η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας CDI παραγώνων, στην περίπτωση των 17-μεθυλιωμένων στεροειδών, εξαρτάται από τις συνθήκες υπό τις οποίες διεξάγεται η παραγωγοποίηση. Έτσι, ενώ η 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη θα μπορούσε να ανιχνευθεί ως μονο-CDI παράγωγο, το δι-CDI (bis-CDI) παράγωγο, θα μπορούσε να ανακτηθεί σε απόδοση υψηλότερη από 90% χρησιμοποιώντας έναν μικρό όγκο πυριδίνης (0,5% κ.ό.) και DMAP (0,5% κ.β.) σε διάλυμα CDI σε έναν ελαφρύ διαλύτη όπως το διχλωρομεθάνιο μετά από επώαση στους 70 °C για 30 λεπτά. Το διχλωρομεθάνιο αφέθηκε να εξατμιστεί κατά τη διάρκεια της παραγωγοποίησης και η χρήση της πυριδίνης ήταν κρίσιμη για την πρόληψη της αφυδάτωσης της 17β-υδροξυλομάδας, η οποία συμβαίνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Αυτές οι συγκεκριμένες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν για τα παράγωγα των ακέραιων θεικών συζευγμάτων των

μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης. Οι υπό εξέταση μεταβολίτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Substance	Structure	Rt (min)	Precursor ion (m/z)
3α-θεική 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλη-καρβονυλοδιμιδαζολική (M2_S_CDI)		12.7	a) 271.2426 b) 479.2216
3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη-καρβονυλοδιμιδαζολική (M3_S_CDI)		12.8	a) 271.2426 b) 479.2216

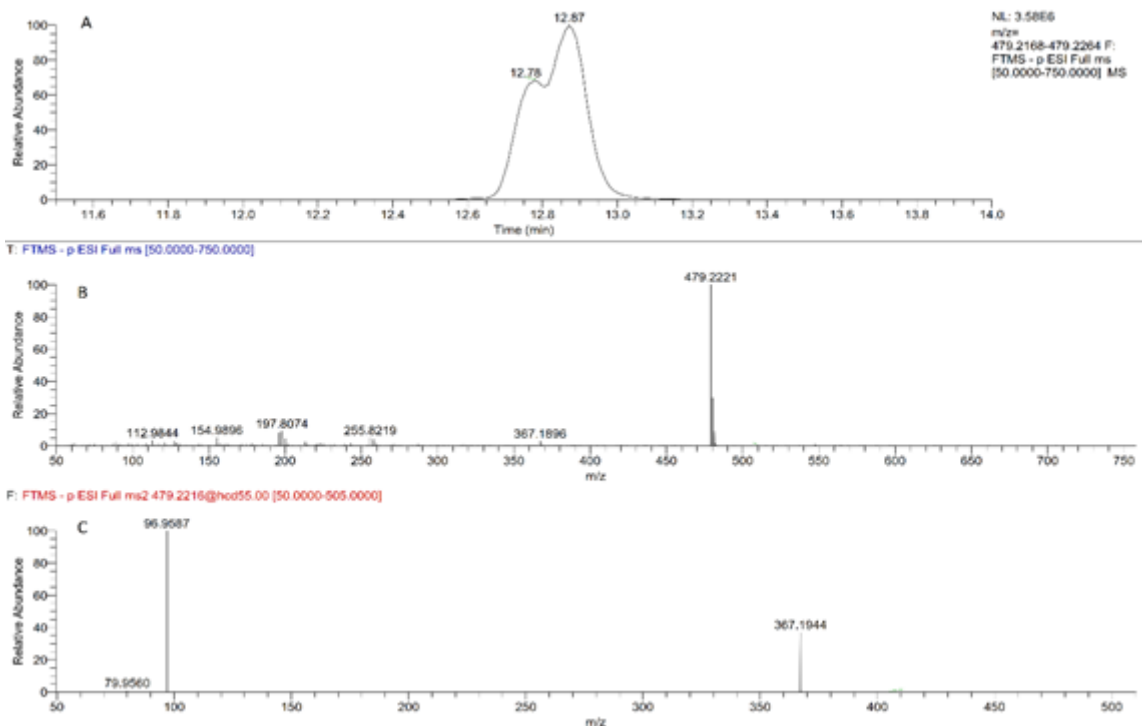
Πίνακας 2. Εξεταζόμενοι ακέραιοι θεικοί μεταβολίτες της MT ως CDI παράγωγα με LC-HRMS/(MS) σε λειτουργία (a) θετικού και (b) αρνητικού ιονισμού.

Τα καρβονυλοδιμιδαζολικά παράγωγα της ακέραιης 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης, εμφανίζουν πανομοιότυπη συμπεριφορά μετά από ανάλυση με LC-HRMS/(MS). Μετά από ανάλυση πλήρους σάρωσης (full scan) σε λειτουργία θετικού ιονισμού, τα μόνα σήματα που ανιχνεύθηκαν ήταν για το ιόν με m/z 271.2426, το οποίο αντιστοιχεί στο καθαρό στεροειδές τμήμα, όπου τόσο η ομάδα παραγώγου όσο και το θεικό τμήμα έχουν εξαλειφθεί κατά τη διάρκεια του ESI, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 12. Το φάσμα ιόντων που χρησιμοποιεί το m/z 271.2426 ως πρόδρομο ιόν, είναι τυπικό για στεροειδή (Pozo et al., 2008; Thevis et al., 2005).



Σχήμα 12. Α) Ιοντικά χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης ενός μείγματος προτύπων καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M2_S_CDI) και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) με m/z 271.2426 σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Β) Μερικό χρωματογράφημα πλήρους σάρωσης των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία θετικού ιονισμού. Γ) Φάσμα ιόντων της M3_S_CDI σε λειτουργία θετικού ιονισμού.

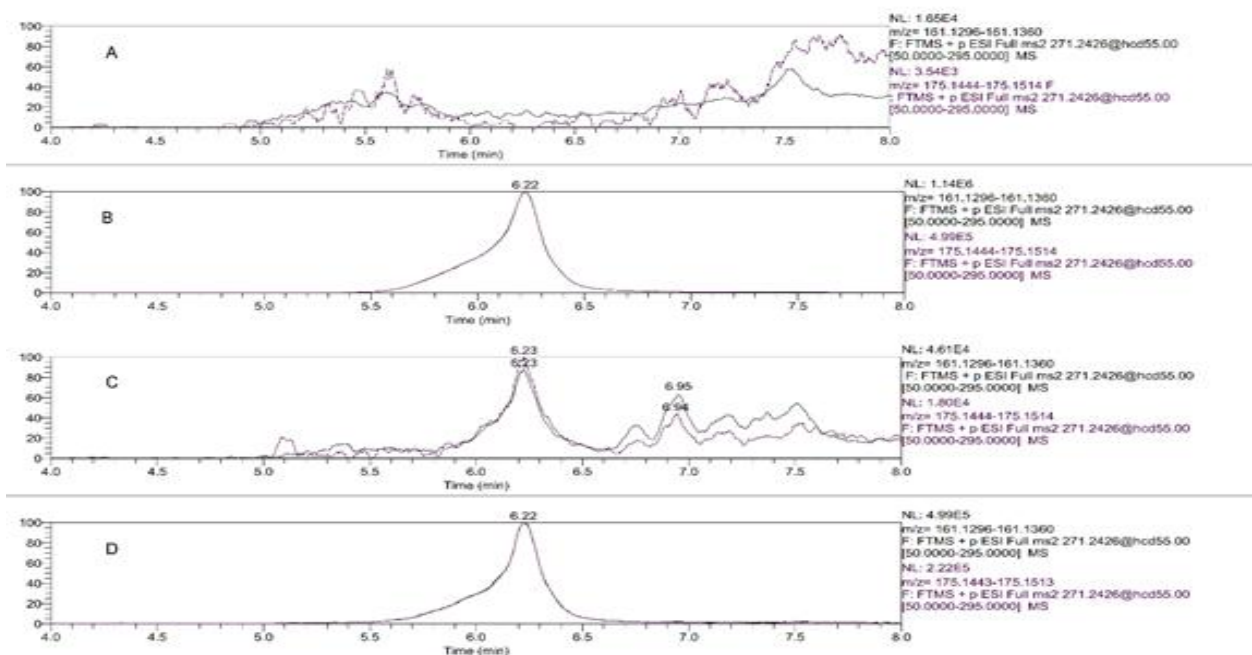
Σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού, τα καρβονυλοδιμιδαζολικά παράγωγα της ακέραιης 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης, παράγουν ένα άφθονο μοριακό ιόν με m/z 479.2216, μαζί με ένα δευτερεύον ιόν με m/z 367.1943, το οποίο αντιστοιχεί στο $[M-H]-CDI-COOH$, αν και σε μικρότερο βαθμό. Το φάσμα ιόντων σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού αποδίδει δύο ιόντα, ένα στα m/z 367.1943, που αντιστοιχεί στο $[M-H]-CDI-COOH$, το οποίο διατηρεί το θεικό τμήμα στον στεροειδή σκελετό και ένα δεύτερο ιόν στα m/z 96.9588, που αντιστοιχεί στο θεικό τμήμα, χαρακτηριστικό των θεικών μεταβολιτών. Τα φάσματα πλήρους σάρωσης (full scan) και τα φάσματα ιόντων καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού, παρουσιάζονται στο Σχήμα 13.



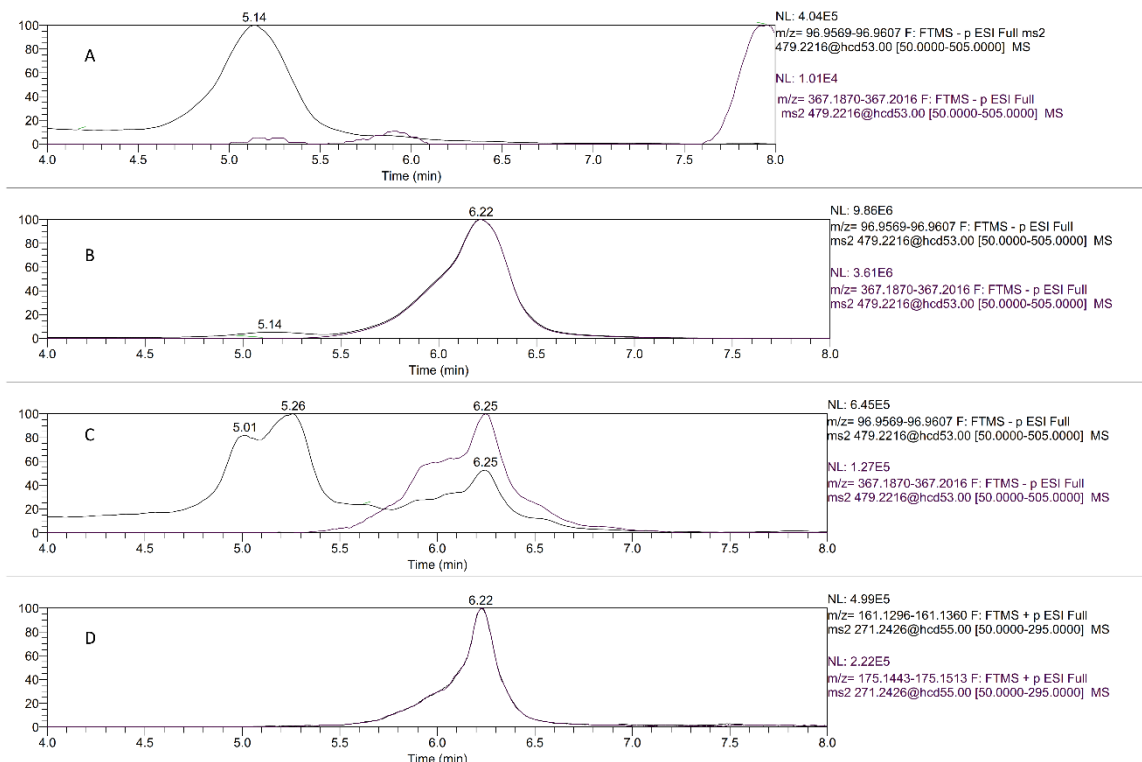
Σχήμα 13. Α) Ιοντικά χρωματογραφήματα πλήρους σάρωσης ενός μείγματος προτύπων καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M2_S_CDI) και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) με m/z 479.2216 σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού Β) Φάσμα πλήρους σάρωσης των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. C) Φάσμα ιόντων των M2_S_CDI και M3_S_CDI σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού.

Δυστυχώς, καμία κορυφή δεν μπόρεσε να ληφθεί τόσο για την 3α-θεική 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλη, όσο και για την 3α-θεική 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλη, οι οποίες κατά την ανάλυση των μη παραγωγοποιημένων δειγμάτων μετά από χορήγηση, εμφάνισαν το μεγαλύτερο χρονικό παράθυρο και συνεπώς αποτελούν τους καλύτερους βιοδείκτες για την ανίχνευση της χρήσης της μεθυλοτεστοστερόνης, όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 4.6.2. Μια ακόμη μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση για την επιμερή 17β-μεθυλο-17α-υδροξυλομάδα των στεροειδών θα μπορούσε να εξηγήσει αυτή την αποτυχία. Παρ' όλα αυτά, το πρωτόκολλο παραγωγοποίησης με CDI εφαρμόστηκε περαιτέρω στα ίδια εκχυλίσματα δειγμάτων ούρων μετά από χορήγηση μεθυλοτεστοστερόνης που περιγράφονται στην παράγραφο 4.6.2. Με βάση α) την αποτυχία ανίχνευσης των παραγώγων CDI της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5α και 3α-θεικής 5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλης, β) τη φτωχή χρωματογραφική ανάλυση των

καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων των 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης και 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (Σχήματα 12 και 13 Α), και γ) την προηγούμενη γνώση της επικράτησης της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης, μεταξύ των 5α και 5β ισομερών, υιοθετήθηκε μια ταχύτερη χρωματογραφική μέθοδος, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.5.1. Τα δείγματα αναλύθηκαν με LC-HRMS/(MS), τόσο σε λειτουργία θετικού όσο και αρνητικού ιονισμού και τα χρωματογραφικά δεδομένα καθώς και τα δεδομένα φασματομετρίας μάζας, αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του TD2023IDCR. Αντιπροσωπευτικά ιοντικά χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 14 και στο Σχήμα 15. Τα παράθυρα χρόνου ανίχνευσης και ταυτοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 19. Επιπλέον, 20 διαφορετικά τυφλά δείγματα αναλύθηκαν με την ίδια μέθοδο, προκειμένου να αξιολογηθεί η εκλεκτικότητά της και η μέθοδος αποδείχθηκε 100% εκλεκτική (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).



Σχήμα 14. Ιοντικά χρωματογραφήματα των καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) για τις ιοντικές μεταπτώσεις m/z 271.2426 > 161.1328 και m/z 271.2426 > 175.1464 Α) τυφλού δείγματος, Β) δείγματος 24 ωρών μετά τη χορήγηση, C) τελευταίου επιβεβαιωμένου δείγματος 9 ημέρες μετά τη χορήγηση και D) εμβολιασμένου δείγματος με 3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη (M3_S_CDI) σε λειτουργία θετικού ιονισμού.

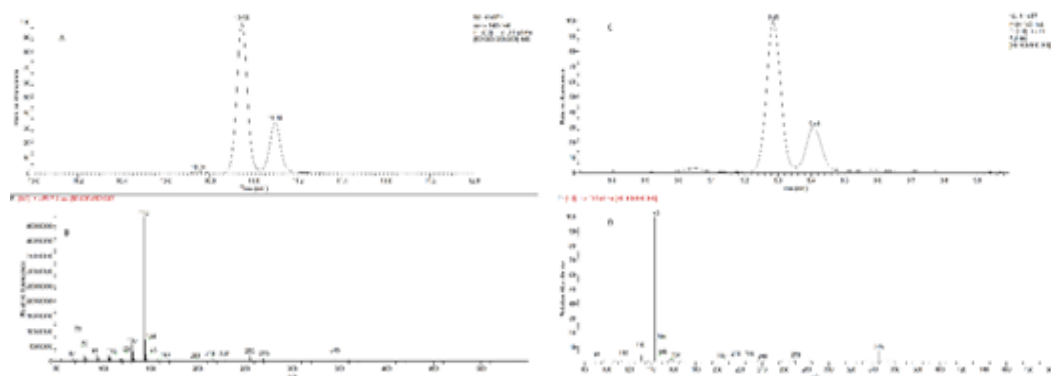


Σχήμα 15. Ιοντικά χρωματογραφήματα των καρβονυλοδιμιδαζολικών παραγώγων της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_S_CDI) για τις ιοντικές μεταπτώσεις m/z 479.2216 > 367.1943 και m/z 479.2216 > 96.9588 A) τυφλού δείγματος, B) δείγματος 24 ωρών μετά τη χορήγηση, C) τελευταίου επιβεβαιωμένου δείγματος 9 ημέρες μετά τη χορήγηση και D) εμβολιασμένου δείγματος με 3α-θεική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη (M3_S_CDI) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού.

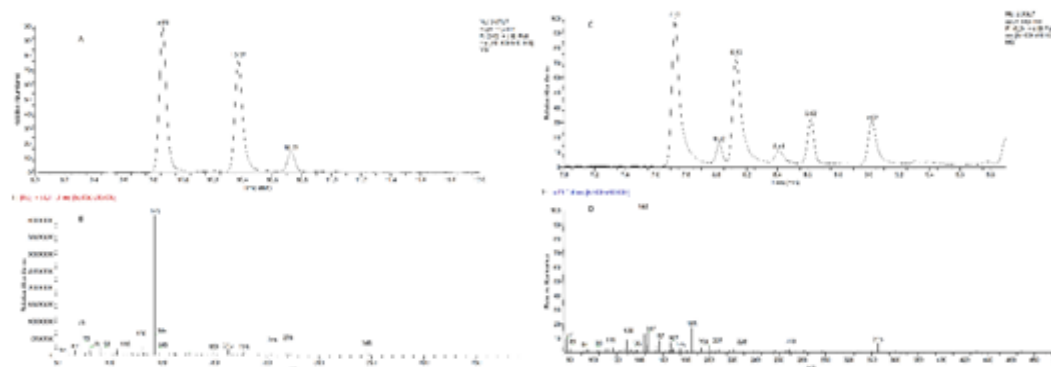
4.6.4.Ανάλυση GC-MS/(MS) των TMS παραγώγων των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της MT

Η ανάλυση των ακέραιων θεικών μεταβολιτών της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης έχει αναφερθεί από τους Albertsdóttir et al. (Albertsdóttir et al., 2023a). Προκειμένου να αξιολογήσουμε τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στο LC-HRMS/(MS) για την ανίχνευση των παραγώγων CDI, την επαναλάβουμε στα δείγματά μας μετά από χορήγηση, ώστε να συγκρίνουμε τις διαφορετικές διαθέσιμες στρατηγικές για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των ενώσεων ενδιαφέροντος. Παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν με GC-MS/(MS) σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan) και MRM, TMS παράγωγα της συνθετικής 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M2_S_TMS) και της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_S_TMS). Τα

χρωματογραφήματα, μαζί με τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσής τους, παρουσιάζονται στο Σχήμα 16 και στο Σχήμα 17.



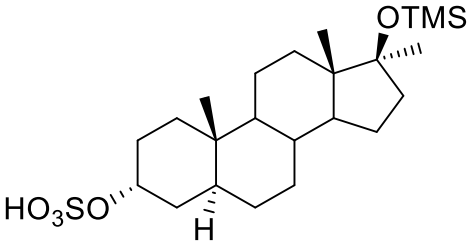
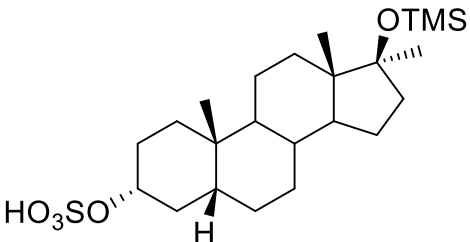
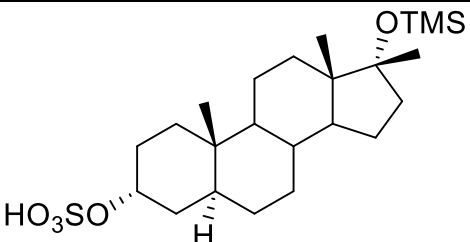
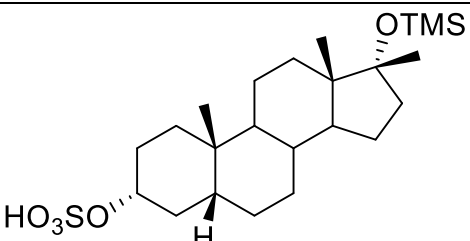
Σχήμα 16. Α) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17β-διόλης-TMS (M2_S_TMS) Β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M2_S_TMS. C) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης-TMS (M5_S_TMS) D) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M5_S_TMS.



Σχήμα 17. Α) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης-TMS (M3_S_TMS) Β) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M3_S_TMS. C) Ιοντικά χρωματογραφήματα του m/z 143 της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλης-TMS (M6_S_TMS) D) Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης της υψηλότερης κορυφής της M6_S_TMS.

Μια στοχευμένη μέθοδος GC-MS/(MS) για αυτά τα αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα βελτιστοποιήθηκε μετά από σάρωση παραγόμενων ιόντων σε λειτουργία παρακολούθησης αυτόματα επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM), αναλυτικών προτύπων που συντέθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας. Οι μεταβολίτες που παρήχθησαν από τη μετάθεση Wagner-Meerwein συμπεριλήφθηκαν επίσης, μαζί με ένα ισομερές του μεταβολίτη θεικής 16z-

υδροξυ-τετραΐδρο-μεθυλοτεστοστερόνης, το οποίο ανιχνεύθηκε μετά από ανάλυση πλήρους σάρωσης (full scan) των δειγμάτων μετά από χορήγηση. Οι παράμετροι της μεθόδου SRM που εφαρμόστηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

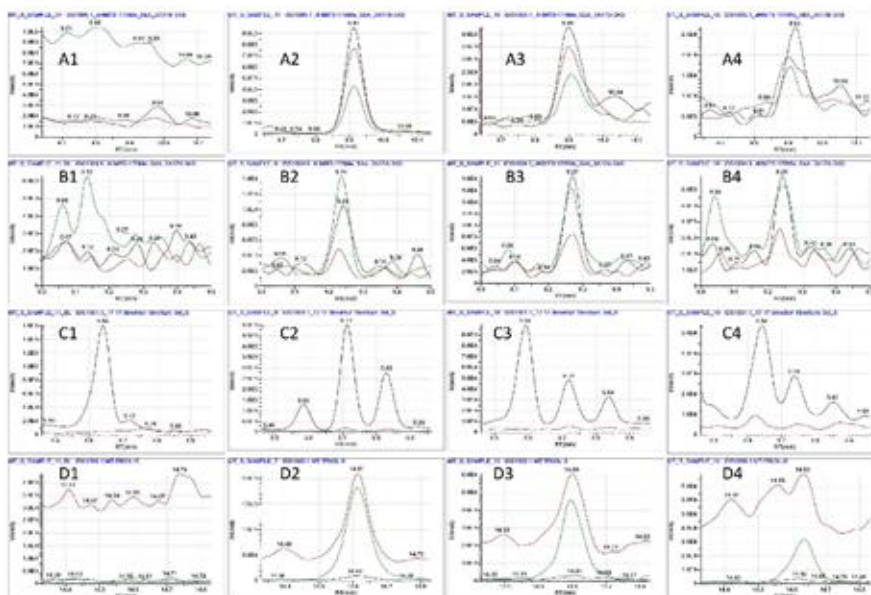
Substance	Structure	Rt (min)	Ion transition (m/z)	Collision Energy (eV)
3α-θεική 17α- μεθυλο-5α- ανδροστανο-3α,17β- διόλη-TMS (M2_S_TMS) (διπλή κορυφή)		10.95	255>199 270>213 270>199	16 28 28
3α-θεική 17α- μεθυλο-5β- ανδροστανο-3α,17β- διόλη-TMS (M3_S_TMS) (πολλαπλές κορυφές)		9.96	270>213 270>228 270>199	22 18 28
3α-θεικής 17β- μεθυλο-5α- ανδροστανο-3α,17α- διόλης-TMS (M5_S_TMS) (διπλή κορυφή)		9.27	345>201 270>216 255>189	20 10 10
3α-θεικής 17β- μεθυλο-5β- ανδροστανο-3α,17α- διόλης-TMS (M6_S_TMS) (πολλαπλές κορυφές)		7.73	270>213 270>228 270>199	22 18 28

3α-θειικό 17,17- διμεθυλο-18-νορ-5α- ανδροστ-13-ένιο- TMS (M7_S_TMS) (διπλή κορυφή)		5.75	255>161 270>161	18 24
3α-θειικό 17,17- διμεθυλο-18-νορ-5β- ανδροστ-13-ένιο- TMS (M8_S_TMS) (πολλαπλές κορυφές)		5.25	270>161 270>255	24 8
Θευκή 16z-υδροξυ- τετραϋδρο- μεθυλοτεστοστερόνη- TMS (M9_S_TMS) (διπλή κορυφή)		14.61	448>231 448>143 218>147	9 24 9

Πίνακας 3. Εξεταζόμενοι ακέραιοι θειικοί μεταβολίτες της MT, ως αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα μετά από παραγωγή/ποίηση TMS με GC-MS/(MS).

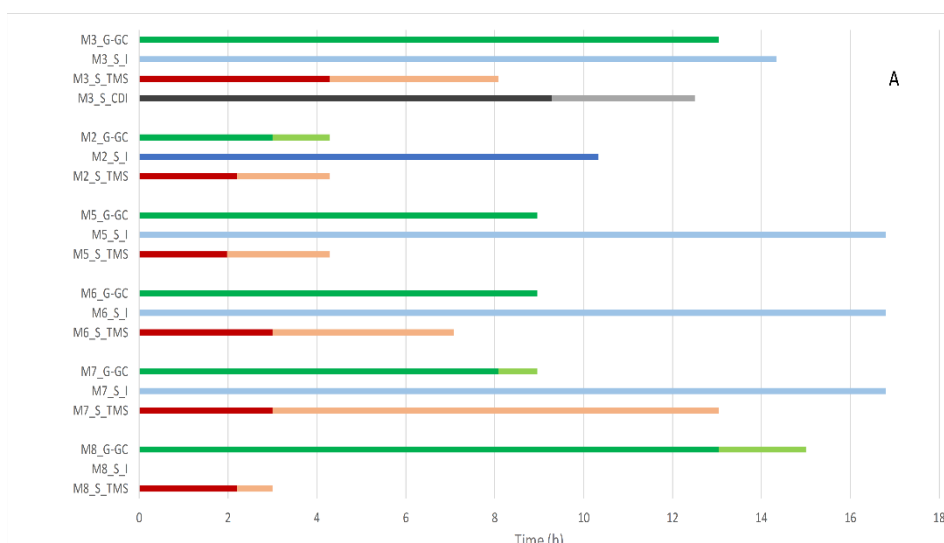
Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται, επιβεβαίωσαν τα ευρήματα των Albertsdóttir et al. (Albertsdóttir et al., 2023a). Στην περίπτωση της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης (M5_S_TMS) και της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17α-διόλης (M6_S_TMS), οι οποίες εμφάνισαν την καλύτερη ανιχνευσιμότητα στο LC-HRMS/(MS), ταυτοποιήθηκαν μόνο σποραδικά υπό τις διατάξεις του TD2023IDCR, σε λίγα δείγματα μετά από χορήγηση. Αυτό αποδόθηκε κυρίως στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αυτών των μεταβολιτών, στα μη ευνοϊκά φάσματα πλήρους σάρωσης (full scan), στα οποία τα πρόδρομα ιόντα για τη μετέπειτα μέθοδο SRM αντιπροσώπευαν μόνο ένα μικρό κλάσμα σε σύγκριση με την κυρίαρχη κορυφή στο m/z 143 (Steff, 2025) και στην εμφάνιση πολλαπλών κορυφών που αντιστοιχούν σε αυτά τα αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα.

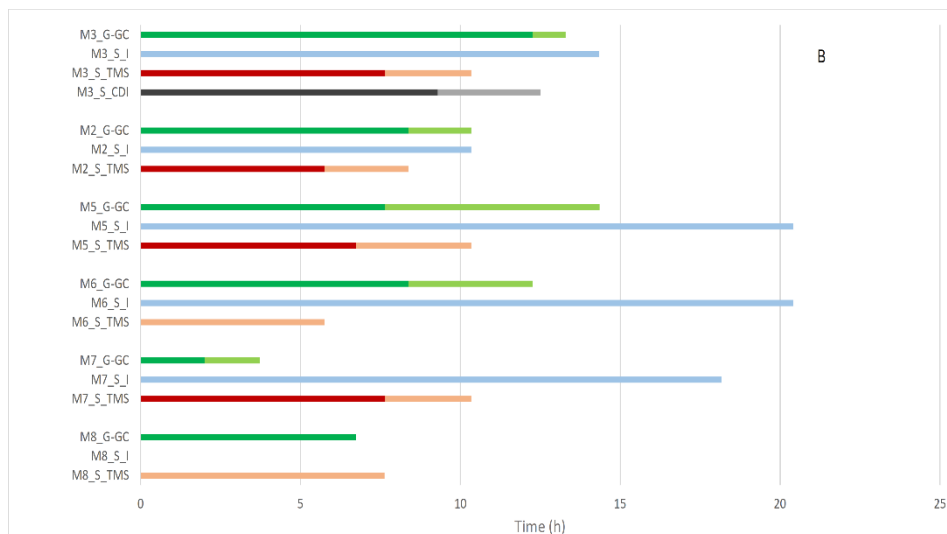
Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα ιόντων για τους κύριους ακέραιους θεικούς μεταβολίτες της MT που ανιχνεύθηκαν με GC-MS/(MS) παρουσιάζονται στο Σχήμα 18. Με βάση τα αποτελέσματα, οι καλύτεροι δείκτες για την ταυτοποίηση της κατάχρησης MT στο πλαίσιο του ελέγχου αντιντόπινγκ στον αθλητισμό, αναλυόμενοι ως παράγωγα TMS με GC-MS/(MS), ήταν η 3α-θειική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη (M3_S_TMS), το 3α-θειικό 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ένιο (M7_S_TMS) και η θειική 16z-υδροξυ-τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνη (M9_S_TMS).



Σχήμα 18. Αντιπροσωπευτικά ιοντικά χρωματογραφήματα από ανάλυση με GC-MS/(MS), δειγμάτων μετά από χορήγηση για Α) 3α-θειική 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλη-TMS (M3_S_TMS) σε Α1) τυφλό δείγμα, Α2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, Α3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και Α4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 11 ημέρες μετά τη χορήγηση Β) 3α-θειική 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλη-TMS (M5_S_TMS) σε Β1) τυφλό δείγμα, Β2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, Β3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και Β4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 11 ημέρες μετά τη χορήγηση, Γ) 3α-θειικό 17,17-διμεθυλο-18-νορ-5α-ανδροστ-13-ένιο-TMS (M7_S_TMS) σε C1) τυφλό δείγμα, C2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, C3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και C4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 11 ημέρες μετά τη χορήγηση και Δ) θειική 16z-υδροξυ-τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνη-TMS derivative (M9_S_TMS) σε D1) τυφλό δείγμα, D2) δείγμα 2 ημέρες μετά τη χορήγηση, D3) τελευταίο επιβεβαιωμένο δείγμα 8 ημέρες μετά τη χορήγηση και D4) τελευταίο δείγμα που ανιχνεύεται 10 ημέρες μετά τη χορήγηση.

Τα αποτελέσματα σχετικά με τα παράθυρα χρόνου ανίχνευσης και ταυτοποίησης για τους κύριους ακέραιους θεικούς μεταβολίτες της MT και από τις δύο μελέτες απέκκρισης I και II παρουσιάζονται στο Σχήμα 19A και στο Σχήμα 19B, αντίστοιχα. Συνοπτικά, ενώ η συμπερίληψη της 3α-θεικής 17β-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3α,17α-διόλης (M5_S_I) στην αρχική διαδικασία ελέγχου (ITP) με LC-MS μπορεί να ενισχύσει σημαντικά το χρονικό παράθυρο ανίχνευσης για την παρακολούθηση της κατάχρησης MT στο πλαίσιο του ελέγχου αντιντόπινγκ στον αθλητισμό, η ταυτοποίησή της παραμένει μια αναλυτική πρόκληση. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για τους μεταβολίτες της MT που εκκρίνονται ως θεικά συζεύγματα στις αντίστοιχες διαδικασίες επιβεβαίωσης (CP), οδήγησε σε παρόμοια ή μικρότερα παράθυρα χρόνου ταυτοποίησης σε σύγκριση με την ανίχνευση αυτών των μεταβολιτών στα ελεύθερα και γλυκουρονιδικά κλάσματα μετά από υδρόλυση, π.χ. της 17α-μεθυλο-5β-ανδροστανο-3α,17β-διόλης (M3_G, Σχήματα 19A και 19B).





Σχήμα 19. Παράθυρα χρόνου Ανίχνευσης (ανοιχτές γραμμές) και Ταυτοποίησης (σκούρες γραμμές) για τους κύριους μεταβολίτες της MT της σειράς I (Α) και της σειράς II (Β) των δειγμάτων μετά από χορήγηση που αναλύθηκαν με LC-HRMS/(MS) ως άθικτοι θεικοί μεταβολίτες (μπλε χρώμα), με GC-MS/(MS) ως αποθειωμένα μόρια των άθικτων θεικών μεταβολιτών μετά από παραγωγοποίηση TMS (κόκκινο χρώμα), με LC-HRMS/(MS) μετά από CDI παραγωγοποίηση των άθικτων θεικών μεταβολιτών (γκρι χρώμα) και με GC-MS/(MS) ως μεταβολίτες των ελεύθερων και γλυκουρονιδικών κλασμάτων έπειτα από υδρόλυση (πράσινο χρώμα).

4.7.Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η σύνθεση μικροκλίμακας έξι από τους οκτώ πιθανούς θεικούς μεταβολίτες της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης. Η ανάλυση του θεικού κλάσματος των εκχυλισμάτων δειγμάτων από δύο μελέτες απέκκρισης μετά από χορήγηση MT έναντι των συνθετικών προτύπων, οδήγησε στην αδιαμφισβήτητη πειραματική απόδειξη των ακριβών χημικών δομών τους. Η στοχευμένη ανάλυση αυτών των δειγμάτων, αποκάλυψε έναν επιπλέον θεικό μεταβολίτη της τετραϋδρο-μεθυλοτεστοστερόνης, συγκεκριμένα την 3β-θεική 17α-μεθυλο-5α-ανδροστανο-3β,17α-διόλη.

Επιπλέον, αυτά τα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μεθόδων ταυτοποίησης στις οποίες τα φάσματα ιόντων θα μπορούσαν να σχετίζονται με το στεροειδές τμήμα. Αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι ταυτοποίησης: η μία βασισμένη σε ανάλυση LC-MS/(HRMS)

των παραγώγων CDI και η δεύτερη βασισμένη σε ανάλυση GC-MS/(MS) των παραγώγων TMS ως αποθειωμένα τεχνικά προϊόντα. Η παραγωγοποίηση με CDI ήταν εν μέρει επιτυχής, καθώς αποδείχθηκε αποτελεσματική μόνο για μεταβολίτες με δομή 17α-μεθυλίου, γεγονός που θεωρείται σημαντικός περιορισμός της μεθόδου. Η ανάλυση με GC-MS/(MS) των αποθειωμένων τεχνικών προϊόντων, μπορούσε να ανιχνεύσει ένα ευρύτερο φάσμα μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένου ενός υδροξυ-θειικού μεταβολίτη που δεν είχε αναφερθεί προηγουμένως. Ωστόσο, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των μακροχρόνιων μεταβολιτών, μαζί με τον σχηματισμό περισσότερων από μία κορυφών για τον καθένα, οδήγησαν σε σποραδική ταυτοποίηση.

Συνοπτικά, η αξιολόγηση της ικανότητας ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μεθόδων που αναπτύχθηκαν, οδήγησε σε χρονικά παράθυρα παρόμοια ή μικρότερα από εκείνα που προέκυψαν για τα αντίστοιχα ελεύθερα και γλυκουρονιδικά ανάλογά τους, με βάση τις καλά εδραιωμένες μεθόδους GC-MS/(MS).

Βιβλιογραφία

1. Backhouse, S. H., McKenna, J., Robinson, S., & Atkin, A. (2007). *International literature review: Attitudes, behaviours, knowledge and education – Drugs in sport: Past, present and future*. World Anti-Doping Agency. wada-ama.org
2. World Anti-Doping Agency. (2021). *World Anti-Doping Code 2021*. wada-ama.org
3. Lippi, G., Franchini, M., & Guidi, G. C. (2008). Doping in competition or doping in sport? *British Medical Bulletin*, 86(1), 95–107.
4. Council of Europe. (1963). *Doping of athletes: Resolution (63) 12*. Council of Europe.
5. ΕΟΚΑΝ. (2024). *Κανονισμοί και διαδικασίες αντι-ντόπινγκ*. Εθνικός Οργανισμός Καταπολέμησης του Ντόπινγκ. eokan.gr
6. Yesalis, C. E., & Bahrke, M. S. (2002). *History of doping in sport*. Human Kinetics.
7. Møller, V. (2010). *The Ethics of Doping and Anti-Doping*. Routledge.
8. Dimeo, P. (2007). *A History of Drug Use in Sport, 1876–1976*. Routledge.
9. Wasson, R. G. (1968). *Soma: Divine Mushroom of Immortality*. Harcourt Brace.
10. Hoberman, J. (2001). Sports physicians and the doping crisis in elite sport. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 11(4), 203–208.
11. International Olympic Committee. (2023). *Seoul 1988 – Official Olympic History*. <https://olympics.com>
12. BBC. (2018). *The Festina Affair: Cycling's biggest doping scandal*. bbc.com
13. UNESCO. (2020). *Doping in sport: Global perspectives*. unesco.org
14. Kayser, B., & Smith, A. C. (2008). Globalisation of anti-doping: The reverse side of the medal. *British Journal of Sports Medicine*, 42(8), 614–618.
15. Ljungqvist, A. (2014). Brief history of anti-doping. *British Journal of Sports Medicine*, 48(10), 839–841.
16. New York Times. (2004). *The BALCO scandal*. nytimes.com
17. USADA. (2004). *THG discovery and BALCO investigation*. usada.org
18. Catlin, D. et al. (2004). Detection of tetrahydrogestrinone (THG).
19. BBC. (2007). *Marion Jones admits doping*. bbc.com
20. USADA. (2012). *Reasoned Decision on Lance Armstrong*. usada.org
21. BBC. (2013). *Lance Armstrong interview*. bbc.com
22. McLaren, R. (2016). *Independent Person Report*. wada-ama.org

23. ARD. (2014). *Geheimsache Doping documentary*. ard.de
24. Rodchenkov, G. (2016). How I built Russia's doping system. *The New York Times*.
25. WADA. (2019). *World Anti-Doping Agency – Annual Report 2019*.
26. WADA. (2021). *World Anti-Doping Code 2021*.
27. WADA. (2021). *International Standard for Laboratories (ISL)*.
28. ISO/IEC. (2017). *ISO/IEC 17025:2017 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*.
29. WADA. (2021). *External Quality Assessment Scheme (EQAS) – Program Description*.
30. Technische Universität München. (n.d.). *Doping Prevention: Educational Platform*. tum.de
31. WADA. (2015). *The World Anti-Doping Code 2015*.
32. Wikipedia contributors. (2026). *Abortion doping*. Wikipedia, The Free Encyclopedia. wikipedia.org
33. Disabled.gr. (2012). *Αντανακλαστική δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Autonomic Dysreflexia)*. Disabled.gr - Πύλη για την Αναπηρία. disabled.gr
34. TheRichest. (2013). *10 most controversial doping scandals in sports history*. therichest.com
35. Wikipedia contributors. (2026). *Marion Jones*. Wikipedia, The Free Encyclopedia. wikipedia.org
36. Χατζηπιερής, Φ. Π., Ντιμτσούδη, Σ., & Γεωργακόπουλος, Κ. (2024). Χρήση Φασματομετρίας Μαζών για Προσδιορισμό Απαγορευμένων Ουσιών σε Αθλητές (Αντιντόπινγκ). *Φαρμακευτική*, 36(2), 20-29. doi.org
37. Badoud, F., Grata, E., Perrenoud, L., Saugy, M., Rudaz, S., & Veuthey, J. L. (2011). Fast analysis of doping agents by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4409-4416.
38. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2005). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (Μετάφραση Μ. Ι. Καραγιάννης, Κ. Ζ. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης). Εκδόσεις Κωσταράκη, 5η έκδοση.
39. Χατζηγιάννου, Θ. Π., & Κουπάρη, Μ. Α. (2010). *Ενόργανη Ανάλυση*. Εκδόσεις ΕΚΠΑ.

40. de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, 3rd edition.
41. Watson, L. T., & Sparkman, O. D. (2007). *Introduction to Mass Spectrometry*. Wiley, 4th Edition.
42. Carlson, N. R. (2013). *Physiology of Behavior*. Pearson, 11th edition.
43. Smith, R. M. (2004). *Understanding Mass Spectra*. Wiley Interscience, 2nd edition.
44. Thevis, M. (2010). *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing: Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*. Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry.
45. Thevis, M., & Schanzer, W. (2007). Mass spectrometry reviews. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 79-107.
46. Mareck, U., Guddat, S., Schwenke, A., Beuck, S., Geyer, H., Flenker, U., Elers, J., Backer, V., Thevis, M., & Schanzer, W. (2011). Determination of salbutamol and salbutamol glucuronide in human urine by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 3(11-12), 831-837.
47. Ardrey, R. E. (2003). *Liquid Chromatography-Mass spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons.
48. Ventura, R., Ramirez, R., Monfort, N., & Segura, J. (2009). Ultrapformance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for direct quantification of salbutamol in urine samples in doping control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(5), 886-890.
49. Ruzicka L, Goldberg MW, Rosenberg HR. Sexualhormone X Herstellung des 17-Methyltestosteron und anderer Androsten und Androstanderivate. Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und männlicher Hormonwirkung. *Helv Chim Acta*. 1935;18:1487–1498.
50. Ebadi M. *Desk Reference of Clinical Pharmacology*. 2nd ed. CRC Press; 2007.
51. Walpurgis K, Piper T, Thevis M. Androgens, sports, and detection strategies for anabolic drug use. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(4):101609. doi:10.1016/j.beem.2021.101609

52. World Anti-Doping Agency. 2021 Anti-Doping Testing Figures. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-01/2021_anti_doping_testing_figures_en.pdf. Accessed March 26, 2023.
53. World Anti-Doping Agency. Prohibited List 2023. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-09/2023list_en_final_9_september_2022.pdf. Accessed September 10, 2023.
54. Schänzer W, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in man: synthesis and use of reference substances for identification of anabolic steroid metabolites. *Anal Chim Acta*. 1993;275(1–2):23–48. doi:10.1016/0003-2670(93)80274-O
55. Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, et al. Detection and characterization of a new metabolite of 17 α -methyltestosterone. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(11):2153–2162. doi:10.1124/dmd.109.028373
56. Gómez C, Pozo OJ, Marcos J, Segura J, Ventura R. Alternative long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. *Steroids*. 2013;78(1):44–52. doi:10.1016/j.steroids.2012.10.008
57. Martinez-Brito D, Iannone M, Tatangelo MA, Molaioni F, de la Torre X, Botrè F. A further insight into methyltestosterone metabolism: New evidences from in vitro and in vivo experiments. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2020;34(19):e8870. doi:10.1002/rcm.8870
58. Loke S, Liu L, Wenzel M, et al. New insights into the metabolism of methyltestosterone and metandienone: Detection of novel A-ring reduced metabolites. *Molecules*. 2021;26(5):1354. doi:10.3390/molecules26051354
59. Albertsdóttir AD, Van Gansbeke W, Van Eenoo P, Polet M. Detection time comparison of non-hydrolysed sulfated metabolites of metenolone, mesterolone and 17 α -methyltestosterone analysed by four different mass spectrometric techniques. *Drug Test Anal*. 2023;15(4):567–576. doi:10.1002/dta.3481
60. Angelis YS, Sakellariou P, Fragkaki AG, et al. New long-standing metabolites of 17 α -methyltestosterone are detected in HepG2 cell in vitro metabolic model and in human urine. *Drug Test Anal*. 2023;15(5):789–798. doi:10.1002/dta.3492
61. Schänzer W, Opfermann G, Donike M. 17-Epimerization of 17 α -methyl anabolic steroids in humans: Metabolism and synthesis of 17 α -hydroxy-17 β -methyl steroids. *Steroids*. 1992;57(11):537–550. doi:10.1016/0039-128X(92)90023-3

62. Sun Y, Giacomello G, Girreser U, et al. Characterization and quantitation of a sulfoconjugated metabolite for detection of methyltestosterone misuse and direct identification by LC-MS. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2024;242:106527. doi:10.1016/j.jsbmb.2024.106527
63. Kiouisi P, Fragkaki AG, Kioukia-Fougia N, Angelis YS. Liquid chromatography–mass spectrometry behavior of Girard's reagent T derivatives of oxosteroid intact phase II metabolites for doping control purposes. *Drug Test Anal*. 2021;13(11–12):1822–1834. doi:10.1002/dta.2921
64. Polet M, Van Gansbeke W, Albertsdóttir AD, et al. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of non-hydrolyzed sulfated steroids by degradation product formation. *Drug Test Anal*. 2019;11(11–12):1656–1665. doi:10.1002/dta.2606
65. Albertsdóttir AD, Van Gansbeke W, Van Eenoo P, Polet M. Enabling the inclusion of non-hydrolyzed sulfated long-term anabolic steroid metabolites in a screening for doping substances by means of gas chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2021;1642:462039. doi:10.1016/j.chroma.2021.462039
66. Angelis YS, Fragkaki AG, Kiouisi P, Sakellariou P, Christophoridis C. LC-MS/MS confirmatory doping control analysis of intact phase II metabolites of methenolone and mesterolone after Girard's Reagent T derivatization. *Drug Test Anal*. 2023;15(6):901–912. doi:10.1002/dta.3505
67. Sakellariou P, Kiouisi P, Fragkaki AG, et al. Alternative markers for methyltestosterone misuse in human urine. *Drug Test Anal*. 2020;12(11–12):1544–1553. doi:10.1002/dta.2907
68. Steff J, Molaioni F, Schlörer N, et al. Reduced and rearranged metabolite structures after metandienone administration: New promising metabolites for anti-doping analysis. *SSRN*. 2022. <https://ssrn.com/abstract=5186326>. Accessed June 11, 2025.
69. Albertsdóttir AD, Van Gansbeke W, Van Eenoo P, Polet M. Evaluation of alternative gas chromatographic and mass spectrometric behaviour of trimethylsilyl-derivatives of non-hydrolyzed sulfated anabolic steroids. *Drug Test Anal*. 2023;15(7):1123–1132. doi:10.1002/dta.3510

70. Athanasiadou I, Angelis YS, Lyris E, Georgakopoulos C. Chemical derivatization to enhance ionization of anabolic steroids in LC-MS for doping-control analysis. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;42:137–156. doi:10.1016/j.trac.2012.10.003
71. Wong CH, Leung DK, Tang FP, Wong JK, Nola HY, Wan TS. Rapid screening of anabolic steroids in horse urine with ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after chemical derivatisation. *J Chromatogr A.* 2012;1232:257–265. doi:10.1016/j.chroma.2012.02.053
72. Fragkaki AG, Petropoulou G, Athanasiadou I, et al. Determination of anabolic androgenic steroids as imidazole carbamate derivatives in human urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2020;43(11):2154–2161. doi:10.1002/jssc.201901285
73. Velosa DC, Dunham AJ, Rivera ME, Neal SP, Chouinard CD. Improved ion mobility separation and structural characterization of steroids using derivatization methods. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2022;33(9):1761–1771. doi:10.1021/jasms.2c00067
74. Guo Q, Ren X, Lu Z. Highly Efficient Regioselective Acylation of Hydroxy Aromatics via N-Acylimidazoles. *Org Lett.* 2019;21:880–884. doi:10.1021/acs.orglett.8b03299
75. Pozo OJ, Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke FT. Efficient approach for the comprehensive detection of unknown anabolic steroids and metabolites in human urine by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80(5):1709–1720. doi:10.1021/ac702303b
76. Thevis M, Bommerich U, Opfermann G, Schänzer W. Characterization of chemically modified steroids for doping control purposes by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2005;40(4):494–502. doi:10.1002/jms.820
77. Steff J, Parr MK. Same, but different: Variations in fragment ions among stereoisomers of a 17 α -methyl steroid in gas chromatography/electron ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2025;39(2):e9934. doi:10.1002/rcm.993

Όλγα Γούλα, « Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης των θεικών μεταβολιτών της μεθυλοτεστοστερόνης στον έλεγχο ντόπινγκ »

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.