

Ako víťaziť v boji proti dopingovému?

Autori:

Mgr. Kristián Slíž, doktorand,

Toxikologické a antidopingové centrum

prof. RNDr. Peter Mikuš, PhD., riaditeľ

Toxikologického a antidopingového centra

Od smrti Knuda E. Jensena až po sofistikované testovanie zakázaných látok na Slovensku

Olympijské hry v roku 1960 sa konali v Ríme. V cyklistických pretekoch družstiev na 100 km sa jazdilo za neuveriteľnej horúčavy, ktorá dosiahla až 40°C. Jorgen B. Jorgensen, jeden zo štvorčlenného dánskeho tímu, dostal úpal a odstúpil už v prvom kole pretekov. Tento incident si vynútil, aby zvyšní traja členovia tímu dokončili preteky za každých okolností.

Závod pokračoval a Knud E. Jensen sa začal sťažovať na intenzívne závraty. Dánsky tím si nemohol dovoliť ďalšie odstúpenie, a tak Niels Baunsøe bránil pádu Jensena, zatiaľ čo ho Vagn Bangsørg ochladzoval vodou. Zdanlivo sa Jensenov stav zlepšil, no keď ho Baunsøe pustil, cyklista sa zrútil a na dlažbe jednej z najznámejších ulíc Ríma (Via Cristoforo Colombo) utrpel fraktúru lebky. Napriek prevozu do nemocnice a snahe lekárov tomuto zraneniu neskôr podľahol.

Mohli za to horúčava a fyzické vypätie? Pravdepodobne. Pitva Knuda E. Jensena však preukázala ďalší faktor – dánsky cyklista bol počas olympijského závodu intoxikovaný rôznymi látkami zo skupiny psychostimulancií. Tréner dánskeho tímu neskôr priznal, že jeho zverenci užili pred štartom „povzbudzujúci koktail“ obsahujúci amfetamíny a liek Ronicol, ktorý rozširuje cievy a zlepšuje prekrvenie kostrového svalstva.

Olympijské hry v Ríme boli vôbec prvým športovým podujatím, ktoré bolo vysielané takmer do celého sveta. Skutočnosť, že tragický pád Knuda E. Jensena videli v priamom

prenose milióny divákov bola pre Medzinárodný olympijský výbor neprijateľná. Niektorí vedúci predstavitelia MOV, vrátane Lorda Burghleyho, ktorý bol olympijským víťazom v behu na 400 m cez prekážky v roku 1928, varovali pred nebezpečným zneužívaním liekov už na zasadnutí vo Varšave v roku 1937, ale ich varovania zostali bezvýsledné. Avšak, keď sa v stávke ocitla povest' olympijských hier, MOV musela reagovať. V roku 1961 bola preto vytvorená tzv. Lekárska komisia, ktorej predseda Sir Arthur Porritt.

Porritt a jeho kolegovia potrebovali niekoľko rokov, aby zmapovali celkovú situáciu zneužívania liekov v športe. Až na zasadnutí v Teheráne v roku 1967 predložili MOV návrh na zoznam zakázaných látok ktorý zahŕňal sympatomimetické amíny, stimulanty centrálného nervového systému, narkotiká, anxiolytiká a antidepresíva, ako aj pravidlá pre testovanie týchto látok na olympijských hráčoch.

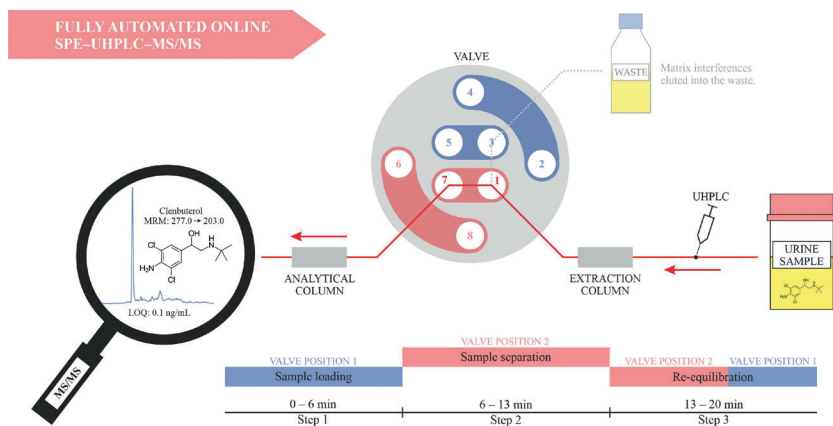
Dnes poznáme podobný zoznam zakázaných látok, ktorý vydáva Svetová antidopingová agentúra. Tento zoznam sa neustále rozširuje o nové zakázané látky a metódy, ktoré majú (a.) potenciál zlepšiť športový výkon a/alebo (b.) predstavujú pre športovcov skutočné alebo potenciálne zdravotné riziko a/alebo (c.) porušujú myšlienku športového ducha. Športovci sa v súčasnosti už netestujú iba na olympijských hráčoch, ale doslova kdekoľvek a kedykoľvek.

Stimulanty používané cyklistami v 60. rokoch sú naďalej populárne, čo dokazuje ich

častý výskyt vo vzorkách z dopingovej kontroly športovcov. Avšak, prvú priečku na neslávnej tabuľke porušení antidopingových pravidiel už niekoľko rokov majú anabolické látky. Prvé správy o užívaní anabolických látok v športe sa objavili už počas olympijských hier v roku 1952 v Helsinkách a boli spojované so športovcami zo Sovietskeho zväzu. Neskôr sa anabolické látky rozšírili do USA, kde sa dokonca stali oficiálnou súčasťou prípravy amerických vzperačov na vrcholné podujatia. Na olympiáde v roku 1972 v Mnichove až 68 % opýtaných priznalo, že anabolické látky využíva v rôznych fázach športovej prípravy. MOV zaradil anabolické látky na Zoznam zakázaných látok až pomerne neskoro, a to v roku 1983.

Testovanie zakázaných látok je od prvého návrhu na teheránskej konferencii v roku 1967 hrou mačky a myši. Mohlo by sa dokonca niekedy zdať, že je to márný boj a príjemcovia dopingov sú stále o krok vpred. Avšak v poslednom desaťročí došlo k enormnému pokroku v oblasti analytickej chémie a v rámci nej v technológiách inštrumentálnej analýzy, a preto môžeme dnes s hrdosťou smelo tvrdiť, že mačka a myš sú minimálne po prvýkrát v histórii na rovnakej úrovni. Antidopingové laboratória vyvinuli sofistikované rutinné metódy na odhalenie anabolických látok, peptidových hormónov, rastových faktorov, beta-2 agonistov, hormonálnych a metabolických modulátorov, diuretik, stimulantov, narkotík, kanabinooidov, glukokortikoidov, manipulácie s krvou alebo krvnými zložkami, fyzikálnych a chemických manipulácií s vzorkami a génového a bunkového dopingov. Dá sa urobiť ešte viac, alebo moderné techniky inštrumentálnej analýzy už dosiahli svoj vrchol?

Nepochybne, analytická inštrumentácia sa stále ďalej rozvíja a vypracované laboratórne metódy prekračujú stále nové limity. Na druhej strane aj nové účinné molekuly, zneužívané športovcami, mnohokrát umožňujú znižovať dávky pod medzu ich stanovenia, alebo sú športovcami vysadené v dostatočnom predstihu, aby neboli na súťaži detekovateľné. Preto v našej vedeckovýskumnej práci v Toxikologickom a antidopingovom centre Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave ukazujeme



Obrázok 1: Inštrumentálna schéma SPE-UHPLC-MS/MS metódy pre analýzu clenbuterolu vo vzorke ľudského moču.

riešenia, ako v rutinných laboratóriách skoko-vo zlepšiť možnosti monitoringu v situáciách, kedy sú hladiny zakázaných látok vo vzorke športovca extrémne nízke. Môžeme si predstaviť, že hľadaná látka je ako drobná muchotrávka dobre ukrytá v hustom a rozľah- lom lese (plnom vysokých stromov a húštin, ktoré predstavujú ióny a molekuly prirodze- ne sa vyskytujúce v ľudskom organizme), na ktorý sa pozeráme zhora. Keď chceme muchotrávku nájsť, musíme teda odstrániť stromy aj húštiny a muchotrávku ešte aj dobre pohnojiť špeciálnym muchotrávkovým hnojivom, aby vyrástla do čo najväčších roz- merov a bola dobre viditeľná. V reči analytic- kej procedúry, ktorá toto dokáže so zakázanou látkou prítomnou v zložitej vzorke športovca, napríklad v moči alebo krvi, ide o proces pre- čistenia (clean-up) a zakonzentrovania (con- centration) analyzovanej látky vo vzorke.

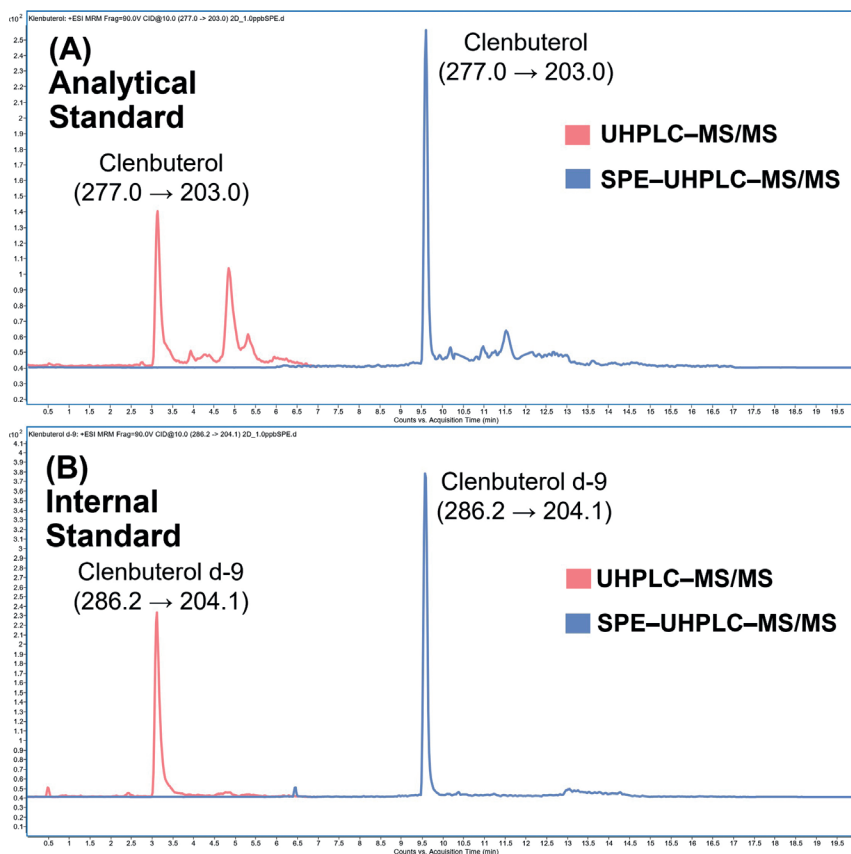
V rutinných antidopingových laboratóri-ách sa tradične používa na rozdelenie zlož- tých zmesí látok chromatografická separácia a na detekciu hľadanej látky hmotnostná spektrometria. Separácia rozdelí jednotlivé látky v čase, zatiaľ čo hmotnostná spektromet- ria na základe hmotností molekúl. Častokrát však ani takéto sofistikované delenie nie je postačujúce kvôli zložitosti biologického materiálu (hľuzovka vs. prales) a vzorku je potrebné pred takouto analýzou upraviť, naj- častejšie extrakciou hľadanej látky z biologic- kého materiálu. Proces úpravy vzorky sa rea- lizuje takmer bez výnimky ako nezávislý krok, pred samotnou analýzou. To však vnáša celý rad subjektívnych faktorov do takéhoto pro- cesu úpravy (od manipulácie s materiálom, cez merania objemov a množstiev materiálu až po izoláciu relevantnej frakcie upraveného materiálu, sprevádzané kumuláciou náhod- ných chýb dielčích procesov), zvyšuje požia- davky na množstvo materiálu a čas jeho úpra- vy. Výrazne efektívnejším spôsobom, ktorý sa snažíme demonštrovať ako vysokoobjektívnu a spoľahlivú alternatívu predúpravy vzorky k tradičnému spôsobu, je on-line integrácia inštrumentálneho predúpravného kroku s analytickým a detekčným krokom.

Metódy, ktoré v rámci výskumnej práce Toxikologického a antidopingového centra navrhujeme ako inovatívne a plne aplikova- telné v rutinných antidopingových laborató- riách, predstavujú tandem on-line prepoje- ných krokov (i) predúpravy vzorky (na princípe extrakcie na pevnej fáze, Solid phase extraction, SPE), (ii) analytickej sepa- racie vysokoúčinnou kvapalinovou chroma- tografiou (HPLC, vrátane ultra rýchleho a účinného režimu, UHPLC) a (iii) hmot-

nostnej detekcie (mass spectrometry, MS, vrá- tane tandemových konfigurácií MS/MS poskytujúcich informáciu o chemickej štruk- ture analyzovanej látky). Tento multidimen- zionálny prístup s vysokou ortogonalitou diel- čích krokov umožňuje bezkonkurenčnú reprodukovateľnosť a objektivitu analýz. Pre- nos želané frakcie obsahujúcej hľadanú látku z komplexnej matrice do analytického chroma- tografického stupňa pre jej finálnu separá- ciu je riadený automaticky elektronickým pre- pínaním viaccestných ventilov spájajúcich jednotlivé dimenzie SPE-UHPLC. Systém navyiac umožňuje dávkovanie veľkých objemov vzoriek (tisícly μl) s minimalizáciou strát ana- lyty a zlepšením medzi detekcie a kvantifiká- cie o niekoľko dekadických poriadkov v porovnaní s tradičnými spôsobmi analýzy (SPE-UHPLC vs. UHPLC). A to je teda naše riešenie, ktoré ponúkame pre dosahova- nie nových víťazstiev v boji proti doping.

Vypracovali sme niekoľko inovatívnych SPE-UHPLC-MS/MS metód, ktoré sa uplatnia v monitorovaní oxandrolonu alebo

klenbuterolu v moči športovcov, ďalšie opti- malizované metódy sme pripravili pre nastu- pujúce látky skupiny SARMs (selektívne modulátory androgénnych receptorov). Tým- to spôsobom dokážeme detegovať zneužíva- nie vybraných anabolických látok v predĺže- nom časovom horizonte (rádovo až niekoľko týždňov po ich vysadení). Navrhnutými metó- dami napríklad dokážeme detegovať množ- stvá oxandrolónu alebo klenbuterolu na úro- vni pikogramov v 1 mililitri vzorky, čo je porovnateľné s hmotnosťou DNA v jadre bunky. „Odtlačok“ anabolických látok hľadá- me okrem vzoriek športovcov aj vo vzorkách prípravkov pre športovcov zakúpených z verejne dostupných internetových stránok. V súčasnosti hľadáme v takýchto prípravkoch zakázané látky zo skupiny SARMs. Kapsuly alebo tablety, ktoré sú dostupné na internete, obsahujú totiž často 10 až 150 násobne vyššie množstvo SARMs v porovnaní s dávkami tes- tovanými v klinických štúdiách, a potenciál- ne aj ďalšie toxické nečistoty (napr. z necerti- fikovanej syntézy) v stopových množstvách.



Obrázok 2: Clean-up efekt on-line SPE úpravy biologickej vzorky. Ilustratívne chromatografické záznamy získané z analýzy (A) analytického štandardu klenbuterolu a (B) interného štandardu klenbuterolu (klenbuterol d-9) vo vzorke ľudského moču pri koncentrácii blízkej tzv. medzi stanovenia (LOQ = 0,1 ng/ml) za podmienok UHPLC-MS/MS alebo SPE-UHPLC-MS/MS metódy.