

Analýza vzoriek

Definícia

Športovcom sa počas i mimo súťaže odoberajú vzorky moču a krvi, ktoré sa v akreditovaných antidopingových laboratóriách následne testujú na zakázané látky. Na tento účel sa používajú rôzne analytické metódy.

Úvod

Odobraté vzorky moču sa do laboratória posielajú v dvoch zapečatených nádobách (vzorka A a vzorka B). V laboratóriu sa vzorka B zmrazí a vzorka A sa analyzuje. Ak sa analýzou preukáže, že vzorka A je pozitívna, športovec má právo požiadať o analýzu vzorky B. Počas analýzy svojej vzorky môže byť prítomný v laboratóriu, aby skontroloval, či je pôvodné zapečatenie vzorky nepoškodené. Ak analýza vzorky B potvrdí výsledok vzorky A, ide o pozitívny dopingový test. Určité zakázané látky sú lepšie detegovateľné v krvi, a preto sa športovcom v niektorých športoch odoberajú aj vzorky krvi.

Skríningové a identifikačné metódy

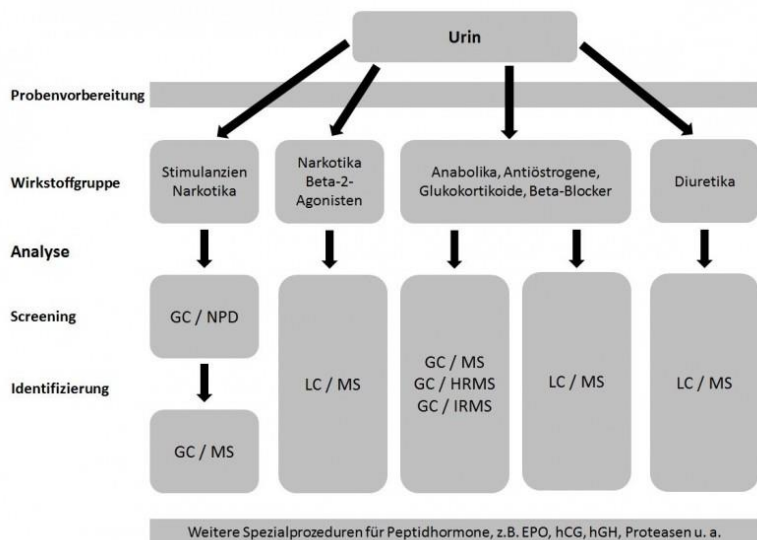
Na testovanie vzoriek moču a krvi sa používajú rôzne skríningové a identifikačné analytické metódy. Najprv sa vykonáva všeobecné testovanie vzorky (skríning), a ak výsledok nie je jednoznačne negatívny, vykonávajú sa ďalšie analytické identifikačné testy. Ak bola vo vzorke detegovaná jedna alebo viac dopingových látok (zakázané látky a/alebo ich transformačné produkty, tzv. metabolity), ide o pozitívnu vzorku. V začiatkoch antidopingovej analýzy (okolo 1970) boli metódy detekcie relatívne jednoduché. V dnešnej dobe sa na analýzu vzoriek vyžadujú sofistikované a finančne nákladné analytické prístroje.



Vzorka krvi. (Image: iStock Photo/robeo)



Vzorka moču. (Image: iStock Photo/robeo)



Prehľad analytických metód používaných na identifikáciu jednotlivých zakázaných látok. (Obrázok: Antidoping Schweiz & Labor Köln)

Prehľad analytických metód

Vzorky, ktoré laboratórium dostane je potrebné pred samotnou analýzou najprv upraviť. Počas tohto procesu sa látky a/alebo ich metabolity z moču izolujú. Izolované látky sú čiastočne podrobené derivatizácií, čo z nich robí prchavé a dostatočne stabilné na to, aby sa mohli plynovou chromatografiou oddeliť.

Na detekciu zakázaných látok používajú antidopingové laboratória rôzne analytické metódy. Niektoré triedy zakázaných látok možno vo vzorkách detegovať pomocou jednoduchých analytických metód. V mnohých prípadoch je však na analýzu vzoriek potrebné použiť niekoľko zložitejších procesov.

Vzorky sa najčastejšie analyzujú pomocou týchto dvoch krokov:

1. V chromatografickom procese sa jednotlivé chemické zlúčeniny zo zmesi izolujú (plynová chromatografia - GC, kvapalinová chromatografia - LC).
2. Potom nasleduje hmotnostná spektrometrická identifikácia (MS). Hmotnostné spektrum každej konkrétnej látky je jedinečné.

Okrem MS sa na identifikáciu jednotlivých látok používajú aj ďalšie (napríklad imunologické) metódy.



Hmotnostný spektrometer. (Image: Antidoping Switzerland, LAD)



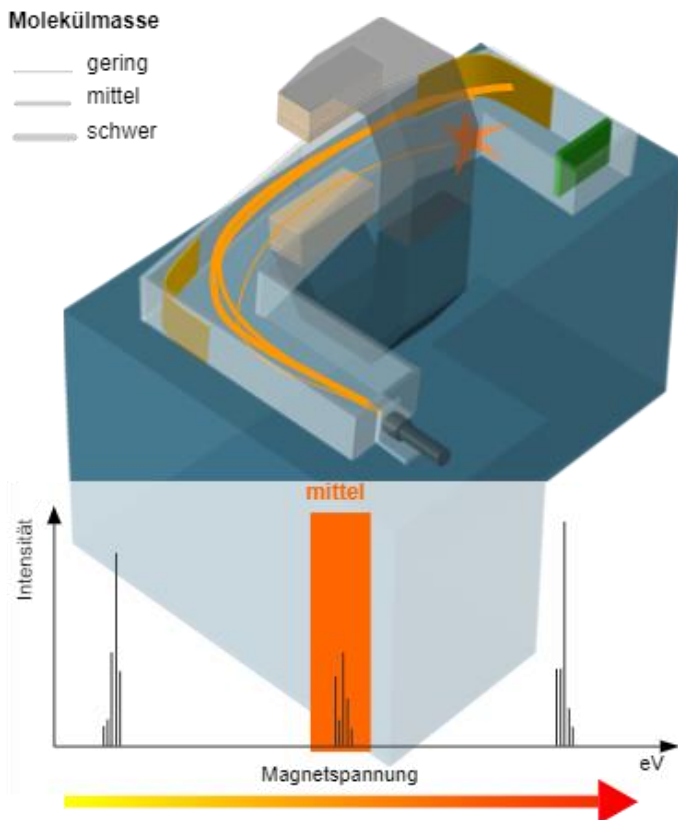
Plynový chromatograf. (Image: Antidoping Switzerland, LAD)

Plynová chromatografia s hmotnostným spektrometrom (GC-MS)

Vzorky sú najčastejšie pozitívne na anaboliká, stimulanty a kanabinoidy. Prítomnosť týchto látok sa zisťuje najmä pomocou plynovej chromatografie s následnou hmotnostnou spektrometriou.

Kvapalinová chromatografia s hmotnostným spektrometrom (LC-MS)

Kvapalinová chromatografia (LC) ako separačná metóda stále viac nahrádza plynovú chromatografiu (GC). Výhodou je možnosť vynechať pomerne drahé spôsoby úpravy vzoriek (napr. derivatizácia). Testovanie vzoriek na prítomnosť diuretík, beta-blokátorov, glukokortikoidov, SARM, peptidových hormónov, génového dopingu a ďalších sa v súčasnosti vykonáva pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou.



Záznam hmotnostného spektrometra.

GC-MS pre nekonjugované dopingové látky

Niektoré zakázané dopingové látky sa z organizmu vylučujú nezmenené (tj. nemetabolizujú sa), teda sú nekonjugované. Medzi také látky patria napríklad niektoré narkotiká a stimulanty. Zo vzoriek moču sa pomocou organického rozpúšťadla extrahujú a následne sa identifikujú plynovou chromatografiou (GC) v spojení s hmotnostným spektrometrom (MS), či detektorom pre dusík.

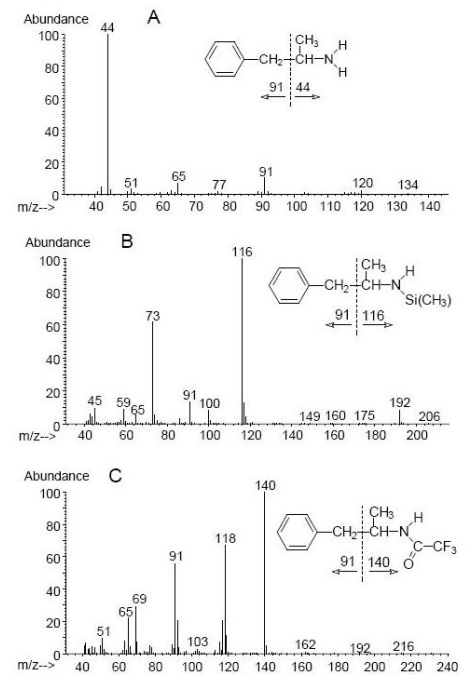
Amfetamín

Perorálne podávaný amfetamín prechádza do moču v prevažne nekonjugovanej forme. Príprava vzorky na jeho detekciu je preto relatívne jednoduchá. Amfetamín sa zo vzorky moču extrahuje organickým rozpúšťadlom za alkalických podmienok a potom sa za pomoci plynovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou priamo identifikuje. Pre spoľahlivejšiu detekciu amfetamínu a potvrdenie jeho prítomnosti vo vzorke je pred uskutočnením separácie plynovou chromatografiou vhodná derivatizácia.

GC-MS pre konjugované a neprchavé dopingové látky

Určité látky sa analyzujú ťažšie, či už kvôli ich chemickým vlastnostiam alebo preto, že v tele vytvárajú s inými látkami konjugáty. Ak sa použité zakázané látky vylučujú vo forme konjugátov, vyžadujú sa sofistikovanejšie analytické postupy a metódy. V takomto prípade je pred uskutočnením GC-MS analýzy potrebné konjugáty rozložiť procesom nazývaným hydrolýza.

Neprchavé alebo nestabilné látky, (napr. niektoré anaboliká) je potrebné pred analýzou upraviť tzv. derivatizáciou. V tomto procese sa molekuly modifikujú takým spôsobom, aby sa následne mohli ľahko previesť do plynného stavu, v ktorom zostanú stabilné počas plynovej chromatografie. Takto upravené vzorky sa podrobia GC-MS, čím sa identifikujú určité zakázané látky a/alebo ich metabolity.



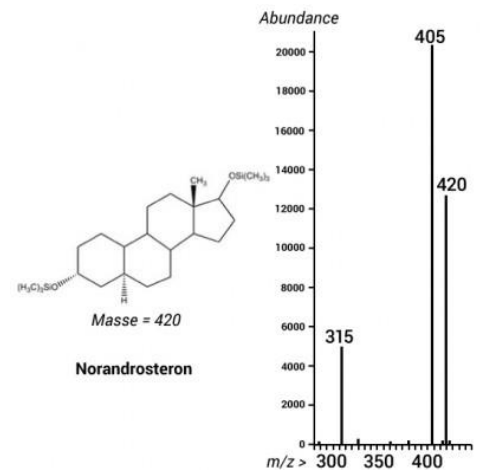
Hmotnostné spektrá:

- A) amfetamínu (M + 135)
- B) amfetamínu TMS (M + 207)
- C) amfetamínu TFA (M + 231)

Anaboliká

Metóda detekcie anabolík bola vyvinutá už v roku 1975, pričom do dnešného dňa zostala takmer nezmenená. Anaboliká sú v moči prítomné buď vo voľnej forme alebo vo forme glukuronidových či sulfátových konjugátov. Niektoré anaboliká sa v tele transformujú (metabolizujú), a v moči teda nie sú v pôvodnej forme.

V prvom kroku prípravy vzorky sa všetky anabolické substancie a ich metabolity hydrolyzujú enzýmovým roztokom, aby sa premenili na voľnú formu. Ďalej sú ich voľné hydroxylové (alkoholové) skupiny chránené, aby boli dostatočne stabilné pre následný separačný proces plynovej chromatografie (derivatizácia). Po separácii plynovou chromatografiou sú anaboliká detegované pomocou hmotnostnej spektrometrie.



Hmotnostné spektrum norandrosterónu.

Špeciálne detekčné metódy pre bioidentické látky

Osobitnou výzvou je detekcia dopingových látok, ktoré organizmus prirodzene produkuje v identickej chemickej forme. V takýchto prípadoch nestačí len identifikovať danú látku vo vzorke, pretože tá je prítomná vo svojej prirodzenej forme v každej vzorke. Na vyriešenie tohto problému bolo potrebné vyvinúť sofistikovanejšie detekčné metódy, ktoré sú obzvlášť dôležité pri detekcii dopingu hormonálnymi látkami, ako je pohlavný hormón testosterón, ľudský rastový hormón (hGH) alebo erytropoetín (EPO).

• Testosterón

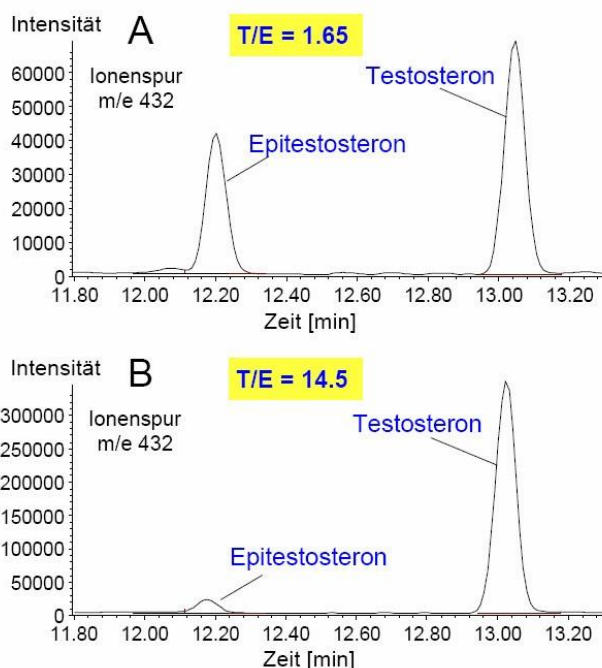
Detekcia bioidentického steroidného hormónu testosterónu je relatívne obtiažna, pretože syntetický a prirodzený testosterón sú veľmi podobné v štruktúre i veľkosti. Od roku 1984 bolo účelné určiť pomer medzi testosterónom a chemicky podobným steroidným hormónom - epitestosterónom vylučovaným močom. Výsledkom tejto analýzy je pomer testosterón/epitestosterón (pomer T/E), ktorý je charakteristický pre každého jednotlivca.

Pomer T/E

U mužov je prirodzený pomer T/E približne 1 až 2; u žien je tento pomer nižší. Po podaní testosterónu sú v moči prítomné zvýšené množstvá testosterónu, zatiaľ čo množstvo epitestosterónu zostáva nezmenené. Výsledkom je zvýšenie pomeru T/E. Ak sa zistí, že vo vzorke moču športovca (muža) je pomer T/E väčší ako štyri, uskutočňujú sa ďalšie analýzy, ako napríklad porovnanie s pomermi T/E predchádzajúcich alebo nasledujúcich vzoriek (dlhodobé štúdie). Tento postup je však časovo náročný a drahý.

Priama detekcia syntetického testosterónu pomocou IRMS

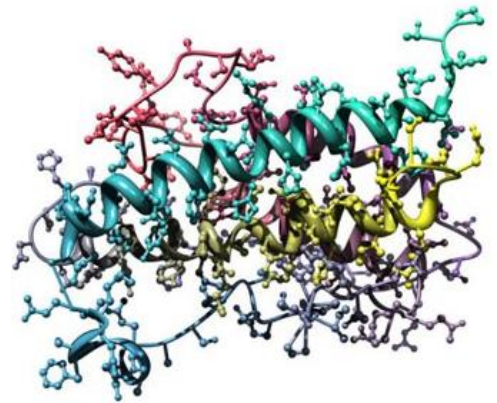
Nevýhodou stanovenia pomeru T/E je skutočnosť, že po podaní malých množstiev testosterónu sa T/E rýchlo normalizuje. Pomer klesne pod prah podozrenia ($T/E = 4$) v priebehu niekoľkých hodín. Novšia metóda umožňuje detegovať syntetický testosterón priamo pomocou hmotnostnej spektrometrie izotopového pomeru (IRMS). Táto metóda sa používa na stanovenie pomeru izotopov uhlíka, pomocou čoho je možné rozlíšiť prirodzený testosterón od syntetického. Použitie IRMS na detekciu zakázaných dopingových látok schválil MOV začiatkom roka 1999.



Obrázok A) pomer T/E v prirodzenom rozsahu (muži).
Obrázok B) ukazuje nápadne zvýšený pomer T/E.

- **Rastový hormón (hGH)**

Syntetický hGH a prirodzený ľudský hGH sú vo svojej peptidovej štruktúre - sekvencii aminokyselín identické na 100%. Jedna z možných detekčných metód je založená na odlišnej distribúcii izoformiem prirodzeného a synteticky produkovaného hGH (izoformová metóda). Ďalšia, novšia metóda detekcie meria dva biomarkery, ktorých hodnoty sú po externom podaní hGH neprirodzené zvýšene.



Metóda merania molekulovej hmotnosti izoformiem

Izoformou proteínu je prakticky identický variant proteínu s mierne odlišným tvarom alebo veľkosťou. V prirodzenom hGH má hlavná izoforma molekulovú hmotnosť 22 000 (22 kD). V organizme možno merať koncentračný pomer jednotlivých izoformiem rastového hormónu (22 kD, 20 kD a/alebo 17 kD) na základe ich molekulovej hmotnosti. Synteticky produkovaný hGH má molekulovú hmotnosť 22 kD a po jeho podaní sa teda zvyšuje len frakcia 22 kD, zatiaľ čo frakcie 20 kD a 17 kD zostávajú viac-menej konštantné. To umožňuje rozlíšiť externe podaný hGH (pre účely dopingu) a hGH produkovaný organizmom. Ak dochádza k prirodzenej stimulácii produkcie hGH napríklad fyzickým cvičením, produkujú sa všetky izoformy hGH, pričom ich relatívne pomery ostávajú zachované.

Štruktúra ľudského rastového hormónu (hGH). (Obrázok: iStock Photo / Martin McCarthy)

Novšia biomarkerová metóda

Ďalšia, novšia metóda detekcie hGH je známa ako biomarkerová metóda. Biomarkery sú molekuly, ktoré môžu byť stanovené v krvi alebo v iných telesných tekutinách, a zároveň umožňujú vyvodiť závery o fyziologickom stave organizmu. Pri tejto nepriamej metóde detekcie hGH sa pomocou imunoanalýzy stanoví koncentrácie dvoch biomarkerov rastového hormónu: inzulínového rastového faktora 1 (IGF-1) a N-terminálneho prokolagénového peptidu typu III (P-III-NP). Namerané koncentrácie IGF-1 a P-III-NP sú dosadené do špecifického matematického vzorca na výpočet takzvaného skóre GH-2000. Prahové hodnoty tohto skóre boli validované. Hodnota presahujúca prahovú hodnotu v závislosti od pohlavia sa považuje za pozitívny test na rastový hormón.

- **erythropoetín**

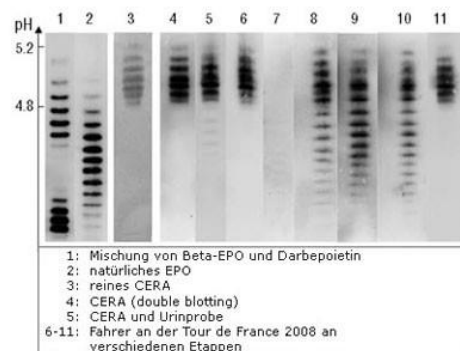
EPO sa v moči deteguje pomocou metódy izoelektrickej fokusácie. Medzi syntetickým a prirodzeným EPO je rozdiel v bočných reťazcoch cukorných zložiek viazaných na dusík asparagínu alebo na kyslík serínu. Odlišná je aj ch rozpustnosť a elektrický náboj sú vo vodnom roztoku s premenlivým pH.

Postup detekcie EPO

Vzorka moču sa najskôr koncentruje (dialýzou alebo ultracentrifugáciou). V nasledujúcom kroku sa aplikuje na gél s gradientom kyslosti. Potom sa pod elektrickým napätím EPO, ktorý má v alkalicknej oblasti záporný náboj pohybuje smerom ku kladnému pólu - do miesta svojho izoelektrického bodu. Na tomto mieste sa fokusuje (sústredzuje), pretože v tomto bode sa jeho celkový náboj vynuluje. Synteticky vyrábaný EPO je menej kyslý ako prirodzený EPO, a za daných podmienok na rozdiel prirodzeného EPO nemigruje k pozitívnemu pólu gélu. Novšia forma syntetického EPO, ktorý je kyslejší a dlhodobejšie pôsobiaci (darbepoetín alfa alebo NESP) ako prirodzený EPO migruje od negatívneho k pozitívnemu pólu na gély ďalej než prirodzený EPO. Použitím imunologických metód môže byť EPO na gély viditeľný.

Problémy s detekciou EPO

Kvôli krátkym polčasom a tzv. mikrodávkam je doping EPO detegovateľný len veľmi krátko po podaní. V súčasnosti sa zvyšuje používanie variantov EPO (tzv. "biosimilárnych"), ktoré sú veľmi podobné prirodzenému EPO, čím sa sťažuje ich detekcia vo vzorkách.

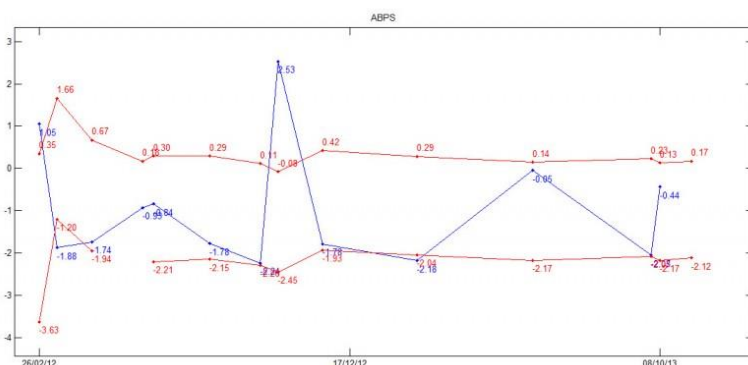
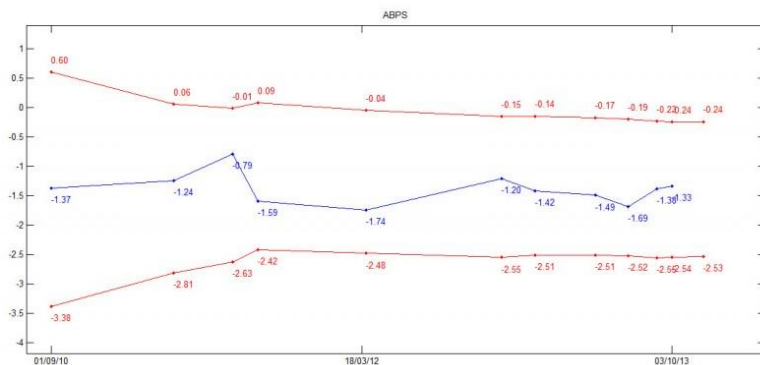


Izoelektrická fokusácia EPO.
(Obrázok: Antidoping Switzerland / LAD)

Nepriama detekcia zakázaných látok a metód na základe biologického pasu

Niektoré zakázané látky a metódy (napr. krvný doping) si na priamu detekciu v moči alebo krvi vyžadujú veľmi nákladné postupy. Na overovanie dopingových priestupkov vedci preto vyvíjajú nepriame detekčné metódy v dlhodobých profiloch (biologický pas športovca). Cieľom je priebežne monitorovať určité parametre v rámci krvného, steroidného a endokrinologického profilu. Tieto parametre umožňujú odborníkom rozpoznať neprirodzené zmeny alebo prevýšenia jednotlivých prahových hodnôt.

Nepriame metódy detekcie sa môžu použiť na začatie disciplinárneho konania proti športovcovi aj keď vzorka A a B nie je pozitívna. V cyklistike a atletike sa na základe týchto metód usvedčilo už niekoľko športovcov používajúcich zakázané látky alebo metódy. V prvom prípade nepriamej detekcie dala disciplinárna komisia pre dopingové prípady Švajčiarskeho olympijského výboru Stéphane Jolyovi zákaz činnosti na dva roky.



Horný obrázok zobrazuje profil krvi s normálnymi hodnotami a dolný obrázok zobrazuje profil krvi s abnormálnymi hodnotami. (Zdroj: Antidoping Switzerland, 2013)