

ОЛИМПИЙСКИЙ СПОРТ: МЕТОДЫ БОРЬБЫ С ДОПИНГОМ

А.Талибова, М.Токарев, к.х.н., М.Рыжов, к.ф.-м.н., ЗАО "МС-АНАЛИТИКА"
mikhail.ryzhov@textronica.com

Современный спорт высших достижений – индустрия, на которую работают передовые достижения фармацевтической промышленности, медицины и науки. Главные события в мире спорта, такие как чемпионаты мира или континентов, Олимпиады, – это не только вершина в спортивной карьере отдельного человека, но и арена для соревнований самых последних научных инноваций, направленных на укрепление и стимуляцию физических качеств спортсмена. Международный олимпийский комитет (МОК) ставит во главу угла концепцию о чистом спорте, в основе которой лежат следующие аргументы борьбы с допингом: применение допинга недопустимо по морально-этическим причинам в связи с тем, что он запрещен; допинг дает одностороннее преимущество спортсменам над соперниками, не применяющими допинг; запрет на применение допинга обусловлен заботой о здоровье спортсмена. Статья посвящена методам борьбы с допинговыми средствами.

После участвовавших смертей спортсменов прямо на соревнованиях из-за неконтролируемого применения допинга было создано независимое Всемирное антидопинговое агентство (WADA). В ходе своей деятельности в течение многих лет WADA и МОК пришли к выводам, что во многих случаях олимпийские победы и рекорды были достигнуты благодаря различным допинговым средствам.

Многие страны имеют собственные антидопинговые лаборатории: на сегодняшний день WADA аккредитованы 32 антидопинговые лаборатории на человеческий допинг и ряд лабораторий по всему миру находятся в процессе аккредитации. Российский антидопинговый центр – одна из ведущих мировых лабораторий по оборудованию и уровню рутинных анализов и исследований. Специальная олимпийская лаборатория в Сочи аккредитована WADA для работы в период Олимпийских и Паралимпийских зимних игр 2014 года. Московский антидопинговый центр проводит до 20 000 анализов в год, тестируя образцы, полученные от спортсменов во внесоревновательный период, в периоды подготовки к соревнованиям и во время соревнований. В соответствии с текущими правилами WADA, образцы, отобранные у всех спортсменов, принимающих участие в крупномасштабных соревнованиях,

проводящихся под эгидой международных организаций, также размещаются на хранение в течение 10 лет (до 2014 года этот срок составлял 8 лет). Делается это для того, чтобы можно было спустя десятилетие вернуться к анализу образцов на том уровне чувствительности, качественного и количественного определения, который станет достижим благодаря развитию аналитического оборудования и методик анализа допинговых средств. Широко известны связанные с обнаружением допинговых препаратов случаи лишения наград по прошествии нескольких лет после соревнований, на которых они были получены.

Деятельность антидопинговых лабораторий связана не только с контролем участников соревнований, но и с масштабной научно-исследовательской работой по изучению широкого спектра фармацевтических препаратов и их метаболизма в организме человека. В связи с появлением и выявлением новых средств, стимулирующих достижение более высоких спортивных результатов, WADA постоянно дополняет список запрещенных к использованию препаратов. Также постоянно разрабатываются новые методические подходы для определения тех или иных веществ, оптимизируются процедуры анализа для их ускорения и уменьшения их стоимости.

Например, специалистами ФГУП "Антидопинговый центр" получен патент на изобретение способа определения приема эритропоэтина при допинговом контроле спортсменов. Основной способ определения экзогенного эритропоэтина человека – прямой анализ эритропоэтина в моче методом ИЭФ (изоэлектрофиксирование – электрофоретическая разгонка по белкам и их фракциям) в сочетании с двойным блоттингом и хемилюминесцентным анализом. Эта методика длительная (3 суток) и трудоемкая. Авторами патента предложено другое решение: не прямое определение выбранных косвенных биохимических маркеров с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией повышенного разрешения. Тем самым удалось удешевить анализ и существенно сократить его время [1].

Все допинговые средства можно условно разделить на две группы – полностью запрещенные к применению препараты в течение всей спортивной карьеры и запрещенные только во время соревнований. Есть нарушения, когда проводят различные медицинские манипуляции, чтобы скрыть следы метаболитов или понизить их концентрацию ниже минимально определяемого уровня. Самым известным является гемодиализ. Кроме того, переливание собственной крови – эффективное средство стимуляции возможностей организма – также запрещено международными правилами. По этой причине современные антидопинговые лаборатории не только тестируют биологические жидкости спортсмена, но и создают банк данных так называемых «паспортов крови» по генетическим и биохимическим показателям.

Постоянно растущий список запрещенных препаратов требует применения самого современного научного оборудования. При этом стоимость анализа одной пробы достаточно высока, что выдвигает дополнительные требования к эффективности оборудования. Исследование биологических жидкостей человека – одна из самых сложных на сегодняшний день аналитических задач. Трудность состоит в том, что биологические жидкости человека представляют собой комплексные многокомпонентные химические матрицы, генерирующие достаточно интенсивный «химический» шум, на фоне которого необходимо найти очень малые концентрации запрещенных веществ или их метаболитов. Поэтому обнаружение допинговых препаратов и их мета-

болитов в сложной матрице образца возможно только с применением самых современных методов хроматографии и масс-спектрометрии.

Широкое распространение получили в антидопинговом контроле тройные квадрупольные масс-спектрометры с газовым или жидкостным хроматографом. Преимущества этих приборов – высочайшая чувствительность, избирательность и высокая скорость анализа. За счет высокой скорости работы масс-спектрометра за одну хроматографическую разгонку образца можно определить несколько десятков запрещенных веществ [2].

Основное преимущество тройных квадрупольных масс-спектрометров – это возможность обнаруживать известные вещества, т.е. вещества, для которых известна молекулярная масса и продукты распада в ячейке соударений тройного квадрупольного масс-спектрометра. Но в последние годы антидопинговые лаборатории все чаще сталкиваются с обнаружением в тестируемых пробах метаболитов неизвестных соединений. В частности, серьезной прогнозируемой проблемой может стать применение так называемых сконструированных стероидов (designer steroid). Для решения этой задачи необходимо использовать масс-спектрометрию высокого разрешения. В этом случае за счет высокого разрешения (50 000 и более) удастся разделить по точным массам искомые вещества и «химический» шум. Преимущество такого метода в том, что в файле анализа хранится информация не только о заданных известных веществах, но и о всех веществах, зарегистрированных во время анализа. В случае необходимости проверки на какие-либо иные вещества можно не проводить дополнительный анализ, а просто заново обработать исходный файл.

Одновременно возможности тандемной масс-спектрометрии с высоким разрешением могут работать и как селективные методы для быстрого высокочувствительного скрининга известных допинговых соединений [3].

Созданный в последние годы принципиально новый тип масс-спектрометрического анализатора – орбитальная ловушка ионов Orbitrap – позволил существенно увеличить эффективность и правильность подобного анализа. Данные приборы обладают высоким разрешением и при этом легко справляются с задачами, связанными с низкими концентрациями определяемых веществ. А именно такого рода исследованиями занимаются антидопинговые лаборатории.

При этом увеличение разрешения не приводит к падению чувствительности, как это происходит у масс-анализаторов времяпролетного типа, которые ранее традиционно применялись для анализа веществ белковой природы. Еще одна проблема, с которой сталкиваются антидопинговые лаборатории в последнее время, – применение так называемых пептидных допингов. Суть проблемы состоит в том, что в организм человека вводятся пептиды, которые сами по себе не являются допингами в классическом понимании этого слова. Однако эти пептиды изменяют биохимические процессы таким образом, что, например, увеличивается содержание различных гормонов в организме человека, легче переносить высокие нагрузки. При этом контроль за самим содержанием гормонов бесполезен, поскольку уровень гормонов индивидуален и может варьироваться в широких пределах.

Задача определения таких пептидов может успешно решаться с помощью прибора высокого разрешения с масс-анализатором типа "орбитальная ловушка". Например, в работе [4] приведен пример использования приборов Orbitrap и Q Exactive для определения пептидов, вызывающих увеличение концентрации гормонов роста.

Один из самых современных видов допинга – применение малых искусственно сконструированных РНК, в число которых входят молекулы, содержащие от 20 до 300 нуклеотидов. siRNA – это самые короткоцепочечные РНК. Они отвечают за РНК-интерференцию, которая вызывает необратимую деградацию матричной РНК и тем самым на генном уровне оказывает влияние на процессы метаболизма в организме. siRNA с успехом могут быть синтезированы для целенаправленного изменения метаболических процессов. Примером может являться воздействие на ген, который отвечает за выработку белка миостатина, блокирующего рост мышечной ткани. Блокирование действия миостатина приводит к значительному увеличению мышечной массы с практически полным отсутствием жировой прослойки. Отличить модифицированные молекулы siRNA от немодифицированных можно с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. В работе [5] описан разработанный авторами метод анализа олигонуклеотидов, выделенных из плазмы и предварительно очищенных, на приборе с орбитальной ловушкой ионов Exactive. Определение точных масс смысловых и антисмысловых (искусственных) цепочек олигонуклеотидов осуществляется с высокой

чувствительностью (предел обнаружения 0,25–1 нмоль/мл определяемого вещества) и точностью (11–21%).

Часто спортсмены в качестве допинга применяют вещества, относящиеся к группе анаболических стероидов – синтетических аналогов тестостерона. Тестостерон естественным образом вырабатывается в организме человека, и применение его аналогов может приводить только к увеличению его концентрации. Наиболее распространенным подходом к выявлению применений синтетического тестостерона ранее было определение отношения тестостерона к эпитестостерону (Т/Э). Показано, что величина Т/Э – достоверный показатель применения тестостерона в качестве допинга, поскольку синтез эпитестостерона в организме происходит независимо от тестостерона и установлено пороговое соотношение Т/Э, равное 4. Но как быть в случаях, когда повышенный уровень тестостерона является индивидуальной метаболической нормой? Кроме того, период времени, в течение которого отношение Т/Э приходит в норму, достаточно короткий, что позволяет всего лишь прекратить прием внутрь синтетических аналогов тестостерона перед соревнованиями или подготовительными сборами. Чтобы обойти эти трудности, применяется метод масс-спектрометрии стабильных изотопов в газовой фазе (IRMS). Возможность использования этого метода связана с тем, что изотопный состав углерода в природном тестостероне человека отличается от изотопного состава его синтетических аналогов. Медицинские препараты синтезируются (частично или полностью) из абиогенного по своей природе сырья, которое изначально имеет отличный от живой природы изотопный состав углерода. Отношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) для синтетических аналогов гормонов колеблется в диапазоне от –27,4 до –36,4‰. Для гормонов человека в зависимости от диеты и популяции эта же величина лежит в диапазоне от –16 до –26‰ и практически никогда не достигает значений ниже –27‰. Чтобы доказать факт употребления синтетических гормонов, в рамках одного организма исследуют метаболиты, в образовании которых заведомо участвуют привнесенные извне гормоны [6]. IRMS масс-спектрометры Thermo Fisher Scientific, применяемые в антидопинговых лабораториях, в том числе в Сочи, обладают самыми высокими показателями чувствительности и работают совместно с газовым хроматографом и онлайн-устройствами пробоподготовки и ввода пробы, тем самым обе-

спечивая низкую погрешность измерений и высокую точность анализа.

Спорт может и должен быть честным. Зрителю и болельщику важно наблюдать за демонстрацией действительно выдающихся физических качеств спортсменов, подаренных природой и отточенных упорной работой и стремлением к победе, а не за соревнованиями фармацевтических достижений в области стимуляции организма. Факт применения допинга фатально отражается на карьере и дальнейшей жизни любого спортсмена. Современный уровень научно-исследовательского оборудования позволяет выявить применение любых допинговых препаратов. А сроки хранения тестовых проб спортсменов сводят к нулю шансы не быть уличенными.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РФ № 2390779, **Апполонова С.А., Дикунец М.А., Родченков Г.М.**, ФГУП "Антидопинговый центр", 2008.
2. **Дикунец М.А., Апполонова С.А., Родченков Г.М.** Определение эндогенных и экзогенных глюкокортикостероидов методом ВЭЖХ-МС в моче человека. – Химико-фармацевтический журнал, 2010, т.44, №6, с.43–49.
3. **Girón A.J., Deventer K., Roels K., Van Eenoo P.** Development and validation of an open screening method for diuretics, stimulants and selected compounds in human urine by UHPLC–HRMS for doping control. – *Analytica Chimica Acta*, 2012, Apr. 6, 721, p.137–146.
4. **Thomas A., Kohler M., Mester J., Geyer H., Schanzer W., Petrou M., Thevis M.** Identification of the growth-hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in a nutritional supplement. – *Drug testing and analysis*, 2010, 2(3), p.144–148.
5. **Kohler M., Thomas A., Walpurgis K., Schanzer W., Thevis M.** Mass spectrometric detection of siRNA in plasma samples for doping control purposes. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, Oct, 398(3), p.1305–1312.
6. **Соболевский Т.Г., Прасолов И.С., Родченков Г.М.** Применение изотопной масс-спектрометрии углерода в допинговом контроле. – *Проблемы аналитической химии*, т.15: Изотопная масс-спектрометрия легких газообразующих элементов. Физматлит, 2011, с.193–209.

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"



МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ: АППАРАТУРА, ТОЛКОВАНИЕ И ПРИЛОЖЕНИЯ

Экман Р., Зильберинг Е.,
Вестман-Бринкмальм Э., Край А.

Москва: Техносфера, 2013. –
368 с.+ 16 с. цв. вкл.,
ISBN 978-5-94836-364-6

Цена: 1090 р.

Написанная при участии видных экспертов из Европы и Северной Америки, книга познакомит читателей с миром масс-спектрометрии, а также перспективами ее использования в различных областях науки. В книге представлена история метода, обсуждение приборов, теории и основных приложений. Особое внимание уделяется применению масс-спектрометрии в таких сферах, как органическая и неорганическая химия, судебная медицина, биотехнологии.

Книга призвана дать широкому кругу читателей фундаментальные знания по масс-спектрометрии, ставшей важной частью академического образования в области аналитической химии.

КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

✉ 125319 Москва, а/я 594; ☎ (495) 956-3346, 234-0110; knigi@technosphera.ru, sales@technosphera.ru

