



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΝΑΝΔΡΟΛΟΝΗΣ ΣΤΟ
ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗ ΕΚΘΕΣΗ**

**ΒΑΣΙΛΑΚΗ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016



**UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF MEDICINE**



**DIVISION OF MORPHOLOGY
LABORATORY OF TOXICOLOGY & FORENSIC CHEMISTRY**

Ph.D Thesis

**EVALUATION OF TOXICITY OF NANDROLONE IN THE
CARDIOVASCULAR SYSTEM OF LABORATORY ANIMALS
AFTER LONG-TERM EXPOSURE**

**VASILAKI FOTINI
CHEMIST**

HERAKLION 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ

ΤΖΑΤΖΑΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ

ΤΖΑΝΑΚΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΤΖΑΡΔΗ ΜΑΡΙΑ, ΑΝΑΠΛ.ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΓΕΡΜΑΝΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΝΙΚΙΤΟΒΙΤΣ-ΤΖΑΝΑΚΑΚΗ ΝΤΡΑΓΚΑΝΑ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΤΖΑΤΖΑΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

Στην οικογένεια μου...

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογίας & Εγκληματολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά τη χρονική περίοδο 2012-2016.

Η σελίδα αυτή πέρα του ότι σηματοδοτεί την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής, υπογραμμίζει την επίτευξη ενός στόχου ετών και ταυτόχρονα, γεννά πληθώρα συναισθημάτων. Ένας κύκλος γεμάτος γνώσεις και εμπειρίες κλείνει και ήταν ιδιαίτερη τιμή που βρέθηκα δίπλα σε αξιόλογους και καταξιωμένους καθηγητές, που με υπομονή προσέφεραν απλόχερα τη βοήθεια και τις γνώσεις τους.

Οφείλω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή Τοξικολογίας, κ.Τσατσάκη Αριστείδη, για την εμπιστοσύνη του και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπληρώσω το όνειρο μου και να ασχοληθώ ερευνητικά με τον τομέα της Τοξικολογίας. Η καθοδήγησή του, η υλική και ηθική υποστήριξη του συνέβαλαν καθοριστικά στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Τοξικολογίας, κ. Τζατζαράκη Μανώλη για την καθοδήγηση και τη βοήθεια του, τη συμπαράσταση καθώς και για τις χρήσιμες υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας, κ.Κουππάρη Μιχαήλ για τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής όσο και κατά την αξιολόγηση της.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, κ.Τζανακάκη Γεώργιο, κα. Τζαρδή Μαρία, κ. Γερμανάκη Ιωάννη και στην κα. Νικίτοβιτς-Τζανακάκη Ντράγκανα για τη συνεργασία και τη συνεισφορά τους στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου οφείλω στη Δρ. Τσιτσιμπίκου Χριστίνα και στον Δρ. Τσαρούχα Κωνσταντίνο, οι οποίοι παρά το γεγονός ότι ήταν χιλιόμετρα μακριά, αποτελούν τους συνοδοιπόρους μου στο ταξίδι αυτό, καθώς με την καθοδήγησή τους, την υπομονή τους και τη συνεχή και αμέριστη προσφορά γνώσεων συνέτελεσαν ουσιαστικά στην εκπόνηση της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο επιστημονικό και διοικητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Κρήτης για την εποικοδομητική συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε κατά την παραμονή μου εκεί.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αθανάσιο Αλεγκάκη, τον Δρ. Καββαλάκη Ματθαίο, τον Δρ. Στιβακτάκη Πολυχρόνη, τον Δρ. Μαραυγάκη Γεώργιο καθώς και την υποψήφια Διδάκτωρ Ρενιέρη Ελισάβετ για τη συμβολή τους στη διεξαγωγή και στην αξιολόγηση των πειραματικών διαδικασιών.

Ιδιαίτερα, πολλά ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Φραγκιαδάκη Περσεφόνη και στον υποψήφιο Διδάκτωρ Βαρδαβά Αλέξανδρο για τη στενή συνεργασία, την κατανόηση, και τη συμπαράσταση που επέδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στους δικούς μου ανθρώπους.

Στους γονείς μου, Λευτέρη και Μαρία και στις αδερφές μου, Γεωργία και Ιωάννα, που δίχως την αγάπη τους, την υπομονή και τη στήριξη τους δε θα τα είχα καταφέρει.

Στον Κώστα, το πιο μεγάλο ευχαριστώ, που με την αγάπη του είναι πάντα δίπλα μου και με προσέχει.

Βασιλάκη Φωτεινή

Ηράκλειο 2016

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά στοιχεία

Διεύθυνση Σαρανταπόρου 11, Ν.Ηράκλειο, Αθήνα
Τηλέφωνο 6974818115, 2102823679
Email fotinivas@yahoo.gr, medp1559@med.uoc.gr

Εκπαίδευση

Διδακτορική διατριβή

Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

02/2012-σήμερα

Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας

2008-2010

2009-2010: Ερευνητική εργασία ειδίκευσης με θέμα: «Ανάπτυξη και αξιολόγηση μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδογενών στεροειδών σε ούρα αθλητών με τη χρήση αεριοχρωματογραφίας/ φασματομετρίας μαζών».

Πτυχίο Χημείας

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας

2001-2007

2006-2007: Πτυχιακή εργασία στον τομέα της Οργανικής Χημείας με θέμα: «Αξιολόγηση των τρόπων ενεργοποίησης μαγνησίου κατά την παρασκευή των αντιδραστηρίων Grignard».

Επαγγελματική Εμπειρία

QC Analyst

Φαρμακοβιομηχανία Specifar S.A, Αθήνα

01/10/2015-31/3/2016

Αναλύσεις stability/ Αναλύσεις τελικών προϊόντων

Troubleshooting

Καθηγήτρια Χημείας

Φροντιστήριο Μέσης Εκπαίδευσης «Μαθητείων», Ηράκλειο

09/2014-08/2015

Ερευνήτρια- QC Analyst

Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

09/2012-06/2015

Ανάπτυξη και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αναβολικών ουσιών σε βιολογικά και άλλα δείγματα.

Προετοιμασία και ανάλυση βιολογικών και άλλων δειγμάτων με LC/MS και εκτίμηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων.

Πρακτική άσκηση στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος

Βιοχημικό Εργαστήριο, Νοσοκομείο Κατ, Αθήνα

07/2010-09/2010

Διδακτική εμπειρία

ΕΚΠΑ

2008-2010

Συμμετοχή στη διδασκαλία και επίβλεψη στη διεξαγωγή των εργαστηριακών ασκήσεων στα προπτυχιακά μαθήματα Αναλυτικής και Κλινικής Χημείας.

QC Analyst

Εργαστήριο Ελέγχου Doping, O.A.K.A , Αθήνα

06/2009-02/2010, 05/2008-01/2009

Προετοιμασία δειγμάτων ούρων αθλητών και αλόγων.

Ανάλυση των προαναφερθέντων δειγμάτων με GC/MS και εκτίμηση των αποτελεσμάτων των αναλύσεων.

09/2007-01/2008

Πρακτική άσκηση

Πρόσθετες γνώσεις

- Πολύ καλή γνώση της Αγγλικής Γλώσσας (First Certificate in English, University of Cambridge).
- Άριστη γνώση χειρισμού ηλεκτρονικών υπολογιστών (Πιστοποιητικό Πληροφορικής Global Intermediate).
- Βεβαίωση οινολογικής εκπαίδευσης στο πλαίσιο του προπτυχιακού κύκλου σπουδών.

Σεμινάρια

- Εκπαιδευτικό πρόγραμμα «Διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις του 21^{ου} αιώνα». (Ηράκλειο, Απρίλιος 2015).
- Εκπαιδευτικό σεμινάριο «Διαπίστευση εργαστηρίων σύμφωνα με το πρότυπο ISO/IEK 17025». (Ηράκλειο, Μάρτιος 2015).
- Eurotox Advanced Toxicology Course 2012 (September 2012, Porto).
- 9^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας (Αθήνα, Ιανουάριος 2009).

Συνέδρια

- Bionanotox Congress 2015 (May 2015, Heraklion).
- 50th Congress of the European Societies of Toxicology (Edinburg, September 2014).
- Bionanotox Congress 2014 (May 2014, Heraklion).
- Bionanotox Congress 2012 (May 2012, Heraklion).
- 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας (Αθήνα, Οκτώβριος 2010).
- 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας (Αθήνα, Απρίλιος 2010).
- 7th International Symposium of Minimal Residual Cancer (Αθήνα, Σεπτέμβριος 2009).
- Ημερίδα «Φαρμακογονιδιωματική και Εξατομικευμένη Θεραπεία» (Αθήνα, Μάιος 2009).

- 20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS (Αθήνα, Νοέμβριος 2008).
- 7th Hellenic Congress of Clinical Chemistry (Αθήνα, Οκτώβριος 2008).
- 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Λίπη, έλαια, λιπίδια: παρόν και μέλλον» (Αθήνα, Ιούνιος 2007).
- 2^ο Ελληνικό Συμπόσιο Οργανικής Χημείας (Αθήνα, Απρίλιος 2007).
- 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Βιοτεχνολογία και τεχνολογία τροφίμων» (Αθήνα, Ιούνιος 2007).

Δημοσιεύσεις

- Kioukia-Fougia N, Georgiadis N, Tsarouhas K, **Vasilaki F**, Fragkiadaki P, Meimeti E, Tsitsimpikou C. «Synthetic and natural nutritional supplements: health "allies" or risk to public health? ». *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2016 (10) [Epub ahead of print].
- Tsitsimpikou C, **Vasilaki F**, Tsarouhas K, Fragkiadaki P, Tzardi M, Goutzourelas N, Nepka C, Kalogeraki A, Heretis I, Epitropaki Z, Kouretas D, Tsatsakis AM. «Nephrotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration». *Toxicol Lett.* 2016;259:21-7.
- Vardavas AI, Stivaktakis PD, Tzatzarakis MN, Fragkiadaki P, **Vasilaki F**, Tzardi M, Datseri G, Tsiaoussis J, Alegakis AK, Tsitsimpikou C, Rakitskii VN, Carvalho F, Tsatsakis AM. «Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits». *Food Chem Toxicol.* 2016;94:250-9.
- **Vasilaki F**, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Germanakis I, Tzardi M, Kavvalakis M, Ozcagli E, Kouretas D, Tsatsakis AM. «Cardiotoxicity in

rabbits after long-term nandrolone decanoate administration». *Toxicol Lett.* 2016;22(241):143-151.

- Zafiropoulos A, Tsarouhas K, Tsitsimpikou C, Fragkiadaki P, Germanakis I, Tsardi M, Maravgakis G, Goutzourelas N, **Vasilaki F**, Kouretas D, Hayes A, Tsatsakis A. Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur and chlorpyrifos. *Hum Exp Toxicol.* 2014;33(12):1241-1252.

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- Stivaktakis PD, Vardavas AI, Tzatzarakis M, Fragkiadaki P, Ozcagli E, **Vasilaki F**, Tsamoukas A, Psycharakis S, Tsatsakis A. «Genotoxicity evaluation of long term rabbit exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide by cytokinesis block micronucleus assay (CBMN)». 51st Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2015, 13-16 Sept, Porto
- **Vasilaki F**, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Fragkiadaki P, Kalogeraki A, Stagkos D, Kouretas D, Ozcagli E, Tsatsakis A. «Oxidative stress and telomerase activity in blood and heart tissue in long-term exposed rabbits to nandrolone decanoate». 51st Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2015, 13-16 Sept, Porto
- **Vasilaki F**, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Fragkiadaki P, Heretis I, Tsardi M, Kalogeraki A, Germanakis I, Tsatsakis A. «Histopathological findings and telomerase activity in kidney tissue in long-term exposed rabbits to nandrolone decanoate». 51st Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2015, 13-16 Sept, Porto
- **Vasilaki F**, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Ozcagli E, Fragkiadaki P, Heretis I, Kovatsi L, Kyriakakis M, Tsatsakis MA. «Biochemical markers in long-term exposed rabbits to nandrolone decanoate». 50th Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2014, 7-10 Sept, Edinburgh
- Germanakis I, Tsarouhas K, **Vasilaki F**, Tsitsimpikou C, Vardavas AI, Fragkiadaki P, Liesivuori J, Datseri G, Tsatsakis MA. «Heart ultrasound measurements in long-term exposed rabbits to nandrolone decanoate». 50th Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2014, 7-10 Sept, Edinburgh
- **Vasilaki F**, Maravgakis G, Stivaktakis P, Tsitsimpikou C, Vakonaki E, Fragkiadaki P, Kovatsi L, Christakis-Hampsas M, Kokkinakis E, Tsatsakis A. «Evaluation of DNA damage and telomerase activity in liver

and kidney after long term rabbits exposure to chlorpyrifos». 49th Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2013, 1-4 Sept, Interlaken, Switzerland.

- Fragkiadaki P, Tsitsimpikou C, **Vasilaki F**, Stivaktakis P, Segradakis J, Tsarouhas K, Tzardi M., Kouretas D, Tsatsakis A. «Histopathological findings, telomerase activity and oxidative stress in kidney tissue after long-term rabbits exposure to turinabol and methanabol». 49th Congress of the European Societies of Toxicology, EUROTOX 2013, 1-4 Sept, Interlaken, Switzerland.
- Tsitsimpikou C., Tsarouhas K., Fragkiadaki P., **Vasilaki F.**, Tzardi M., Kouretas D., Lasithiotakis K., Tsatsakis A. «Histopathological findings, telomerase activity in liver tissues after long-term rabbits exposure to turinabol and methanabol». 14th International Symposium on Extraction Technologies (ExTech), Messina, Italy, 24-26 Sept, 2012.
- Tzatzarakis M., Kavvalakis M., Stivaktakis P., **Vasilaki F.**, Theodoropoulou E., Vakonaki E., Vynias D., Tsatsakis A. «Development of a rapid multi-component analysis of electronic cigarette's liquid». 14th International Symposium on Extraction Technologies (ExTech), Messina, Italy, 24-26 Sept, 2012.
- Bourmbopoulou A, Roumana M, **Vasilaki F.**, Angelis YS, Lyris M, Tsivou M, Kiouisi P, Vouroudi A, Koupparis MA, Georgakopoulos G. «A unified doping screening procedure based on LLE with ethyl acetate and combined GCMS, GCHRMS and LCQTOFMS analysis». Recent Advances in Doping Analysis (20) – Proceedings of the 30th Cologne Workshop, 26.2- 2.3.2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΔΟΠΙΝΓ-ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ.....	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Ιστορική Αναδρομή	15
1.2 Ορισμός ντόπινγκ	19
1.3 Απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι εντός και εκτός αγώνων	20
1.3.1 Απαγορευμένες ουσίες	20
1.3.2 Απαγορευμένες μέθοδοι.....	21
1.3.3 Απαγορευμένες ουσίες εκτός αγώνων	22
1.4 Ανδρογόνα Αναβολικά Στεροειδή.....	23
1.4.1 Εισαγωγή.....	23
1.4.2 Κατηγορίες ΑΑΣ.....	24
1.4.3 Μηχανισμός δράσης ΑΑΣ.....	26
1.4.4 Μεταβολισμός ΑΑΣ	28
1.4.5 Τα ΑΑΣ στην κλινική πράξη	32
1.5 Νανδρολόνη	33
1.5.1 Γενικά-Ιδιότητες	33
1.5.2 Μεταβολισμός νανδρολόνης	34
1.5.3 Χρήση της νανδρολόνης στην κλινική πράξη.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ-ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ	37
2.1 Δομή και λειτουργία της καρδιάς	38
2.1.1 Παθοφυσιολογία.....	40
2.2 Δομή και λειτουργία των νεφρών.....	42
2.3 Κατάχρηση ΑΑΣ	43
2.4 Παρενέργειες.....	45
2.4.1 Ενδοκρινικές διαταραχές- αναπαραγωγικό σύστημα	46

2.4.2 Ήπαρ	47
2.4.3 Μυοσκελετικό σύστημα	47
2.4.4 Δέρμα	47
2.4.5 Ψυχιατρικές εκδηλώσεις.....	47
2.5 Παρενέργειες στο καρδιαγγειακό σύστημα.....	48
2.6 Παρενέργειες στο νεφρικό σύστημα	55
2.7 Παρενέργειες σε επίπεδο κυττάρου	56
2.8 Παρενέργειες στους δείκτες του οξειδωτικού στρες.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ	62
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥΣ	63
3.1 Υγροχρωματογραφία.....	64
3.1.1 Γενικά-Αρχή μεθόδου.....	64
3.1.2 Φασματομετρία μαζών	65
3.1.2.1 Οργανολογία	66
3.1.2.2 Διασύνδεση της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών	68
3.2 Τα ούρα ως βιοδείκτης.....	69
3.3 Η τρίχα ως βιοδείκτης	71
ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ.....	73
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΝΑΝΔΡΟΛΟΝΗΣ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ	76
4.1 Σχεδιασμός και υλοποίηση της in-vivo μελέτης	77
4.1.1 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας βιολογικών δειγμάτων	78
4.1.2 Πρωτόκολλο θανάτωσης πειραματόζωων.....	79
4.2 Ανάπτυξη και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση νανδρολόνης και μεταβολιτών της σε ούρα και τρίχα πειραματόζωων.....	81
4.2.1 Αντιδραστήρια.....	81
4.2.2 Πρότυπα διαλύματα εργασίας.....	81
4.2.3 Υλικά-εργαστηριακές συσκευές.....	81
4.2.4 Οργανολογία	82
4.2.5 Παρασκευαστικά στάδια για την ανάλυση δειγμάτων ούρων.....	83
4.2.6 Παρασκευαστικά στάδια για την ανάλυση δειγμάτων τρίχας	84
4.2.7 Αποτελέσματα για τα δείγματα ούρων και τρίχας	85
4.2.7.1 Γραμμικότητα	85

4.2.7.2 Όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης.....	86
4.2.7.3 Μέση ανάκτηση	87
4.2.7.4 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα	87
4.2.7.5 Επίπεδα νανδρολόνης και των μεταβολιτών της στην τρίχα και στα ούρα	88
4.3 Υπερηχογραφικός έλεγχος	89
4.3.1 Πρωτόκολλο υπερηχογραφικού ελέγχου	89
4.3.2 Αποτελέσματα υπερηχογραφικού ελέγχου	90
4.4 Ιστοπαθολογική διερεύνηση.....	92
4.4.1 Επεξεργασία των ιστών.....	92
4.4.2 Ιστοπαθολογική εκτίμηση των δειγμάτων καρδιάς.....	92
4.4.3 Ιστοπαθολογική εκτίμηση των δειγμάτων νεφρών	94
4.5 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών	96
4.5.1 Συλλογή και προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών.....	96
4.5.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού βιοχημικών δεικτών	96
4.6 Προσδιορισμός ενεργότητας τελομεράσης	98
4.6.1 Μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας της τελομεράσης	98
4.6.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού της ενεργότητας της τελομεράσης	98
4.7 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες	100
4.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	100
4.7.2 Αντιδραστήρια και μέθοδοι προσδιορισμού.....	100
4.7.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού TBARS.....	100
4.7.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	101
4.7.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	101
4.7.2.4 Μέθοδος προσδιορισμού καταλάσης	101
4.7.2.5 Μέθοδος προσδιορισμού GSH.....	102
4.7.2.6 Αποτελέσματα των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα.....	102
4.7.2.7 Αποτελέσματα των δεικτών οξειδωτικού στρες στους νεφρούς	102
Συζήτηση	105
Βιβλιογραφία.....	111
Παραρτήματα	122
Π1. Λίστα Συντμήσεων	123
Π2. Λίστα Πινάκων	126
Π3. Λίστα Εικόνων	127
Π4. Λίστα Σχημάτων	128

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η *in-vivo* τοξικότητα του αναβολικού στεροειδούς, νανδρολόνης στο καρδιαγγειακό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η επίδραση της παρατεταμένης χρήσης του συνηθέστερα χρησιμοποιούμενου ενέσιμου εστέρα της νανδρολόνης, του δεκανοϊκού (nandrolone decanoate) στο καρδιαγγειακό σύστημα πειραματόζωων, τόσο σε μακροσκοπικό, όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Ακόμα μελετήθηκε η αντιστρεψιμότητα ή μη των τυχόν παρενεργειών της αναβολικής ουσίας μετά από χρονικό διάστημα αποτοξίνωσης (wash-out period, 4 μήνες). Για την επίτευξη των ανωτέρω, πραγματοποιήθηκε υπερηχογραφικός έλεγχος καθώς και ιστολογικός έλεγχος, του καρδιακού ιστού των πειραματόζωων. Συνάμα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενεργότητας της τελομεράσης στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος και στον καρδιακό ιστό, όπως επίσης μέτρηση βιοχημικών δεικτών και οξειδωτικού στρες στο αίμα. Επιπρόσθετα, αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της μητρικής ουσίας, αλλά και των μεταβολιτών της σε βιολογικά δείγματα (ούρα, τρίχα) προερχόμενα από τα πειραματόζωα.

Παράλληλα, με τη μελέτη της τοξικής δράσης της νανδρολόνης στην καρδιά, έγινε έλεγχος της πιθανής τοξικής δράσης του αναβολικού στους νεφρούς. Για το σκοπό αυτό, έγινε ιστολογική εκτίμηση των νεφρών, μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης στους νεφρούς, μέτρηση οξειδωτικού στρες στους νεφρούς και μέτρηση βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με τη λειτουργία των νεφρών.

Τα Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή (ΑΑΣ) αποτελούν συνθετικά παράγωγα της φυσικής ορμόνης τεστοστερόνης και ασκούν δύο βασικές λειτουργίες, προάγουν την ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος και τη μυϊκή αύξηση. Παρόλο που τα ΑΑΣ χρησιμοποιούνται σε διάφορες καταστάσεις ως θεραπευτική αγωγή, γρήγορα ακολούθησε η μη ιατρική χρήση τους, με σκοπό τη βελτίωση της αγωνιστικής ικανότητας η οποία αρχικά αφορούσε αθλητές της άρσης βαρών, αλλά και αθλημάτων που απαιτούν αυξημένη μυϊκή δύναμη. Στις μέρες μας, παρά το γεγονός ότι τα ΑΑΣ ανήκουν στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών της W.A.D.A (World Antidoping Agency), αποτελούν την ηγετική ομάδα των θετικών αποτελεσμάτων κατά τους ελέγχους doping.

Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των τελευταίων χρόνων, είναι ότι η κατάχρηση των αναβολικών ουσιών έχει αυξηθεί ραγδαία και έχει εξαπλωθεί σε χώρους πέρα του αθλητικού, για λόγους κοινωνικούς (π.χ για λόγους ψυχαγωγίας σε συνδυασμό με αλκοόλ) και κοσμητικούς (π.χ βελτίωση εξωτερικής εμφάνισης, απόκτηση μυώδους σωματότυπου). Ένα ακόμα ανησυχητικό στοιχείο είναι ότι οι δόσεις που λαμβάνουν

οι χρήστες γίνονται όλο και μεγαλύτερες με τα χρόνια. Αναφέρεται πως οι δόσεις που λαμβάνουν οι αθλητές με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσής τους είναι από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από τις αποδεκτές για θεραπευτικούς λόγους.

Παρότι η νανδρολόνη συντέθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1950, αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα αναβολικά στεροειδή στο χώρο του αθλητισμού, ενώ κλινικά εφαρμόζεται σε καταβολικές καταστάσεις, όπως σοβαρά εγκαύματα, καρκίνο και AIDS, καθώς επίσης στην απλαστική αναιμία, στη χρόνια ηπατική ανεπάρκεια και στην οστεοπόρωση. Η δομή της είναι παρόμοια με αυτήν της τεστοστερόνης, με τη μόνη διαφορά την απουσία της μεθυλομάδας στη θέση 19 και έτσι χαρακτηρίζεται ως 19-νορτεστοστερόνη. Η νανδρολόνη συναντάται είτε υπό τη μορφή ενέσιμων εστέρων της, είτε ως προορμόνες χορηγούμενες από το στόμα. Όλες οι μορφές της νανδρολόνης μετατρέπονται σχεδόν ολοκληρωτικά σε μεταβολίτες της φάσης I και εκκρίνονται ως συζεύγματα της νορανδροστερόνης (3α-υδροξυ-5α-εστραν-17-όνη) και νορετιοχολανολόνης (3α-υδροξυ-5β-εστραν-17-όνη).

Για τη διεξαγωγή του *in vivo* πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα (κουνέλια) ίδιας ηλικίας και ίδιου φύλου. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: Control, High dose Intramuscular (HDIM), Low dose Intramuscular (LDIM) και High Dose Subcutaneous (HDSC). Στα πειραματόζωα των ομάδων HDIM και HDSC η χορηγούμενη δόση ήταν 10 mg/kg και στα πειραματόζωα της ομάδας LDIM η χορηγούμενη δόση ήταν 4 mg/kg, δύο ημέρες την εβδομάδα για 6 μήνες. Το πειραματικό σχήμα της χορήγησης επιλέχθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να προσομοιώνει τη χρήση από τους αθλητές. Αποτελείται από δύο περιόδους, την περίοδο χορήγησης που διήρκεσε 6 μήνες και το διάστημα της αποτοξίνωσης (*wash-out period*) που διήρκεσε 4 μήνες. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, συλλέχθηκαν βιολογικά δείγματα (αίμα, τρίχα, ούρα) στην αρχή του πειράματος και στο τέλος κάθε διμήνου χορήγησης και αποτοξίνωσης. Το αίμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βιοχημικών δεικτών, της ενεργότητας της τελομεράσης και των δεικτών του οξειδωτικού στρες. Τα ούρα χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του μεταβολισμού και η τρίχα για τη μελέτη της πιθανής εναπόθεσης στον οργανισμό.

Για την ανίχνευση της αναβολικής ουσίας και των μεταβολιτών της στη τρίχα και στα ούρα αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος υγροχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών (LC-MS). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε στήλη Discovery HS C18 (25cm x 4.6cm x 5μm), η κινητή φάση αποτελούνταν από 0, 1% φορμικό οξύ και μεθανόλη (*gradient*) και πηγή χημικού ιονισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI), σε ρύθμιση θετικού ιονισμού. Για την αξιολόγηση αυτής χρησιμοποιήθηκαν οι αναλυτικές παράμετροι: γραμμικότητα, ακρίβεια, ανάκτηση, επαναληψιμότητα, όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Ο χρόνος έκλουσης της νανδρολό-

νης ήταν 14,93 min και τα ιόντα που εξετάστηκαν ήταν 275,15 and 307,25. Για το μεταβολίτη 19-NE και το 19-NA ο χρόνος ανάλυσης ήταν 16,13 min και 16,33 αντίστοιχα, ενώ τα ιόντα που εξετάστηκαν ήταν 259,25 και 241,10. Ο χρόνος ανάλυσης του turinabol (I.STD) ήταν 15.73 min και τα ιόντα που εξετάστηκαν ήταν 317.73 και 335.25.

Στα δείγματα τρίχας, το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου, για τη μητρική ουσία, ήταν 1,2 pg/mg, ενώ για τους δύο κύριους μεταβολίτες 19-NE και 19-NA ήταν 2,8 pg/mg και 6,2 pg/mg αντίστοιχα. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για τη μητρική ουσία, ήταν 4,0 pg/mg, ενώ για τους δύο κύριους μεταβολίτες 19-NE και 19-NA ήταν 9.3 pg/mg και 20,8 pg/mg, αντίστοιχα. Στα δείγματα τρίχας, η μέση ανάκτηση της νανδρολόνης βρέθηκε 92%, ενώ των μεταβολιτών 119%. Η ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου στα δείγματα τρίχας, ήταν για τη νανδρολόνη 99%, για τη 19-NE 98% και για τη 19-NA 102%. Η επαναληψιμότητα (precision) εκφρασμένη σε %RSD στα δείγματα τρίχας ήταν 14% για τη νανδρολόνη, 29% για τη 19-NE και 17% για τη 19-NA. Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν ικανοποιητική τόσο για τη μητρική ουσία όσο για τους μεταβολίτες (>0,99) στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0-1000 pg/mg). Σε δείγματα τρίχας προερχόμενα από τα πειραματόζωα βρέθηκε μόνο η μητρική ουσία: η μέση συγκέντρωση της οποίας για την ομάδα υψηλής δόσης ήταν $33,9 \pm 5,9$ pg/mg ενώ η μέση συγκέντρωση για την ομάδα χαμηλής δόσης ήταν $26,7 \pm 1,0$ pg/mg.

Στα δείγματα ούρων, το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου, για τη μητρική ουσία, ήταν 0,9 ng/ml, ενώ για τους δύο κύριους μεταβολίτες 19-νορετιοχολανολόνη και 19-νορανδροστερόνη 1,8 ng/ml και 1,7 ng/ml αντίστοιχα. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου, για τη μητρική ουσία, ήταν 3,1 ng/ml, ενώ για τους δύο κύριους μεταβολίτες 19-NE και 19-NA 8,7 ng/ml και 5,5 ng/ml, αντίστοιχα. Η μέση ανάκτηση της νανδρολόνης βρέθηκε 75%, του μεταβολίτη 19-νορετιοχολανολόνη 101% και του 19-νορανδροστερόνη 114%. Η ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου στα δείγματα ούρων, ήταν για τη νανδρολόνη 104%, για τη 19-νορετιοχολανολόνη 93% και για τη 19-νορανδροστερόνη 98%. Το %RSD στα δείγματα τρίχας ήταν 27% για τη νανδρολόνη, 25% για τη 19-NE και 30% για τη 19-NA. Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν ικανοποιητική τόσο για τη μητρική ουσία όσο για τους μεταβολίτες (>0,99) στο εύρος συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0-1000 ng/ml). Σε δείγματα ούρων προερχόμενα από τα πειραματόζωα βρέθηκαν μόνο οι μεταβολίτες της νανδρολόνης, για την ομάδα υψηλής δόσης η μέση συγκέντρωση της 19-NE ήταν $6,9 \pm 4,0$ ng/ml και αντίστοιχα, η μέση συγκέντρωση της 19-NA ήταν $8,9 \pm 4,5$ ng/ml. Για την ομάδα χαμηλής δόσης η μέση συγκέντρωση της 19-NE ήταν $1,6 \pm 0,5$ ng/ml και η μέση συγκέντρωση της 19-NA ήταν $11,7 \pm 2,9$ ng/ml.

Κατά την ιστολογική εκτίμηση του καρδιακού ιστού παρατηρήθηκε εστιακή ίνωση και ήπια χρόνια φλεγμονή στις ομάδες υψηλής δόσης (HDIM, HDSC). Επιπλέον, στην HDSC ομάδα παρατηρήθηκε οίδημα. Αντίθετα, ήπια εστιακή ίνωση παρατηρήθηκε στην ομάδα χαμηλής δόσης (LDIM). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές, τόσο στο βάρος της καρδιάς, όσο και στο συνολικό βάρος του σώματος των πειραματόζων στα οποία χορηγούνταν η αναβολική ουσία ($p > 0,05$).

Στα πειραματόζωα στα οποία πραγματοποιήθηκε η χορήγηση της αναβολικής ουσίας παρατηρήθηκε μια τάση για μη σημαντικές αυξημένες τιμές της μάζας του μυοκαρδίου ($p = 0,340$) η οποία συνδέθηκε με επιδείνωση των δεικτών της ολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας (MPI-PW: treated animals $0,73 \pm 0,16$ vs control group $0,52 \pm 0,07$, $p = 0,026$; MPI-TDI: treated animals $0,91 \pm 0,09$ vs control group $0,63 \pm 0,02$, $p = 0,001$). Η συστολική λειτουργία δεν παρουσίασε αλλαγές ή τάση για επιδείνωση στα πειραματόζωα στα οποία έγινε η χορήγηση. Επιπλέον, στα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε υψηλή δόση αναβολικής ουσίας παρουσίασαν πιο έκδηλη αύξηση στη μάζα του μυοκαρδίου (myocardial mass-mode: high-dose treated animals $6,0 \pm 1,4$ g vs low-dose treated animals $4,9 \pm 0,31$ g, $p = 0,343$) όπως επίσης και πιο σημαντική επιδείνωση στους δείκτες της ολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας, σε σχέση με τα πειραματόζωα χαμηλής δόσης.

Πραγματοποιήθηκε ακόμα μέτρηση των δεικτών του οξειδωτικού στρες (TBARS, carbonyls, TAC, catalase). Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων των TBARS ($p < 0,05$) στις δύο ομάδες υψηλής δόσης (HDIM, HDSC) και μη σημαντική μείωση των επιπέδων της καταλάσης ($p = 0,237$, $p = 0,238$ αντίστοιχα). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης τα επίπεδα των TBARS και της καταλάσης επέστρεψαν στα φυσιολογικά επίπεδα στην ομάδα HDIM, ενώ στην ομάδα HDSC, παρότι τα επίπεδα της καταλάσης επέστρεψαν σε φυσιολογικά επίπεδα, τα επίπεδα των TBARS αυξήθηκαν σημαντικά ($p = 0,01$). Στην ομάδα χαμηλής δόσης (LDIM) τα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες παρέμειναν πρακτικά σταθερά. Στα επίπεδα των carbonyls και TAC δε παρουσιάστηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση σε καμία ομάδα χορήγησης.

Από τη μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης στον καρδιακό ιστό διαπιστώθηκε πως κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης η σχετική ενεργότητα της τελομεράσης, αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις ομάδες χορήγησης (LDIM 230% vs HDIM 552%, $p = 0,004$; HDSC 212%). Ο ενδομυϊκός τρόπος χορήγησης ίσως συμβάλλει στην αύξηση της φλεγμονής, όπως φαίνεται από τη σχετική ενεργότητα της τελομεράσης στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (HDIM 652% vs HDSC 312%, $p = 0,003$; LDIM 330% vs HDSC 312%, $p = 0,20$). Κατά το διάστημα της αποτο-

ξίνωσης δε παρατηρείται επιστροφή των τιμών στα φυσιολογικά επίπεδα σε καμία από τις δύο ομάδες υψηλής δόσης ($p < 0,05$).

Παράλληλα μετρήθηκαν τα επίπεδα βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με τη καρδιαγγειακή λειτουργία. Παρατηρήθηκε μη σημαντική ($p > 0,05$) αύξηση των επιπέδων της CPK σε όλες τις ομάδες χορήγησης (control: 332 ± 253 U/L, LDIM: 645 ± 442 U/L, HDIM: 1149 ± 733 U/L, HDSC: 461 ± 314 U/L) και ταυτόχρονα μια ήπια αύξηση των επιπέδων LDH στις ομάδες ενδομυϊκής χορήγησης. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της Τροπονίνης I στην ομάδα HDSC ($p = 0,024$) κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης. Αυξημένα επίπεδα Τροπονίνης I παρατηρήθηκαν και κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης για την προαναφερθείσα ομάδα καθώς επίσης παρατηρήθηκε μια απότομη αύξηση στα επίπεδα του BNP ($7,3 \pm 3,6$ pg/mg).

Στο πλαίσιο της μελέτης της νεφροτοξικότητας η ιστολογική εκτίμηση των νεφρών έδειξε για την ομάδα HDIM υπεραϊμία στα σπειράματα και στον ενδιάμεσο χώρο των ουροφόρων σωληναρίων. Επίσης παρατηρήθηκε εστιακή ίνωση και ήπια διάμεση φλεγμονή. Στην ομάδα LDIM παρατηρήθηκε υπεραϊμία και ήπια χρόνια φλεγμονή. Στην ομάδα HDSC παρατηρήθηκε υπεραϊμία στον ενδιάμεσο χώρο των ουροφόρων σωληναρίων, αγγειακή συμφόρηση και αγγειοβρίθεια.

Επιπρόσθετα, μετρήθηκαν τα επίπεδα της ουρίας και της κρεατινίνης στον ορό προερχόμενο από τα πειραματόζωα. Οι δείκτες αυτοί αυξήθηκαν σε όλες τις ομάδες, με σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) μόνο στις HD (ουρία: control: $13,8 \pm 6,4$ ng/dl, LDIM: $20,0 \pm 5,7$ ng/dl, HDIM: $21,6 \pm 9,1$ ng/dl, HDSC: $16,7 \pm 7,3$ ng/dl, κρεατινίνη: control: $0,37 \pm 0,37$ mg/dl, LDIM: $0,46 \pm 0,27$ mg/dl, HDIM: $0,55 \pm 0,27$ mg/dl, HDSC: $0,36 \pm 0,26$ mg/dl). Οι τιμές της κρεατινίνης για την ομάδα HDIM μειώθηκαν κατά την περίοδο της αποτοξίνωσης κατά 20%, ενώ οι τιμές της ουρίας αυξήθηκαν σημαντικά για τις ομάδες HDIM και HDSC (56%, $p = 0,034$ and 21%, $p = 0,047$, αντίστοιχα) και δεν παρουσιάσθηκε σημαντικές αλλαγές κατά την περίοδο της αποτοξίνωσης. Παρατηρήθηκε επίσης αλλαγή των δεικτών του οξειδωτικού στρες (TBARS, GSH) στον ιστό των νεφρών στις ομάδες HDIM και HDSC (control: TBARS: $17,7 \pm 4,6$ nmol/mg protein, HDIM: $35,4 \pm 7,2$ nmol/mg protein, HDSC: 42 ± 29 nmol/mg protein, GSH: control: $0,138 \pm 0,004$ μ mol/mg protein, HDIM: $0,063 \pm 0,020$ μ mol/mg protein, HDSC: $0,098 \pm 0,012$ μ mol/mg protein). Τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν σημαντικά ($p = 0,018$) κατά 50% στην ομάδα HDIM και κατά 29% στην ομάδα HDSC ($p = 0,046$). Κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης τα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες παρέμειναν πρακτικά αμετάβλητα με μια μη σημαντική ($p > 0,05$) αύξηση των επιπέδων των TBARs και carbonyls στην ομάδα HDSC.

Οι μετρήσεις της ενεργότητας της τελομεράσης στο νεφρικό ιστό έδειξαν σημαντική αύξηση μόνο στην ομάδα HDIM ($p=0,020$) στην περίοδο χορήγησης. Κατά το διάστημα της αποτοξίνωσης η σχετική ενεργότητα της τελομεράσης μειώθηκε μη σημαντικά στις ομάδες HDIM και HDSC (12% και 26%, αντίστοιχα).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πως η νανδρολόνη προκαλεί επιδείνωση στους βιοχημικούς δείκτες της νεφρικής λειτουργίας σε συνδυασμό με τις αλλοιώσεις στους νεφρούς, πιθανώς ως απόρροια αυξημένου οξειδωτικού στρες.

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί μια καινοτόμα ερευνητική προσπάθεια στην μελέτη των παρενεργειών της κατάχρησης των αναβολικών στεροειδών, καθώς εξετάζει ποικίλες και πρωτοποριακές παραμέτρους ώστε να γίνει η εκτίμηση του βαθμού και του μηχανισμού της καρδιοτοξικότητας της νανδρολόνης. Συμπερασματικά, η παρατεταμένη χρήση της νανδρολόνης επηρεάζει την διαστολική λειτουργία, όπως αυτό φαίνεται από τους δείκτες της ολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας. Η αύξηση των επιπέδων της τροπονίνης και του BNP αποτελεί σημαντική ένδειξη της έναρξης της καρδιακής ανεπάρκειας. Το γεγονός ότι παρατηρείται αύξηση της τροπονίνης κατά το διάστημα της αποτοξίνωσης αποτελεί μια ανησυχητική ένδειξη για παρατεταμένη ή καθυστερημένη τοξική δράση των αναβολικών στην καρδιά. Επιπλέον, τα ιστοπαθολογικά ευρήματα καταδεικνύουν την τοπική βλάβη του καρδιακού ιστού καθώς και η αυξημένη ενεργότητα της τελομεράσης πιθανότατα λειτουργεί ως αντισταθμιστικός μηχανισμός για την επιβίωση των κυττάρων μπροστά στην υπάρχουσα συσσώρευση του οξειδωτικού στρες. Ακόμα, από τα αποτελέσματα φαίνεται πως οι ομάδες υψηλής δόσης επιβαρύνονται περισσότερο από αυτήν της χαμηλής. Η ενδομυϊκή χορήγηση υψηλής δόσης φαίνεται πως επηρεάζει περισσότερο το καρδιαγγειακό σύστημα σε σχέση με την αντίστοιχη χαμηλής δόσης. Η υποδόρια χορήγηση όμως φαίνεται να προκαλεί πιο αμετάβλητες παρενέργειες στο καρδιαγγειακό σύστημα.

ABSTRACT

In the present PhD thesis, the *in-vivo* toxicity of anabolic steroid, nandrolone on the cardiovascular system was studied. Specifically, we evaluated the effects of the prolonged use of the most commonly used injectable ester of nandrolone, (nandrolone decanoate), on the cardiovascular system of the experimental animals, both at a macroscopic and cellular level. Furthermore, the possibility of reversible, or not, side effects from the anabolic substance after a time period of detoxification (wash-out period, 4 months) was additionally evaluated. To achieve the above, an ultrasound scan as well as a histological estimation of the animal's cardiac tissue was done. Besides the cardiological aspect, telomerase activity in peripheral blood monocytes and heart tissue, as well as measurements of biochemical indicators of oxidative stress in the blood were determined. To ensure these results, an analytical method was developed and applied to determine the parent compound and its metabolites in biological matrices (urine, hair) sampled from the study animals.

At the same time of the study, possible toxic effects on the kidney function was estimated conducting histological tests and measuring telomerase activity, oxidative stress indicators as well as kidney function biochemical markers.

Anabolic Androgenic Steroids (AAS) are synthetic derivatives of the natural hormone testosterone and exert two main functions, them being to promote the development of the male reproductive system and to enhance muscle growth. Although AAS was initially used in various situations as a medical treatment, non-medical use of AAS followed in order to improve athlete's capabilities regarding weight lifting and sports that would require increased muscle strength. Nowadays, despite the fact that the AAS is a banned substance of W.A.D.A (World Antidoping Agency), they are still the leading group of positive results during doping control.

In the recent years, anabolic substance abuse has increased rapidly and has spread into areas beyond sports, such as for social (i.e. entertainment purposes in combination with alcohol) and cosmetic reasons (e.g. improved appearance, acquiring a muscular body type). Another interesting aspect is that the intake doses have increased over the years with doses taken by the athletes to be 10-100 times higher than the acceptable level needed for a therapeutic purpose.

Although nandrolone was synthesized in the early 1950s, it is one of the most used anabolic steroids in sports and clinically applied in catabolic states, such as severe burns, cancer, AIDS, aplastic anemia, chronic liver failure and osteoporosis. The chemical structure is similar to that of testosterone, with the only difference being the absence of the methyl group at position 19, thus characterized as 19-nortestosterone. Nandrolone is available either in the form of injectable esters, or as

prohormones, administered orally. All forms of nandrolone are converted almost completely into phase I metabolites and excreted as conjugates of norandrosterone (3 α -hydroxy-5 α -estr-17-one, 19-NA) and noretiocholanolone (3 α -hydroxy-5-estr-17-one, 19-NE).

The in vivo experiment consisted of rabbits of the same age and sex. The animals were divided into 4 groups: Control, High dose Intramuscular (HDIM), Low dose Intramuscular (LDIM) and High Dose Subcutaneous (HDSC). In the HDIM and HDSC groups the dose was 10 mg/kg and in the LDIM group the dose was 4 mg/kg, administered twice a week for a six-month period. The experimental scheme of administration was selected in such a way so as to simulate an athlete's use. It consisted of two periods, the administration period that lasted six months and the period of detoxification (wash-out period) that lasted for four months. During the experiment, biological matrixes (blood, hair, urine) were collected at the start of the experiment and at the end of each two-month period of administration and detoxification. Sampled blood was used for estimating biochemical indicators, telomerase activity and oxidative stress markers, whereas urine was used to study the metabolism of AAS and hair was used to study possible deposition.

For the detection of nandrolone and its metabolites, in hair and urine, an analytical method was developed based on liquid chromatography-mass spectrometry system (LC-MS). The analysis was conducted in a Discovery HS C18 (25cm x 4.6cm x 5 μ m) column, the mobile phase was gradient, consisting of 0.1% formic acid and methanol and APCI source was used. For the evaluation of the proposed methods, the following analytical parameters: linearity, accuracy, recovery, precision, LOD and LOQ were measured. The retention time for nandrolone was 14.93 min and the examined ions were 275.15 and 307.25. The retention time for 19-NE was 16.13 min and the examined ions were 259.25 and 241.10. The retention time for 19-NA was 16.33 min and the examined ions were 259.15 and 277.15. The retention time for turinabol (I.STD) was 15.73 min and the examined ions were 317.73 and 335.25.

In hair samples, LOD of the method regarding the parent compound was 1.2 pg/mg, while for the two major metabolites 19-NE and 19-NA it was 2.8 pg/mg and 6.2pg/mg respectively. The LOQ for the parent compound was 4.0 pg/mg, while for the two major metabolites 19-NE and 19-NA were 9.3 pg/mg and 20.8 pg/mg, respectively. In hair samples, the average recovery of nandrolone was 92% and 119% for the metabolites. The accuracy of the method for nandrolone was 99%, while for 19-NE was 98% and 19-NA 102%. The % RSD in the hair samples was 14% for nandrolone, 29% for 19-NE and 17% for the 19-NA The linearity of the method was satisfactory for both the parent compound as well as for its metabolites (> 0.99) in the

concentration range studied (0-1000 pg/mg). In hair samples, only the parent compound was detected where the average concentration of the high dose group was $33,9 \pm 5,9$ pg/mg and the average concentration for the low dose group was $26,7 \pm 1,0$ pg/mg.

In the urine samples, LOD of the method regarding the parent substance was 0.9 ng/ml, while the two major metabolites, 19-NE and 19-NA were 1.8 ng/ml and 1.7 ng/ml respectively. The LOQ for the parent substance was 3.1 ng/ml, while the two major metabolites, 19-NE and 19-NA were 8.7 ng / ml and 5.5 ng /ml, respectively. The mean recovery for nandrolone was 75%, for 19-NE 101% and for 19-NA 114%. The accuracy of the method in urine samples for nandrolone was 104% and for 19-NE 93% and for 19-NA 98%. The % RSD was 27% for nandrolone, 25% for the 19-NE and 30% for 19-NA. The linearity of the method was satisfactory for both the parent substance as also for the metabolites (> 0.99) in the concentration range studied (0-1000 ng/ml). Urine samples of the exposed animals were found to be positive only to nandrolone metabolites with the high dose group having a mean concentration of 6.9 ± 4.0 ng/ml for 19-NE and respectively, the average concentration of 19-NA was 8.9 ± 4.5 ng/ml.

In the histological evaluation of the cardiac tissues, focal fibrosis and mild chronic inflammation in the high dose groups (HDIM, HDSC) was observed although mild focal fibrosis was also observed in the low dose group (LDIM). In addition to this, the HDSC group also had a noticeable edema. No statistically significant changes were observed in both the weight of the heart and the total weight of the animal body in which the anabolic substance was administered ($p > 0,05$).

Animals that were exposed to the anabolic substance had a tendency for non-significant increased values of the myocardial mass ($p=0.340$), which was associated with the deterioration of the indices of total myocardial performance (MPI-PW: treated animals 0.73 ± 0.16 vs control group 0.52 ± 0.07 , $p = 0.026$; MPI-TDI: treated animals 0.91 ± 0.09 vs control group 0.63 ± 0.02 , $p = 0.001$). The systolic function showed no change or trend for deterioration in the exposed animals. Moreover, animals that received a high dose of anabolic substance showed a more pronounced increase in myocardial mass (myocardial mass-mmode: high-dose treated animals 6.0 ± 1.4 g vs low-dose treated animals 4.9 ± 0.31 g, $p = 0.343$) as well as more significant deterioration in the indices of total myocardial function compared with the low-dose group.

Measurement of oxidative stress markers (TBARS, carbonyls, TAC, catalase) showed a significant increase in the levels of TBARS ($p < 0,05$) in the two high dose groups (HDIM, HDSC) and non-substantially reduction of catalase levels ($p = 0,237$,

p = 0,238 respectively). Of particular interest is the fact that during the detoxification period, levels of TBARS and catalase returned to normal in the HDIM group but for the HDSC group, although the levels of catalase did return to normal, the level of TBARS increased (p = 0.01). In the low dose group (LDIM) levels of oxidative stress indicators remained practically constant. The levels of carbonyls and TAC did not show any significant differences in any treatment group.

Measurement of telomerase activity in heart tissues during the exposure period significantly increased in all administration groups (LDIM 230% vs HDIM 552%, p = 0,004; and HDSC 212%). The intramuscular administration route may have contributed to the increased inflammation, as shown by the relative activity of telomerase in peripheral blood monocytes (HDIM 652% vs HDSC 312%, p = 0,003; LDIM 330% vs HDSC 312%, p = 0,20). During the detoxification period, all telomerase activity levels remained stable in the two high dose groups (p <0,05).

Measured levels of biochemical markers that are linked with cardiovascular function showed an inconsistent significant (p > 0.05) increase in CPK levels in all administration groups (control: 332 ± 253 U / L, LDIM: 645 ± 442 U / L, HDIM: 1149 ± 733 U / L, HDSC: 461 ± 314 U / L) while a mild increase in LDH levels in the intramuscular administration group was also noticed. A significant increase was observed for Troponin I levels in the HDSC group (p = 0,024) during the administration period. Elevated Troponin I levels were observed during the detoxification period for the aforementioned group as well as a sudden increase was observed in the BNP levels (7.3 ± 3.6 pg / mg).

Additionally, the measured levels of urea and creatinine in the serum showed an increase in all groups, with significant differences (p <0.05) only in the HD (urea: control: 13.8 ± 6.4 ng / dl, LDIM: 20.0 ± 5.7 ng / dl, HDIM: 21.6 ± 9.1 ng/dl, HDSC: 16.7 ± 7.3 ng / dl, creatinine: control: 0.37 ± 0.37 mg / dl, LDIM: 0.46 ± 0.27 mg / dl, HDIM: 0.55 ± 0.27 mg / dl, HDSC: 0.36 ± 0.26 mg / dl). Values of creatinine for the HDIM group decreased during the detoxification period by 20%, while values of urea significantly increased in the HDIM and HDSC groups (56%, p = 0,034 and 21%, p = 0,047, respectively) and non-significant changes occurred during the detoxification period.

There was also a change of oxidative stress indicators (TBARS, GSH) in kidney tissue in the HDIM and HDSC groups (control: TBARS: 17.7 ± 4.6 nmol / mg protein, HDIM: 35.4 ± 7.2 nmol / mg protein, HDSC: 42 ± 29 nmol / mg protein, GSH: control: 0.138 ± 0.004 mol / mg protein, HDIM: 0.063 ± 0.020 mol / mg protein, HDSC: 0.098 ± 0.012 mol / mg protein). The levels of GSH decreased significantly (p = 0.018) by 50% in the HDIM group and by 29% in HDSC group (p = 0,046). During

the period of detoxification, levels of oxidative stress markers practically remained unchanged with a non-significant ($p > 0,05$) increased levels of TBARs and carbonyls in the HDSC group.

Measurements of telomerase activity in the renal tissues showed a significant increase only in the HDIM group ($p = 0,020$) throughout the administration period. During the detoxification period, relative telomerase activity decreased non-significantly in HDIM and HDSC groups (12% and 26%, respectively).

From the above results it appears that nandrolone is responsible for the deterioration in biochemical markers of renal function along with alterations in the kidneys, presumably as a result of increased oxidative stress.

This protocol is an innovative research effort to study the side effects of the abuse of anabolic steroids as it examines diverse and innovative parameters so as to make an assessment of the extent and mechanism of nandrolone cardiotoxicity. In conclusion, prolonged use of nandrolone affects diastolic function, as shown by the indicators of total myocardial function. The increased levels of Troponin and BNP are an important indications of initial heart failure. The fact that there is an increase of Troponin during the detoxification period is a concerning sign for prolonged or delayed toxic effects of the anabolic to the heart. In addition, histopathological findings demonstrate the local damage of heart tissue as well as that the increased activity of telomerase probably functions as a counteract mechanism due to the increase of oxidative stress. Concluding, high dose groups are by far affected more compared to the low dose groups. The intramuscular administration of high doses seems to affect the cardiovascular system in relation to the corresponding low dose intramuscular administration. However, subcutaneous administration appears to cause the most invariant effects on the cardiovascular system.

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - DOPING-ΑΝΑΒΟΛΙΚΑ

Εισαγωγή

Στην εποχή μας, εύκολα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι ο αθλητισμός ολοένα και απομακρύνεται από την αρχική φιλοσοφία του, ως μέσο έκφρασης και οδός άσκησης σώματος και πνεύματος. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, μαζί με την αναβίωση των σύγχρονων Ολυμπιακών Αγώνων, αρχίζει να κυριαρχεί η έννοια του πρωταθλητισμού, ο οποίος αργά αλλά σταθερά διαστρεβλώνει τα αθλητικά ιδεώδη. Έννοιες όπως «αθλητικό πνεύμα», «ευγενής άμιλλα» και «ολυμπιακό ιδεώδες» τείνουν να εκλείψουν για την πλειοψηφία του αθλητικού κόσμου καθώς η εμπορευματοποίηση του αθλητισμού δε συνάδει με το πνεύμα του συναγωνισμού. Το οικονομικό δέλεαρ είναι τέτοιο που ωθεί την πλειοψηφία των αθλητών στην υιοθέτηση αθέμιτων τακτικών προκειμένου να διασφαλίσουν τη διάκριση και τη νίκη.



Η χρήση απαγορευμένων ουσιών με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης των αθλητών, πλέον έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις και έχει στιγματίσει όλες σχεδόν τις μεγάλες αθλητικές διοργανώσεις των τελευταίων χρόνων. Ο έλεγχος ντόπινγκ πέρα από την ηθική και νομική του διάσταση, αποτελεί ένα μέτρο για την προστασία της υγείας των αθλητών, οι οποίοι προσπαθούν να υπερνικήσουν τα όρια της φύσης και πολλές φορές αγνοούν τις ανεπιθύμητες δράσεις των ουσιών και τεχνικών που χρησιμοποιούν. Επιπλέον, συμβάλλει στην καταπολέμηση της παράνομης διακίνησης και χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών.

Περισσότερα όπως ξαφνικοί θάνατοι ατόμων που έκαναν χρήση κυρίως αναβολικών ουσιών, καθιστά επιτακτικό το σχεδιασμό δράσεων και προληπτικών μέτρων για τον περιορισμό και την αντιμετώπιση του φαινομένου ντόπινγκ, καθώς αυτό δεν αποτελεί αποκλειστικό σύμπτωμα του επαγγελματικού αθλητισμού αλλά έχει εξαπλωθεί σε διάφορες κοινωνικές ομάδες. Η ολοκληρωμένη και υπεύθυνη ενημέρωση των εμπλεκομένων στο πρόβλημα αθλητών, προπονητών, γιατρών, αλλά κι εκείνη του ευρύτερου κοινωνικού περιβάλλοντος κι ιδιαίτερα των γονέων και εκπαιδευτικών θα συμβάλλει στην αποφυγή υιοθέτησης λανθασμένων αντιλήψεων και τακτικών που αποσκοπούν μόνο στη νίκη. Σημασία άλλωστε δεν έχει ο προορισμός αλλά το ταξίδι...

1.1 Ιστορική αναδρομή

Το φαινόμενο του ντόπινγκ ως μέσο βελτίωσης της απόδοσης των αθλητών, παρουσιάζεται ήδη από τους Ολυμπιακούς Αγώνες στην αρχαιότητα, όπου γίνονται αναφορές χρήσης επιλεγμένων μανιταριών, φυτών και μιγμάτων κρασιού και βοτάνων. Επίσης, διάφορα φυτά χρησιμοποιούνταν για την ανακούφιση του πόνου επιτρέποντας έτσι στους τραυματισμένους αθλητές να συνεχίσουν τον αγώνα τους [1]. Ο όρος doping (ντόπινγκ) εμφανίζεται για πρώτη φορά σε αγγλικό λεξικό το 1869, όπου προσδιορίζεται ως ένα μείγμα από όπιο και άλλα είδη ναρκωτικών ουσιών για χρήση σε αγώνες ιπποδρόμου. Η λέξη dope ανάγεται σε μια διάλεκτο της Νότιας Αφρικής. Πρόκειται για ένα υψηλής περιεκτικότητας και ιδιόχειρης κατασκευής αλκοολούχο ποτό, το οποίο χρησιμοποιείτο ως διεγερτικό σε θρησκευτικές τελετές [2]. Σήμερα, ο αγγλικός όρος doping προσδιορίζεται ως η χορήγηση σε αθλητή ή η χρήση από αυτόν, ενός απαγορευμένου μέσου (ουσίας ή μεθόδου), με σκοπό την τεχνητή (παροδική ή μη) βελτίωση της αγωνιστικής του ικανότητας, απόδοσης ή διάθεσης, κατά τη διάρκεια των αγώνων ή κατά το στάδιο της προπονητικής προετοιμασίας του.

Η χρησιμοποίηση μεθόδων ντόπινγκ γνωστοποιείται το 19^ο αιώνα σε ιππικούς αγώνες στη Μεγάλη Βρετανία. Το 1865 πληροφορούμαστε για περιστατικά ντόπινγκ σε κολυμβητικούς αγώνες στα κανάλια του Άμστερνταμ. Το 1879 αναφέρεται η χρήση μειγμάτων με βάση την καφεΐνη από Γάλλους κολυμβητές. Ο θάνατος του ποδηλάτη Linton στον αγώνα Παρίσι-Μπορντώ συσχετίστηκε με υπερβολική δόση καφεΐνης [2,3]. Οι ποδηλατικοί αγώνες των 6 ημερών που καθιερώθηκαν το 1879, η επαγγελματική πυγμαχία σε συνδυασμό με τον ιππόδρομο και τη σκυλοδρομία προώθησαν την ενίσχυση των προσπαθειών ντόπινγκ με αλκοόλη, κοκαΐνη, καφεΐνη, ηρωίνη, νιτρογλυκερόλη και στρυχνίνη. Στους Ολυμπιακούς αγώνες το 1904, ο μαραθωνοδρόμος νικητής Thomas Hicks έλαβε κατά τη διάρκεια του αγώνα ένα μίγμα κονιάκ και στρυχνίνης και παραλίγο να πεθάνει [1].

Στις δεκαετίες του 1940 και 1950 η αμφεταμίνη αντικαθιστά τη στρυχνίνη και γίνεται το φάρμακο επιλογής των αθλητών, ιδίως σε αθλήματα, όπως η ποδηλασία, όπου η δράση της θεωρήθηκε ωφέλιμη για τη βελτίωση της αθλητικής επίδοσης. Χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά τη διάρκεια του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου ως μέσο για την αύξηση της σωματικής επίδοσης στον αθλητισμό, αλλά ακόμη και από στρατιώτες για τη βελτίωση της διανοητικής εγρήγορσης και την καθυστέρηση της εμφάνισης καμάρου [2]. Μια νέα διάσταση του ντόπινγκ εμφανίστηκε στο δεύτερο ήμισυ της δεκαετίας του 1950 και σχετίζεται με τη χρήση των αναβολικών στεροειδών ή γνωστότερων απλά ως αναβολικών. Η Σοβιετική Ολυμπιακή ομάδα πρώτη κάνει χρήση ανδρικών ορμονών ώστε να αυξήσει δύναμη και αντοχή. Όταν έπεσε το τείχος του Βερολίνου, γνωστοποιείται το κυβερνητικό πρόγραμμα της Ανατολικής Γερμανίας

περί ενίσχυσης της απόδοσης νέων αθλητών μέσω σχολαστικής χορήγησης στεροειδών και άλλων φαρμάκων. Το αποτέλεσμα του προγράμματος αυτού ήταν η δημιουργία χρυσών Ολυμπιονικών, κυρίως γυναικών, που όμως τελικά υπέστη σοβαρές ιατρικές διαταραχές και ανωμαλίες, ακόμα και πρόωρο θάνατο [1,2].

Η ιστορία του ντόπινγκ, που αρχίζει να υφίσταται ή μάλλον να προσδιορίζεται ως όρος το 1869, αποκτά χαρακτήρα προβλήματος για την αθλητική κοινότητα το 1960, αφού οι πρώτες επιδόσεις που σχετίστηκαν με τη διαδικασία του ντόπινγκ ήταν εκείνες αμερικανών αθλητών. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Ρώμης το 1960 εντοπίστηκαν από αμερικανικής πλευράς, οι πρώτοι αθλητές που είχαν πάρει αναβολικά. Αναφορές αθέμιτης χρήσης φαρμάκων στον αθλητισμό γίνονται και στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Τόκιο το 1964 με χειρότερες διαστάσεις στους αντίστοιχους Αγώνες του Μεξικού το 1968. Στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μονάχου το 1972, το φαινόμενο του ντόπινγκ αποκτά τόσο ανεξέλεγκτο χαρακτήρα ώστε να χαρακτηριστούν ως «Ολυμπιακοί Αγώνες των Αναβολικών».

Ενώ οι περιορισμοί για τη χρήση φαρμάκων στον αθλητισμό είχαν εισαχθεί από το 1920 και η IAAF (Διεθνής Ένωση Ομοσπονδιών Κλασικού Αθλητισμού) είχε απαγορεύσει τη χρήση διεγερτικών, επίσημος έλεγχος σε αθλητές δεν είχε ακόμα πραγματοποιηθεί. Ως εκ τούτου, οι περιορισμοί παρέμεναν αναποτελεσματικοί λόγω έλλειψης δυνατοτήτων πραγματοποίησης των δοκιμών [3]. Η πρώτη νομοθεσία για την καταπολέμηση της κατάχρησης φαρμάκων στον αθλητισμό παρουσιάστηκε από τη Γαλλική κυβέρνηση το 1963 και στη συνέχεια, το 1965, από τη Βελγική. Το 1967 ιδρύθηκε η Ιατρική Επιτροπή της IOC (Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή) και ο έλεγχος των αθλητών των Ολυμπιακών Αγώνων για απαγορευμένες ουσίες άρχισε το 1968 στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Πόλης του Μεξικού [2]. Ο έλεγχος κατά τη διάρκεια των αγώνων αποδείχθηκε αναποτελεσματικός ως προς τις ουσίες μακράς δράσης, όπως αναβολικών παραγόντων, καθώς η βελτίωση των επιδόσεων παρέμενε αρκετό χρονικό διάστημα μετά την αποβολή της ουσίας. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι έλεγχοι για ντόπινγκ θα πρέπει να πραγματοποιούνται και εκτός του αγώνα. Παρά τις αντιρρήσεις, οι έλεγχοι εκτός αγώνα καθιερώθηκαν και πλέον αποτελούν τη ραχοκοκαλιά στην καταπολέμηση του ντόπινγκ [3]. Σημαντικό γεγονός στη μάχη κατά του ντόπινγκ αποτελεί η αφαίρεση του χρυσού μεταλλίου από το δρομέα Ben Johnson στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ το 1988, λόγω χρήσης της αναβολικής ουσίας στανοζολόλης [3].

Η IOC δημοσίευσε πρώτη φορά το 1967 τη λίστα των απαγορευμένων κατηγοριών ουσιών και μεθόδων, η οποία περιελάμβανε πέντε κατηγορίες: συμπαθομιμητικές αμίνες, αναλγητικά ναρκωτικά, διεγερτικές ουσίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, αντικαταθλιπτικά και ηρεμιστικά. Ένα χρόνο αργότερα τα αντικαταθλιπτικά

και τα ηρεμιστικά απομακρύνθηκαν από τη λίστα [2,4]. Η λίστα των απαγορευμένων ουσιών και μεθόδων της IOC έχει τροποποιηθεί και επεκταθεί πολλές φορές. Τα αναβολικά στεροειδή (1976), ντόπινγκ αίματος (1988), παράγοντες επικάλυψης (1988), β-αγωνιστές (1988), διουρητικά (1988), πρωτεϊνικές ορμόνες (1992) και άλλα αναβολικά (1993) επίσης απαγορεύτηκαν. Η IOC συμπεριέλαβε στη λίστα την τεστοστερόνη το 1983, η οποία αποτέλεσε το πρώτο ενδογενές ή φυσικά παραγόμενο στεροειδές που απαγορεύτηκε. Η ανίχνευση της τεστοστερόνης βασίστηκε στη σύγκριση με άλλες ορμόνες: την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH) που εκκρίνεται από την υπόφυση και την επιτεστοστερόνη που εκκρίνεται από τους όρχεις [2, 5,6].

Το 1999, σε μια προσπάθεια των διεθνών αθλητικών οργανισμών και κυρίως της IOC να συνεργαστούν με τις κυβερνήσεις, ώστε να οργανωθεί και να εναρμονιστεί ο παγκόσμιος αγώνας κατά του ντόπινγκ, ιδρύθηκε στη Λωζάννη ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ (W.A.D.A.). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ διατηρεί τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ που συμπεριλαμβάνει τη λίστα που καθορίζει τις ουσίες και μεθόδους που απαγορεύονται στον αθλητισμό. Για τον έλεγχο doping, χρησιμοποιούνται βιολογικά δείγματα προερχόμενα από τους αθλητές. Δείγματα ούρων ή δείγματα αίματος συλλέγονται από τους αθλητές, είτε πριν είτε κατά τη διάρκεια αγώνων. Τα δείγματα αυτά αναλύονται για απαγορευμένες ουσίες σε αναλυτικά εργαστήρια διαπιστευμένα από τη W.A.D.A [2].

Στο πλαίσιο της προσπάθειας καταπολέμησης του φαινομένου, ο W.A.D.A. συνεργάζεται με την IOC, τη Διεθνή Παραολυμπιακή Επιτροπή, όλες τις Διεθνείς Αθλητικές Ομοσπονδίες, καθώς και τους κατά τόπους Εθνικούς Οργανισμούς Αντι-Ντόπινγκ (N.A.D.O.) και τις Εθνικές Ολυμπιακές Επιτροπές. Ο W.A.D.A., εκτός από συντονιστικό ρόλο, έχει δικαίωμα να διεξάγει ελέγχους ντόπινγκ εκτός αγώνων, ανεξάρτητα από τους N.A.D.O. ή τους ελέγχους που πραγματοποιούν οι Αθλητικές Ομοσπονδίες. Ο εθνικός φορέας καταπολέμησης του ντόπινγκ στην Ελλάδα είναι το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης του Ντόπινγκ (Ε.Σ.Κ.Α.Ν.). Κεντρικός ρόλος του Ε.Σ.Κ.Α.Ν είναι ο σχεδιασμός, η παρακολούθηση, ο έλεγχος, ο συντονισμός και η εφαρμογή δράσεων και προγραμμάτων για την καταπολέμηση του ντόπινγκ σε εθνικό επίπεδο [2].

Ακολουθεί μια σύντομη ιστορική αναδρομή που περιλαμβάνει τα σημαντικότερα γεγονότα στο χώρο του ντόπινγκ (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ιστορική αναδρομή με τα σημαντικότερα γεγονότα ντόπινγκ

1865	Παλαιότερη καταγεγραμμένη περίπτωση λήψεως φαρμάκων στους κολυμβητικούς αγώνες του Άμστερνταμ.
1886	Πρώτος καταγεγραμμένος θάνατος του αθλητή Linton, κατά τη διάρκεια του ποδηλατικού αγώνα στο Παρίσι.
1904	Ο νικητής μαραθωνοδρόμος του St.Louis Tom Hicks καταρρέει στη γραμμή τερματισμού μετά τη λήψη στρυχνίνης και κονιάκ.
1910	Προσπάθειες εργαστηριακού ελέγχου ντόπινγκ με την ανίχνευση αλκαλοειδών σε σίελο αγωνιστικών αλόγων και σκύλων.
1930-1960	Διαδεδομένη χρήση διεγερτικών τύπου αμφεταμίνης και ξεκινά η χρήση αναβολικών στεροειδών. Θάνατος του Δανού ποδηλάτη Knut Enemark Jensen στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Ρώμης το 1960.
1963	Η Γαλλία θεσπίζει νομοθεσία κατά του ντόπινγκ και δύο χρόνια μετά ακολουθεί το Βέλγιο.
1967	Θάνατος του Άγγλου ποδηλάτη Tom Simpson λόγω χρήσης αμφεταμινών και αλκοόλ στον ποδηλατικό γύρο της Γαλλίας.
1968	Ξεκινάει η εφαρμογή ελέγχου απαγορευμένων ουσιών στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Μεξικού.
1960-1980	Ανατολικογερμανοί ιατροί χορηγούν συστηματικά αναβολικά σε έφηβους αθλητές με απολογισμό, τόσο Ολυμπιακά μετάλλια, όσο και σοβαρά προβλήματα υγείας, γεγονός που αποδείχτηκε μετά την πτώση του Τείχους του Βερολίνου. Η Heidi Krieger, πρωταθλήτρια Ευρώπης το 1986 στη σφαιροβολία, αναγκάστηκε το 1997 να κάνει αλλαγή φύλλου και πλέον ζει σαν Andreas Krieger.
1988	Αφαίρεση χρυσού μεταλλίου από τον Καναδό δρομέα μικρών αποστάσεων Ben Johnson λόγω θετικού δείγματος σε στανολόλη.
1999	Ίδρυση του W.A.D.A στη Λωζάννη.
2000	Η αθλήτρια του στίβου Marion Jones κερδίζει πέντε μετάλλια στους Ολυμπιακούς Αγώνες του Σίνδαι, τα οποία παραδίδει το 2007 μετά από ομολογία της ότι έκανε χρήση της ουσίας τετραϋδρογεστρινόνης (THG), ενός νέου τύπου αναβολικού στεροειδούς.
2003	Συγκρότηση του Ε.Σ.Κ.Α.Ν.
2004	Κατά τους Ολυμπιακούς αγώνες της Αθήνας ανιχνεύονται 25 θετικά δείγματα, στη πλειοψηφία τους λόγω αναβολικών ουσιών. Οι Έλληνες αθλητές του στίβου Κώστας Κεντέρης και Κατερίνα Θάνου αποκλείονται από τους Ολυμπιακούς Αγώνες λόγω παράβασης του κανονισμού αντι-ντόπινγκ. Αφαίρεση των χρυσών μεταλλίων από τους Ούγγρους ρίπτες, Αντριάν Άνους στη σφύρα και Ρόμπερτα Φάζεκας στον δίσκο, όταν ο πρώτος προσπάθησε να δώσει άλλο δείγμα στον έλεγχο ντόπινγκ ενώ ο δεύτερος δεν εμφανίστηκε ποτέ.

1.2 Ορισμός ντόπινγκ

Για τον αγγλικό όρο doping, που έχει επικρατήσει διεθνώς, έχει προταθεί στα Ελληνικά ο όρος φαρμακοδιέγερση, ο οποίος όμως δεν αποδίδει πλήρως το περιεχόμενο του αντίστοιχου αγγλικού. Ο όρος φαρμακοδιέγερση είναι περιοριστικός, καθότι το ντόπινγκ δε γίνεται μόνο με φάρμακα και δεν προκαλεί απαραίτητα διέγερση. Έτσι έχει υιοθετηθεί και στην ελληνική γλώσσα ο διεθνής όρος «ντόπινγκ».

Στον Παγκόσμιο Κώδικα για την καταπολέμηση του Ντόπινγκ του W.A.D.A., ως ντόπινγκ ορίζεται η παραβίαση ενός ή περισσότερων διατάξεων του άρθρου 2.1 έως 2.8 του Κώδικα αυτού, όπως συνοπτικά παρουσιάζονται παρακάτω :

- Παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών της ή δεικτών σε ένα δείγμα του αθλητή.
- Χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Άρνηση ή αποτυχία, χωρίς επαρκή αιτιολόγηση, συμμετοχής στη διαδικασία δειγματοληψίας μετά από ειδοποίηση, όπως περιγράφεται από τους ισχύοντες κανονισμούς ή η κατά οποιοδήποτε τρόπο αποφυγή της διαδικασίας δειγματοληψίας.
- Παραβίαση των ισχυόντων κανονισμών διαθεσιμότητας του αθλητή για έλεγχο εκτός συναγωνισμού, συμπεριλαμβανομένης της αποτυχίας υποβολής απαιτούμενων πληροφοριών διαμονής και τη μη εμφάνιση του αθλητή για έλεγχο.
- Αλλοίωση ή απόπειρα αλλοίωσης σε οποιοδήποτε μέρος του ελέγχου doping.
- Κατοχή απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων.
- Διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης απαγορευμένων ουσιών ή μεθόδων.
- Χορήγηση ή απόπειρα χορήγησης απαγορευμένης ουσίας ή μεθόδου εντός ή εκτός συναγωνισμού, ενθάρρυνση ή οποιασδήποτε μορφής συνενοχή σε παραβίαση ή απόπειρα παραβίασης κανονισμών.

Είναι χαρακτηριστικό ότι ο ορισμός αυτός αναφέρεται σε απαγορευμένες κατηγορίες ουσιών και όχι σε συγκεκριμένες ουσίες. Αυτό γίνεται για να καλυφθούν όλες οι λιγότερο γνωστές παραλλαγές μιας ουσίας και οι τυχόν μελλοντικές παρόμοιες ουσίες. Το αν μια ουσία ανήκει σε μια απαγορευμένη κατηγορία κρίνεται από την Επιτροπή Εργασίας Καταλόγου Απαγορευμένων του W.A.D.A. με βάση τη δράση ή τη χημική δομή της [7]. Οι όροι που πρέπει να πληροί μια ουσία ώστε να συμπεριληφθεί στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών είναι : α) να θέτει σε πραγματικό ή πιθανό κίνδυνο την υγεία του αθλητή, β) να αποσκοπεί στην ενίσχυση της απόδοσης του αθλητή και γ) να αντιτίθεται του πνεύματος του αθλητισμού [9].

1.3 Απαγορευμένες ουσίες και μέθοδοι εντός και εκτός αγώνων

1.3.1 Απαγορευμένες ουσίες

Ανδρογόνα Αναβολικά Στεροειδή (ΑΑΣ)

- Τα εξωγενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι ουσίες που δεν παράγονται από τον οργανισμό, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ορισμένα παραδείγματα αυτών είναι τα εξής: στανολόλη, 1-τεστοστερόνη, τρενμπολόνη, μεθυλοτριενολόνη, καθώς και άλλων ουσιών με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοια φαρμακολογική και βιολογική δράση.
- Τα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι ουσίες που είναι δυνατό να παραχθούν από τον οργανισμό, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ορισμένα παραδείγματα αυτών είναι: ανδροστενεδιόλη, ανδροστενεδιόνη, διυδροτεστοστερόνη, δεϋδροεπιανδροστερόνη και τεστοστερόνη.
- Άλλοι αναβολικοί παράγοντες συμπεριλαμβανομένων, αλλά όχι περιοριζόμενων στα: κλενβουτερόλη, εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέα ανδρογόνων (SARMs), τιμπολόνη, ζερανόλη και ζιλπατερόλη [8]

Πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες και σχετικές ουσίες

Απαγορεύονται οι παρακάτω ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των αποδεδειγμένων τους παραγόντων:

- Παράγοντες που διεγείρουν την ερυθροποίηση, όπως η ερυθροποιητίνη (erythropoietin, EPO), δαρβεποϊτίνη, αιματίδη.
- Χοριονική γοναδοτροπίνη (CG) και LH στους άνδρες
- Αυξητική ορμόνη (GH), αυξητικοί παράγοντες τύπου ινσουλίνης όπως ο IGF-1, μηχανο-αυξητικοί παράγοντες, και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοια φαρμακολογική και βιολογική δράση.

β2-αγωνιστές

Απαγορεύονται όλοι οι β2-αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένων των οπτικών ισομερών τους. Συνεπώς, και η χορήγηση δια εισπνοής σαλβουταμόλης και σαλμετερόλης απαιτεί προηγούμενη έγκριση από τον αρμόδιο φορέα για κατ' εξαίρεση χρήση για θεραπευτικούς σκοπούς.

Ανταγωνιστές και τροποποιητές ορμονών

Απαγορεύονται οι ακόλουθες κατηγορίες:

- Αναστολείς της αρωματάσης συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων στους: αναστραζόλη, αμινογλουτεθιμίδιο, εξεμεστάνη, λετροζόλη, τεστολακτόνη, φορμεστάνη.
- Εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων (SERMs) συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων στους: ραλοξιφαίνη, ταμοξιφαίνη, τορεμιφαίνη.
- Άλλες ουσίες με αντι-οιστρογονική δράση συμπεριλαμβανομένων αλλά μη περιοριζόμενων στις: κλομιφαίνη, κυκλοφενίλιο, φουλβεστράντη.
- Παράγοντες που τροποποιούν τις λειτουργίες της μωστατίνης συμπεριλαμβανομένων, αλλά μη περιοριζόμενων στους αναστολείς της μωστατίνης.

Διουρητικά και άλλοι παράγοντες επικάλυψης

Απαγορεύονται οι παράγοντες επικάλυψης, οι οποίοι περιλαμβάνουν: διουρητικά, προβενεσίδη, διαστολείς πλάσματος (π.χ. ενδοφλέβια χορήγηση αλβουμίνης, δεξτράνης, υδροξυαιθυλαμύλου και μαννιτόλης) και άλλες ουσίες με παρόμοιες βιολογικές δράσεις. Στα διουρητικά περιλαμβάνονται τα: ακεταζολαμίδιο, αμιλορίδη, κανρενόνη, αιθακρυνικό οξύ, μετολαζόνη, και άλλες ουσίες με παρόμοια χημική δομή ή παρόμοια φαρμακολογική και βιολογική δράση.

1.3.2 Απαγορευμένες μέθοδοι

Αύξηση μεταφοράς οξυγόνου

Απαγορεύονται:

- Το ντόπινγκ αίματος συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυτόλογου, ομόλογου ή ετερόλογου αίματος ή προϊόντων ερυθρών αιμοσφαιρίων οποιασδήποτε άλλης προέλευσης.
- Η τεχνητή αύξηση της πρόσληψης, μεταφοράς ή απόδοσης οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένης, αλλά όχι περιοριζόμενης, της χρήσης υπερφθοριοχημικών ενώσεων, εφαπροξιράλης (RSR13) και τροποποιημένων προϊόντων αιμοσφαιρίνης.

Χημικοί και φυσικοί χειρισμοί

- Απαγορεύεται η αλλοίωση ή η απόπειρα αλλοίωσης με σκοπό τη μεταβολή της ακεραιότητας και της εγκυρότητας των δειγμάτων που συλλέγονται σε ε-

λέγχους ντόπινγκ. Οι χειρισμοί περιλαμβάνουν, αλλά δεν περιορίζονται σε καθετηριασμό, αντικατάσταση ή/και νόθευση ούρων.

- Οι ενδοφλέβιες εγχύσεις απαγορεύονται, εκτός από αυτές που πραγματοποιούνται νόμιμα κατά την εισαγωγή σε νοσοκομείο επειγόντων ιατρικών περιστατικών ή κλινικών εξετάσεων [8].

Γονιδιακό ντόπινγκ

Ως γονιδιακό ντόπινγκ ορίζεται η χρήση για μη θεραπευτικούς σκοπούς γονιδίων, γενετικών στοιχείων ή/και κυττάρων ή η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που έχουν την ικανότητα να αυξάνουν την αθλητική απόδοση. Πειραματικά έχει καταστεί δυνατή η μείωση του σωματικού βάρους σε ποντίκια με τη χορήγηση γονιδίων που διεγείρουν τη σύνθεση λεπτίνης, αλλά και αύξησης του μεγέθους και της δύναμης των μυών με απομάκρυνση του γονιδίου της μωστατίνης [2].

Απαγορεύεται η μεταφορά κυττάρων ή γενετικών στοιχείων (DNA, RNA) ή η χρήση φαρμακευτικών ή βιολογικών παραγόντων που μεταβάλλουν τη γονιδιακή έκφραση, με σκοπό τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, τα οποία έχουν την ικανότητα να βελτιώσουν την αθλητική απόδοση [8].

1.3.3 Απαγορευμένες ουσίες εκτός αγώνων

Διεγερτικά

Απαγορεύονται όλα τα διεγερτικά (συμπεριλαμβανομένων αμφότερων των οπτικών ισομερών τους), εκτός των παραγώγων ιμιδαζολίου για τοπική χρήση και των διεγερτικών εκείνων που περιλαμβάνονται στο Πρόγραμμα Παρακολούθησης του 2015: βουπροπιόνη, καφεΐνη, φαινυλεφρίνη, φαινυλο-προπανολαμίνη, πιπραδόλη, συνεφρίνη. Ορισμένες από τις διεγερτικές ουσίες που απαγορεύονται είναι οι: αμφεταμίνη, κοκαΐνη, μοδαφινίλη, νικεταμίδιο, οκτοπαμίνη, πεμολίνη, στρυχνίνη κ.ά. Οι ουσίες εφεδρίνη και μεθυλεφεδρίνη απαγορεύονται, όταν η συγκέντρωσή τους στα ούρα είναι μεγαλύτερη από 10 μg/mL.

Ναρκωτικά

Ορισμένα παραδείγματα ναρκωτικών που απαγορεύονται είναι τα εξής: βουπρενορφίνη, δεξτρομοραμίδιο, ηρωίνη, μεθαδόνη, μορφίνη.

Κανναβινοειδή

Απαγορεύονται τα κανναβινοειδή

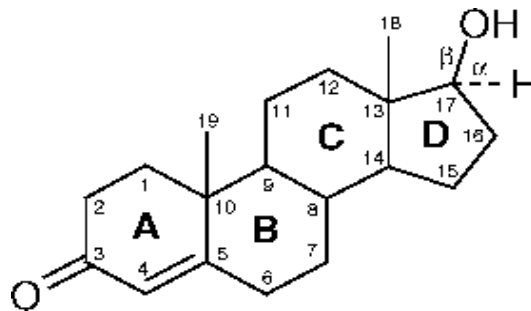
Γλυκοκορτικοστεροειδή

Απαγορεύονται όλα τα γλυκοκορτικοστεροειδή

1.4 Ανδρογόνα Αναβολικά Στεροειδή

1.4.1 Εισαγωγή

Η απομόνωση, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός της τεστοστερόνης το 1935 [10] οδήγησε στην περαιτέρω μελέτη της ορμόνης αυτής με αποτέλεσμα την καλύτερη κατανόηση της βιολογικής της δράσης. Η τεστοστερόνη (Σχήμα 1) είναι η κύρια ανδρική ορμόνη και συντίθεται στα κύτταρα Leydig στους όρχεις. Ωστόσο είναι παρούσα και στις γυναίκες, στις οποίες συντίθεται στις ωοθήκες και τα επινεφρίδια [11-13].



Σχήμα 1: Δομή τεστοστερόνης

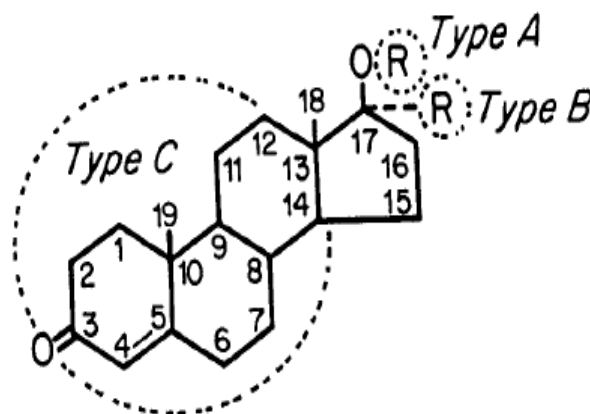
Η τεστοστερόνη κατέχει ανδρογενείς αλλά και αναβολικές ιδιότητες, τις οποίες ασκεί τόσο σε αναπαραγωγικά αλλά και σε μη αναπαραγωγικά όργανα- στόχους. Η ανδρογενής δράση της τεστοστερόνης είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος καθώς και των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου, ενώ η αναβολική δράση αναφέρεται στην δέσμευση του αζώτου και στην προαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε διάφορους ιστούς και όργανα. Η αναβολική δράση της τεστοστερόνης και των παραγώγων της εκδηλώνεται κυρίως ως μυοτροφική δράση με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μυϊκής μάζας και δύναμης.

Η δυνητική θεραπευτική αξία της δράσης της τεστοστερόνης σε διαφορετικές καταβολικές καταστάσεις οδήγησε στην σύνθεση πολλών παραγώγων της, με στόχο την παράταση της βιολογικής δραστηριότητας των αρχικών μορίων *in vivo*, την παραγωγή δραστικών ανδρογόνων εκ του στόματος καθώς και την ανάπτυξη παραγώγων που εμφανίζουν μεγαλύτερη αναβολική και μικρότερη ανδρογενή δράση από την τεστοστερόνη. Παρότι η προσπάθεια για την πλήρη αποσύνδεση των αναβολικών και ανδρογενών ιδιοτήτων της τεστοστερόνης έχει αποβεί άκαρπη μέχρι σήμερα, τα αναβολικά στεροειδή που έχουν παραχθεί, θα πρέπει να αναφέρονται ως ΑΑΣ προσδιορίζοντας επακριβώς τη φαρμακολογική τους δράση.

1.4.2 Κατηγορίες ΑΑΣ

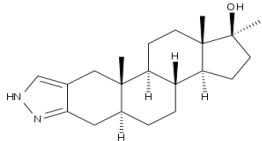
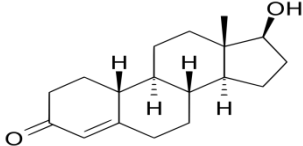
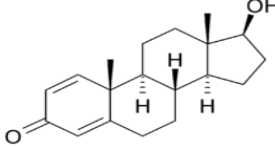
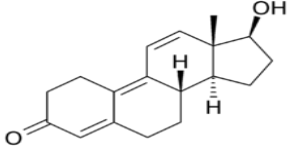
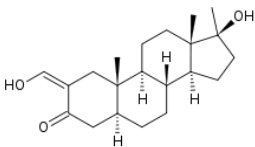
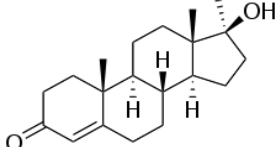
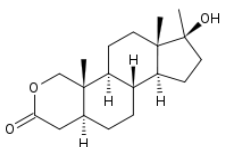
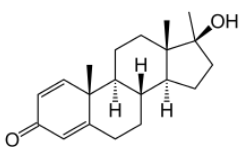
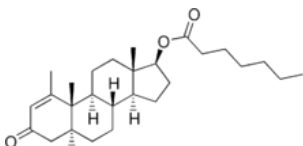
Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή προκύπτουν από τη χημική τροποποίηση του πρόδρομου μορίου της τεστοστερόνης. Οι τροποποιήσεις αυτές οδηγούν στην αλλαγή της φαρμακολογικής δράσης της τεστοστερόνης, με στόχο τη σύνθεση ενεργών παραγώγων με παρατεταμένη δραστηριότητα *in vivo*, στα οποία η αναβολική δράση θα υπερτερούσε της ανδρογονικής και θα ελαχιστοποιούνταν η μετατροπή της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη. Τα αναβολικά ανδρογενή στεροειδή μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες: α) παράγωγα που προκύπτουν από την εστεροποίηση του 17-β-OH, β) παράγωγα που προκύπτουν από την αλκυλίωση στη 17-α θέση και γ) παράγωγα που προκύπτουν από την τροποποίηση των δακτυλίων A, B ή C. Συχνά τα ΑΑΣ ανήκουν σε περισσότερες από μια κατηγορία [14-16].

Η αλκυλίωση στη 17-α θέση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εκ του στόματος ενεργών στεροειδών καθώς με την τροποποίηση αυτή της τεστοστερόνης προστατεύονται από τη ηπατική αποδόμηση. Τα περισσότερα 17-αλκυλιωμένα στεροειδή είναι μέθυλο παράγωγα, υπάρχουν όμως και αιθυλο και αιθινο παράγωγα. Η εστεροποίηση του 17-β-OH της τεστοστερόνης με καρβοξυλικά οξέα επιτρέπει την παρεντερική χορήγηση της τεστοστερόνης, καθώς γίνεται διαλυτή σε λιπώδη έκδοχα, όπως το σησαμέλαιο, και ως εκ τούτου είναι δυνατή η χορήγηση της ενδομυϊκά. Οι πιο συχνοί ενέσιμοι εστέρες της τεστοστερόνης είναι οι testosterone cypionate, propionate, enanthate, undecanoate. Η πλειοψηφία των ΑΑΣ παρουσιάζει δομικές τροποποιήσεις είτε στον A, B ή C δακτύλιο και συχνά είναι διαθέσιμα για χρήση εκ του στόματος. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η δομή ορισμένων εξωγενών αναβολικών στεροειδών (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Δομικές τροποποιήσεις της τεστοστερόνης [14]

Πίνακας 2: Δομές ορισμένων ΑΑΣ

Δομή ορισμένων ΑΑΣ	Όνομασία
 <p>The chemical structure of Stanozolol is a steroid with a 14-membered imidazole ring fused to the A-ring, a double bond in the B-ring, and a hydroxyl group at the 17-position.</p>	Stanozolol
 <p>The chemical structure of Nandrolone is a steroid with a double bond in the B-ring and a hydroxyl group at the 17-position.</p>	Nandrolone
 <p>The chemical structure of Boldenone is a steroid with a double bond in the B-ring and a hydroxyl group at the 17-position.</p>	Boldenone
 <p>The chemical structure of Trenbolone is a steroid with a double bond in the B-ring, a double bond in the D-ring, and a hydroxyl group at the 17-position.</p>	Trenbolone
 <p>The chemical structure of Oxymetholone is a steroid with a double bond in the B-ring, a hydroxyl group at the 17-position, and a hydroxymethyl group at the 2-position.</p>	Oxymetholone
 <p>The chemical structure of Methyltestosterone is a steroid with a double bond in the B-ring, a hydroxyl group at the 17-position, and a methyl group at the 13-position.</p>	Methyltestosterone
 <p>The chemical structure of Oxandrolone is a steroid with a double bond in the B-ring, a hydroxyl group at the 17-position, and a lactone ring at the 13-position.</p>	Oxandrolone
 <p>The chemical structure of Methandienone is a steroid with a double bond in the B-ring, a double bond in the D-ring, and a hydroxyl group at the 17-position.</p>	Methandienone
 <p>The chemical structure of Methenolone enanthate is a steroid with a double bond in the B-ring, a hydroxyl group at the 17-position, and an enanthate ester group at the 17-position.</p>	Methenolone enanthate

1.4.3 Μηχανισμός δράσης ΑΑΣ

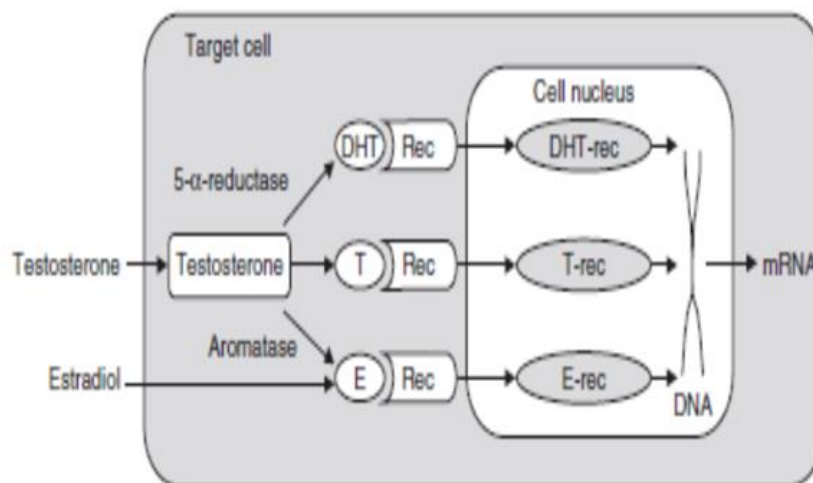
Ο μηχανισμός δράσης των ΑΑΣ δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και αποτελεί ακόμα ένα αντικείμενο μελέτης. Έχουν προταθεί διάφοροι γενικοί μηχανισμοί για να εξηγήσουν τον τρόπο δράσης των ΑΑΣ, ενώ τα τελευταία χρόνια ειδικοί μηχανισμοί και θεωρητικά μοντέλα έχουν αρχίσει να αναγνωρίζονται [17]. Ο μηχανισμός δράσης των ΑΑΣ διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών στεροειδών λόγω της διαφορετικής δομής αυτών. Οι μεταβολές αυτές στα μόρια των στεροειδών έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται διαφορές ως προς την ειδικότητα σύνδεσης με τους υποδοχείς ή στην αλληλεπίδραση με τα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των στεροειδών. Οι διάφορες κλινικές επιδράσεις προσδιορίζονται από τον τύπο και τις συγκεντρώσεις των υποδοχέων καθώς και των ενζύμων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των στεροειδών σε ένα συγκεκριμένο όργανο. Μέχρι στιγμής, μόνο ένας τύπος AR έχει ταυτοποιηθεί, η έκφραση του οποίου διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ιστών [18].

Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες των στεροειδικών υποδοχέων, αρκετά μονοπάτια μπορούν να διακριθούν. Αρχικά, στεροειδή που συνδέονται με υψηλή συγγένεια με τους ανδρογονικούς υποδοχείς, χαρακτηρίζονται ως ισχυρά ανδρογόνα (π.χ 19-νορτεστοστερόνη, μεθеноλόνη). Άλλα στεροειδή χαρακτηρίζονται από χαμηλότερης συγγένειας σύνδεση με τους υποδοχείς και έτσι είναι ασθενέστερα ανδρογενή (π.χ στανολόλη, φλουοξυμεστερόνη). Επιπλέον, άλλα στεροειδή δε συνδέονται με τους υποδοχείς (π.χ οξυμεθελόνη). Τα στεροειδή αυτά θεωρείται ότι δρουν μετά την βιομετατροπή τους σε πιο δραστικές ουσίες ή μέσω εναλλακτικών μηχανισμών δράσης. Επιπλέον, έχει καθιερωθεί πως εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί δράσης των ΑΑΣ [17].

A. 5^α-αναγωγή

Το ένζυμο 5^α-αναγωγή έχει αναγνωρισθεί πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό δράσης των ΑΑΣ (Σχήμα 3). Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την μετατροπή των ΑΑΣ σε ένα πιο δραστικό μόριο, τη διυδροτεστοστερόνη (DHT). Μετά τη διάχυση στα κύτταρα του ιστού-στόχου, τα ΑΑΣ μπορεί να υποστούν δύο κύριες διαδικασίες. Το στεροειδές συνδέεται απ' ευθείας ή μετά από μετατροπή του στη DHT, με τους ειδικούς υποδοχείς των στεροειδών. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος στεροειδούς-υποδοχέα μέσα στον πυρήνα του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό παράγεται mRNA και έτσι, προάγεται η πρωτεϊνική σύνθεση [11-13,19, 20]. Τα κύρια όργανα-συστήματα που διαθέτουν υψηλής δραστηριότητας 5^α-αναγωγή είναι οι όρχεις, το δέρμα, ο προστάτης, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος, τα λιποκύτταρα και τα οστά. Επομένως, τα όργανα αυτά εμφανίζουν υψηλή συγγένεια

με τις ανδρογενείς παρά με τις αναβολικές ουσίες. Αντιθέτως, υπάρχουν όργανα (π.χ καρδιά, μυς) που εμφανίζουν 5^α-αναγωγή χαμηλής δραστηριότητας και ασκούν μεγαλύτερη απόκριση στις αναβολικές ουσίες.



Σχήμα 3: Μηχανισμός δράσης των ΑΑΣ [17]

B. Αρωματάση

Η αρωματάση φαίνεται πως παίζει περιορισμένο ρόλο, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται μέσα στα κύτταρα και είναι υπεύθυνο για την μετατροπή των ΑΑΣ στις θηλυκές ορμόνες, την εστραδιόλη και οιστρόνη (Σχήμα 3). Οι ορμόνες αυτές συνδέονται με τους οιστρογονικούς υποδοχείς και δημιουργούν τα αντίστοιχα συμπλέγματα. Τα συμπλέγματα αυτά ασκούν δράση στο λιπώδη ιστό, στα κύτταρα Leydig και Sertoli, και σε μερικά κύτταρα του ΚΝΣ. Ο μηχανισμός τους πιθανώς ενεργοποιείται όταν το σύστημα υποδοχέων-ανδρογόνων είναι κορεσμένο από τα κυκλοφορούντα ανδρογόνα και αναβολικά στεροειδή. Αντίθετα, τα ΑΑΣ πιθανώς ασκούν ανταγωνιστική δράση στα οιστρογόνα όταν υπερβολικές ποσότητες ΑΑΣ βρίσκονται στον ορό. Αυτό οδηγεί στον κορεσμό και την μείωση των ανδρογονικών υποδοχέων. Η περίσσεια των ΑΑΣ θα προσπαθήσει να συνδεθεί στους υποδοχείς των οιστρογόνων, σε ανταγωνισμό με τα διαθέσιμα οιστρογόνα. Επομένως, το αποτέλεσμα των δύο αυτών αντίθετων διαδικασιών δε μπορεί να προβλεφθεί.

Γ. Αντι-γλυκοκορτικοειδή δράση

Συμπληρωματικά με την ανταγωνιστική δράση των ΑΑΣ με τους οιστρογονικούς υποδοχείς, μια παρόμοια δράση έχει προταθεί για τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ουσίες με καταβολικές ιδιότητες που απελευθερώνονται στον ορό μετά από έντονο φυσικό ή πνευματικό στρες π.χ προπόνηση, χειρουργική επέμβαση και ψυχολογικά προβλήματα. Μέσω της σύνδεσης τους με

τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, τα ΑΑΣ μπορούν να εξουδετερώσουν τη διάσπαση των πρωτεϊνών από τα γλυκοκορτικοειδή. Ο ανταγωνισμός πιθανώς να μπορεί να συμβάλλει στη θεραπεία της οστεοπόρωσης μέσω της μείωσης της φθοράς των οστών και τη διέγερση του σχηματισμού της. Πρόσφατα, μελέτες έδειξαν πως τα ΑΑΣ διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστικών κυττάρων και έχουν την ικανότητα να εξουδετερώσουν τη φθορά των οστών (bone breakdown). Αναφέρεται πως η τεστοστερόνη συμβάλλει στην ισορροπία του ασβεστίου και στον σχηματισμό των οστών, παίζοντας ρόλο στη μείωση της οστικής επαναρρόφησης.

1.4.4 Μεταβολισμός ΑΑΣ

Τα ανδρογενή αναβολικά στεροειδή υφίστανται με ποικίλες χημικές αντιδράσεις εκτενείς μετατροπές πριν την απέκκριση της στα ούρα. Οι μεταβολικές πορείες που ακολουθούνται χωρίζονται σε δύο φάσεις: φάση I (functionalization) και φάση II (conjugation) και οδηγούν στη μετατροπή του στεροειδούς σε μια μορφή λιγότερο τοξική, λιγότερο δραστική και περισσότερο πολική. Οι αντιδράσεις που υφίστανται τα ΑΑΣ επηρεάζουν της διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ καθώς συμβάλλουν στην εκτίμηση της ώρας χορήγησης του στεροειδούς και της ενδοατομικής διακύμανσης. Οι αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού παίζουν σημαντικό ρόλο στη δομική τροποποίηση των μορίων και καθορίζουν την αναλυτική προσέγγιση που θα εφαρμοστεί ενώ οι αντιδράσεις της φάσης II συμβάλλουν στην επιλογή της κατάλληλης προετοιμασίας των δειγμάτων, καθώς οι υδρολυτικές ιδιότητες των συζευγμένων με γλυκουρονικό οξύ και αυτών με θειικό οξύ ανδρογενών αναβολικών παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Οι πληροφορίες που σχετίζονται με τη μεταβολική πορεία του αναλύτη είναι απαραίτητες για να καθοριστεί το είδος της υδρόλυσης (χημική ή ενζυμική), η δραστηριότητα του ενζύμου και οι απαιτούμενες συνθήκες της υδρόλυσης [22].

Η διάκριση των αντιδράσεων μεταξύ της φάσης I και II φαίνεται στον Πίνακα 3. Γενικά, οι αντιδράσεις της φάσης I εισάγουν μια νέα λειτουργική ομάδα (π.χ. $-OH$) στο μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας, στην περίπτωση που αυτή δεν υπάρχει, ώστε να επακολουθήσουν οι αντιδράσεις σύζευξης της φάσης II και να πραγματοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό. Οι αντιδράσεις σύζευξης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των ανδρογενών αναβολικών, καθώς το ασύζευκτο κλάσμα των ανδρογενών αναφέρεται ότι περιλαμβάνει λιγότερο από το 3% του συνολικού ποσού των ανδρογενών που εκκρίνεται στα ούρα [22,23].

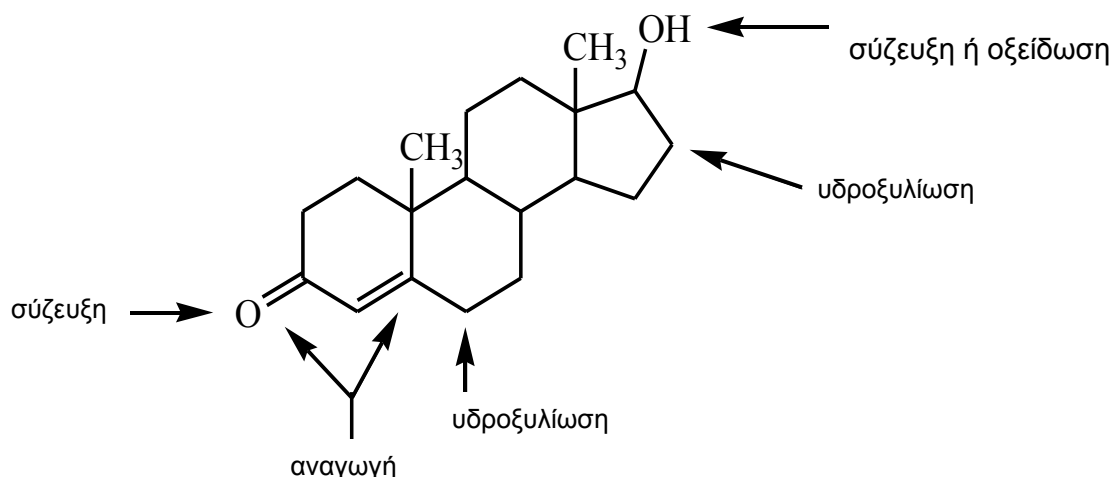
Πίνακας 3: Διάκριση αντιδράσεων φάσης I και II

ΦΑΣΗ I	ΦΑΣΗ II
οξειδωση	σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ
αποικοδόμηση	σύζευξη με θειικό οξύ
υδρόλυση	μεθυλίωση
υδρογόνωση	ακετυλίωση
διθειοακετυλίωση	σύζευξη με αμινοξέα
ισομερείωση	σύζευξη με γλουταθείο
	σύζευξη με λιπαρά οξέα
	συμπύκνωση

Από τις κύριες αντιδράσεις της φάσης II, αποτελεί η σύζευξη του στεροειδούς με το γλυκουρονικό οξύ ή το θειικό οξύ, με τη γλυκουρονιδοποίηση να αποτελεί το κυρίαρχο μεταβολικό μονοπάτι στον ανθρώπινο οργανισμό. Η γλυκουρονιδοποίηση αποτελεί μια διμοριακή πυρηνόφιλη αντίδραση υποκατάστασης, για την πραγματοποίηση της οποίας απαιτείται ως καταλύτης μια γλυκουρονική μεταφοράση (UDP-glucuronosyl-transferase, UGT) και το ουριδινοδιφωσφο-γλυκουρονικό οξύ (UDP-glucuronic acid) ως συμπράγοντας. Η αντίδραση οδηγεί στη σύνδεση του καρβοξυλίου του γλυκουρονικού οξέος στη δομή του στεροειδούς με άμεσο αποτέλεσμα το σχηματισμό β-γλυκοσιδικού δεσμού. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το αποτέλεσμα της γλυκουρονιδοποίησης είναι ο τερματισμός της δραστηριότητας των ξενοβιοτικών ή ενδογενών παραγόντων. Παρ' όλ' αυτά, έχει αναφερθεί ότι τα προϊόντα σύζευξης της τεστοστερόνης, διυδροτεστοστερόνης και των 17-β-υδροξυοιστρογόνων με το D-γλυκουρονικό οξύ παρουσιάζουν μεγαλύτερη τοξικότητα από τις μητρικές ενώσεις. Η γλυκουρονιδοποίηση πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ ενώ έχει παρατηρηθεί και εξωηπατική γλυκουρονιδοποίηση στους νεφρούς, το έντερο, στους πνεύμονες και τον προστάτη [22,23].

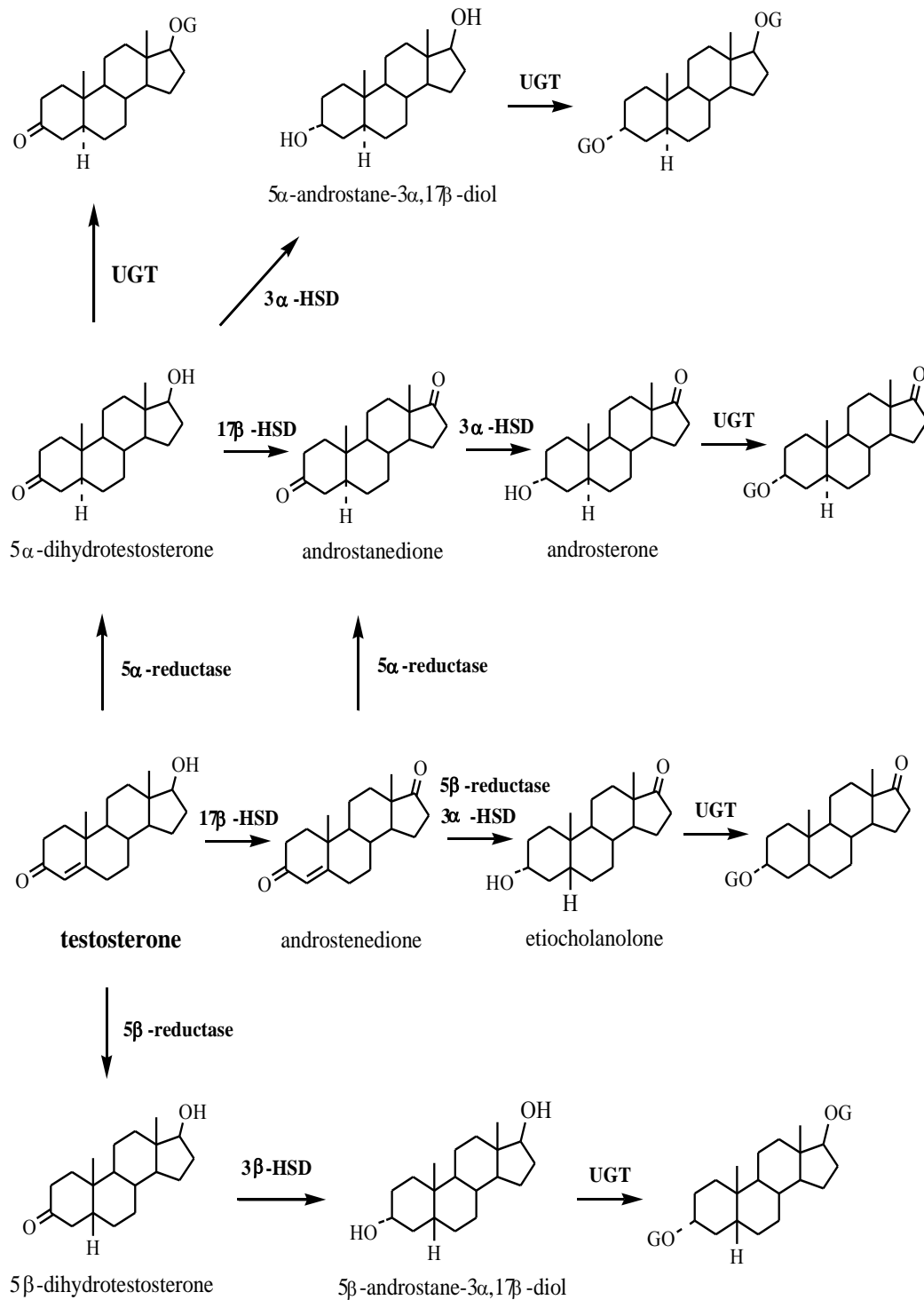
Οι κυριότεροι στόχοι στη φάση I του μεταβολισμού είναι οι δακτύλιοι A, B και Δ. Ο διπλός δεσμός μεταξύ των ατόμων C4 και C5 ανάγεται σε 5^α- και 5β-ισομερή. Επίσης, η κετονομάδα στον άνθρακα C3 ανάγεται εύκολα, δίνοντας κυρίως 3^α-υδροξυ-ισομερή. Όσον αφορά τα στεροειδή με δομή 1,4-διένιο, ο δακτύλιος A είναι ανθεκτικός σε αντιδράσεις αναγωγής και η πιο κοινή μεταβολική της αλλαγή στο δακτύλιο B είναι η 6β-υδροξυλίωση. Επιπλέον, στο δακτύλιο Δ, το άτομο του οξυγόνου στη θέση C17 είναι πολύ ευαίσθητο σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Πολλά 17β-

υδροξυ-στεροειδή οξειδώνονται της 17-κετο-στεροειδή (Σχήμα 4). Οι αντιδράσεις σύζευξης της φάσης II του μεταβολισμού γίνονται της δακτυλίους A και Δ. Στα 3^α-υδροξυ-στεροειδή επικρατεί η σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, ενώ στα 3β-υδροξυ-στεροειδή μεθειικό οξύ. Αντίθετα, στα 17β-υδροξυ-στεροειδή είναι δυνατόν να γίνουν και οι δύο αντιδράσεις σύζευξης (Σχήμα 4) [23].



Σχήμα 4: Πιθανές αντιδράσεις των φάσεων I και II του μεταβολισμού των ΑΑΣ

Η τεστοστερόνη μεταβολίζεται είτε στους ιστούς-στόχους είτε στο ήπαρ. Στον προστάτη, το δέρμα και το ήπαρ, η τεστοστερόνη ανάγεται σε 5^α-DHT, μη αντιστρεπτά, μέσω του αναγωγικού ενζύμου, 5^α-αναγωγάση, παρουσία NADPH. Ένα μικρό ποσό της τεστοστερόνης μετατρέπεται μέσω αρωματοποίησης, που πραγματοποιείται στο λιπώδη ιστό και στις ωοθήκες, σε οιστραδιόλη. Επιπρόσθετα, η τεστοστερόνη μπορεί να αδρανοποιηθεί περαιτέρω στο ήπαρ, με αντιδράσεις αναγωγής και οξείδωσης, οι οποίες ακολουθούνται από γλυκουρονιδοποίηση και νεφρική απέκκριση. Αρχικά, είναι δυνατόν να μεταβληθεί σε ανδροστενεδιόνη, με οξείδωση της 17β-OH ομάδας, καθώς επίσης και σε ανδροστανοδιόνη, με 5^α-αναγωγή του δακτυλίου A στη θέση C5. Η ανδροστανοδιόνη μετατρέπεται περαιτέρω σε ανδροστερόνη, κατόπιν αναγωγής της κετονομάδας στη θέση C3. Εναλλακτικά, η ανδροστενεδιόνη μπορεί να μετατραπεί σε ετιοχολανολόνη, με αναγωγή της κετονομάδας στη θέση C3 και του διπλού δεσμού του δακτυλίου A. Οι κυριότεροι μεταβολίτες που εκκρίνονται στα ούρα είναι η ανδροστερόνη και η ετιοχολανολόνη. Πρόκειται για δύο ανενεργούς μεταβολίτες, οι οποίοι εκκρίνονται συζευγμένοι, κατά βάση ως γλυκουρονίδια (Σχήμα 5) [24].



όπου G: γλυκουρονίδιο, HSD: υδροξυ-στεροειδική-δεϋδρογονάση, UGT: UDP-γλυκουρονοσυλοτρανσφεράση [25].

Σχήμα 5: Ο μεταβολισμός της τεστοστερόνης

1.4.5 Τα ΑΑΣ στην κλινική πράξη

Στην κλινική πράξη η χρήση της τεστοστερόνης βελτιώνει την ανάρρωση από καταβολικές καταστάσεις. Η θεραπευτική χρήση των ΑΑΣ έχει αναγνωριστεί σε πολλές κλινικές περιπτώσεις και τα ΑΑΣ χορηγούνται κυρίως σε σύνδρομο που χαρακτηρίζονται από αρνητικό ισοζύγιο αζώτου καθώς και σε σύνδρομο με ορμονικές διαταραχές. Παραδείγματα θεραπευτικής χορήγησης των ΑΑΣ είναι ο υπογοναδισμός, το σύνδρομο καχεξίας συνδυαζόμενο με τη λοίμωξη HIV, απλαστική αναιμία και άλλα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, συγγενές αγγειοίδημα και σαρκοπενία στους ηλικιωμένους. Τα ΑΑΣ έχουν χρησιμοποιηθεί στην προώθηση της εναπόθεσης των μυών μετά από εγκαύματα, χειρουργικές επεμβάσεις και ακτινοθεραπεία. Επιπλέον, η δράση των ΑΑΣ στους ηλικιωμένους είναι διπλή, καθώς, πέρα από τη μυοτροφική τους δράση, ασκούν και ευεργετική επίδραση στην οστική πυκνότητα μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τους οστεοβλάστες. Έτσι, τα ΑΑΣ θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην πρόληψη και θεραπεία της οστεοπόρωσης. Αναφέρονται οι θετικές επιδράσεις των ΑΑΣ στην επούλωση καταγμάτων, καθώς και στη ρήξη τενόντων και συνδέσμων και μυϊκών τραυματισμών [11,13,14, 26].

Επιπρόσθετα, από το τέλος της δεκαετίας του 1930 η τεστοστερόνη και τα παράγωγα της συνταγογραφούνταν για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης σε ψυχιατρικούς ασθενείς. Τα τελευταία 10 χρόνια μελετάται η χρήση της τεστοστερόνης ως πιθανή αντικαταθλιπτική θεραπεία είτε ως μονοθεραπεία [27,28] είτε ως ενισχυτικό φάρμακο [29-30].

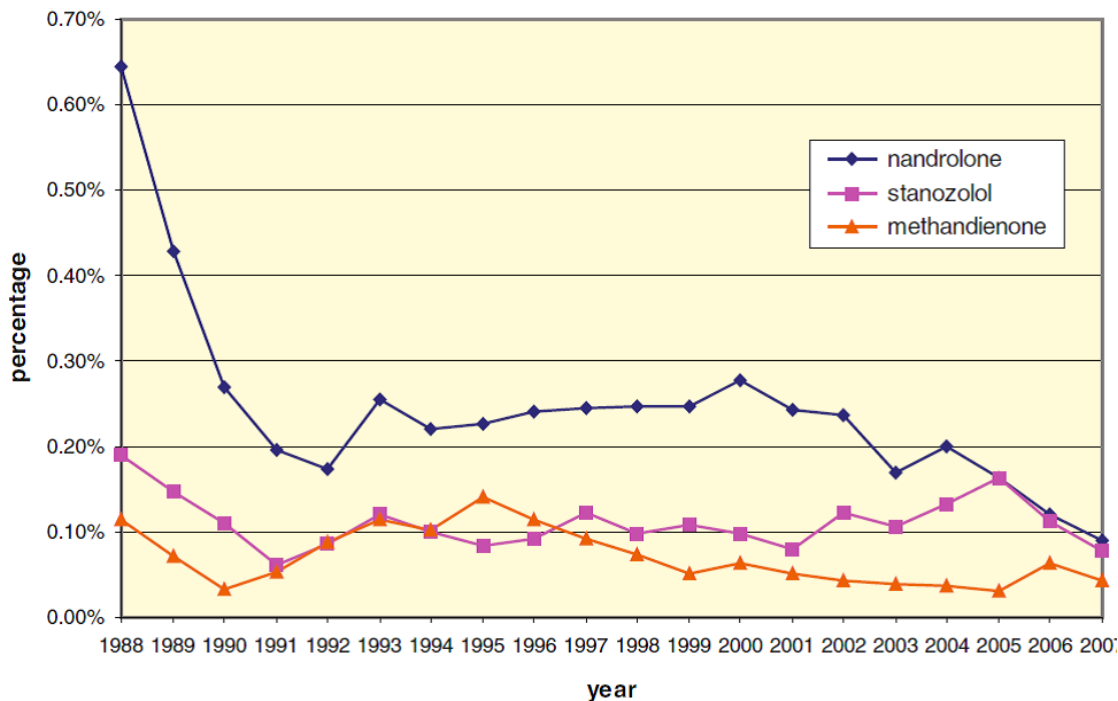
Παρόλη την αναγνωρισμένη δράση της τεστοστερόνης και παραγώγων της, μόνο λίγα από αυτά χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη καθώς παρουσιάζουν σοβαρές τοξικολογικές επιπτώσεις λόγω της μη επιλεκτικότητας που παρουσιάζουν στη σύνδεση της με τους υποδοχείς. Πρόσφατα, δημιουργήθηκε μια νέα ομάδα φαρμάκων, τα SARMs, που αποτελούν τις μη στεροειδικές εναλλακτικές των ΑΑΣ, και επιλεκτικά ενεργοποιούν τους ανδρογενείς υποδοχείς είτε στους μύες είτε στα οστά. Η επιλεκτική αυτή δράση των φαρμάκων αυτών απέναντι στους ανδρογενείς υποδοχείς, επιτρέπει την προαγωγή της μυϊκής αύξησης χωρίς το ρίσκο των ανεπιθύμητων παρενεργειών που συχνά παρουσιάζονται στις στεροειδικές θεραπείες υποκατάστασης [31].

1.5 Νανδρολόνη

1.5.1 Γενικά-Ιδιότητες

Η νανδρολόνη (17β-υδροξυ-εστρ-4-εν-όνη) αποτελούσε μια από τις ουσίες επιλογής των αθλητών, από την εποχή που άρχισαν να χρησιμοποιούνται τα αναβολικά στεροειδή ως μέσα για την ενίσχυση και την βελτίωση της απόδοσης της. Η προσδοκία ότι η επιθυμητή αναβολική δράση, η αύξηση δηλαδή της μυϊκής μάζας λόγω της καλύτερης κατακράτησης αζώτου και της ενισχυμένης πρωτεϊνοσύνθεσης, σε συνδυασμό με την εξαιρετικά έντονη προπόνηση θα οδηγούσε σε συνολικά βελτιωμένες επιδόσεις, στα αθλήματα κυρίως που βασίζονται στη μυϊκή δύναμη, έγινε η αρχή της δεκαετίας του 1970. Συνειδητοποιώντας τον κίνδυνο, η Ιατρική Επιτροπή της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής IOC το 1974 αποφάσισε να απαγορεύσει τη κατάχρηση αναβολικών στεροειδών. Αφού εξαλείφθηκαν οι ανεπάρκειες στις στρατηγικές ανίχνευσης της νανδρολόνης τη δεκαετία του 1980, ο αγώνας ανάμεσα στον έλεγχο ντόπινγκ και στους χρήστες της νανδρολόνης χαρακτηρίστηκε από τη βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων με χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, οδηγώντας τελικά σε νέες γνώσεις αναφορικά με την φαρμακολογία της νανδρολόνης και τις προσαρμογές στη χρήση και οδό χορήγησης συγκεκριμένων φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Η νανδρολόνη αποτελεί μια από τις ουσίες της Απαγορευμένης Λίστας της W.A.D.A και ανήκει στην κατηγορία των αναβολικών στεροειδών, στην υποκατηγορία των εξωγενών ανδρογενών αναβολικών στεροειδών. Η νανδρολόνη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα «παλιό» αναβολικό στεροειδές που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως εδώ και δεκαετίες σε διάφορες μορφές και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ή ακόμα παρατηρείται ακούσια κατάποση. Τα στατιστικά στοιχεία της W.A.D.A για το 2004, έδειξαν ότι τα αναβολικά στεροειδή αποτελούσαν το 36% των αναλυτικών πορισμάτων των διαπιστευμένων εργαστηρίων και μάλιστα το 28.5% αυτών, σχετίστηκαν με μεταβολίτες της νανδρολόνης. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σταθερά για τα προηγούμενα 15 χρόνια. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια οι απόλυτοι αριθμοί των αποτελεσμάτων που σχετίζονται με την κατάχρηση της νανδρολόνης έχουν σχετικά μειωθεί. Αυτή η μείωση πιθανή τάση, ίσως μπορεί να εξηγηθεί από την βελτιστοποίηση των στρατηγικών αντι-ντόπινγκ με τις αυξανόμενες αποτελεσματικές διαδικασίες ελέγχου, κυρίως με αιφνιδιαστικούς ελέγχους out-of competition, συμβάλλοντας έτσι στην αποτροπή αθλητών από τη χρήση αναβολικών ουσιών [32,33] (Εικόνα 1).

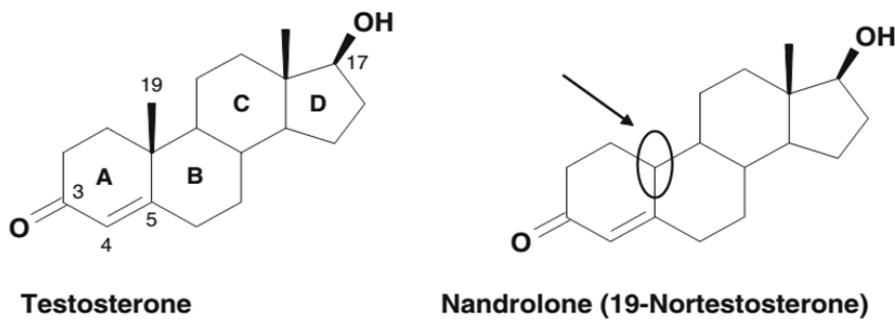


Εικόνα 1: Αναλυτικά αποτελέσματα συγκεκριμένων αναβολικών στεροειδών από τα διαπιστευμένα αντι-ντόπινγκ εργαστήρια [32]

Η νανδρολόνη μπορεί να χορηγηθεί ενέσιμα ή από το στόμα. Οι ενέσιμες μορφές της νανδρολόνης αποτελούνται συνήθως από τα εστερικά της παράγωγα, με ευρέως χρησιμοποιούμενο το δωδεκανοϊκό (decanoate, Deca-Durabolín) είτε ως το λιγότερο ενεργό φαινυλοπροπιονικό (phenyl propionate, Durabolín). Στα μέσα της δεκαετίας του 1990, ουσίες παρόμοιες με την νανδρολόνη (19-νορανδροστενεδιόνη, 19-νορανδροστενεδιόλη) κυκλοφορούν για χρήση εκ του στόματος ως συμπληρώματα διατροφής. Η νορανδροστενεδιόλη και η νορανδροστενεδιόνη χημικά και φαρμακολογικά σχετίζονται στενά με την νανδρολόνη και συχνά αναφέρονται ως προορμόνες ή πρόδρομες ενώσεις της, λόγω του ότι μετατρέπονται εντός του σώματος στην δραστική ορμόνη. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στη Λίστα των Απαγορευμένων Ουσιών της W.A.D.A.

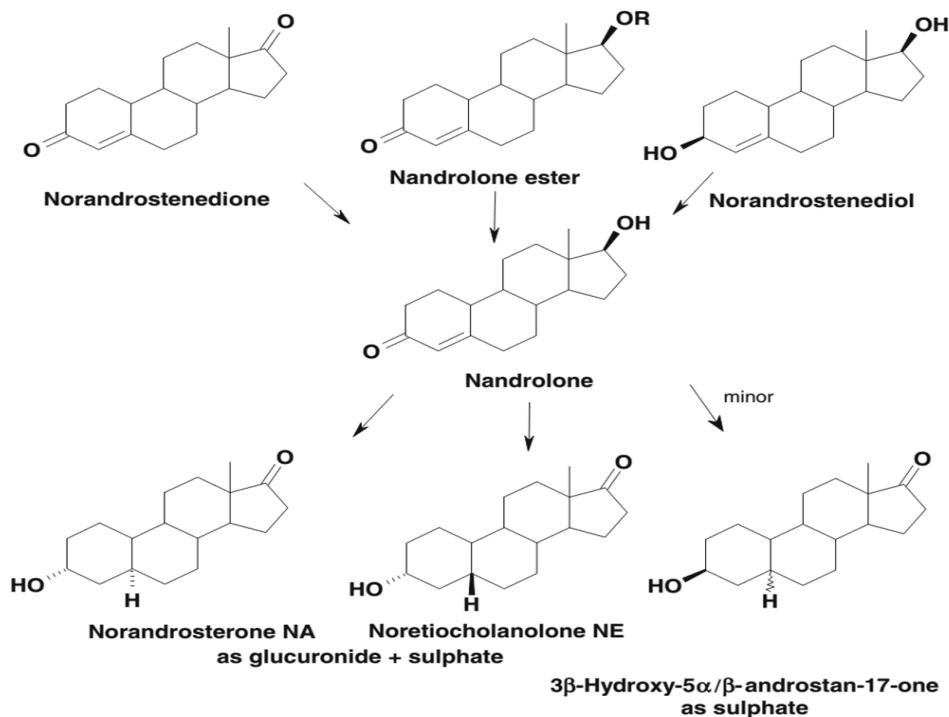
1.5.2. Μεταβολισμός νανδρολόνης

Η νανδρολόνη συντέθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1950 και παρουσιάζει έντονη δομική ομοιότητα με την τεστοστερόνη, καθώς διαφέρει από αυτή, μόνο στο 19^ο άτομο άνθρακα. Για το λόγο αυτό ονομάζεται 19-νορτεστοστερόνη, νορτεστοστερόνη (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Δομή νανδρολόνης

Η φάση I του μεταβολισμού της νανδρολόνης, ακολουθεί σε μεγάλο βαθμό, τα βήματα μεταβολισμού της τεστοστερόνης, με οξείδωση της υδροξυλικής ομάδας του 17^{ου} ατόμου άνθρακα της σχηματισμό της 17-οξο-στεροειδούς, με ολοκληρωτική αναγωγή του A δακτυλίου (αναγωγή του διπλού δεσμού στη θέση 4, υπό τη δράση της 5^α και 5^β αναγωγάσης αντίστοιχα) και με υδρογόνωση της 3-κετο ομάδας. Ως αποτέλεσμα σχηματίζονται οι δύο κύριοι μεταβολίτες της νανδρολόνης, η νορανδροστερόνη (5^α ισομερές, 19-NA) και η νορετιοχολανολόνη (5^β ισομερές, 19-NE), οι οποίοι εκκρίνονται κυρίως ως γλυκουρονίδια. Ακόμα εκκρίνονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες, 3β-υδρόξυ ισομερή (3β-υδροξυ-5^α/β-εστραν-17-όνη: νορεπιανδροστερόνη και νορεπιετιοχολανολόνη). Οι μεταβολίτες NA και NE αποτελούν τους κύριους μεταβολίτες της φάσης I του μεταβολισμού κι άλλων στεροειδών παρόμοιων με τη νανδρολόνη (π.χ. νορανδροστενεδιόνη και νορανδροστενεδιόλη) [32-34] .(Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Μεταβολισμός νανδρολόνης

1.5.3 Χρήση της νανδρολόνης στην κλινική πράξη

Η προτίμηση της νανδρολόνης έναντι της φυσικής ορμόνης τεστοστερόνης, οφείλεται κυρίως στις διαφορές στη βιοχημική της δραστικότητα και στη βιομετατροπή της, η οποία περιορίζει τις πιθανές ανεπιθύμητες δράσεις της χρήσης των ΑΑΣ. Η νανδρολόνη παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια από την τεστοστερόνη με τους ανδρογονικούς υποδοχείς ενώ η κατάσταση με τους διυδρο μεταβολίτες μετά την δράση της 5^α-αναγωγάσης είναι ακριβώς η αντίθετη. Είναι πιθανόν ότι η τεστοστερόνη και/ή νανδρολόνη ασκούν τη δράση τους στα μυικά κύτταρα στην αρχική τους μοριακή δομή, ενώ στους ανδρογενείς ιστούς, όπου η 5^α-αναγωγάση είναι διαθέσιμη κυριαρχεί η ανηγμένη μορφή. Αυτό επομένως εξηγεί το λόγο για τον οποίο η νανδρολόνη παρουσιάζει αυξημένη αναβολική-ανδρογενή διαφοροποίηση ακόμα και αν υπάρχει ένας μόνο τύπος ανδρογονικού υποδοχέα.

Μια σημαντική ακόμα διαφορά μεταξύ της νανδρολόνης και της τεστοστερόνης είναι η συμμετοχή της νανδρολόνης στην αντίδραση αρωματοποίησης προς οιστρογόνα. Αντίθετα, με την τεστοστερόνη η νανδρολόνη δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου αρωμάτωση του κυτοχρώματος P450 που καταλύει την μετατροπή σε οιστρογόνα. Ωστόσο, η νανδρολόνη και οι παρόμοιες ουσίες με αυτήν, πιθανώς υπόκεινται αρωματοποίηση μέσω διαφορετικών μονοπατιών στο ήπαρ [35].

Λόγω των παραπάνω αλλά και άλλων χαρακτηριστικών η νανδρολόνη χρησιμοποιείται τόσο ως αναβολικό μέσο αλλά και στην κλινική πράξη. Θεραπευτικά, η νανδρολόνη χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση παθολογικών καταστάσεων που χαρακτηρίζονται από αρνητικό ισοζύγιο αζώτου, όπως εγκαύματα, καρκίνος και AIDS. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στη χρόνια ηπατική ανεπάρκεια, στην απλαστική αναιμία και δοκιμαστικά, στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Ακόμα, είναι διαθέσιμα οφθαλμολογικά παρασκευάσματα που περιέχουν άλας της νανδρολόνης για την επούλωση του κερατοειδούς [32].

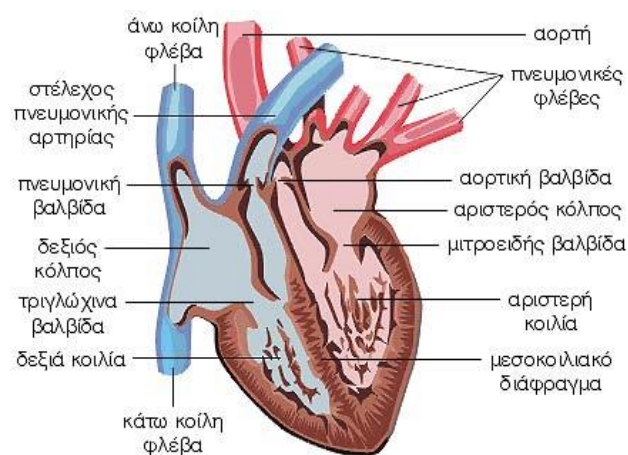
Παρότι η χρήση της νανδρολόνης έχει μειωθεί σε κλινικό επίπεδο αποτελεί ένα από τα πλέον προτιμητέα μέσα ντοπινγκ με σκοπό την βελτίωση της επίδοσης. Σε επίπεδο bodybuilding η χρήση των ΑΑΣ χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό διαφορετικών σκευασμάτων ανά χρονικά διαστήματα ή «κύκλους». Οι δόσεις που χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ντόπινγκ είναι 10-100 φορές μεγαλύτερες από αυτές που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη [32].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο-ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ-ΠΑΡΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

2.1 Δομή και λειτουργία της καρδιάς

Η καρδιά είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο και βρίσκεται πίσω από το στήρνο στο ύψος του 3^{ου}-6^{ου} πλευρικού χόνδρου. Έχει σχήμα τρίπλευρης πυραμίδας με τη βάση προς τα πίσω, δεξιά και άνω ενώ η κορυφή της στρέφεται προς τα εμπρός αριστερά και κάτω. Έχει το μέγεθος γροθιάς περίπου, με επιμήκη διάμετρο 12-15 εκ. και εγκάρσια διάμετρο 11-14 εκ. και βρίσκεται μέσα σε ένα λεπτό ινώδη σάκκο που ονομάζεται περικάρδιο [36,37].

Διαιρείται σε δεξιά και αριστερά πλευρά μέσω μυϊκού τοιχώματος που λέγεται διάφραγμα και στη συνέχεια 4 κοιλότητες. Δύο κόλπους και δύο κοιλίες. Οι κόλποι χωρίζονται μεταξύ τους με το μεσοκοιλιακό διάφραγμα ενώ μεταξύ των δύο κοιλιών παρεμβάλλεται το μεσοκοιλιακό διάφραγμα. Κάθε κόλπος επικοινωνεί με την αντίστοιχη κοιλία με ένα στόμιο, που ονομάζεται κοιλιοκοιλιακό στόμιο και κλείνει με μια βαλβίδα ειδικής κατασκευής. Ο δεξιός κόλπος συγκοινωνεί με τη δεξιά κοιλία μέσω της τριγλώχινας βαλβίδας, ενώ ο αριστερός κόλπος συγκοινωνεί μέσω της μιτροειδούς βαλβίδας με την αριστερή κοιλία. Από τις κοιλίες ξεκινούν οι αρτηρίες, που μεταφέρουν το αίμα προς την περιφέρεια, ενώ στους κόλπους καταλήγουν οι φλέβες, με τις οποίες το αίμα επιστρέφει στην καρδιά. Ειδικότερα, από την αριστερή κοιλία ξεκινά η αορτή και από τη δεξιά κοιλία η πνευμονική αρτηρία, ενώ στο δεξιό κόλπο εκβάλλουν η άνω και κάτω κοίλη φλέβα και στον αριστερό κόλπο καταλήγουν οι τέσσερις πνευμονικές φλέβες. Τα στόμια της αορτής και της πνευμονικής αρτηρίας κλείνουν με την αορτική και πνευμονική βαλβίδα που εξασφαλίζουν τη ροή του αίματος μόνο από την καρδιά προς την περιφέρεια [36,37] (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Δομή της καρδιάς

Το τοίχωμα της καρδιάς αποτελείται από τρία στρώματα, που από έξω προς τα μέσα είναι το επικάρδιο, το μυοκάρδιο και το ενδοκάρδιο. Το μυοκάρδιο αποτελείται από ένα παχύ στρώμα γραμμωτών μυικών ινών που διαπλέκονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα δικτυωτό πλέγμα, που είναι ισχυρότερο στις κοιλίες, ιδιαίτερα στην αριστερή. Κύριο γνώρισμα των καρδιακών ινών είναι το ότι παρόλο που είναι γραμμωτές λειτουργούν αυτόνομα. Η καρδιά για τις δικές της ανάγκες, τροφοδοτείται από συγκεκριμένα αγγεία. Οι στεφανιαίες αρτηρίες εκφύονται από την αορτή και τροφοδοτούν το μυοκάρδιο με οξυγονωμένο αίμα.

Η καρδιά ως μηχανική αντλία εκπληρώνει την κύρια λειτουργία της που είναι η κυκλοφορία του αίματος σε όλο το σώμα. Το αίμα φθάνει από την περιφέρεια στο δεξιό κόλπο μέσω της άνω και κάτω κοίλης φλέβας. Κατά τη φάση της διαστολής των κοιλιών το αίμα μεταφέρεται από το δεξιό κόλπο στη δεξιά κοιλία. Στη συνέχεια, κατά τη συστολική φάση, το αίμα από τη δεξιά κοιλία μέσω της πνευμονικής αρτηρίας μεταφέρεται στους πνεύμονες όπου πραγματοποιείται ανταλλαγή των αερίων. Το αίμα από τους πνεύμονες επανέρχεται στην καρδιά μέσω των πνευμονικών φλεβών που εκβάλλουν στον αριστερό κόλπο. Κατά τη διαστολική φάση, το αίμα από τον αριστερό κόλπο μεταφέρεται στην αριστερή κοιλία, απ' όπου, κατά τη συστολή των κοιλιών μεταφέρεται σε όλο το σώμα μέσω της αορτής [38]. Έτσι, η λειτουργία της καρδιάς διακρίνεται σε δύο φάσεις, τη συστολική και τη διαστολική. Κατά τη συστολική φάση, το αίμα εξωθείται από τη δεξιά κοιλία στην πνευμονική αρτηρία και από την αριστερή κοιλία στην αορτή. Κατά τη φάση της διαστολής πραγματοποιείται η χάλαση των κοιλιών, οι οποίες πληρούνται εκ νέου. Ο χρόνος που περικλείει μια καρδιακή συστολή και διαστολή λέγεται καρδιακός κύκλος.

Η λειτουργία της καρδιάς ρυθμίζεται με ειδικό σύστημα αγωγής νευρικών διεγέρσεων, που ελέγχεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα.

2.1.1 Παθοφυσιολογία

Καρδιακή ανεπάρκεια

Όταν η καρδιά φτάσει στο σημείο να αδυνατεί να στείλει αίμα ανάλογο με τις μεταβολικές απαιτήσεις των ιστών ή το καταφέρνει μόνο με αύξηση της πίεσης πλήρωσης, τότε αναφερόμαστε στην καρδιακή ανεπάρκεια. Μια σειρά από νόσους του καρδιαγγειακού συστήματος μπορούν να αποτελέσουν τη γενεσιουργό αιτία της καρδιακής ανεπάρκειας. Η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι καρδιομυοπάθειες και οι βαλβιδοπάθειες αποτελούν τις συχνότερες αιτίες. Η καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να είναι συστολική όταν πάσχει η συστολική λειτουργία και παραβλάπτεται η εξώθηση του αίματος από τις κοιλίες και διαστολική όταν έχει επηρεαστεί ο μηχανισμός κοιλιακής πλήρωσης [38].

Στεφανιαία νόσος

Η στεφανιαία νόσος εμφανίζεται με διάφορες μορφές και παθολογοανατομική βάση. Η αθηροσκλήρυνση των στεφανιαίων αρτηριών, η συνεχής εναπόθεση αθηρωματικής πλάκας στο εσωτερικό των αρτηριών προκαλώντας τη στένωση των αυλών της και την παρεμπόδιση της ομαλής ροής του αίματος, αποτελεί το κοινό υπόστρωμα σε όλες τις μορφές. Οι σημαντικότερες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ο αιφνίδιος θάνατος, η ασταθής και η σταθερή στηθάγχη. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου εμφανίζονται όταν υπάρχει στένωση μιας τουλάχιστον στεφανιαίας αρτηρίας σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70% του αυλού. Μικρότερες στενώσεις μπορεί να προδιαθέτουν σε αιφνίδιο θάνατο ή οξύ έμφραγμα όταν συμβεί ρήξη μιας αθηρωματικής πλάκας που δεν προκαλούσε σημαντική στένωση. Προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου είναι το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπερλιπιδαιμία, η υπέρταση και η κληρονομικότητα.

Ο αιφνίδιος θάνατος αποτελεί ένα απροσδόκητο γεγονός σε άτομα φαινομενικά υγιή ή με γνωστή καρδιακή νόσο, το οποίο συμβαίνει εντός 1-2 ωρών από την έναρξη της παθήσεως. Στους ενήλικους συμβαίνει κυρίως σε σοβαρή στεφανιαία νόσο, στους νέους σε αορτική ή υποαορτική στένωση και στα νεογνά είναι αγνώστου αιτιολογίας. Η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια θεωρείται ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας για αιφνίδιο θάνατο σε νεαρούς αθλητές. Η συχνότητα του αιφνίδιου θανάτου σχετίζεται με το άρρεν φύλο, την προχωρημένη ηλικία, την υπέρταση, τον σακχαρώδη διαβήτη, την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και την παχυσαρκία.

Ως έμφραγμα θεωρείται η νέκρωση τιμήματος του μυοκαρδίου λόγω απόφρα-

ξης μιας ή περισσότερων στεφανιαίων αρτηριών. Για την εγκατάσταση του εμφράγματος απαιτείται ρήξη της ινώδους κάψας της ήδη υπάρχουσας αθηρωματικής πλάκας, η οποία θα οδηγήσει σε εξέλκωση και αιμορραγία. Ακολούθως αιμοπετάλια θα προσκολληθούν στην περιοχή ρήξης της πλάκας κατ' αυτόν τον τρόπο θα δημιουργηθεί θρόμβος και απόφραξη του αυλού του αγγείου. Ανάλογα του σημείου που επέρχεται η απόφραξη και της χρονικής αντιμετώπισης του εμφράγματος, εξαρτάται και η έκβασή του [38].

Υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια

Αποκαλούμε την ανεξήγητη υπερτροφία του μυοκαρδίου με συνοδό υπερδυναμική λειτουργία της αριστερής κοιλίας. Υπάρχουν διάφορα είδη ταξινόμησης της. Εάν η πάχυνση αφορά το μεσοκοιλιακό διάφραγμα και το ελεύθερο τοίχωμα, αποκαλείται συμμετρική, ενώ ασύμμετρη αποκαλείται αν η υπερτροφία εντοπίζεται κατά μεγάλο μέρος στο διάφραγμα. Πιο αναλυτική είναι η ταξινόμηση κατά Maron, όπου αναλόγως της εντοπίσεως της υπερτροφίας χωρίζεται σε 5 διαφορετικούς τύπους. Η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια έχει βρεθεί ότι μεταδίδεται γενετικώς στο 50% των περιπτώσεων με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα [38].

2.2 Δομή και λειτουργία των νεφρών

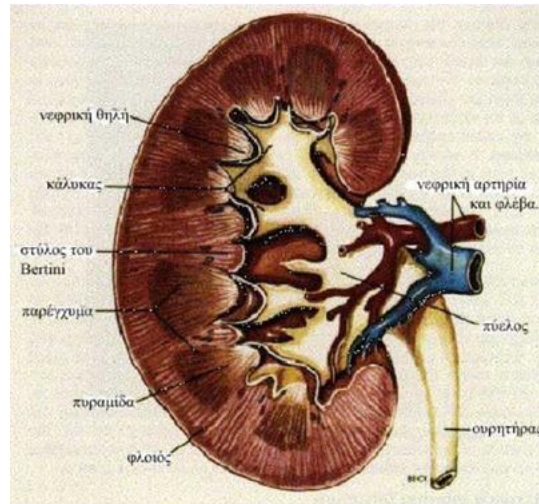
Οι νεφροί είναι ζωτικής σημασίας όργανα που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση του ισοζυγίου του ύδατος, του pH και της ισορροπίας των ηλεκτρολυτών, καθώς και για την απομάκρυνση των διαλυτών προϊόντων του μεταβολισμού με την παραγωγή των ούρων. Οι νεφροί επιτελούν μερικές ενδοκρινικές λειτουργίες, όπως είναι η σύνθεση της ρενίνης, της ερυθροποιητίνης και της 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνης D₃ [39]

Οι δύο νεφροί βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, στα δύο πλάγια της οσφυϊκής μοίρας της σπονδυλικής στήλης. Κάθε νεφρός έχει σχήμα φασολιού με μήκος περίπου 12 εκατοστά, πλάτος 5-6 εκατοστά, πάχος περίπου 3 εκατοστά και βάρος 120-175 γραμμάρια. Ο δεξιός νεφρός έρχεται σε επαφή με το ήπαρ, τη δεξιά κοιλική καμπή και το δωδεκαδάκτυλο. Ο αριστερός με τον σπλήνα, το στομάχι, την ουρά του παγκρέατος και την αριστερή κοιλική καμπή [36, 40].

Στο άνω πόλο του νεφρού βρίσκεται καθηλωμένο το αντίστοιχο επινεφρίδιο. Στο μέσο, του έσω χείλους του νεφρού υπάρχει μια βαθιά εντομή, που αποτελεί τις πύλες του νεφρού, από όπου μπαίνουν στο εσωτερικό του η νεφρική αρτηρία και τα νεύρα του και βγαίνουν η νεφρική φλέβα και η νεφρική πύελος [36].

Κάθε νεφρός αποτελείται από το παρέγχυμα και την αποχετευτική μοίρα. Σε επιμήκη διατομή διακρίνουμε την εξωτερική ζώνη (φλοιό) και την εσωτερική (μυελό). Ο φλοιός έχει κοκκιώδη όψη, περιβάλλει τον μυελό και διεισδύει σε αυτόν δημιουργώντας προσεκβολές, τους λεγόμενους νεφρικούς στύλους του Bertini. Ο φλοιός περιλαμβάνει τα σπειράματα και τα εσπειραμένα τμήματα των σωληναρίων. Ο μυελός έχει υποτρεφή γραμμώδη όψη και διακρίνονται 8-18 κωνοειδείς περιοχές που ονομάζονται νεφρικές πυραμίδες. Η κορυφή κάθε πυραμίδας λέγεται θηλή. Στην θηλή υπάρχουν 12-30 τμήματα που αποτελούν τις εκβολές των αθροιστικών σωληναρίων τα οποία εκβάλλουν της ελάσσονες κάλυκες. Η νεφρική πυραμίδα με την αντίστοιχη περιβάλλουσα φλοιώδη ουσία συνιστά τον νεφρικό λοβό [41].

Η λειτουργική μονάδα του νεφρού είναι ο νεφρώνας (1.000.000 ανά νεφρό) και βρίσκεται στη φλοιώδη ουσία. Ο νεφρώνας αποτελείται από το αγγειώδες σπείραμα, που χρησιμεύει για τη διήθηση του πλάσματος, την κάψα του Bowman, που αποτελείται από δύο πέταλα ανάμεσα στα οποία συγκεντρώνεται το διήθημα, το ουροφόρο σωληνάριο, που αποτελείται από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο, και την παρασπειραματική συσκευή [41].



Εικόνα 3: Δομή του νεφρού

Οι νεφροί δέχονται περίπου το ένα πέμπτο του αίματος που αντλεί η καρδιά με κάθε παλμό μέσω των νεφρικών αρτηριών, που είναι κλάδοι της κοιλιακής αορτής. Εκεί, στο επίπεδο του αγγειώδους σπειράματος διηθείται και σχηματίζεται το πρόουρο, ένα υπερδιήθημα του πλάσματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το πρόουρο έχει την ίδια ακριβώς σύσταση με το πλάσμα με εξαίρεση τα λευκώματα, που δε διηθούνται. Στη συνέχεια, το πρόουρο, που συγκεντρώνεται στην κοιλότητα του Bowman, διέρχεται από τα νεφρικά σωληνάκια, όπου εκεί υφίστανται αλλαγές στη σύσταση του με μηχανισμό επαναρρόφησης αλλά και απέκκρισης. Τελικά, σχηματίζεται το ούρο που ρέει από τους αθροιστικούς πόρους στη νεφρική πύελο και μέσω των ουρητήρων στην ουροδόχο κύστη [39,40]. Καθημερινά, υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγονται από τα νεφρικά σπειράματα περίπου 180 λίτρα προούρου από το οποίο περίπου το 99% επαναρροφάται από τα ουροφόρα σωληνάκια. Τελικά, προκύπτουν 1-2 λίτρα ούρων που απεκκρίνονται στο περιβάλλον.

2.3 Κατάχρηση ΑΑΣ

Παρότι τα αναβολικά στεροειδή εισήχθησαν στην κλινική πράξη στα τέλη της δεκαετίας του 1950, γρήγορα ακολούθησε η μη ιατρική χρήση της, με σκοπό τη βελτίωση της αγωνιστικής ικανότητας η οποία αρχικά αφορούσε αθλητές της άρσης βαρών, αλλά και αθλημάτων που απαιτούν αυξημένη μυϊκή δύναμη [2]. Το πρώτο καταγεγραμμένο περιστατικό χρήσης αναβολικών ουσιών με σκοπό την ενίσχυση της αθλητικής επίδοσης αναφέρθηκε τη δεκαετία του 1950. Στους Ολυμπιακούς αγώνες του Μονάχου το 1972, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως «οι Ολυμπιακοί αγώνες των αναβολικών», η κατάχρηση των αναβολικών στεροειδών αποκτά πλέον ανεξέλεγκτο χαρακτήρα και προσδιορίζεται ως σύμπτωμα του επαγγελματικού αθλητισμού. Τα αναβολικά εντάσσονται στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών της IAAF το 1972 και το 1976 στη λίστα της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής. Στις μέρες μας, παρά το γεγονός ότι τα ΑΑΣ ανήκουν στη λίστα των απαγορευμένων ουσιών της W.A.D.A αποτελούν την ηγετική ομάδα των θετικών αποτελεσμάτων κατά της ελέγχους doping. Συγκεκριμένα, μελέτες από τα εργαστήρια ελέγχου ντόπινγκ αναφέρουν ότι το 36% των θετικών αναλυτικών αποτελεσμάτων αφορούν στη χρήση αναβολικών [15,16].

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των τελευταίων χρόνων, είναι ότι η κατάχρηση των αναβολικών ουσιών έχει αυξηθεί ραγδαία και έχει εξαπλωθεί σε χώρους πέρα του αθλητικού για λόγους κοινωνικούς (π.χ. για λόγους ψυχαγωγίας σε συνδυασμό με αλκοόλ) και κοσμητικούς (π.χ. βελτίωση εξωτερικής εμφάνισης, απόκτηση μυώδους σωματότυπου). Ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι οι χρήστες λαμβάνουν δόσεις που γίνονται όλο και μεγαλύτερες με τα χρόνια σε συνδυασμό μάλιστα, με την ταυτόχρονη λήψη είτε δύο ή περισσότερων αναβολικών στεροειδών είτε αναβολικών με άλλη κατηγορία απαγορευμένων ουσιών [42]. Η χρήση συνδυασμού απαγορευμένων ουσιών ή διαφορετικών δοσολογικών σχημάτων, ανάλογα το άθλημα, εμποδίζει στο να προσδιορίσουμε τις διαφορές στις παρενέργειες είτε μεταξύ των φύλων είτε μεταξύ των διαφορετικών ειδών προπόνησης.

Πίνακας 4: Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα ΑΑΣ [13, 26]

Στεροειδές	Χορήγηση
Τεστοστερόνη	Όλες οι πιθανές
Εστέρες της τεστοστερόνης (propionate, enanthate, cypionate)	Ενέσιμη μορφή
Τεστοστερόνη undecanoate	Εκ του στόματος
Εστέρες της νανδρολόνης: Decanoate, phenylpropionate	Ενέσιμη μορφή
Μπολντενόνη undecyclenate	Ενέσιμη μορφή
Τρενμπολόνη	Ενέσιμη μορφή
Τρενμπολόνη acetate	Ενέσιμη μορφή
Μεθενολόνη enanthate	Ενέσιμη μορφή
Μεθυλτεστοστερόνη	Εκ του στόματος
Δαναζόλη	Εκ του στόματος
Μεθενολόνη acetate	Εκ του στόματος
Μεστερολόνη	Εκ του στόματος
Στανοζολόλη	Εκ του στόματος
Οξανδρολόνη	Εκ του στόματος
Οξυμεθολόνη	Εκ του στόματος
Μεθανδροστενολόνη	Εκ του στόματος
Νορεθανδρολόνη	Εκ του στόματος
Ανδροστενδιόνη	Πρόδρομο μόριο της τεστοστερόνης
Δεϋδροεπιανδροστερόνη	Πρόδρομο μόριο της τεστοστερόνης

2.4 Παρενέργειες

Από τη χρήση των αναβολικών στη θεραπευτική, είναι γνωστές οι ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορούν να εμφανισθούν και σχετίζονται με τη δόση καθώς και τον τύπο του στεροειδούς [20]. Η χρήση των ΑΑΣ διαταράσσει τη φυσιολογική παραγωγή των ορμονών στο ανθρώπινο σώμα, προκαλώντας αναστρεπτές και μη αναστρεπτές μεταβολές. Παρόλα αυτά, οι παρενέργειες των ΑΑΣ φαίνονται πως εκδηλώνονται μόνο κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας χρήσης [10,11].

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα συμπεράσματα για τις παρενέργειες των ΑΑΣ, στην περίπτωση των αθλητών, δεν μπορεί να είναι σαφή και κυρίως ασφαλή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι δεν μπορούν να διεξαχθούν σχετικές κλινικές μελέτες για λόγους δεοντολογίας και έτσι τα διαθέσιμα στοιχεία προέρχο-

νται κυρίως από παρατηρήσεις σε άτομα που λαμβάνουν αναβολικά στεροειδή θεραπευτικά ή από μεμονωμένα περιστατικά αθλητών που εμφάνισαν συγκεκριμένα προβλήματα υγείας, χωρίς όμως να έχει επιστημονικά τεκμηριωθεί η ευθύνη της λήψης των ουσιών αυτών [2,20]. Σε περιπτώσεις αθλητών το είδος και ο αριθμός των αναβολικών που λαμβάνονται, οι ακριβείς δόσεις ή η διάρκεια χρήσης τους δεν είναι γνωστά και όταν ομολογούνται δεν είναι βέβαιο ότι αντιστοιχούν στην πραγματικότητα. Ακόμα, δεν γίνεται γνωστό, αν λαμβάνονται ταυτόχρονα άλλα φάρμακα που μπορούν να δράσουν συνεργιστικά με τα αναβολικά στην εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών [2]. Παρακάτω παρουσιάζονται οι παρενέργειες που προκαλούνται από τη χρόνια χρήση των ΑΑΣ, όπως αυτές προκύπτουν από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.

2.4.1 Ενδοκρινικές διαταραχές-αναπαραγωγικό σύστημα.

Οι προκαλούμενες μεταβολές από τη χρήση ΑΑΣ στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων δεν είναι ίδιες μεταξύ των διαφορετικών φύλων και ηλικιών. Στους άνδρες, η χρήση στεροειδών οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της ωχρινοτρόπου (LH) και της θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) με συνέπεια την καταστολή της παραγωγής της ενδογενούς τεστοστερόνης. Έτσι, παρατηρείται ατροφία των όρχεων και μειωμένη σπερματογένεση. Όταν η λήψη των αναβολικών διακοπεί, η παραγωγή και η μορφολογία του σπέρματος επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από 4-12 μήνες. Υπερπλασία του προστάτη, και σπάνια, καρκίνος του προστάτη συνδέονται με τη χρήση ΑΑΣ. Ακόμα, στους άνδρες μπορεί να εμφανιστεί γυναικομαστία, λόγω της βιομετατροπής των ανδρογόνων στεροειδών σε οιστρογόνα, όπως οιστραδιόλη και οιστρόνη.

Στις γυναίκες, η χρήση στεροειδών συνδέεται τόσο με διαταραχές της έμμηνου ρύσεως όσο και φαινόμενα «αρρενοποίησης» τα οποία εκδηλώνονται με δασυτριχισμό, ακμή, αλλαγές στη χροιά της φωνής, αύξηση του μεγέθους της κλειτορίδας και εμφάνιση φαλάκρας ανδρικού τύπου. Ορισμένες από τις παραπάνω ανδρογενείς επιδράσεις μπορεί να είναι μη αντιστρεπτές, ακόμα και μετά τη διακοπή των φαρμάκων [2,20,26].

Σε νέους που βρίσκονται σε προεφηβικό και εφηβικό στάδιο, η χρήση στεροειδών επιταχύνει την ωρίμανση σε συνδυασμό με αλλαγές στην εξωτερική εμφάνιση και ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου [20]. Μια τελευταία ενδοκρινική διαταραχή, κοινή και για τα δύο φύλα, είναι η διαταραχή της ευαισθησίας στην ινσουλίνη που μπορεί να οδηγήσει σε δυσανεξία στη γλυκόζη, όπως επίσης έχουν αναφερθεί μεταβολές στις ορμόνες του θυρεοειδούς [20,26].

2.4.2 Ήπαρ

Οι τιμές των ηπατικών ενζύμων (ασπαρτική και αμινοτρασφεράση της αλανίνης, γαλακτική αφυδρογονάση) εμφανίζονται αυξημένες, αλλά συχνά επανέρχονται στις φυσιολογικές, όταν η χρήση των αναβολικών διακοπεί. Η ηπατική δυσλειτουργία συχνά συνδέεται με τη χρήση των 17-α αλκυλιωμένων στεροειδών, όπως η μεθυλτεστοστερόνη, η οξυμεθαλόνη, η οξανδρολόνη και η στανολολόλη. Παρατηρείται επίσης χολαστικός ίκτερος και υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ηπατικής πελίωσης (σχηματισμός κύστεων γεμάτων αίμα στο ηπατικό παρέγχυμα). Ακόμα, έχουν σημειωθεί θάνατοι αθλητών με βαρύ ιστορικό κατάχρησης αναβολικών είτε από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ή από ρήξη του ηπατικού όγκου. Τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα έχουν συχνά συνδεθεί με τη χρήση οξυμεθαλόνης και μεθυλτεστοστερόνης [20].

2.4.3 Μυοσκελετικό σύστημα

Η χορήγηση των αναβολικών στεροειδών πριν ή κατά τη διάρκεια της ήβης, προκαλεί πρόωμη σύγκλιση των επιφύσεων των μακρών οστών και αναστολή της ανάπτυξης του σκελετού σε ύψος. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η χρήση των αναβολικών εγκυμονεί αυξημένο κίνδυνο μυοτενοντωδών τραυματισμών. Οι μεταβολές στη δύναμη των τενόντων δεν μπορούν να ακολουθήσουν τις αυξήσεις της μυϊκής δύναμης και συχνά παρατηρούνται σε ρήξεις των τενόντων και ταυτόχρονες εκτεταμένες κακώσεις των μυών [20].

2.4.4 Δέρμα

Τα αναβολικά μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της έκκρισης σμήγματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση σμηγματορροϊκής δερματίτιδας και τη δημιουργία φαγέσωρων. Στη συνέχεια, εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές βλάβες της κοινής ακμής, συνήθως στο πρόσωπο και την πλάτη. Η λύση της συνέχειας του δέρματος ευνοεί την εμφάνιση δευτερογενών μολύνσεων του δέρματος. Δέρμα με ερυθρότητα ή κίτρινη χροιά, κνησμός, οίδημα αλλά και έντονες εφιδρώσεις έχουν παρατηρηθεί σε αθλητές που έκαναν συστηματική χρήση αναβολικών στεροειδών [2].

2.4.5 Ψυχιατρικές εκδηλώσεις

Βιβλιογραφικές αναφορές συνδέουν τη χρόνια χρήση των αναβολικών στεροειδών με πληθώρα ψυχιατρικών συμπτωμάτων όπως μανιακές ή υπομανιακές εκδηλώσεις που συχνά συνοδεύονται από ήπια ψυχωσικά συμπτώματα όπως παρανοϊκές ψευδαισθήσεις και αίσθημα ανωτερότητας. Επιπλέον, η χρόνια χρήση των ανα-

βολικών συνδέεται με διαταραχές προσωπικότητας, κυκλοθυμικά επεισόδια αλλά και επεισόδια επιθετικής, ακόμα και βίαιης συμπεριφοράς. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι μελέτες αναφέρουν πως άνδρες χωρίς ή μικρό ιστορικό βίας ή εγκληματικής συμπεριφοράς πριν από τη χρήση των ΑΑΣ, διέπραξαν ή προσπάθησαν να διαπράξουν φόνο κατά το διάστημα που έπαιρναν ΑΑΣ. Η χρόνια χρήση αναβολικών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ισχυρής ψυχικής αλλά και σωματικής εξάρτησης, οδηγώντας στην εμφάνιση του συνδρόμου αποστέρησης, μετά τη διακοπή της παρατεταμένης χρήσης. Το σύνδρομο αποστέρησης χαρακτηρίζεται από κατάθλιψη, επίμονη αναζήτηση αναβολικών στεροειδών, άγχος, ναυτία, ευερεθιστικότητα, αυτοκτονικές τάσεις, αϋπνία, εφίδρωση, κόπωση, ταχυκαρδία [2,20,26].

2.5 Παρενέργειες στο καρδιαγγειακό σύστημα

Παρότι ο αθλητισμός είναι συνυφασμένος με την καλή φυσική κατάσταση και την υγεία του ανθρώπου, στην πράξη παρατηρείται πως συνδέεται με διάφορες διαταραχές, με πιο επικίνδυνες αυτές που αφορούν το καρδιαγγειακό σύστημα. Οι καρδιαγγειακές διαταραχές είναι οι πιο συχνές αιτίες για τους ξαφνικούς θανάτους που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της άσκησης. Σε νεότερους αθλητές, αυτό οφείλεται σε συγγενείς καρδιοπάθειες, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας αθλητές η αθηροσκλήρωση αποτελεί την κύρια αιτία [43].

Τα τελευταία χρόνια η χρήση απαγορευμένων ή παράνομων ουσιών, από αθλητές, επαγγελματίες ή ερασιτέχνες, ή άτομα που απλά ασχολούνται με τον αθλητισμό σε επίπεδο γυμναστηρίου, έχει συνδεθεί με την εμφάνιση σοβαρών καρδιαγγειακών διαταραχών. Οι επιπτώσεις των ΑΑΣ στο καρδιαγγειακό σύστημα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άμεσες επιδράσεις των ΑΑΣ στο μυοκάρδιο και την αγγείωση και σε έμμεσες επιδράσεις μέσω της μεταβολής των λιπιδίων και των αιμορραγικών ιδιοτήτων του αίματος [44]. Συγκεκριμένα, οι καρδιαγγειακές επιπτώσεις θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν σε: α) Εγκεφαλικά ισχαιμικά επεισόδια, οβελιαίες θρομβώσεις των κόλπων, β) Πνευμονική εμβολή, στεφανιαία νόσο, διαστολική δυσλειτουργία, υπερτροφία αριστερής κοιλίας, αρρυθμία, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ξαφνικός θάνατος, γ) Αύξηση της πίεσης, δ) Αλλοιωμένη αγγειακή δραστικότητα, ε) περιφερική αρτηριακή ασθένεια και στ) Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση.

Συχνά σε αθλητές που κάνουν κατάχρηση ΑΑΣ παρατηρείται υπερτροφία της αριστερής κοιλίας και καρδιακές αρρυθμίες [45-47]. Ωστόσο, επειδή η υπερτροφία μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο μεταφορτίο μετά από ισομετρική άσκηση [48] η ερμηνεία για την παρουσία υπερτροφίας στην αριστερή κοιλία αθλητών που έχουν παραδεχτεί ότι κάνουν χρήση ΑΑΣ παραμένει πολύπλοκη. Η πιθανή σχέση μεταξύ ΑΑΣ

και της υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας, μπορεί να εξηγηθεί ως δευτερεύουσα στην υπέρταση ή ως άμεση επίδραση στο μυοκάρδιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μελέτες σε απομονωμένα ανθρώπινα μυοκύτταρα έχουν δείξει ότι τα ΑΑΣ δεσμεύονται με τους ανδρογονικούς υποδοχείς και μπορεί άμεσα να προκληθεί υπερτροφία [14,49] πιθανώς μέσω της αυξημένης δράσης του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης [46]. Πράγματι, κλινικές μελέτες προτείνουν μια χαρακτηριστική μορφή υπερτροφίας σε χρήστες ΑΑΣ, με αλλαγές στην υφή του μυοκαρδίου στην υπερηχογραφία, πριν την έναρξη της εκταταμένης υπερτροφίας [50].

Η ομάδα της D'Andrea [51] μελετώντας υπερηχογραφικά τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, μετά από χρόνια κατάχρηση ΑΑΣ σε αθλητές έδειξε ότι οι αθλητές είχαν υποκλινική αλλοίωση τόσο της διαστολικής όσο και της συστολικής λειτουργίας. Η δυσλειτουργία αυτή μάλιστα συνδέεται με τη δοσολογία και τη διάρκεια χρήσης των ΑΑΣ. Σε αντίθεση, άλλη μελέτη [52] έδειξε πως η χρήση ΑΑΣ, σε διάρκεια μικρότερης από 16 εβδομάδες, δεν οδηγεί σε ανιχνεύσιμες υπερηχογραφικά αλλοιώσεις στη μορφολογία και διαστολική και συστολική λειτουργία της καρδιάς σε αθλητές δύναμης. Η ομάδα του Krieg [53] έδειξε ότι οι χρήστες ΑΑΣ είχαν διευρυμένο μεσοκοιλιακό διαφραγματικό τοίχωμα σε σχέση με τους μη χρήστες και την ομάδα ελέγχου και με το οπίσθιο τοίχωμα να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο. Σε αντίθεση, σε άλλη μελέτη [54] παρατηρήθηκε ότι η χρήση ΑΑΣ συνδέεται με αυξημένο οπίσθιο τοίχωμα και μεσοκοιλιακό διαφραγματικό πάχος σε σύγκριση με τους μη χρήστες.

Σε έρευνες που παρατηρήθηκε υπερτροφία της αριστερής κοιλίας σε συνδυασμό με την κατάχρηση ΑΑΣ, αναφέρεται ότι πιθανότατα η υπερτροφία αναστρέφεται με τη διακοπή των ΑΑΣ, αν και οι παρενέργειες παραμένουν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα [45,55]. Ορισμένες έρευνες μάλιστα προτείνουν ότι η υπερτροφία μπορεί να παραμένει χρόνια μετά τη διακοπή των ΑΑΣ [56], αλλά αυτό μπορεί να είναι δευτεροπαθής υπερτροφία λόγω προπόνησης δύναμης.

Μια από τις συνηθέστερες επιπτώσεις της χρήσης ΑΑΣ αποτελεί η μεταβολή στη συγκέντρωση των λιποπρωτεϊνών στο αίμα. Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η κατάχρηση ΑΑΣ από αθλητές αυξάνει τα επίπεδα της χαμηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) κατά 20% [57, 58-59] ενώ μειώνει τα επίπεδα της υψηλής-πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (High Density Lipoprotein) κατά 20%-70% [56-57,60-61]. Συγκεκριμένα, τα ανδρογόνα που δεν αρωματοποιούνται, όπως η στανολόλη, αναφέρεται πως προκαλούν μείωση της HDL πάνω από 30%. Η μείωση αυτή είναι σημαντικά μικρότερη όταν χρησιμοποιούνται ανδρογόνα που υφίστανται αρωματοποίηση, όπως η τεστοστερόνη [62].

Γενικότερα, οι στεροειδείς ορμόνες μεταβάλλουν τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών στον ορό, μέσω της λιπολυτικής υποβάθμισης των λιποπρωτεϊνών και της απο-

μάκρυνσης τους από τους υποδοχείς μέσω της τροποποίησης της απολιποπρωτεΐνης A και της B σύνθεσης. Παρότι φαίνεται από αρκετές μελέτες να υπάρχει σύνδεση μεταξύ της χρήσης ΑΑΣ και αυξημένων επιπέδων LDL, δεν έχει αποδειχθεί κανένας μηχανισμός. Προτείνεται πως τα επίπεδα της LDL στον ορό πιθανόν να αυξάνονται μέσω της επαγωγής της ηπατικής λιπάσης τριγλυκεριδίων και τον καταβολισμό πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης. Η επαγωγή της ηπατικής λιπάσης μπορεί να προκαλεί τον καταβολισμό της HDL και έτσι να μειώνονται τα επίπεδα της τελευταίας στον ορό. Εκτιμάται ότι αυτές οι διαταραχές στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών αυξάνουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου από 3-6 φορές [45]. Ενώ, οι διαταραχές στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών μπορεί να εμφανιστούν μέσα σε 9 εβδομάδες από την έναρξη λήψης ΑΑΣ [57-59, 62-64] φαίνεται πως είναι αναστρέψιμες και επιστρέφουν σε φυσιολογικά επίπεδα 5 μήνες μετά τη διακοπή λήψης τους. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες επειδή η διάρκεια δράσης της είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι αναμενόταν από της χρόνους ημιζωής των ΑΑΣ.

Αμφιλεγόμενη εξακολουθεί να παραμένει η σχέση μεταξύ της χρήσης ΑΑΣ και της αρτηριακής πίεσης καθώς υπάρχει πληθώρα μελετών που υποστηρίζει τόσο την ύπαρξη σύνδεσης όσο και τη μη σύνδεση της. Όταν παρατηρείται υπέρταση από τα ΑΑΣ, αυτό πιθανόν να ακολουθείται από νεφρική κατακράτηση νατρίου. Η απόκριση της αρτηριακής πίεσης στην κατάχρηση των ΑΑΣ σχετίζεται με τη δόση. Η ομάδα του Uthausen [56] έδειξε ότι η μέση αρτηριακή πίεση χρηστών ΑΑΣ ήταν αυξημένη, στα προϋπερτασικά και σταδίου I όρια, σε σύγκριση με τους προηγούμενους ή μη χρήστες. Αντίθετα, η ομάδα της D'Andrea [51] έδειξε ότι η αρτηριακή πίεση αθλητών, χρηστών ΑΑΣ δε διεφερε σημαντικά από αθλητές που δεν έκαναν χρήση και ακολουθούσαν το ίδιο πρωτόκολλο προπόνησης. Οι επιπτώσεις της χρήσης ΑΑΣ στην αρτηριακή πίεση μπορεί να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται πως τα αυξημένα επίπεδα παραμένουν από 5-12 εβδομάδες. Το γεγονός αυτό βέβαια μπορεί να αντανάκλα τους παρατεταμένους χρόνους ημιζωής των σκευασμάτων ΑΑΣ, ή να καθιστά μη αξιόπιστη την αναφορά περί διακοπής των ΑΑΣ από της χρήστες. Η διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών πάνω στη σχέση της χρήσης των ΑΑΣ και της πιθανής μεταβολής της αρτηριακής πίεσης κρίνεται αναγκαία καθώς παράμετροι στις διακυμάνσεις στο προπονητικό σχήμα, δοσολογίες που λαμβάνονται και το χρονικό διάστημα λήψης επηρεάζουν την έκβαση αυτών.

Ανησυχητικό αποτελεί το γεγονός ύπαρξης αναφορών που συνδέουν τα ΑΑΣ με οξεία στεφανιαία σύνδρομα, κοιλιακές αρρυθμίες, εμφράγματα του μυοκαρδίου και ξαφνικών θανάτων, νέων κυρίως ατόμων χωρίς προηγούμενο ιστορικό [44-45,65].

Ελλείψει προσεκτικών ερευνών σε ζωικά μοντέλα, η κατάχρηση των ΑΑΣ θεωρείται ότι μπορεί να προκαλέσει ισχαιμία από την υπερβολική ζήτηση οξυγόνου

στο μέγιστο της άσκησης. Ως ένας δυνητικά άμεσος μηχανισμός, τα ΑΑΣ ενισχύουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμό θρόμβων μέσω της αυξημένης παραγωγής αιμοπεταλίων της θρομβοξάνης A_2 , μειώνοντας την παραγωγή προστακυκλίνης και αυξάνοντας τα επίπεδα ινωδογόνου. Οι σχετικές κλινικές επιδράσεις των μηχανισμών αυτών παραμένουν ασαφείς. Παρόλα αυτά, ο συνδυασμός αυτών μπορεί να δικαιολογήσει τα εμφράγματα ή τις κοιλιακές αρρυθμίες σε νεαρά άτομα με κανένα παράγοντα κινδύνου καρδιακής νόσου, σε πολλούς από τους οποίους η κατάχρηση ΑΑΣ έχει αποκλειστεί ως κύρια αιτία θανάτου.

Η ομάδα του McNutt [66] ανέφερε περιστατικό ενός 22-χρόνου bodybuilder με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που παραδέχθηκε την κατάχρηση ΑΑΣ, αλλά δε διέθετε οικογενειακό ιστορικό πρόωρης αθηροσκλήρωσης ή καρδιακά επεισόδια. Ο ασθενής παρουσίασε σημαντικά αυξημένα επίπεδα LDL (596 mg / dl) και μειωμένα επίπεδα HDL (14 mg / dl). Μέσα σε ένα μήνα από τη διακοπή των ΑΑΣ, η LDL του μειώθηκε σε 220 mg / dl και HDL του αυξήθηκε σε 35 mg / dl. Σε άλλη μελέτη αναφέρεται περιστατικό καρδιακής ανακοπής 23-χρόνου bodybuilder που έκανε χρήση ΑΑΣ. Η νεκροψία απέδειξε κοιλιακή υπερτροφία, ίνωση του μυοκαρδίου και οξύ έμφραγμα [67]. Αναφέρεται επίσης περιστατικό καρδιακής ανακοπής 20-χρόνου bodybuilder που έκανε χρήση 700 mg/εβδομάδα ΑΑΣ. Η νεκροψία έδειξε υπερτροφία της αριστερής κοιλίας με καρδιακή μάζα δύο φορές μεγαλύτερη από τη φυσιολογική [68]. Δύο ακόμα περιπτώσεις [69] αναφέρονται σε νέους άνδρες (οι οποίοι έκαναν χρήση υψηλών δόσεων διαφορετικών αναβολικών) που δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό καρδιάς και φυσιολογικές στεφανιαίες αρτηρίες στην νεκροψία. Κοινό εύρημα αυτών στην νεκροψία ήταν τα υπερσυσταλμένα ηωσινοφιλικά καρδιακά μυοκύτταρα με διερηγμένη την μυοϊνώδη δομή. Το μοντέλο του υπερσυσταλμένου μυοκαρδίου θεωρείται πως είναι μια εκδήλωση της αυξημένης δραστηριότητας του συμπαθητικού συστήματος [44]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται περιστατικά ξαφικών θανάτων που συνδέονται με τη χρήση αναβολικών στεροειδών (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Περιπτώσεις ξαφνικών θανάτων συσχετιζόμενων με χρήση ΑΑΣ

Μελέτη	Περιπτώσεις	Φύλο/Ηλικία	Συμβάν	Ευρήματα απαγορευμένων ουσιών	Παθολογικά ευρήματα
Luke et al. (1990) [70]	1	Άρρεν/21χρ.	Κατέρρευσε κατά τη διάρκεια προπόνησης	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στα ούρα: 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone,	Σημαντική καρδιακή και νεφρική υπερτροφία, με περιφερική μυοκαρδιακή ίνωση και εστιακή νέκρωση του μυοκαρδίου. Ηπατοσπληνομεγαλία
Kennedy et al.(1993) [71]	2	Άρρεν/18χρ.	Καρδιακή προσβολή κατά τη διάρκεια προπόνησης	Στα ούρα: oxymesterone	Εστιακή ίνωση, υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, μυοκαρδίτιδα
		Άρρεν/24χρ.			Εστιακή ίνωση, λεμφοκυτταρική διήθηση
Dickerman et al.(1995) [68]	1	Άρρεν/20χρ.	Καρδιακή προσβολή	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών	Ομόκεντρη υπερτροφία
Dickerman et al.(1996) [72]	1	Άρρεν/26χρ.	Κατέρρευσε ενώ μετακινούσε έπιπλα	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών	Υπερτροφία αριστερής κοιλίας, δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια ως αποτέλεσμα πνευμονικής εμβολής από εντω βάθει φλεβική θρόμβωση των κάτω άκρων
Hausmann et al. (1998) [67]	1	Άρρεν/23χρ.	Βρέθηκε νεκρός στο σπίτι του	Στα ούρα: mesterolone, methandienone, testosterone, nandrolone και clenbuterol. Λόγος T/E 64:1	Καρδιακή υπερτροφία, οξεία κυτταρική νέκρωση και διάμεση ίνωση του μυοκαρδίου
Fineschi et al. (2001) [69]	2	Άρρεν/32χρ.	Ξαφνικός θάνατος κατά τη διάρκεια προπόνησης άρσης βαρών	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στα ούρα: 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone, norepiandrosterone, 3-hydroxy-17-epistanozolol	Μια γκριζωπή ζώνη στο εσωτερικό μισό του πρόσθιου-πλευρικού τοιχώματος της αριστερής κοιλίας που αντιστοιχεί σε τυπική νέκρωση του μυοκαρδίου, νεκρά υπερδιατελεμένα κύτταρα του μυοκαρδίου. Περιστασιακές εστίες νέκρωσης με ζώνες συστολής

		Άρρεν/29χρ.	Βρέθηκε αναίσθητος στο κρεβάτι του	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στα ούρα: 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone, norepiandrosterone, 3-hydroxy-17-epistanozolol	Περιστασιακά, απομονωμένα κύτταρα του μυοκαρδίου με ζώνες συστολής
Di Paolo et al.(2007) [73]	4	Άρρεν/29χρ.	Απώλεια συνείδησης κατά τη διάρκεια προπόνησης	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών	Έντονη ίνωση, υπερτροφικά μυοκύτταρα, εστιακή λιπώδη υποκατάσταση του πρόσθιου τοιχώματος της αριστερής κοιλίας, ήπια εστιακή υπερπλασία του έσω χιτώνα των στεφανιαίων αρτηριών
		Άρρεν/27χρ.	Ξαφνικός θάνατος κατά τη διασκέδαση	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στα ούρα: stanozolol, testosterone	Εστιακή ίνωση, υπερτροφικά μυοκύτταρα στην περιοχή της ίνωσης, ήπια εστιακή υπερπλασία του έσω χιτώνα των στεφανιαίων αρτηριών
		Θήλυ/37χρ.	Βρέθηκε νεκρή στο αυτοκίνητο της	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών	Εστιακή ίνωση, ήπια εστιακή υπερπλασία των μυοκυττάρων, κεντρική κοκκοποίηση ιστού, φυσιολογικές στεφανιαίες αρτηρίες
		Άρρεν/31χρ.	Βρέθηκε νεκρός στο σπίτι του	Στα ούρα: stanozolol	Έντονη εστιακή ίνωση, ήπια εστιακή υπερπλασία των μυοκυττάρων, περιστασιακός εκφυλισμός βασεόφιλων, ήπια εστιακή υπερπλασία του έσω χιτώνα των στεφανιαίων αρτηριών, μικρές αθηρωματικές πλάκες

Fineschi et al.(2007) [74]	2	Άρρεν/29χρ.	Κατέρρευσε και πέθανε στο σπίτι του	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στα ούρα: nandrolone, stanozolol, Λόγος T/E 28,7	Εστίες νέκρωσης με ζώνες συστολής
		Άρρεν/30χρ.		Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στο αίμα: nandrolone Στα ούρα: norandrostosterone, Λόγος T/E 42	Εστιακή μυοκαρδιακή ίνωση, χολοσταση, ηπατική πελίωση
Thiblin et al.(2009) [75]	1	Θήλυ/29χρ.	Βρέθηκε νεκρή στο σπίτι της	Ιστορικό χρήσης αναβολικών και διεγερτικών ουσιών. Στο αίμα: ephedrine και norephedrine Στα ούρα: testosterone, OH-stanozolol, 16βOH-stanozolol, Λόγος T/E 28,3	Μικρές εστίες κοκκοποίησης ιστού, λεμφοκυτταρική διήθηση γύρω από διάφορα μικρά και μεσαίου μεγέθους αγγεία. Συρρικνωμένος φλοιός και μυελός επινεφριδίων, πνευμονική συμφόρηση, ασυνήθιστα βαριά όργανα (ήπαρ, πνεύμονες, νεφροί).
Montisci et al.(2012) [76]	4	Άρρεν/32χρ.	Βρέθηκε νεκρός στο σπίτι του	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών.	Ομόκεντρη υπερτροφία αριστερής κοιλίας, διάμεση ίνωση, ηπατική στεάτωση, πολυοργανική ανεπάρκεια.
		Άρρεν/31χρ.	Κατέρρευσε μετά από προπόνηση. Καρδιακή ανεπάρκεια κατά την παραμονή του στο νοσοκομείο	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών. Στην τρίχα: stanozolol	Σημαντική καρδιομεγαλία με αμφικολιακή έκκεντρη υπερτροφία, ήπια κολπική διάταση, διάμεση ίνωση με σπάνιες φλεγμονώδεις διηθήσεις, ηπατική στεάτωση, ατροφία όρχεων, πολυοργανική ανεπάρκεια, οξύ πνευμονικό οίδημα, EBV.

		Άρρεν/32χρ.	Πέθανε μετά από επίσκεψη στον οδοντίατρο	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών Στα ούρα: testosterone, epitestosterone	Καρδιομεγαλία με υπερτροφία και αμφικοιλιακή διάταση, υπερτροφικά μυοκύτταρα με μη φυσιολογικούς πυρήνες, πολυοργανική ανεπάρκεια, οξεία ηπατική ανεπάρκεια, αιμορραγικό πνευμονικό εμφρακτό.
		Άρρεν/25χρ.	Πέθανε κατά τη διάρκεια του ύπνου	Ιστορικό χρήσης αναβολικών ουσιών Στα ούρα: nandrolone	Ηωσινοφιλική μυοκαρδίτιδα, πολυοργανική ανεπάρκεια

2.6 Παρενέργειες στο νεφρικό σύστημα

Η επιστημονική γνώση επί των πιθανών επιπτώσεων των ΑΑΣ στη νεφρική λειτουργία περιορίζεται σε περιπτώσιολογικές αναφορές (case reports) ή σειρά περιστατικών (case series) και μελέτες σε ζωικά μοντέλα. Στις μελέτες αυτές ως παρενέργειες της χρήσης ΑΑΣ αναφέρονται περιστατικά με οξεία νεφρική βλάβη [77], οξεία νεφρική ανεπάρκεια ως επιπλοκή της ραβδομύωσης [78], διάχυτη μεμβρανούπερπλαστική σπειραματονεφρίτιδα [79], σοβαρή χολόσταση με νεφρική ανεπάρκεια [80]. Επιπλέον, αναφέρεται πως τα ΑΑΣ προκαλούν αύξηση της κρεατινίνης και του ουρικού οξέος στον ορό, οι τιμές των οποίων επιστρέφουν εντός των φυσιολογικών ορίων μετά τη διακοπή των στεροειδών [20]. Ακόμα, ως παρενέργεια αναφέρεται ο καρκίνος Wilm's σε αθλητές που χρησιμοποιούσαν ΑΑΣ, ενώ σπάνια παρατηρείται σε ενήλικες [81]. Τα ανδρογόνα είναι επίσης γνωστό ότι προκαλούν οξειδωτικό στρες και επηρεάζουν το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης [82,83]. Σε πρόσφατη μελέτη, αναφέρεται ότι στα ποντίκια που λάμβαναν νανδρολόνη, η οξειδωτική βλάβη της νεφρούς είναι δόσοεξαρτώμενη [84].

Παρότι οι πιθανές επιπτώσεις των ΑΑΣ στη νεφρική λειτουργία των ανθρώπων δεν έχουν διευκρινιστεί και καθοριστεί πλήρως, μελέτες προτείνουν ότι τα ΑΑΣ ασκούν άμεση τοξική επίδραση στα κύτταρα του σπειράματος, οδηγώντας σε μεσαγωγειακή συσσώρευση και εξάντληση των ποδοκυττάρων, ανεξάρτητα από τις δομικές-λειτουργικές αναπροσαρμογές [84-85].

2.7 Παρενέργειες σε επίπεδο κυττάρου

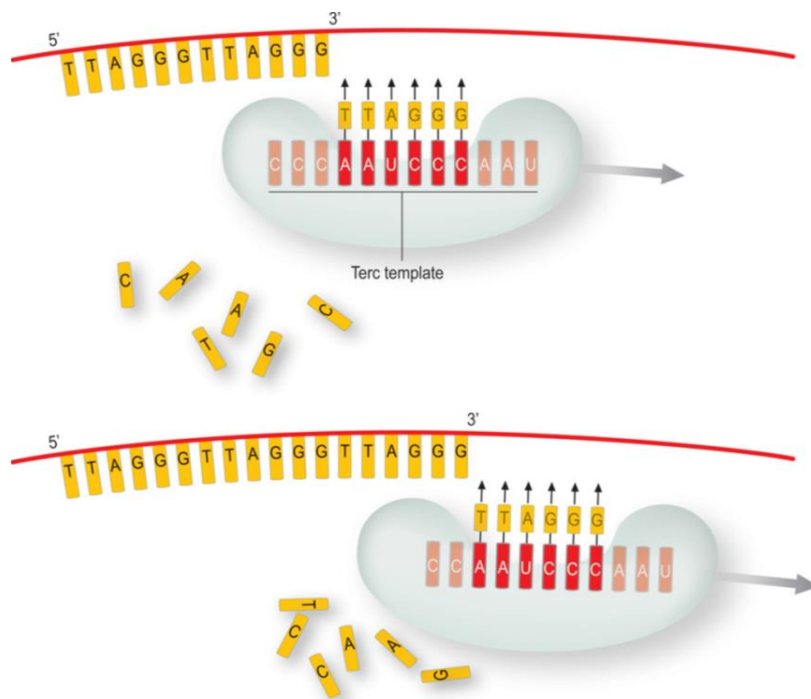
Στις Δυτικές χώρες τα καρδιαγγειακά νοσήματα θεωρούνται ως η κυριότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Ενώ πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν προσδιορίσει αρκετούς από τους παράγοντες που εμπλέκονται στην παθογένεση της αθηρωσκλήρωσης και της καρδιακής ανεπάρκειας, η κατανόηση των μηχανισμών παραμένει ελλιπής. Τα τελευταία χρόνια, η βιολογία των τελομερών έχει εισέλθει στο πεδίο της καρδιαγγειακής έρευνας ως ένας δυνητικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της αθηρωσκλήρωσης και της καρδιακής ανεπάρκειας [86].

Τα τελομερή αποτελούν εξειδικευμένα συμπλέγματα πρωτεϊνών-DNA και βρίσκονται στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων. Τα τελομερή αποτελούνται από μη κωδικοποιούμενες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, πλούσιες σε γουανίνη (TTAGGG της ανθρώπου) που τελειώνουν σε ένα προεξέχον μονόκλωνο 3-άκρο που δρα ως υπόστρωμα για την τελομεράση και από πρωτεΐνες που έχουν δομικές και ρυθμιστικές ιδιότητες. Το μήκος των τελομερών διαφέρει μεταξύ και εντός των ειδών, στους ανθρώπους είναι περίπου 20kb, ενώ στα ποντίκια από 40-80kb.

Τα τελομερή διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν δομές θηλιάς (T-, D- loops), οι οποίες δρουν ως προστατευτικό «καπάκι» (cap). Με τον τρόπο αυτό, τα τελομερή εμποδίζουν την απώλεια της γενετικής πληροφορίας και προστατεύουν τα χρωμοσώματα από το να αναγνωριστούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς ως θραύσματα διπλής έλικας DNA [87, 88]. Είναι σημαντικό ότι, μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση, το μήκος των τελομερών μειώνεται κατά 50-200 ζεύγη βάσεων, και σε συνδυασμό με την κυτταρική γήρανση οδηγεί τελικά σε ένα κρίσιμο σημείο όπου πυροδοτείται η χρωμοσωμική σύντηξη και/ή απόπτωση [89].

Η ακεραιότητα των τελομερών προστατεύεται από τη δράση του κυτταρικού ολοενζύμου, της τελομεράσης. Η τελομεράση αποτελεί ένα μοναδικό ριβονουκλεοπρωτεϊνικό ένζυμο που ως βασική λειτουργία έχει την επιμήκυνση και τη διατήρηση των τελομερών. Η τελομεράση αποτελείται από, την καταλυτική υπομονάδα αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης (hTERT), η οποία προσθέτει τις τελομερικές αλληλουχίες DNA στα άκρα των χρωμοσωμάτων, και το RNA συστατικό (hTERC) που χρησιμεύει ως εκμαγείο για τη σύνθεση των νέων τελομερικών αλληλουχιών DNA [88-89]. Η δραστηριότητα της τελομεράσης και η διατήρηση των τελομερών είναι σημαντικά προαπαιτούμενα για την κυτταρική αθανασία κυρίως λόγω της σταθεροποίησης των τελομερών και της λειτουργίας του πολλαπλασιασμού. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί λειτουργίες της τελομεράσης στην ογκογένεση, που είναι ανεξάρτητες των τελομερών [90].

Η τελομεράση συναντάται σε διάφορα επίπεδα στα ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς. Υπάρχει υψηλό επίπεδο έκφρασης κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ αντίθετα τα επίπεδα μειώνονται σημαντικά στους ιστούς των ενηλίκων [90]. Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα των ενηλίκων παρουσιάζουν χαμηλή ή μηδενική δραστηριότητα τελομεράσης με συνέπεια να βιώνουν προοδευτική φθορά των τελομερών σε κάθε μιτωτικό κύκλο, τόσο σε κυτταρική καλλιέργεια όσο και κατά τη διάρκεια γήρανσης όλου του οργανισμού. Σε αντίθεση, τα καρκινικά κύτταρα, τα κύτταρα της γενετικής σειράς (germline cells) και τα προγονικά πολυδύναμα κύτταρα (stem cells), διατηρούν υψηλή δραστηριότητα τελομεράσης και μακριά τελομερή, με αποτέλεσμα να έχουν ένα παρατεταμένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση του TERC αναστέλλει την κυτταρική γήρανση και παρατείνει τη διάρκεια ζωής σε διάφορους τύπους κυττάρων [88]. Επιπλέον, μελέτες σε ανθρώπους αλλά και ζωικά μοντέλα έδειξαν στα θηλυκά παρουσιάζεται υψηλότερη δραστηριότητα της τελομεράσης και μακρύτερα τελομερή και ότι τα οιστρογόνα ίσως συνεισφέρουν σ' αυτή τη φυλετική διαφορά [88].



Εικόνα 4: Δράση της τελομεράσης [86]

Το μήκος των τελομερών έχει συσχετιστεί με καρδιαγγειακά νοσήματα. Μια πιθανή εξήγηση για την σύνδεση της δυσλειτουργίας των τελομερών με τις καρδιαγγειακές ασθένειες είναι ότι το περιορισμένο μήκος των τελομερών οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της γήρανσης και της απόπτωσης. Ως επιπλοκή της μειωμένης ικανότητας πολλαπλασιασμού, για το καρδιαγγειακό σύστημα, μπορεί να θεωρηθεί η εξάντληση των προγονικών κυττάρων που έχουν επιδιορθωτικές ιδιότητες. Έτσι, η νεοαγγειογένεση σε ισχαιμική καρδιοπάθεια και αθηρωσκλήρωση μπορεί να είναι περιορισμένη. Επιπλέον, η κυτταρική σταθερότητα είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της λειτουργίας του οργάνου, ειδικά του ιστού που σπάνια αναγεννάται, όπως το μυοκάρδιο. Αυξημένη κυτταρική ευπάθεια ή πραγματική αυξημένη γήρανση και απόπτωση λόγω δυσλειτουργίας των τελομερών, μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια. Εναλλακτικά, η σύνδεση μεταξύ της δυσλειτουργίας των τελομερών και της καρδιαγγειακής νόσου, μπορεί να είναι το γεγονός ότι η ίδια η νόσος προκαλεί την δυσλειτουργία ή βράχυνση των τελομερών. Έτσι, αν και οι ακριβείς μηχανισμοί που συνδέουν τη βιολογία των τελομερών με τους διαφορετικούς καρδιαγγειακούς φαινότυπους δεν έχουν διευκρινιστεί, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν πως τα τελομερή παίζουν κάποιο ρόλο στην καρδιαγγειακή παθοφυσιολογία.

Βραχέα τελομερή έχουν συσχετιστεί με αγγειακή γήρανση και στην αθηροσκλήρωση. Ενδοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αθηρωματικές πλάκες έχουν βραχύτερα τελομερή σε σύγκριση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα από μη αθηρωματικές περιοχές του ίδιου ατόμου. Ασθενείς με αθηροσκλήρωση έχουν βραχύτερα τελομερή στα λευκοκύτταρα τους σε σύγκριση με υγιή, της ίδιας ηλικίας άτομα. Επιπρόσθετα, σε ενδομυοκαρδιακή βιοψία ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια τα περισσότερα κύτταρα ήταν υπό γήρανση και τα τελομερή ήταν βραχύτερα συγκριτικά με άτομα της ίδιας ηλικίας. Καθώς είναι δύσκολο να αποκτηθεί ιστός από το μυοκάρδιο, για μελέτες πάνω σε ανθρώπους, έχει εκτιμηθεί το μήκος των τελομερών στα λευκοκύτταρα. Το μήκος των τελομερών των λευκοκυττάρων σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια είναι βραχύτερο από της αντίστοιχους υγιείς [86].

2.8 Παρενέργειες στους δείκτες οξειδωτικού στρες

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών ουσιών και της αντιρροπιστικής δράσης των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού υπέρ των πρώτων, μια κατάσταση που μπορεί δυνητικά να προκαλέσει βλάβη των ιστών. Πιο συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει από υπέρμετρη άθροιση οξειδωτικών ουσιών, ανεπάρκεια των οξειδωτικών συστημάτων ή και τα δύο [91].

Οι κυριότερες οξειδωτικές ουσίες που παράγονται είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι δραστικές μορφές αζώτου (Nitrogen reactive Oxygen Species), γνωστές ως ελεύθερες ρίζες. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), η ρίζα του υπεροξειδίου του οξυγόνου ($O_2^{\cdot-}$), το υδροξύλιο (OH^{\cdot}) και το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}) αποτελούν τις σημαντικότερες οξειδωτικές ουσίες. Ενώ οι ROS παράγονται σε φυσιολογικές συνθήκες ως παραπροϊόντα του αερόβιου κυτταρικού μεταβολισμού, παράγοντες όπως η ακτινοβολία, η ρύπανση, το κάπνισμα, η έκθεση σε χημικά, η φλεγμονή, η άσκηση ευνοούν τη δημιουργία της. Ο ανθρώπινος οργανισμός ανέπτυξε συστήματα που ανταγωνίζονται τη δράση των οξειδωτικών ουσιών, ώστε να διατηρηθεί η προστασία του από την οξειδωτή βλάβη. Τα αντιοξειδωτικά αυτά συστήματα δρουν μειώνοντας την αναγέννηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και μπορεί να είναι ενζυμικά ή μη. Στα πρώτα ανήκουν η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), που μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε νερό (H_2O) από την καταλάση. Ακόμα, η περιέχουσα σελήνιο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px), που αντιδρά με τις λιπιδικές υπεροξειδάσες. Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα ανήκουν η γλουταθειόνη (GSH) η οποία αντιδρά με H_2O_2 , το OH^{\cdot} και τις χλωριωμένες οξειδωτικές ουσίες, η φερριτίνη, η τρανσφερρίνη, η σερουλοπλασμίνη, ακόμα και η λευκωματίνη. Εξωγενείς ουσίες, όπως οι βιταμίνες A, C και E, ο χαλκός και το σελήνιο αποτελούν τις σημαντικές μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες.

Ο προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες γίνεται με τη βοήθεια δεικτών που αποτελούν ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα αντιδράσεων των ROS με τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες και το DNA. Το χαρακτηριστικό των δεικτών αυτών είναι ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής, από ώρες έως εβδομάδες, σε σχέση με τις ROS. Αλδεΐδες όπως η ακρολεΐνη, η μαλονυλοδιαλδεΐδη (MDA), η 4hydroxynonenal, και οι δραστικές μορφές του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), προκύπτουν από αλυσιδωτές αντιδράσεις, που ακολουθούν την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Τα F2-ισοπροστάνια προέρχονται από την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος, ενώ χρήσιμους δείκτες οξειδωτικού στρες μπορεί να αποτελέσουν τα τελικά προϊόντα οξείδωσης των λιπιδίων (ALEs) και τα αντισώματα κατά των οξειδωμένων χαμηλής πυκνότητας

τητας λιποπρωτεϊνών (anti-ox-LDLs). Η οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και προϊόντων ανθεκτικών στην πρωτεόλυση, όπως τα πρωτεϊνικά προϊόντα προκεχωρημένης οξειδωσης (AOPPs), κατ' αναλογία με τα τελικά προϊόντα προκεχωρημένης γλυκοτελικής οξειδωσης (AGEs). Η οξειδωτική βλάβη στο DNA μπορεί να προσδιοριστεί με μέτρηση των τροποποιημένων βάσεων. Η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνη (8-OHdG) αποτελεί τον συχνότερα χρησιμοποιούμενο δείκτη της οξειδωτικής βλάβης στο γενετικό υλικό καθώς εκκρίνεται στα ούρα.

Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα εξαρτάται από το είδος των οξειδωτικών ουσιών, την ένταση του οξειδωτικού στρες, τη διάρκεια της δράσης του, το είδος των κυττάρων που παρουσιάζουν αυτήν την ανισορροπία αλλά και τα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη δράση των ελεύθερων ριζών και των δραστικών μεταβολιτών της. Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται στα μακρομόρια, με καταστροφικές συνέπειες τόσο για τα κύτταρα όσο για τον ίδιο τον οργανισμό συνολικά. Παραδείγματα της οξειδωτικής βλάβης που παρατηρείται στα λιποειδή, τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και στο DNA είναι η δυσλειτουργία των μεμβρανών, η τροποποίηση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών με συνέπεια την απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας, διάσπαση των κλώνων DNA και η τροποποίηση των βάσεων του.

Η καρδιά αποτελεί το όργανο που επηρεάζεται περισσότερο από τη χορήγηση εξωγενών αναβολικών. Το οξειδωτικό στρες συνδέεται στην παθογένεια της καρδιακής ανεπάρκειας. Προκαλεί βλάβη ή απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και εμπλέκεται στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης, μέσω πληθώρας μηχανισμών και ειδικά αυτών που σχετίζονται με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Μια από τις πιο σημαντικές αγγειοδραστικές ουσίες που απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO). Το ενδοθηλιακό NO έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιαθηρογόνες ιδιότητες και αγγειοδιασταλτική δράση, καθώς αναστέλλει τη φλεγμονή, τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και το πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [92, 93]. Το αγγειακό οξειδωτικό στρες με αυξημένη παραγωγή ROS συνεισφέρει στους μηχανισμούς της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η αυξημένη συγκέντρωση ROS οδηγεί μέσω χημικής απενεργοποίησης στη μείωση της ποσότητας του βιοδιαθέσιμου NO με αποτέλεσμα το σχηματισμό του τοξικού νιτρικού υπεροξειδίου.

Η ομάδα της Skogastierna [94] έδειξε πως η χορήγηση υπερβολικής δόσης τεστοστερόνης σε υγιείς εθελοντές οδήγησε στην αναστολή της παραγωγής NO στα ούρα εντός 48ώρου μετά τη χορήγηση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η χορήγηση μιας μόνο δόσης τεστοστερόνης μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της παραγωγής NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς το NO στα ούρα λειτουργεί ως δείκτη της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι υπερβολικές

δόσεις τεστοστερόνης μπορούν να προκαλέσουν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, γεγονός που σχετίζεται με τις καρδιαγγειακές παρενέργειες που παρατηρούνται στους χρήστες ΑΑΣ.

Επιπρόσθετα, στοιχεία που να συνδέουν τις παρενέργειες των ΑΑΣ στους νεφρούς και τη νεφρική λειτουργία είναι σποραδικά και κυρίως προέρχονται από κλινικές αναφορές χρηστών με παρατεταμένη και υπερβολική κατάχρηση [77-80,85]. Είναι γνωστό πως μετά από χορήγηση φαρμάκων με τοξική δράση στα ζώα οι νεφροί είναι επιρρεπείς σε οξειδωτικές βλάβες [95]. Πειραματικές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι τόσο η νανδρολόνη όσο και η έντονη άσκηση αυξάνουν την έκταση της νεφρικής βλάβης ως απάντηση σε τοξικό νεφρικό τραυματισμό. Η κατάχρηση της μπολντενόνης μπορεί να καθορίσει την εμφάνιση μιας χρόνιας νεφρικής βλάβης, όπως η μείωση της μάζας του σπειράματος που μπορεί να οδηγήσει σε σταδιακή νεφρική ανεπάρκεια [92].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο-ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

Εισαγωγή στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς

Η χρωματογραφία εφευρέθηκε από το Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett στις αρχές του εικοστού αιώνα. Χρησιμοποίησε την τεχνική αυτή για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες και οι ξανθοφύλλες, με διαβίβαση διαλύματός της μέσω υάλινου σωλήνα, ο οποίος ήταν γεμάτος με εξαιρετικά λεπτό ανθρακικό ασβέστιο. Οι διαχωριζόμενες ουσίες εμφανίζονταν ως χρωματιστές ζώνες στη στήλη και αυτός ήταν ο λόγος για τον οποίο ο Tswett επέλεξε (από την ελληνική γλώσσα) το χαρακτηριστικό αυτό όνομα για την τεχνική.

Οι εφαρμογές της χρωματογραφίας αυξήθηκαν με εκρηκτικό ρυθμό κατά τα τελευταία πενήντα χρόνια και αυτό δεν οφείλεται μόνο στην ανάπτυξη νέων τύπων χρωματογραφικών τεχνικών, αλλά και στη συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση από τους επιστήμονες καλύτερων μεθόδων για το χαρακτηρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Η τεράστια απήχηση των μεθόδων αυτών αποδεικνύεται και από το ότι το βραβείο Nobel Χημείας του έτους 1952 δόθηκε της A.J.P. Martin και R.L. Synge για τις ανακαλύψεις τους στο πεδίο της χρωματογραφίας. Ίσως περισσότερο εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι 12 βραβεία Nobel, από το 1937 έως το 1972, δόθηκαν σε επιστήμονες των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε σημαντικό βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους [95].

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει σειρά μεθόδων διαχωρισμού μειγμάτων ανόργανων ή οργανικών ή οργανομεταλλικών ουσιών, που βασίζονται στις διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις, τη στατική φάση, που αποτελείται από ένα ακίνητο στρώμα μεγάλου εμβαδού επιφάνειας και την κινητή φάση, ένα ρευστό, που κινείται δια μέσου και κατά μήκος της στατικής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στο σημείο ή κοντά στο σημείο, όπου συμβαίνει η πρώτη επαφή των δύο φάσεων. Τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται, στη συνέχεια, κατά μήκος της διαδρομής της κινητής φάσης, με διάφορη ταχύτητα, που εξαρτάται από τις σχετικές συγγένειες των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, όπου στη συνέχεια τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά [95, 96].

Οι παρατηρούμενες διαφορές φυσικοχημικής συγγένειας στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς είναι δυνατόν να οφείλονται, κυρίως, σε μηχανισμό προσρόφησης ή μηχανισμό κατανομής. Ο διαχωρισμός με προσρόφηση βασίζεται στην προσκόλληση μιας ουσίας πάνω στην επιφάνεια του στερεού με δυνάμεις μοριακής

φύσεως. Ο διαχωρισμός με κατανομή βασίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα της ουσίας στις δύο φάσεις με αποτέλεσμα η ουσία να κατανέμεται διαφοροτρόπως στις δυο φάσεις.

3.1 Υγροχρωματογραφία

3.1.1 Γενικά- Αρχή μεθόδου

Στην υγροχρωματογραφία η κινητή φάση είναι υγρή και η στατική φάση είναι είτε ένα στερεό πορώδες υλικό είτε ένα υγρό προσροφημένο σε στερεό υπόστρωμα. Αρχικά η υγροχρωματογραφία πραγματοποιούνταν σε γυάλινες στήλες διαμέτρου 1-5 cm και μήκους 50-500 cm. Για την επίτευξη ικανοποιητικής ταχύτητας ροής, η διάμετρος των σωματιδίων της στερεάς φάσης ήταν συνήθως 150-250 μm. Συνεπώς, οι χρόνοι διαχωρισμού ήταν μεγάλοι και απόπειρες επιτάχυνσης με εφαρμογή κενού ή με άντληση δεν ήταν αποτελεσματικές. Κατά τη διάρκεια εξέλιξης της υγροχρωματογραφίας, έγινε αντιληπτό ότι η απόδοση της στήλης θα μπορούσε να βελτιωθεί με ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 αναπτύχθηκε η τεχνολογία παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με σωματίδια διαμέτρου 3-10 μm. Η τεχνολογία αυτή απαιτούσε εξελιγμένα όργανα, με δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλές πιέσεις, κάτι που ήταν δύσκολο να επιτευχθεί με τις απλές γυάλινες στήλες της κλασικής υγροχρωματογραφίας με βαρυτική ροή. Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί πλέον τη πιο διαδεδομένη από τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι για την ευρεία αποδοχή της τεχνικής αυτής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως η εφαρμογή της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, την κλινική πράξη και διάφορα ερευνητικά πεδία [95].

Για να επιτευχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής του υγρού έκλουσης όταν χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης αποτελούμενα από σωματίδια μεγέθους 2-10 μm, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις χιλιάδες psi. Ως συνέπεια των υψηλών αυτών πιέσεων, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη από την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας. Τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μια διάταξη HPLC είναι : α) δοχεία κινητής και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών, β) συστήματα έγχυσης δείγματος, γ) στήλες υγροχρωματογραφίας, δ) ανιχνευτής και ε) καταγραφικό σύστημα. Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής-κινητής φάσης χωρίζεται σε κανονικής φάσης, αν η στα-

τική φάση είναι πολική και η κινητή μη πολική και αντίστροφης φάσης αν η κινητή φάση είναι πολική και η στατική φάση μη πολική.

3.1.2 Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών (MS) αποτελεί μια από τις πλέον σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και παρουσιάζει ευρύ πεδίο εφαρμογής. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων και την αναλογία ισότοπων ατόμων σε δείγματα.

Η φασματομετρία μαζών αποτελεί μια τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού μιας ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μαζών. Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων στην αέρια φάση από ένα δείγμα (στερεό, υγρό ή αέριο) και στην ανάλυση αυτών με βάση το λόγο μάζα της ηλεκτρικό φορτίο (mass to charge ratio, m/z). Με τη χρήση κατάλληλου ανιχνευτή καταγράφεται το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως προς το λόγο m/z αποτελεί το φάσμα μαζών και είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία. Σε σύγκριση με τις αναλυτικές τεχνικές η φασματομετρία μαζών χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση [98].

Η χρήση της MS επεκτείνεται σε τομείς όπως η ατομική φυσική, η ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντολογικών ρύπων, η ιατροδικαστική επιστήμη, η μελέτη κινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων, η φαρμακευτική ανάλυση και η ανίχνευση και επιβεβαίωση της λήψης απαγορευμένων ουσιών από αθλητές κατά τον έλεγχο ντόπινγκ [96,98]. Μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει η χρησιμοποίηση όπως στους τομείς της γονιδιωματικής (genomics) και πρωτεωμικής (proteomics) [99, 100], στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων και στη διάγνωση ασθενειών και μεταβολικών νοσημάτων (metabolomics) [101].

Η MS αναπτύχθηκε ραγδαία κατά τη διάρκεια της δεκαετίας 1995-2005. Η πρόοδος αυτή οδήγησε στην κατασκευή ολοκληρωτικά νέων οργάνων. Αναπτύχθηκαν νέες πηγές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι υπάρχοντες αναλυτές τελειοποιήθηκαν και νέα υβριδικά όργανα δημιουργήθηκαν με πρωτότυπους συνδυασμούς αναλυτών για την εκπλήρωση των σημερινών αναλυτικών απαιτήσεων. Οι συνδυασμένες αναλυτικές τεχνικές (LC-MS, GC-MS) που αναπτύχθηκαν από τη σύζευξη της MS με χρωματογραφικές τεχνικές (LC και GC) αποτελούν πιο ευαίσθητες και ειδικές τεχνικές και χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον προσδιορισμό, ποιοτικό και ποσοτικό, συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

3.1.2.1 Οργανολογία

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα τμήματα:

- A) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος
- B) την πηγή ιόντων
- Γ) τον αναλυτή μαζών και
- Δ) τον ανιχνευτή.

Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσίασης των φασμάτων. Το υψηλό κενό εξασφαλίζει ότι τα παραγόμενα ιόντα φτάνουν στον ανιχνευτή χωρίς να αλληλεπιδρούν με άλλα αέρια μόρια, γεγονός που θα επέφερε είτε εκτροπή από την επιθυμητή τροχιά είτε περαιτέρω θραυσματοποίηση. Ακόμα, το υψηλό κενό προστατεύει την επιφάνεια της πηγής ιοντισμού, του αναλυτή και του ανιχνευτή από τη διάβρωση που μπορεί να επέλθει λόγω των ατμών, γεγονός που θα οδηγούσε στη μείωση της ικανότητας του φασματομέτρου να σχηματίζει, να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ιόντα [102]. Τα σύγχρονα φασματόμετρα μαζών περιλαμβάνουν ηλεκτρονικό υπολογιστή, τόσο για τον κεντρικό έλεγχο της λειτουργίας τους, όσο και για την ταχεία επεξεργασία, παρουσίαση και ερμηνεία του φάσματος.

Τα μόρια του υπό ανάλυση δείγματος πρέπει να ιοντιστούν ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση και η ανίχνευσή τους με φασματομετρία μαζών. Έχει αναπτυχθεί ποικιλία τεχνικών ιοντισμού και η επιλογή της εκάστοτε τεχνικής εξαρτάται από το ποσό της ενέργειας που μεταφέρεται κατά τη διαδικασία του ιοντισμού και της φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό ανάλυση ουσίας. Οι πηγές ιοντισμού χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τις πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources) όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και τις πηγές εκρόφησης (desorption sources) όπου το δείγμα σε στερεά ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται απ' ευθείας σε ιόντα στην αέρια φάση.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) και οι πηγές χημικού ιοντισμού (CI). Οι πηγές αυτές συνήθως περιορίζονται σε θερμικώς σταθερές ενώσεις, με σημεία ζέσεως μικρότερα από περίπου 500°C. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι πηγές ιοντισμού πεδίου (FI), εκρόφησης πεδίου (FD), ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), ιοντισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI), εκρόφησης πλάσματος (PD), βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB) και ιοντισμού με θερμοψεκασμό. Πλεονέκτημα των πηγών εκρόφησης αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής της σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα [96].

Στη συνέχεια, τα παραγόμενα ιόντα με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου επιταχύνονται και κατευθύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Η βασική λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι διαχωρισμός των ιόντων, που παράγονται στην πηγή, ανάλογα με τις

διαφορετικές τιμές των λόγων m/z . Ο διαχωρισμός είναι απαραίτητος, έτσι ώστε το μετρούμενο ρεύμα ιόντων στον ανιχνευτή ιόντων, που ακολουθεί τον αναλυτή μαζών, να αντιστοιχεί σε ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z . Οι αναλυτές διακρίνονται σε συνεχείς αναλυτές μαζών, και σε παλμικούς αναλυτές μαζών. Οι πρώτοι μεταφέρουν επιλεγμένο m/z προς τον ανιχνευτή και το φάσμα μαζών λαμβάνεται με σάρωση του αναλυτή οπότε ιόντα διαφορετικού m/z ανιχνεύονται σε κάθε χρονική στιγμή. Οι δε παλμικοί αναλυτές συλλέγουν ολόκληρο το φάσμα από παλμό ιόντων. Από αυτούς, ο τετραπολικός αναλυτής αποτελεί σήμερα τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο αναλυτή μαζών και ο διαχωρισμός των παραγόμενων ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z βασίζεται στη σταθερότητα της τροχιάς. Θεωρείται ιδανικός στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται συστήματα συνδυασμού χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών, λόγω του μικρού χρόνου λήψης της φάσματος μαζών.

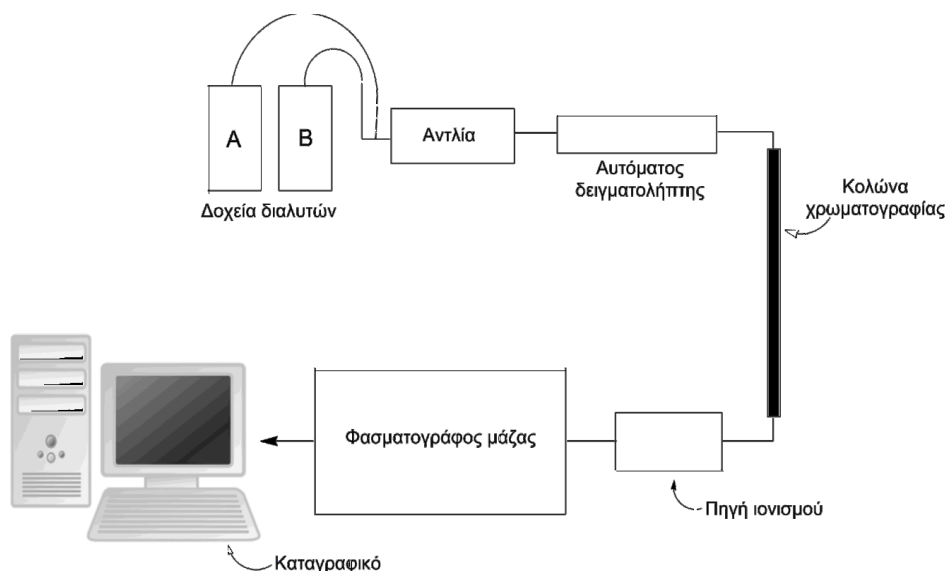
Στην εικόνα 5, απεικονίζεται η διάταξη του γραμμικού τετραπολικού αναλυτή. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους, που δρουν ως ηλεκτρόδια και είναι τοποθετημένες συμμετρικά ως προς τη δέσμη των διερχόμενων ιόντων. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με το θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις, που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με τον αναλυτή αυτόν, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα της ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον ανιχνευτή μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z . Με τα τετραπολικά όργανα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν κατά μια μονάδα μάζας.



Εικόνα 5: Γραμμικός τετραπολικός αναλυτής

3.1.2.2 Διασύνδεση της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών

Η υγροχρωματογραφία χρησιμοποιείται για μη πτητικές ουσίες και ουσίες που δεν μπορούν να αναλυθούν με αεριοχρωματογραφία. Αρχικά, η σύνδεση της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών ήταν ανεπιτυχής λόγω των υψηλών επιπέδων του διαλύτη στο έκλουσμα. Για την επίλυση του προβλήματος αυτού έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές όπως η απόθεση σε συνεχώς κινούμενο ιμάντα ή η διεπαφή δέσμης σωματιδίων (PB) που βασίζονται στην επιλεκτική απομάκρυνση του διαλύτη πριν την είσοδο του εκλούσματος στην πηγή. Οι τεχνικές όπως η άμεση εισαγωγή (DLI) ή με συνεχή ροή FAB (CF-FAB) βασίζονται στην μείωση της ροής του υγρού που εισάγεται στη διεπαφή ώστε αν ληφθεί μια ροή που να μπορεί να εισαχθεί κατευθείαν στην πηγή. Η κατάσταση άλλαξε με την ανάπτυξη πηγών ιόντων ατμοσφαιρικής πίεσης, όπως χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI), ο ηλεκτροψεκασμός (ESI), ο θερμοψεκασμός (TSP) και σε μικρότερο βαθμό ο φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APPI). Με τις τεχνικές αυτές μπορούν να επιτευχθούν ταχύτητες ροής περίπου 1 ml/min χωρίς να απαιτείται διαχωρισμός ροής. Στην εικόνα 6, παρουσιάζεται η απεικόνιση της τυπικού συστήματος LC-MS.



Εικόνα 6: Σύστημα LC/MS

Η αντλία και η στήλη πρέπει να επιλέγονται με βάση την πηγή που χρησιμοποιείται. Λόγω των διαφορετικών μηχανισμών ιονισμού, κάθε πηγή έχει το δικό της βέλτιστο ρυθμό ροής και πολικότητα διαλύτη. Η APCI έχει μεγαλύτερο ρυθμό ροής από την ESI και είναι συμβατή με μη πολικές κινητές φάσεις. Σήμερα, τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως και επιτρέπουν την εφαρμογή της φασματομετρίας μαζών σε τομείς όπως της βιολογίας και της βιοϊατρικής, που μόλις λίγα χρόνια πριν ήταν εκτός των ορίων εφαρμογής της.

3.2 Τα ούρα ως βιοδείκτης

Τα ούρα είναι το προτιμητέο βιολογικό υλικό στο οποίο πραγματοποιείται η ανάλυση των στεροειδών αναβολικών κατά τον έλεγχο ντόπινγκ. Αποτελεί ένα εύκολο και μη επεμβατικό ως προς τη συλλογή δείγμα. Τα ούρα, λόγω της ποσότητας τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εκτενείς αναλύσεις και να αποθηκευτούν για περαιτέρω εξέταση, αν κριθεί αναγκαίο. Ωστόσο, τα ούρα μπορούν εύκολα να νοθευτούν σε αντίθεση, με τα άλλα βιολογικά υλικά. Επιπρόσθετα, τα ούρα παρέχουν πληροφορίες για άμεση και πρόσφατη χρήση αναβολικών ουσιών [103].

Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για το screening των αναβολικών εστιάζουν κυρίως στους μεταβολίτες αυτών, οι οποίοι εκκρίνονται στα ούρα είτε ασύζευκτοι είτε συζευγμένοι με γλυκουρονικό οξύ. Ως αποτέλεσμα της σύζευξής τους με το γλυκουρονικό οξύ, είναι η αύξηση της πολικότητάς τους, γεγονός που οδηγεί στην ευκολότερη απέκκρισή τους στα ούρα. Κατά την προετοιμασία του δείγματος, αρχικά πραγματοποιείται υδρόλυση με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση. Η μεταφορά των αποσυζευγμένων στεροειδών από τα ούρα πραγματοποιείται είτε με

υγρή-υγρή εκχύλιση είτε με εκχύλιση στερεάς φάσης και ακολουθείται από φασματομετρική ανίχνευση είτε με υγρόχρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS) είτε με αεριοχρωματογραφία συνδεδεμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS). Για τον έλεγχο κρίσιμων σημείων της προετοιμασίας των δειγμάτων και για τον προσδιορισμό των ποσοτήτων των στεροειδών που εκκρίνονται, χρησιμοποιούνται ουσίες, συνήθως δευτεριωμένες, ως εσωτερικό πρότυπο [104,105].

Η αναλυτική στρατηγική θα πρέπει να διαθέτει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα σε πολύπλοκα δείγματα, σε ουσίες με μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων και μοριακών βαρών, περιορισμένο όγκο δείγματος, γρήγορη διαδικασία [106]. Η διάδοση των παράνομων ουσιών και πρακτικών, καθώς και η αυξανόμενη χρήση αυτών, υπογραμμίζει το πόσο σημαντική και απαιτητική είναι η ταυτόχρονη ανάπτυξη και εξέλιξη των αναλυτικών στρατηγικών. Ο έλεγχος ντόπινγκ αποτελεί μια συνεχή πρόκληση καθώς, η ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ουσίες με γνωστή δομή ενώ ουσίες που παρουσιάζουν παρόμοια δράση και έχουν τροποποιηθεί δομικά, δε μπορούν να αναλυθούν. Επιπλέον, η συγκέντρωση των ουσιών είναι χαμηλότερη από τα όρια ανίχνευσης των αναλυτικών μεθόδων όπως επίσης η διαφοροποίηση μεταξύ ενδογενών και εξωγενών ουσιών παραμένει δύσκολη [107].

Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα εντός των ατόμων, όσο αναφορά στο μεταβολισμό καθώς τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτόν, υπόκεινται διακυμάνσεις στη δραστηριότητα τους καθώς και γενετικούς πολυμορφισμούς. Ως εκ τούτου, το αρχικό βιολογικό δείγμα και το μοντέλο έκκρισης πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά ώστε να εξασφαλιστεί η ορθή επιλογή των ουσιών που στοχεύουν στον έλεγχο ντόπινγκ. Για παράδειγμα, οι συζευγμένοι μεταβολίτες εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες στα ούρα, αλλά ανακτώνται σε πολύ μικρές ποσότητες από δείγματα αίματος [106].

3.3 Η τρίχα ως βιοδείκτης

Η δυνατότητα προσδιορισμού φαρμακευτικών προϊόντων, ναρκωτικών, βαρέων μετάλλων και άλλων τοξικών ουσιών στην τρίχα έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον. Οι ουσίες που εναποτίθενται στην τρίχα παραμένουν αναλλοίωτες για μεγάλο χρονικό διάστημα, ανοίγοντας έτσι ένα ευρύτερο παράθυρο ανίχνευσης συγκριτικά με αυτό που λαμβάνεται από τις αναλύσεις ουσιών στο αίμα ή στα ούρα [103, 108-109]. Η ανάλυση της τρίχας αποτελεί πλέον ένα εργαλείο για την ανίχνευση ξενοβιοτικών ουσιών σε διάφορους τομείς όπως η εγκληματολογία, η κλινική τοξικολογία, στη θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκων, στον έλεγχο λήψης φαρμάκων στο χώρο εργασίας.

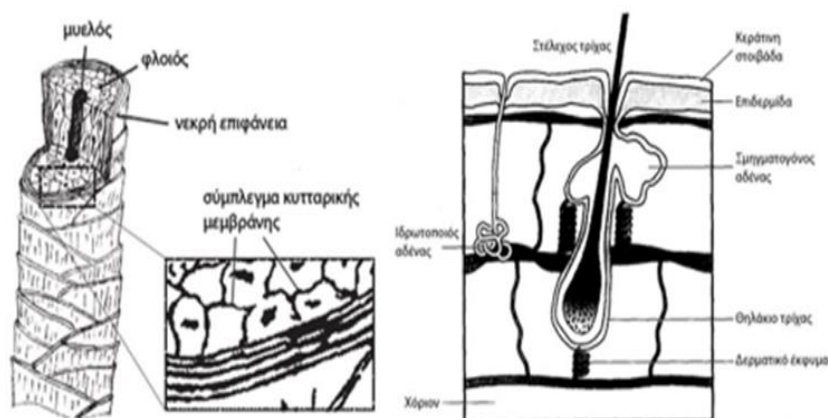
Η ανάλυση της τρίχας παρ' ότι αναγνωρίζεται και είναι αποδεκτή σε δικαστικές υποθέσεις σε πολλές χώρες, δεν έχει ακόμα υιοθετηθεί από τη Διεθνή Ολυμπιακή Επιτροπή ή τη W.A.D.A ως μια εναλλακτική του ελέγχου ντόπινγκ στα ούρα. Η ανάλυση ξενοβιοτικών ουσιών στην τρίχα, και συγκεκριμένα ουσιών που σχετίζονται με το ντόπινγκ παρέχει πληροφορίες για τη μακροπρόθεσμη χρήση τους, χρόνια ή μη, και υπερτερεί έτσι, έναντι της ανάλυσης των ούρων καθώς τα τελευταία παρέχουν πληροφορίες για πρόσφατη μόνο χρήση. Η μεγαλύτερη αξία της ανάλυσης στην τρίχα φαίνεται από το γεγονός ότι μπορεί να εντοπίσει τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που οφείλονται στη διακοπή της λήψης των ουσιών λίγες ημέρες πριν τον έλεγχο ντόπινγκ. Ακόμη, η τμηματική ανάλυση της τρίχας μπορεί να υποδείξει το ιστορικό και τη συχνότητα της κατάχρησης ουσιών σε αντίθεση, με μια ανάλυση ούρων. Έτσι, με την ανάλυση της τρίχας είναι εφικτή η διαπίστωση της παρουσίας ντόπινγκ κατά την προπονητική περίοδο και της διακοπής λίγο διάστημα πριν τον έλεγχο [110, 111]. Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της ανάλυσης στην τρίχα αποτελεί το γεγονός ότι είναι πιθανή η διάκριση μεταξύ της νανδρολόνης και των 19-νοροστεροειδών, καθώς στην τρίχα μπορεί να γίνει ταυτοποίηση της μητρικής ουσίας. Σε αντίθεση με τα ούρα, όπου οι μεταβολίτες των ουσιών αυτών είναι ίδιοι και επομένως, δε δύναται να γίνει η αναγνώριση της μητρικής ουσίας [111]. Επιπλέον, η δειγματοληψία για την ανάλυση της τρίχας είναι μια απλή, εύκολη και μη επεμβατική διαδικασία και ακόμα παρέχει τη δυνατότητα απόκτησης πολλών διαφορετικών δειγμάτων, σε αντίθεση με τη δειγματοληψία αίματος και ούρων. Τα δείγματα της τρίχας μπορούν να αποθηκευτούν ή να μεταφερθούν, χωρίς την ανάγκη ψύξης, ή ελέγχου pH και προσθήκης συντηρητικών [103].

Η τρίχα αποτελείται από πρωτεΐνες (65-95%, κυρίως κερατίνη), νερό (15-35%), λιπίδια (1-9%) και ιχνοστοιχεία (<1%). Ο ρυθμός ανάπτυξης της τρίχας είναι περίπου 0,35 mm/ ημέρα ή 1-1,5 cm ανάλογα την ανατομική περιοχή, φύλο, ηλικία, φυλή του ατόμου. Η τρίχα της κεφαλής μεγαλώνει περίπου 1cm/μήνα. Θεωρητικά, είναι πιθανό ότι, οι ουσίες που εναποτίθενται στην τρίχα μέσω των κυττάρων που βρίσκονται στους θύλακες των τριχών, εμφανίζονται 3cm μακριά από το δέρμα της κεφαλής, μετά την πάροδο 3 μηνών από την κατανάλωση τους [103].

Η τρίχα αποτελείται από κυλινδρικές δομές ή στελέχη. Τα στελέχη δημιουργούνται από συμπιεσμένα κύτταρα που παράγονται από δομές που λέγονται θυλάκια. Η τρίχα αποτελείται από τρία διαφορετικά στρώματα κυττάρων. Ο εσωτερικός πυρήνας, καλείται μυελώδης ουσία (medulla) και τα κύτταρα αυτής πακετάρονται χαλαρά και σταδιακά αφυδατώνονται αφήνοντας στη θέση τους μια σειρά από κενοτόπια κατά μήκος του άξονα του στελέχους της τρίχας. Γύρω από τον μυελό, υπάρχει η

φλοιώδης ουσία (cortex). Η φλοιώδης ουσία αποτελεί το κύριο δομικό υλικό της τρίχας και δίνει τα χαρακτηριστικά της. Επιπλέον, στο φλοιό της τρίχας υπάρχει και η μελανίνη που δίνει το χρώμα της τρίχας. Τέλος, το εξωτερικό λεπτό περίβλημα της τρίχας (cuticle) που ρόλο έχει την πρόσδεση του στελέχους στα θυλάκια και την προστασία των εσωτερικών ινών.

Τα θυλάκια εντοπίζονται στο επιθήλιο της επιδερμίδας, 3-4 mm κάτω από την επιφάνεια του δέρματος. Το θυλάκιο αποτελείται από 3 λειτουργικές περιοχές: το κέντρο σύνθεσης των κυττάρων που δομούν την τρίχα, την περιοχή σκλήρυνσης και σταθεροποίησης της τρίχας με την προσθήκη κερατίνης και την περιοχή της μόνιμης τρίχας.



Εικόνα 7: Ανατομία τρίχας [112]

Τα θυλάκια βρίσκονται σε στενή επαφή με δυο τύπους αδένων, τον σημηματογόνο και τον αποκρινή. Η ανάπτυξη της τρίχας ξεκινά στη βάση του θυλακίου και πραγματοποιείται σε κύκλους που εναλλάσσονται ανάμεσα σε περιόδους ανάπτυξης (αναγενής φάση) και περιόδους ανάπαυσης (καταγενής και τελογενής φάση) [111,112].

Ενώ ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι ξενοβιοτικές ουσίες κατανέμονται στην τρίχα παραμένει άγνωστος, θεωρείται πως αυτές μπορούν να εναποτεθούν στην τρίχα από το αίμα μέσω παθητικής διάχυσης κατά το σχηματισμό της τρίχας, από τον ιδρώτα και το σμήγμα και τέλος, από το εξωτερικό περιβάλλον (Kintz, 2006). Ουσίες παρούσες στο αίμα μπορούν να μεταφερθούν στο θυλάκιο της τρίχας, και αν έχουν τη δυνατότητα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, θα παραμείνουν σχεδόν αναλλοίωτες στα κύτταρα του υποστρώματος του θυλακίου, καθώς δε συμμετέχουν σε αντιδράσεις βιομετατροπής ή διάχυσης. Οι συγκεντρώσεις των μητρικών ουσιών στην τρίχα γενικά υπερβαίνουν τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών ακόμα και όταν μητρικές ουσίες και μεταβολίτες αυτών, δεν είναι πλέον ανιχνεύσιμες στο αίμα ή στα ούρα [103].

ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απομόνωση, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός της τεστοστερόνης οδήγησε στην ανάπτυξη των αναβολικών στεροειδών τα οποία, εκτός της κλινικής τους εφαρμογής, κατέχουν ιδιαίτερη θέση στην αθλητική κοινότητα καθώς αποτελούν ένα μέσο βελτίωσης της απόδοσης και επίτευξης των επιθυμητών στόχων. Στις μέρες μας, η αυξανόμενη χρήση τους όχι μόνο από επαγγελματίες αλλά και από ερασιτέχνες αθλητές και άτομα που απλά επιθυμούν να βελτιώσουν την εξωτερική τους εμφάνιση καθιστά αναγκαία τη διερεύνηση των παρενεργειών τους στην υγεία του ανθρώπου.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί η δυσκολία διεξαγωγής μελετών που στοχεύουν στην εύρεση σχέσης μεταξύ της χρήσης των αναβολικών στεροειδών και των επιπτώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι αρχικά η διεξαγωγή μελέτης της δράσης υπερδοσολογιών αναβολικών στεροειδών σε υγιή άτομα αντιτίθεται στους κανόνες της βιοηθικής. Λόγω των κανόνων βιοηθικής, πολλές μελέτες επιλέγουν εθελοντές που προτιθενται ή μη να πάρουν αναβολικά στεροειδή. Η επιλογή αυτή αποκλείει τη δυνατότητα της τυχαιοποίησης και μπορεί να επηρεάσει την έκβαση της μελέτης, ως αποτέλεσμα προκατειλημμένης επιλογής. Επιπλέον, ο σχεδιασμός μιας τέτοιας μελέτης οφείλει να αντικατοπτρίσει τις πρακτικές που εφαρμόζουν οι αθλητές, όπως π.χ οι αθλητές έχουν την τάση να λαμβάνουν διαφορετικούς τύπους αναβολικών ταυτόχρονα και σε υψηλές δόσεις (stacking). Στις περισσότερες μελέτες, η διάρκεια και οι δόσεις που χρησιμοποιούνται είναι πολύ χαμηλότερες από τις καθημερινές πρακτικές στα γυμναστήρια και στην αθλητική κοινότητα. Ως αποτέλεσμα, οι μελέτες αυτές υπερεκτιμούν τις αληθινές επιπτώσεις, καθώς έχει καθιερωθεί η ύπαρξη σχέσης δόσης-απόκρισης. Πολύ σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι οι αναβολικές ουσίες είναι διαθέσιμες στη «μαύρη αγορά» και στο διαδίκτυο με συνέπεια να μην εξασφαλίζεται η ποιότητα τους και έτσι πολλές φορές να γίνεται υπερκατανάλωση αυτών με αναμφίβολα αποτελέσματα στην υγεία των χρηστών. Ακόμα, η γνώση που παρέχεται πάνω στο θέμα των παρενεργειών των αναβολικών ουσιών στηρίζεται κυρίως πάνω σε περιπτώσιολογικές μελέτες (case reports), η αξιοπιστία των οποίων ελέγχεται και μπορεί να αμφισβητηθεί [17].

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της *in-vivo* τοξικότητας, τόσο μακροσκοπικά όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, του αναβολικού στεροειδούς, νανδρολόνης στο καρδιαγγειακό σύστημα πειραματόζωων μετά από παρατεταμένη χορήγηση. Πιο συγκεκριμένα, χορηγήθηκε ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος ενέσιμος εστέρας της νανδρολόνης, ο δεκανοϊκός (nandrolone decanoate). Στη συνέχεια, στην προσπάθεια να προσομοιωθεί το πειραματικό μοντέλο με τις πρακτικές που εφαρμόζουν οι αθλητές, μελετήθηκε η αντιστρεψιμότητα ή μη των τυχόν παρενεργειών της αναβολικής ουσίας μετά από χρονικό διάστημα αποτοξίνωσης

(wash-out period, 4 μήνες). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε υπερηχογραφικός έλεγχος της καρδιάς καθώς και ιστολογικός έλεγχος, του καρδιακού ιστού των πειραματόζων. Επιπλέον, μετρήθηκε η ενεργότητα της τελομεράσης στα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος και στον καρδιακό ιστό, όπως επίσης μετρήθηκαν βιοχημικοί δείκτες που σχετίζονται με την καρδιαγγειακή λειτουργία και με το οξειδωτικού στρες. Επιπρόσθετα, αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της μητρικής ουσίας, αλλά και των μεταβολιτών της σε βιολογικά δείγματα (ούρα, τρίχα) προερχόμενα από τα πειραματόζωα.

Παράλληλα, με τη μελέτη της πιθανής τοξικής δράσης της νανδρολόνης στην καρδιά, πραγματοποιήθηκε η αντίστοιχη μελέτη στους νεφρούς καθώς η βιβλιογραφία πάνω στις παρενέργειες των αναβολικών στεροειδών είναι ιδιαίτερα μικρή. Για το σκοπό αυτό, έγινε ιστολογική εκτίμηση των νεφρών, μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης στους νεφρούς, μέτρηση οξειδωτικού στρες στους νεφρούς και μέτρηση βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με τη λειτουργία των νεφρών.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - *In-vivo* μελέτη της παρατεταμένης χορήγησης
νανδρολόνης σε πειραματόζωα**

4.1 Σχεδιασμός και υλοποίηση της *in-vivo* μελέτης

Για τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν 14 αρσενικά κουνέλια, ηλικίας 3-4 μηνών και μέσου βάρους 3Kg το καθένα. Τα ζώα τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε ειδικά μεταλλικά κλουβιά στις ειδικές εγκαταστάσεις πειραματόζωων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ). Τα ζώα βρίσκονταν σε συνθήκες 12ωρου κύκλου ημέρας/νύκτας με μέση θερμοκρασία τους 25°C, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή (εμπορικά διαθέσιμες πελέτες) και πόσιμο νερό βρύσης. Μετά την εγκατάσταση των ζώων στο χώρο, αφήθηκαν 2 εβδομάδες να εγκλιματιστούν με συνεχή παρακολούθηση πριν ξεκινήσει η χορήγηση της νανδρολόνης.

Τα ζώα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες: μια ομάδα ελέγχου, μια ομάδα υψηλής δόσης ενδομυϊκά (HDIM), μια ομάδα χαμηλής δόσης ενδομυϊκά (LDIM) μια ομάδα υψηλής δόσης υποδόρια (HDSC). Στις ομάδες υψηλής δόσης χορηγούνταν 10mg/kg του δεκανοϊκού εστέρα της νανδρολόνης ενώ ομάδα χαμηλής δόσης χορηγούνταν 4mg/kg, δύο φορές την εβδομάδα. Οι κατάλληλες ποσότητες της αναβολικής ουσίας διαλύονταν σε φυσιολογικό ορό. Η χορήγηση διήρκεσε 6 μήνες. Η ομάδα ελέγχου λάμβανε ενδομυϊκά ποσότητα φυσιολογικού ορού ίση με την ποσότητα που δέχονταν τα υπόλοιπα ζώα. Οι διατροφικές συνήθειες, η φυσική αλλά και κλινική κατάσταση των ζώων παρακολουθούνταν καθημερινά. Δεν παρατηρήθηκε καμία ένδειξη είτε σύμπτωμα οξείας τοξικότητας από τις χορηγούμενες δόσεις της αναβολικής ουσίας.

Το πειραματικό σχήμα της χορήγησης της αναβολικής ουσίας σχεδιάστηκε ώστε να προσομοιώνει τη χρήση των αναβολικών ουσιών από τους αθλητές, όπως αυτή προκύπτει από δηλώσεις αυτών. Η πειραματική διαδικασία χωρίζεται σε δύο φάσεις, τη φάση χορήγησης (6 μήνες) και τη φάση αποτοξίνωσης (4 μήνες). Για την περίοδο της αποτοξίνωσης επιλέχθηκαν δυο ζώα από τις δύο ομάδες υψηλής δόσης. Πραγματοποιήθηκαν δύο υπερηχογραφικοί έλεγχοι της καρδιάς, ο ένας στο τέλος της περιόδου χορήγησης (6 μήνες) και ο άλλος στο τέλος της περιόδου αποτοξίνωσης (10 μήνες).

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Κτηνιατρική Υπηρεσία Ηρακλείου, την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Κρήτης και το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου και κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ακολουθήθηκαν όλοι οι κανόνες ασφάλειας και βιοηθικής που ορίζουν οι Εθνικοί και Διεθνείς φορείς σχετικά με τη φροντίδα και τη διαχείριση των πειραματόζωων.

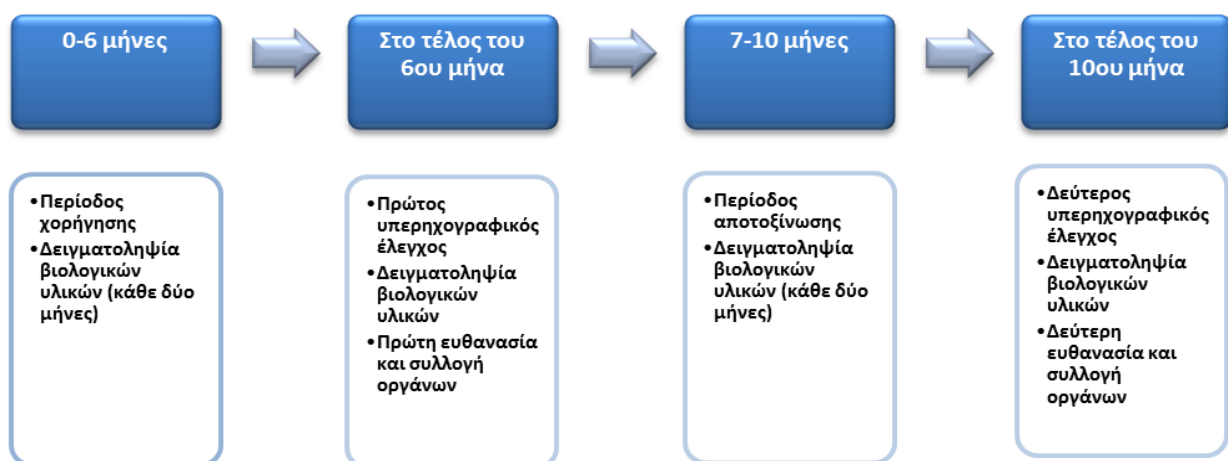
4.1.1 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας βιολογικών δειγμάτων

Η δειγματοληψία των βιολογικών υλικών (αίμα, ούρα, τρίχα) από κάθε ζώο αρχικά, πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της χορήγησης της αναβολικής ουσίας και έπειτα, κάθε 2 μήνες μετά την έναρξη της χορήγησης (0,2, 4, 6 μήνες) . Επιπλέον, δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο διάστημα της αποτοξίνωσης (στο 2^ο μήνα και στο τέλος της περιόδου αποτοξίνωσης) (Σχήμα 8).

Τα δείγματα ούρων συλλέχθηκαν από το ειδικό μεταλλικό δίσκο που βρίσκονταν τοποθετημένος κάτω από το μεταλλικό κλουβί κάθε ζώου, και κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε ούρα του προηγούμενου 24ώρου. Τα δείγματα ούρων μεταφέρονταν σε ειδικό πλαστικό δοχείο (Urobox) και φυλάσσονταν στους -20°C.

Για την παραλαβή αρκετής ποσότητας τρίχας για την επακόλουθη ανάλυση, η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κάθε φορά σε δύο περιοχές του ζώου (λαιμός και πλάτη) και αναμιγνύονταν. Η τρίχα λαμβάνονταν με ψαλίδι όσο το δυνατό πιο κοντά από το δέρμα του ζώου. Οι τρίχες κάθε φορά φυλάσσονταν σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκιερό και ξηρό μέρος αφού πρώτα, είχαν τοποθετεί σε αλουμινοχαρτο και σφραγιστεί σε φάκελο με κατάλληλη σήμανση.

Η δειγματοληψία αίματος πραγματοποιούνταν από την ωτική φλέβα (vena auricularis) και το αίμα, ανάλογα της ανάλυσης που προορίζονταν, φυλάσσονταν σε κατάλληλο σωληνάκι με αντιπηκτικό ή μη. Αφού γινόταν η φυγοκέντρηση, ο όρος φυλάσσονταν στους -18°C.



Σχήμα 8: Διάγραμμα πειραματικής πορείας

4.1.2 Πρωτόκολλο θανάτωσης πειραματόζων

Στο τέλος της περιόδου χορήγησης και της περιόδου αποτοξίνωσης πραγματοποιήθηκε ευθανασία των πειραματόζων, κατά τη διάρκεια της οποίας έγιναν διάφορες δειγματοληψίες. Τα πειραματόζα αρχικά, αναισθητοποιήθηκαν με υποδόρια χορήγηση διαλύματος ξυλαζίνης : κεταμίνης (σκευάσματα Rompun και Imalgene) σε αναλογία όγκων 2:1. Ενώ, τα πειραματόζα βρίσκονταν υπό μερική αναισθησία, έγινε η δειγματοληψία αίματος και τρίχας.

Στη συνέχεια, η θανάτωση των ζώων πραγματοποιήθηκε με χορήγηση πεντοβαρβιτάλης στην καρδιά (εμπορικό διάλυμα Dolethal, αντιστοιχία όγκου 5ml για ζώα μέχρι 5Kg). Κατά τη διάρκεια της νεκροτομής-νεκροψίας έγιναν μετρήσεις του βάρους των οργάνων (καρδιά, ήπαρ, αριστερός και δεξιός πνεύμονας, αριστερός και δεξιός νεφρός) κάθε πειραματόζου και ταυτόχρονα, σημειώθηκαν οι πιθανές μακροσκοπικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν από τον ειδικό χειρουργό. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται το μέσο βάρος σώματος, το μέσο βάρος της καρδιάς και των νεφρών ανά ομάδα ζώων, καθώς επίσης ο λόγος του μέσου βάρους της καρδιάς προς το συνολικό βάρος (Πίνακας 6) και ο αντίστοιχος λόγος για τους νεφρούς (Πίνακας 7). Οι λόγοι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη ύπαρξης υπερτροφίας.

Πίνακας 6: Μέσο βάρος ζώων ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης, μέσο βάρος καρδιάς ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης και λόγος αυτών

	Control Group	Administration period			Wash-out period	
		LDIM	HDIM	HDSC	HDIM	HDSC
Body weight (g)	4025±35	4050±70	4050±70	3950±71	5100±566	4800±120
Heart weight (g)	8.40±0.14	7.90±0.10	8.75±0.14	8.70±1.27	11.4±1.6	10.1±0.5
Heart Weight/Body Weight ratio x1000	2.00±0.05	1.95±0.05	2.15±0.05	2.20±0.03	2.5±0.7	2.20±0.10

Πίνακας 7: Μέσο βάρος ζώων ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης, μέσο βάρος νεφρών ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης και λόγος αυτών

	Control Group	Administration period			Wash-out period	
		LDIM	HDIM	HDSC	HDIM	HDSC
Body weight (g)	4025±35	4050±70	4050±70	3950±71	5100±566	4800±120
Kidney weight(g)	12.6±0.1	10.8±2.0	11.1±0.6*	10.8±0.9*	12.2±0.5	10.2±0.1*
Kidney Weight/Body Weight ratio x1000	3.1±0.04	2.7±0.55	2.7±0.12*	2.7±0.20	2.4±0.25*	2.1±0.23*

*: Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, $p < 0,05$

4.2 Ανάπτυξη και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση νανδρολόνης και των μεταβολιτών της σε ούρα και τρίχα πειραματόζων

4.2.1 Αντιδραστήρια

- ❖ Μεθανόλη (Fluka)
- ❖ Φορμικό οξύ (Riedel de Haën)
- ❖ Νανδρολόνη (Sigma-Aldrich)
- ❖ 19-νορετιοχολανολόνη (19-NE) και 19-νορανδροστερόνη (19-NA), μεταβολίτες της νανδρολόνης (LGC Standards).
- ❖ Turinabol (LGC Standards)
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 6.8)
- ❖ Ενζυμικό διάλυμα β-γλυκουρονιδάσης από *Helix Pomatia* (Sigma)
- ❖ Στερεό μίγμα $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$, αναλογίας 10:1 (Merck)
- ❖ Οξικός αιθυλεστέρας (Merck)

4.2.2 Πρότυπα διαλύματα εργασίας

Παρασκευάστηκαν μεθανολικά, πρότυπα διαλύματα της νανδρολόνης και των μεταβολιτών της (νορετιοχολανολόνη και νορανδροστερόνη) καθώς επίσης και του εσωτερικού προτύπου (turinabol) σε συγκέντρωση 1000 ppm. Στη συνέχεια, από αυτά παρασκευάστηκαν πρότυπα πολυσυστατικά διαλύματα 1, 10 και 100 ppm. Από το τελευταίο πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες αραιώσεις, έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 100, 250, 500 και 1000 ng/ml. Τα διαλύματα αποθηκεύονταν στην κατάψυξη, σε θερμοκρασία -20°C . Τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία και των δειγμάτων ούρων και των δειγμάτων τρίχας.

4.2.3 Υλικά-Εργαστηριακές συσκευές

- ❖ Αυτόματες πιπέτες τύπου Finnpiquette-Labsystems 5-40 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL και 1-5 mL
- ❖ Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- ❖ Φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα χωρητικότητας 2 mL, διαφανή
- ❖ Micro-insert, χωρητικότητας 0,1 mL, διαφανή με κωνικό πυθμένα
- ❖ Πλαστικά ρύγχη αυτόματων πιπετών
- ❖ Φίλτρα μέγεθος πόρων 0,20 μm (Sarstedt)
- ❖ Κλίβανος (Mettmert, μοντέλο 4000)

- ❖ Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4^{ου} δεκαδικού ψηφίου (AND, μοντέλο ER-120A) και μέγιστου βάρους ζύγισης 120g
- ❖ Αυτόματος αναδευτήρας τύπου Vortex (Velp scientific, μοντέλο Zx3)
- ❖ Ανακινήτης (μοντέλο RFL 3260)
- ❖ Υδατόλουτρο υπερήχων (Branson, μοντέλο 3510).
- ❖ Φυγόκεντρος (Hettich zentrifugen, μοντέλο Rotofix 32A)
- ❖ Συσκευή εξάτμισης, η οποία αποτελείται από το σύστημα του διανεμητή αέριου αζώτου και του μεταλλόλουτρου. Τα μεταλλόλουτρα είναι τύπου TECHNE DRI-BLOCK DB-3A, με θερμαντική πλάκα που φέρει οπές κατάλληλες για τη υποδοχή των σωλήνων και χρησιμοποιείται για την εξάτμιση της οργανικής φάσης.

4.2.4 Οργανολογία

Υγροχρωματογράφος συζευγμένος με ένα φασματομέτρο μαζών Shimadzu (μοντέλο LC-MS 2010 EV) με αυτόματο δειγματολήπτη και λογισμικό LC Solution.

Παράμετροι υγροχρωματογράφου

Στήλη: Discovery HS C18 (25cm x 4.6cm x 5μm) της εταιρείας Supelco

Κινητή φάση: A: φορμικό οξύ 0,1% (aq), B: μεθανόλη,

Φούρνος: 30°C

Ροή: 0,6ml / min

Πρόγραμμα ροής:

Από το 0' μέχρι τα 15', η ροή της κινητής φάσης B ξεκινούσε από 30% και έφτανε, σταδιακά, σε 90%, ενώ στα 15' περίπου, η ροή της κινητής φάσης B έπεφτε απότομα στο 30% και διατηρούνταν στο ποσοστό αυτό μέχρι τα 20'.

Παράμετροι φασματομέτρου μαζών

Ιονισμός: χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI)

Μέθοδος καταγραφής (acquisition mode): Καταγραφή επιλεγμένων ιόντων (SIM)

Πίνακας 8: Χρόνοι ανάσχεσης και ιόντα των υπό προσδιορισμό ουσιών

Ουσίες	Rt	m/z
Νανδρολόνη	14.93	275.15 / 307.25
19-NE	16.13	259.25 / 241.10
19-NA	16.33	259.15 / 277.15
Turinabol	15.73	317.25 / 335.25

4.2.5 Παρασκευαστικά στάδια για την ανάλυση δειγμάτων ούρων

Προετοιμασία δειγμάτων ούρων

Πριν την έναρξη της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα όλων των δειγμάτων ούρων, με τη βοήθεια φίλτρων διαμέτρου 0,20μm. Τα στάδια προετοιμασίας των δειγμάτων ούρων περιλαμβάνουν 3 στάδια: υδρόλυση, εκχύλιση και ανασύσταση.

Παρασκευή «φορτισμένων» δειγμάτων (spiked)

Για την παρασκευή των «φορτισμένων» δειγμάτων (spiked), χρησιμοποιούνται ούρα (2ml), ελεύθερα από αναβολικές ουσίες (blank), στα οποία εμβολιάζεται ποσότητα από το πρότυπο πολυσυστατικό διάλυμα αναβολικών 5 ppm, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι 0, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml

Υδρόλυση

- Μεταφορά 2.0 ml από δείγμα ούρων σε επισημασμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθήκη 50μl πρότυπου διαλύματος turinabol 1 ppm.
- Προσθήκη 1.0 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH = 6.8).
- Προσθήκη 40μl ενζυμικού διαλύματος β-γλυκουρονιδάσης από Helix Pomatia.
- Μεταφορά του δείγματος στο φούρνο και παραμονή για 1.5h σε θερμοκρασία 50°C.

Εκχύλιση

- Επαναφορά του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη ~2g στερεού μίγματος NaHCO_3 : Na_2CO_3 10:1 w/w, vortex κι έλεγχο του pH (με πεχαμετρικό χαρτί), ώστε να βρίσκεται εντός της περιοχής 9-10. Απαιτείται υψηλό pH για να λειτουργήσει το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση.
- Προσθήκη 2.0 ml οξικού αιθυλεστέρα (ethyl acetate).
- Ανάδευση στον ανακινητήρα για 10min.
- Ισοβάρυνση των σωλήνων και φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 10 min.
- Μεταφορά της οργανικής φάσης σε καθαρό, επισημασμένο σωλήνα.
- Εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού.

Ανασύσταση

- Προσθήκη 100μl μεθανόλης και ανάδευση με το σύστημα vortex.
- Μεταφορά του διαλύματος σε vial 2.0 ml για ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

4.2.6 Παρασκευαστικά στάδια για την ανάλυση δειγμάτων τρίχας

Προετοιμασία δειγμάτων τρίχας

Από κάθε δείγμα, ζυγίστηκαν, 100 mg τρίχας, τα οποία ξεπλύθηκαν αρχικά, με νερό (milli Q water) (3 εκπλύσεις) και στη συνέχεια, με μεθανόλη (3 εκπλύσεις). Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο φούρνο, στους 50°C, προκειμένου να στεγνώσουν πλήρως. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν εξωτερικές επιμολύνσεις των δειγμάτων.

Παρασκευή «φορτισμένων» δειγμάτων τρίχας (spiked)

Για την παρασκευή των «φορτισμένων» δειγμάτων (spiked), χρησιμοποιούνται τρίχες, ελεύθερες από αναβολικές ουσίες (blank), στις οποίες εμβολιάζεται ποσότητα από το πρότυπο πολυσυστατικό διάλυμα αναβολικών 0.5 ppm, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι 0, 50, 100, 250, 500 και 1000 pg/mg.

Εκχύλιση δειγμάτων

- Μεταφορά των 100 mg από δείγμα τρίχας σε επισημασμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Προσθήκη 50 μl πρότυπου διαλύματος turinabol 1 ppm.
- Προσθήκη 2 ml μεθανόλης.
- Τοποθέτηση του δείγματος στους υπερήχους για 3h.
- Συλλογή μεθανολικής φάσης σε νέο, επισημασμένο δοκιμαστικό σωλήνα και εξάτμιση της υπό ρεύμα αζώτου.
- Προσθήκη 2 ml μεθανόλης στην ποσότητα τρίχας που βρίσκεται στο δοκιμαστικό σωλήνα.
- Τοποθέτηση του δείγματος στους υπερήχους για 3h.
- Συλλογή της μεθανολικής φάσης, η οποία αρχικά φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου 0.20μm και εν συνεχεία, μεταφέρεται στο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει και την προηγούμενη μεθανολική φάση.
- Εξάτμιση της μεθανολικής φάσης υπό ρεύμα αζώτου.

Ανασύσταση δειγμάτων

- Προσθήκη 100 μl μεθανόλης και ανάδευση με το σύστημα vortex.
- Μεταφορά του διαλύματος σε vial 2.0 ml για ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

4.2.7 Αποτελέσματα για τα δείγματα ούρων και τρίχας

4.2.7.1 Γραμμικότητα

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου κατασκευάστηκαν τέσσερις καμπύλες αναφοράς σε τέσσερις εργαστηριακές μέρες. Για κάθε μία από τις προσδιοριζόμενες ουσίες υπολογίζεται ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στον αναλύτη προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο (Area Ratio). Η στατιστική επεξεργασία των καμπύλων αναφοράς έγινε χρησιμοποιώντας γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (ελάχιστα τετράγωνα). Τα αποτελέσματα φαίνονται στους παρακάτω πίνακες. (Πίνακες 9, 10).

Πίνακας 9: Γραμμικότητα μεθόδου ανάλυσης ούρων

Ουσία	Καμπύλη	Πρότυπα διαλύματα	Φορτισμένα δείγματα
Νανδρολόνη	r^2	0,9986	0,9959
	κλίση	0,0046	0,0675
	τομή	-0,0314	0,112
19-NA	r^2	0,9994	0,9924
	κλίση	0,0001	0,0143
	τομή	0,0017	0,0078
19-NE	r^2	0,9994	0,9991
	κλίση	0,0002	0,0139
	τομή	-0,0017	0,0085

Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίνεται ικανοποιητική τόσο για τη μητρική ουσία όσο για τους μεταβολίτες ($r^2 > 0,99$) στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0-1000 ng/ml).

Πίνακας 10: Γραμμικότητα μεθόδου ανάλυσης τρίχας

Ουσία	Καμπύλη	Πρότυπα διαλύματα	Φορτισμένα δείγματα
Νανδρολόνη	r^2	0,9986	0,9973
	κλίση	0,0046	0,0172
	τομή	-0,0314	-0,419
19-NA	r^2	0,9994	0,9982
	κλίση	0,0001	0,0007
	τομή	0,0017	-0,0052
19-NE	r^2	0,9994	0,9919
	κλίση	0,0002	0,0009
	τομή	-0,0017	0,0006

Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίνεται ικανοποιητική τόσο για τη μητρική ουσία όσο για τους μεταβολίτες ($r^2 > 0,99$) στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0-1000 ng/ml).

4.2.7.2 Όριο ανίχνευσης (LOD), όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου, υπολογίστηκε βάσει του λόγου σήματος προς θόρυβο ($S/N > 3$), ενώ το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου βάσει του λόγου σήματος προς θόρυβο ($S/N > 10$). Οι τιμές LOD και LOQ για τη μητρική ουσία (νανδρολόνη) και τους μεταβολίτες της (19-NE και 19-NA) στα ούρα και στην τρίχα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: LOD και LOQ των αναλυτικών μεθόδων των ούρων και της τρίχας

Βιολογικό δείγμα	Παράμετρος	Νανδρολόνη	19-NE	19-NA
Ούρα	LOD (ng/ml)	0,9	1,8	1,7
	LOQ (ng/ml)	3,1	8,7	5,5
Τρίχα	LOD (pg/mg)	1,2	2,8	6,2
	LOQ (pg/mg)	4,0	9,3	20,8

4.2.7.3 Μέση ανάκτηση

Για την εκτίμηση της ανάκτησης τυφλά δείγματα ούρων φορτίστηκαν (3 επαναλήψεις) με τους αναλυτές προς ανίχνευση και ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία εκχύλισης των αναλυτών από τα δείγματα ούρων υπολογίστηκε η ανάκτηση. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε πέντε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (5, 10, 25, 50 και 100 ng/ml). Η ανάκτηση προκύπτει υπολογίζοντας την πειραματικά μετρούμενη συγκέντρωση των αναλυτών και συγκρίνοντας την με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα. Για τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε η μέση ανάκτηση της νανδρολόνης βρέθηκε 75%, ενώ για τους μεταβολίτες της 19-NE και 19-NA 101% και 114% αντίστοιχα.

Με παρόμοιο τρόπο χρησιμοποιώντας τυφλά δείγματα τρίχας και ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία εκχύλισης των αναλυτών από τα δείγματα τρίχας υπολογίστηκε η ανάκτηση. Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων (100, 250, 500 και 1000 pg/mg). Για τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε η μέση ανάκτηση της νανδρολόνης βρέθηκε 92%, ενώ για τους μεταβολίτες της 19-NE και 19-NA 119% και 119% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Μέση ανάκτηση μεθόδων ούρων και τρίχας

Ουσία	Μέση ανάκτηση \pm sd	
	Μέθοδος ούρων	Μέθοδος τρίχας
Νανδρολόνη	75 \pm 15 (n=4)	92 \pm 10 (n=4)
19-NE	101 \pm 25 (n=4)	119 \pm 20 (n=4)
19-NA	114 \pm 26 (n=4)	119 \pm 18 (n=4)

4.2.7.4 Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Η ακρίβεια των μεθόδων προσδιορίστηκε από φορτισμένα δείγματα πέντε επιπέδων για τα ούρα και τεσσάρων επιπέδων για την τρίχα. Για τα ούρα τα επίπεδα αυτά ήταν 5, 10, 25, 50 και 100 ng/ml ενώ για την τρίχα τα επίπεδα ήταν 100, 250, 500 και 1000 pg/mg. Η ακρίβεια για τη μέθοδο των ούρων υπολογίστηκε για τη νανδρολόνη 104 \pm 11 (n=4), για τη 19-NE 93 \pm 15 (n=4) και για τη 19-NA 98 \pm 18 (n=4). Η ακρίβεια για τη μέθοδο της τρίχας υπολογίστηκε για τη νανδρολόνη 99 \pm 5 (n=4), για τη 19-NE 98 \pm 9 (n=4) και για τη 19-NA 102 \pm 2 (n=4).

Η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου εκφράζεται ως η % σχετική τυπική απόκλιση (RSD), που ισούται με το πηλίκο της τυπικής απόκλισης δια τη μέση τιμή των πειραματικών αποτελεσμάτων. Η inter-days επαναληψιμότητα υπολογίστηκε με τρεις

μετρήσεις σε τρεις διαφορετικές μέρες, φορτισμένων δειγμάτων τρίχας και ούρων. Για τη μέθοδο των ούρων, το %RSD ήταν 27% για τη νανδρολόνη, 25% για τη 19-NE και 30% για τη 19-NA. Για τη μέθοδο της τρίχας, το %RSD ήταν 14% για τη νανδρολόνη, 29% για τη 19-NE και 17% για τη 19-NA.

4.2.7.5 Επίπεδα νανδρολόνης και των μεταβολιτών της στα ούρα και στην τρίχα

Πρότυπα μεθανολικά διαλύματα νανδρολόνης και των μεταβολιτών της καθώς και φορτισμένα δείγματα ούρων και τρίχας συμπεριλαμβάνονταν σε κάθε σειρά ανάλυσης.

Στα δείγματα των ούρων, δεν ανιχνεύθηκε η αναβολική ουσία και οι μεταβολίτες της σε κανένα από τα δείγματα που προήλθαν από την ομάδα ελέγχου (Control). Για την ομάδα υψηλής δόσης (HD), η μέση συγκέντρωση που βρέθηκε είναι: για το μεταβολίτη 19-NE, ήταν <LOQ, 6,2, 10,3 και 4,3 ng/ml για τους μήνες έκθεσης 0, 2, 4 και 6 αντίστοιχα. Για το μεταβολίτη 19-NA ήταν <LOQ, 5,9, 3,5 και 17,2 για τους μήνες έκθεσης 0, 2, 4 και 6 αντίστοιχα. Για την ομάδα χαμηλής δόσης (LD), οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται: για το μεταβολίτη 19-NE από <LOQ έως 1,7 ng/ml και για το μεταβολίτη 19-NA από <LOQ έως 11,7 ng/ml για τους μήνες έκθεσης 0, 2, 4 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 13: Μέση συγκέντρωση 19-NE και 19-NA σε δείγματα ούρων προερχόμενα από τα πειραματόζωα

Πειραματόζωα	Μήνας έκθεσης	Μέση συγκέντρωση 19-NE (ng/ml)	Μέση συγκέντρωση 19-NA (ng/ml)
Control	0	<LOQ	<LOQ
	2	<LOQ	<LOQ
	4	<LOQ	<LOQ
	6	<LOQ	<LOQ
High dose	0	<LOQ	<LOQ
	2	6,2	5,9
	4	10,3	3,5
	6	4,3	17,2
Low dose	0	<LOQ	<LOQ
	2	<LOQ	<LOQ
	4	1,6	11,7
	6	<LOQ	<LOQ

Σε δείγματα τρίχας, δεν ανιχνεύθηκε η αναβολική ουσία και οι μεταβολίτες της σε κανένα από τα δείγματα που προήλθαν από την ομάδα ελέγχου (Control). Δεν ανιχνεύθηκαν μεταβολίτες σε κανένα δείγμα τρίχας σε καμία ομάδα ζώων. Η μέση συγκέντρωση νανδρολόνης της ομάδας υψηλής δόσης (HD), είναι <LOQ, 40,1, 33,4 και 28,2 pg/mg, για τους μήνες έκθεσης 0, 2, 4 και 6 αντίστοιχα. Η μέση συγκέντρωση νανδρολόνης της ομάδας χαμηλής δόσης (LD) είναι <LOQ, <LOQ, 27,2 pg/mg και 26,2 pg/mg, για τους μήνες έκθεσης 0, 2, 4 και 6 αντίστοιχα.

Πίνακας 14: Μέση συγκέντρωση νανδρολόνης σε δείγματα τρίχας προερχόμενων από πειραματόζωα

Πειραματόζωα	Μήνας έκθεσης	Μέση συγκέντρωση νανδρολόνης (pg/mg)
Control	0	<LOQ
	2	<LOQ
	4	<LOQ
	6	<LOQ
High dose	0	<LOQ
	2	40,1
	4	33,4
	6	28,2
Low dose	0	<LOQ
	2	<LOQ
	4	27,2
	6	26,2

4.3 Υπερηχογραφικός έλεγχος

4.3.1 Πρωτόκολλο υπερηχογραφικού ελέγχου

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την υπερηχογραφική εκτίμηση των πειραματόζωων περιγράφεται παρακάτω.

Τα πειραματόζωα αφού υποβλήθηκαν σε αναισθησία με υποδόρια χορήγηση κεταμίνης και ξυλαζίνης (1:2 αντίστοιχα), τους αφαιρέθηκε με ξύρισμα το τρίχωμα στο πρόσθιο τμήμα του στήθους και στην άνω κοιλία. Στη συνέχεια, αφού βρίσκονταν υπό αναισθησία, μεταφέρθηκαν σε ειδική αίθουσα όπου τοποθετήθηκαν σε ύπτια θέση και εξετάστηκαν από υψηλής τεχνολογίας ηχοκαρδιογραφικό σύστημα το οποίο ήταν εξοπλισμένο με 10MHz ανιχνευτή καρδιακών υπερήχων. M-Mode, απεικόνιση 2D, παλμικού κύματος (PW) Doppler και Doppler ιστού (TDI) που καταγράφονται και αποθηκεύονται ψηφιακά, επιτρέποντας την εκτός δικτύου ανάλυση από έναν

έμπειρο παρατηρητή με πιστοποιημένες γνώσεις σε ηχοκαρδιογράφημα. Στις μετρήσεις M-Mode και 2D-Mode περιλαμβάνεται τεκμηρίωση των ακτινικών διαστάσεων της αριστερής κοιλίας (LV), συστολική λειτουργία (κλασματική βράχυνση (FS), κλάσμα εξώθησης (EF), Όγκος παλμού (SV), η καρδιακή παροχή (CO) και εκτίμηση της μάζας του μυοκαρδίου. Η διαθεσιμότητα των πρωτογενών δεδομένων επιτρέπει την εκτίμηση, βάση της ανατομικής M-Mode, της διαμήκους συστολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας (MAPSE και TAPSE). Η απεικόνιση παλμικού κύματος (PW) Doppler και Doppler ιστού (TDI) χρησιμοποιήθηκε για την τεκμηρίωση της διαστολικής ροής και των ταχυτήτων των βασικών τμημάτων του μυοκαρδίου και ο δείκτης λειτουργίας του μυοκαρδίου (MPI) ως μέτρο της ολικής λειτουργίας του μυοκαρδίου. Για κάθε μετρούμενη μεταβλητή, η μέση τιμή των τριών μετρήσεων που αντιστοιχούν σε διαδοχικούς καρδιακούς κύκλους τεκμηριώθηκε ως ενιαία τιμή.

4.3.2 Αποτελέσματα υπερηχογραφικού ελέγχου

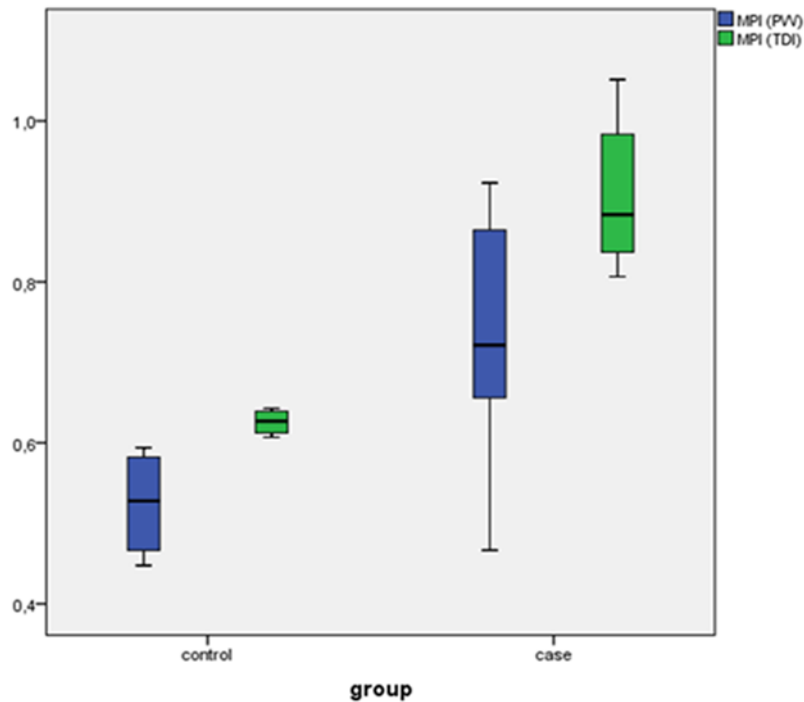
Στα πειραματόζωα στα οποία πραγματοποιήθηκε η χορήγηση της αναβολικής ουσίας παρατηρήθηκε μια τάση για μη σημαντικές αυξημένες τιμές της μάζας του μυοκαρδίου ($p=0,340$) η οποία συνδέθηκε με επιδείνωση των δεικτών της ολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας (MPI-PW: treated animals $0,73\pm 0,16$ vs control group $0,52\pm 0,07$, $p=0,026$; MPI-TDI: treated animals $0,91\pm 0,09$ vs control group $0,63\pm 0,02$, $p=0,001$). Η συστολική λειτουργία δεν παρουσίασε αλλαγές ή τάση για χειροτέρευση στα πειραματόζωα στα οποία έγινε η χορήγηση. Επιπλέον, στα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε υψηλή δόση αναβολικής ουσίας παρουσίασαν πιο έκδηλη αύξηση στη μάζα του μυοκαρδίου (myocardial mass-mmode: high-dose treated animals $6,0\pm 1,4$ g vs low-dose treated animals $4,9\pm 0,31$ g, $p=0,343$) όπως επίσης και πιο σημαντική επιδείνωση στους δείκτες της ολικής μυοκαρδιακής λειτουργίας, σε σχέση με τα πειραματόζωα χαμηλής δόσης.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα δεικτών υπερηχογραφικού ελέγχου στην περίοδο χορήγησης

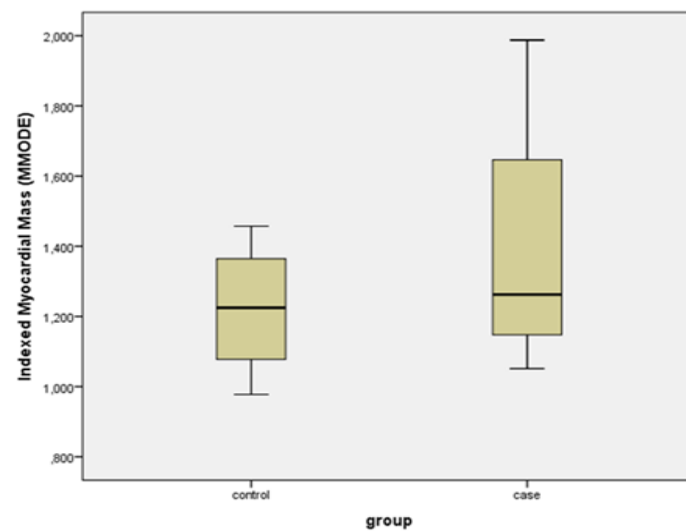
	Control	LDIM	HDIM	HDSC
MPI (PW)	0,52±0,07	0,50±0,46	0,85±0,10	0,73±0,08
MPI (TDI)	0,63±0,02	0,89±0,13	0,88±0,08	0,94±0,08
Myocardial Mass (MMODE)	5,0±0,9	4,9±0,3	6,9±0,9	5,3±1,6
Indexed Myocardial Mass (MMODE)	1,2±0,2	1,2±0,1	1,6±0,3	1,3±0,4
Cardiac Output (Doppler)	0,31±0,07	0,34±0,01	0,45±0,18	0,42±0,11

Πίνακας 16: Αποτελέσματα δεικτών υπερηχογραφικού ελέγχου στην περίοδο αποτοξίνωσης

Δείκτες	Περίοδο χορήγησης	Περίοδο αποτοξίνωσης
MPI (PW)	0,79±0,11	0,76±0,01 (p=0,793)
MPI (TDI)	0,96±0,12	0,68±0,15 (p=0,223)
Myocardial Mass (MMODE)	5,6±0,7	6,1±0,2 (p=0,237)



Σχήμα 9: Σύγκριση MPI στην ομάδα ελέγχου και στα πειραματόζωα που έλαβαν νανδρολόνη



Σχήμα 10: Σύγκριση Index Myocardial Mass (MMODE) στην ομάδα ελέγχου και στα πειραματόζωα που έλαβαν νανδρολόνη

4.4 Ιστοπαθολογική διερεύνηση

4.4.1 Επεξεργασία των ιστών

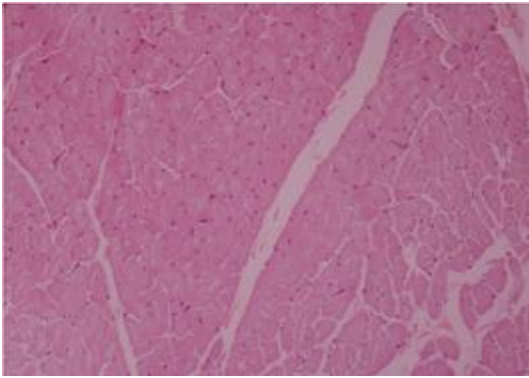
Η ιστοπαθολογική διερεύνηση, διεξήχθη τυφλά από έμπειρη παθολογοανατόμο. Οι ιστοί της καρδιάς και των νεφρών, αφού σταθεροποιήθηκαν σε φορμαλδεΰδη και διαποτίστηκαν με παραφίνη, τοποθετούνται στη μικροτόμο για παραγωγή τομών των 3 μ m. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται χρώση των τομών με τις χρωστικές ηωσίνη και αιματοξυλίνη και ακολουθεί, η εξέταση αυτών υπό το μικροσκόπιο φωτός. Σε όποια δείγματα καρδιάς παρατηρήθηκε ίνωση, πραγματοποιήθηκε τρίχρωμη χρώση Masson.

4.4.2 Ιστοπαθολογική εκτίμηση δειγμάτων καρδιάς

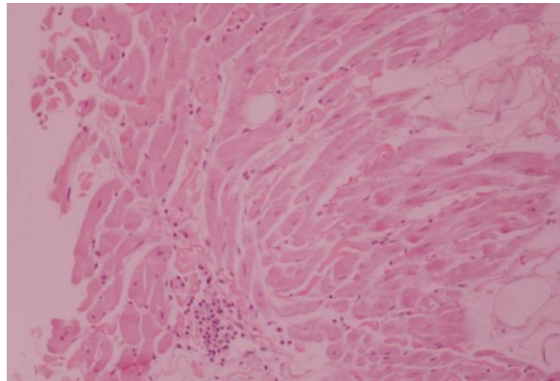
Εστιακή ίνωση και ήπια χρόνια φλεγμονή του καρδιακού ιστού παρατηρήθηκε στα πειραματόζωα των υψηλών δόσεων, σε αντίθεση με τα πειραματόζωα της χαμηλής δόσης, στα οποία παρατηρήθηκε ήπια εστιακή ίνωση. Στα πειραματόζωα, στα οποία η χορήγηση της αναβολικής ουσίας γινόταν υποδόρια, παρουσιάστηκε επίσης οίδημα. Τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής εκτίμησης των δειγμάτων της καρδιάς, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) καθώς επίσης και χαρακτηριστικές εικόνες των ευρημάτων.

Πίνακας 17: Ιστοπαθολογικά ευρήματα των δειγμάτων καρδιάς

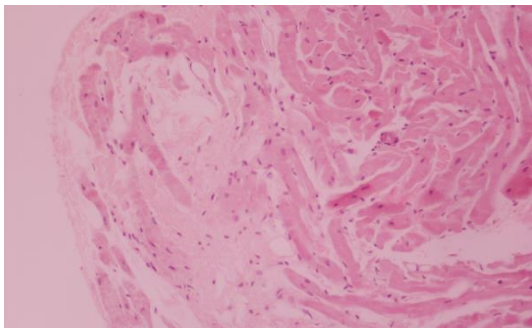
Πειραματόζωο	Εύρημα
Control 1	Φυσιολογικό
Control 2	Φυσιολογικό
Control 3	Φυσιολογικό
Control 4	Φυσιολογικό
HDIM1	Εστιακή ίνωση, εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις
HDIM2	Εστιακή ίνωση, εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις
HDIM3	Εστιακή ίνωση, εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις
HDIM4	Εστιακή ίνωση
HDSC1	Εστιακή ίνωση, εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις
HDSC2	Εστιακή ίνωση
HDSC3	Εστιακή ίνωση, εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις
HDSC4	Εστιακή ίνωση, οίδημα
LDIM1	Εστιακή ίνωση
LDIM2	Εστιακή ίνωση



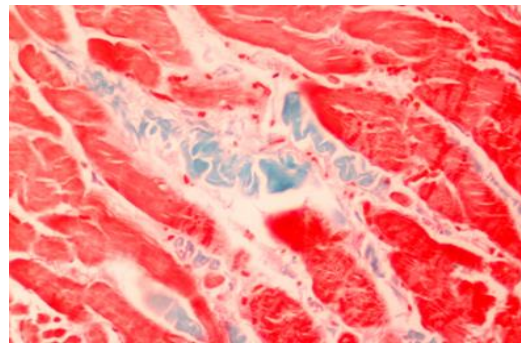
Εικόνα 8: Φυσιολογικός καρδιακός ιστός της ομάδας ελέγχου (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)



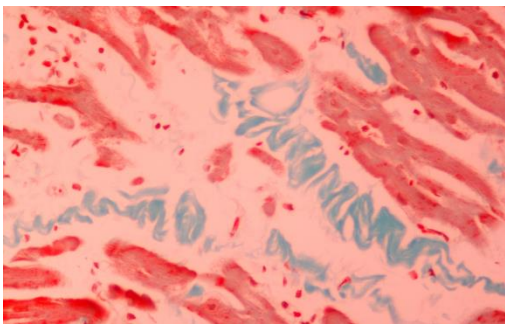
Εικόνα 9: Φλεγμονή του καρδιακού ιστού στην ομάδα HDSC (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)



Εικόνα 10: Ίνωση του καρδιακού ιστού στην ομάδα HDIM (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)



Εικόνα 11: Φλεγμονώδεις διηθήσεις, οίδημα και ίνωση του καρδιακού ιστού στις ομάδες HD (Masson Trichrome)



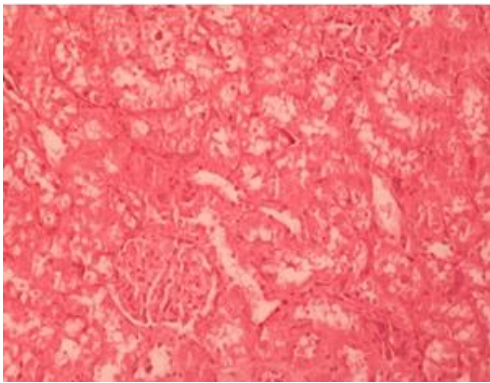
Εικόνα 12: Ίνωση του καρδιακού ιστού στις ομάδες HD (Masson Trichrome)

4.4.3 Ιστοπαθολογική εκτίμηση δειγμάτων νεφρών

Στην ομάδα HDIM, παρατηρήθηκε υπεραιμία στα σπειράματα και στον ενδιάμεσο χώρο, όπως επίσης ίνωση και ήπια φλεγμονή. Στην ομάδα HDSC, παρατηρήθηκε υπεραιμία στον ενδιάμεσο χώρο, αγγειακή συμφόρηση και αγγειοβρίθεια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ήπια φλεγμονή. Στην ομάδα LDIM, παρατηρήθηκε υπεραιμία και ήπια φλεγμονή. Τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής εκτίμησης των δειγμάτων των νεφρών, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 18) καθώς επίσης και χαρακτηριστικές εικόνες των ευρημάτων.

Πίνακας 18: Ιστοπαθολογικά ευρήματα των δειγμάτων νεφρών

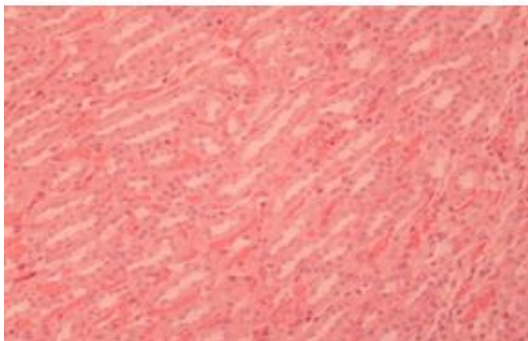
Πειραματόζωο	Εύρημα
Control 1	Φυσιολογικό
Control 2	Φυσιολογικό
Control 3	Φυσιολογικό
Control 4	Φυσιολογικό
HDIM1	Υπεραιμία και ίνωση στον ενδιάμεσο χώρο, υπεραιμία στα σπειράματα, εστιακή ίνωση, ήπια φλεγμονή
HDIM2	Ίνωση στον ενδιάμεσο χώρο, υπεραιμία στα σπειράματα, ήπια φλεγμονή
HDIM3	Υπεραιμία στα σπειράματα, ήπια φλεγμονή
HDIM4	Υπεραιμία, ίνωση στον ενδιάμεσο χώρο
HDSC1	Υπεραιμία στον ενδιάμεσο χώρο, αγγειακή συμφόρηση, αγγειοβρίθεια
HDSC2	Υπεραιμία στον ενδιάμεσο χώρο, αγγειακή συμφόρηση, ίνωση
HDSC4	Υπεραιμία στον ενδιάμεσο χώρο, αγγειοβρίθεια
LDIM1	Υπεραιμία στον ενδιάμεσο χώρο, ήπια φλεγμονή
LDIM2	Υπεραιμία στον ενδιάμεσο χώρο, ήπια φλεγμονή



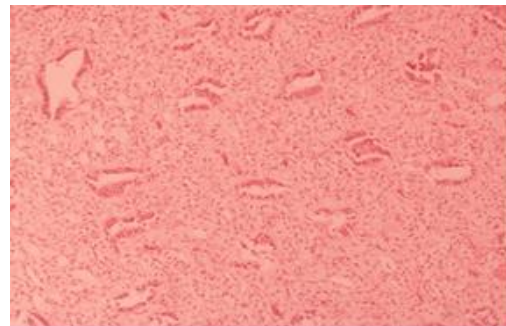
Εικόνα 13: Φυσιολογικός νεφρικός ιστός από την ομάδα ελέγχου (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)



Εικόνα 14: Εστιακή ίνωση και ήπια φλεγμονή του νεφρικού ιστού στην ομάδα HDIM (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)



Εικόνα 15: Αγγειακή συμφόρηση στην ομάδα HDSC (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)



Εικόνα 16: Ίνωση και αγγειοβρίθεια στον νεφρικό ιστό της ομάδας HDSC (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)

4.5 Μέτρηση βιοχημικών δεικτών

4.5.1 Συλλογή και προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών

Μετά τη λήψη των δειγμάτων αίματος από τα πειραματόζωα και τη συλλογή αυτών στα κατάλληλα επισημασμένα σωληνάκια, ακολούθησε φυγοκέντρηση και αποθήκευση στους -18°C . Οι βιοχημικοί δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η ουρία (Urea), η κρεατινίνη (Creatinine), η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), η τροπονίνη I (Troponin I), η κινάση της κρεατίνης (CPK), το Β-τύπου νατριουρητικό πεπτιδίο (BNP), η γλουταμινική οξαλοξική τρανσαμινάση ορού (SGOT), η γλουταμινική πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού (SGPT), η γ-γλουταμυλ-τρανσφεράση (γGT) και η αλκαλική φωσφατάση (ALP). Οι προσδιορισμοί των βιοχημικών δεικτών πραγματοποιήθηκαν σε αυτόματους αναλυτές και συγκεκριμένα, το BNP και η τροπονίνη μετρήθηκαν στον αναλυτή ADVIA Centaur XP Immunoassay System (Siemens Healthcare Diagnostics) και οι υπόλοιποι δείκτες στον αναλυτή Olympus AU2700.

4.5.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού βιοχημικών δεικτών

Η CPK ήταν καθολικά αλλά μη σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ για τη LDH παρατηρήθηκε ήπια άνοδος, στις ομάδες ενδομυϊκής χορήγησης (26%). Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τροπονίνης I ($p=0,024$) παρατηρήθηκαν στην ομάδα HDSC. Τα επίπεδα της τροπονίνης στην ομάδα HDSC συνέχισαν να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης, όπου παρουσιάστηκε επίσης μια απότομη αύξηση των επιπέδων του BNP (7.3 ± 3.6 pg/mg). Για την ουρία και την κρεατινίνη, παρουσιάστηκε μια συσχετιζόμενη αύξηση ($r=0,899$, $p=0,001$) σε όλες τις ομάδες χορήγησης, με στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο στην ομάδα υψηλών δόσεων. Συγκεκριμένα, η κρεατινίνη αυξήθηκε ως 46%, $p=0,024$ και οι τιμές έπεσαν κατά τη διάρκεια της φάσης αποτοξίνωσης περίπου 20%. Η ουρία, ωστόσο αυξήθηκε σημαντικά τόσο στη HDIM όσο και στη HDSC ομάδα (56%, $p=0,024$ και 21%, $p=0,047$ αντίστοιχα) ενώ στην περίοδο αποτοξίνωσης δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Αποτελέσματα βιοχημικών δεικτών

Βιοχημικοί δείκτες	Control Group	Administration period			Wash-out period	
		LDIM	HDIM	HDSC	HDIM	HDSC
CPK (U/L)	332 ± 253	645 ± 442	1149 ± 733	461 ± 314	553 ± 353	351 ± 333
LDH (U/L)	117 ± 133	253 ± 121	183 ± 142	126 ± 81	125 ± 60	52 ± 36
Troponin I (U/L)	0.000	0,0015±0.0015	0,003±0,002	0,007±0,0015 ^a	0,3 ± 0,08 ^a	1,2 ± 1,07 ^a
Urea (ng/dl)	13,8±6,4	20,0±5,7	21,6±9,1 ^a	16,7±7,4 ^a	21,7±5,2 ^a	15,0±7,16 ^a
Creatinine(mg/dl)	0,37±0,37	0,46±0,27	0,55±0,27 ^a	0,36±0,26	0,46±0,08	0,35±0,21
SGOT (U/L)	7,2±4,3	15,4±6,6	11,3±5,2 ^b	9,7±7,2	8,3±4,3	4,5±3,5
SGPT (U/L)	7,3±5,2	12,0±4,9 ^a	13,8±7,2 ^a	9,5±3,3	10,7±4,4	4,5±0,8
γGT (U/L)	1,5±1,1	2,1±0,7	1,6±0,6	2,5±1,3	1,8±0,4	1,0±0,2
ALP (U/L)	13,8±8.0	9,7±3,6	8,8±6,6	8,0±4,7	7,0±3,4	14,3±9,0

^a: Στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, $p < 0,05$

^b: Στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, $p < 0,01$

4.6 Προσδιορισμός ενεργότητας τελομεράσης

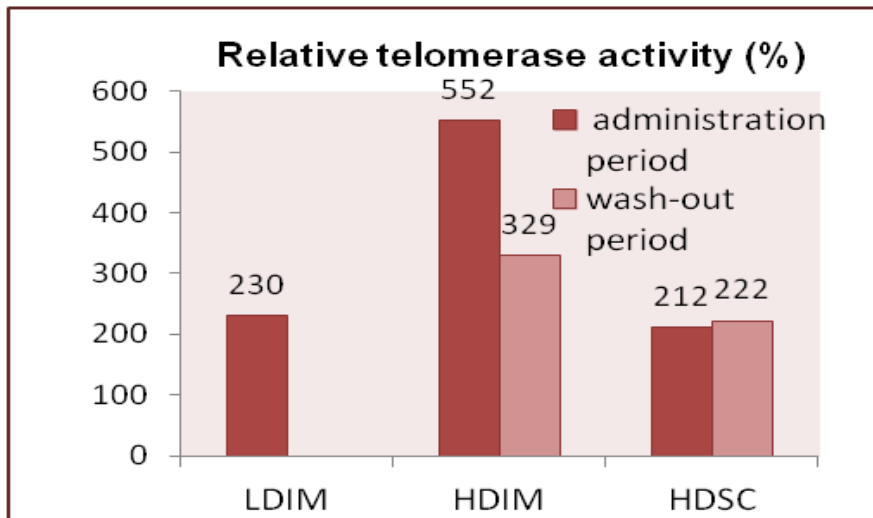
4.6.1 Μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας της τελομεράσης

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της τελομεράσης σε δείγματα ιστών (καρδιάς και νεφρών) που προέρχονται από τα πειραματόζωα καθώς και στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, χρησιμοποιήθηκε εμπορικό kit, αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης- ανοσοπροσδιορισμού, PCR-ELISA, (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA), το οποίο βασίζεται στο πρωτόκολλο επαναλαμβανόμενης τελομερικής ενίσχυσης.

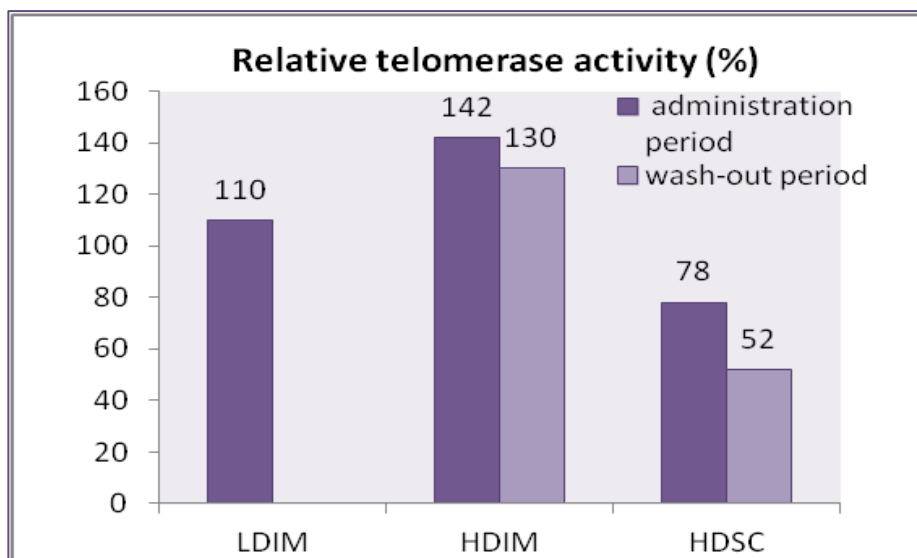
4.6.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού της ενεργότητας της τελομεράσης

Από τη μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης στον καρδιακό ιστό διαπιστώθηκε πως κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης η σχετική ενεργότητα της τελομεράσης, αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις ομάδες χορήγησης (LDIM 230% vs HDIM 552%, $p=0,004$; And HDSC 212%). Ο ενδομυϊκός τρόπος χορήγησης ίσως συμβάλλει στην αύξηση της φλεγμονής, όπως φαίνεται από τη σχετική ενεργότητα της τελομεράσης στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (HDIM 652% vs HDSC 312%, $p=0,003$; LDIM 330% vs HDSC 312%, $p=0,20$). Κατά το διάστημα της αποτοξίνωσης δε παρατηρείται επιστροφή των τιμών στα φυσιολογικά επίπεδα σε καμία από τις δύο ομάδες υψηλής δόσης ($p<0,05$). Ο ενδομυϊκός τρόπος χορήγησης ίσως συμβάλλει στην αύξηση της φλεγμονής, όπως φαίνεται από τη σχετική ενεργότητα της τελομεράσης στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (HDIM 652% vs HDSC 312%, $p=0,003$; LDIM 330% vs HDSC 312%, $p=0,20$).

Οι μετρήσεις της ενεργότητας της τελομεράσης στον νεφρικό ιστό έδειξαν σημαντική αύξηση μόνο στην ομάδα HDIM ($p=0,020$) στην περίοδο χορήγησης. Το φαινόμενο της δόσης-απόκρισης ήταν σχεδόν στατιστικά σημαντικό ($p=0,057$). Στην ομάδα HDSC, κατά το διάστημα χορήγησης, παρατηρήθηκε μια μη σημαντική πτώση της σχετικής ενεργότητας της τελομεράσης. Κατά το διάστημα της αποτοξίνωσης η σχετική ενεργότητα της τελομεράσης μειώθηκε μη σημαντικά ($p>0,05$) στις ομάδες HDIM και HDSC (12% και 26%, αντίστοιχα) με τη μείωση να είναι εντονότερη στην ομάδα HDSC ($p=0,04$). Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της σχετικής ενεργότητας της τελομεράσης στην καρδιά και στους νεφρούς (Σχήμα 11, 12).



Σχήμα 11: Σχετική ενεργότητα τελομεράσης στα δείγματα καρδιάς



Σχήμα 12: Σχετική ενεργότητα τελομεράσης στα δείγματα νεφρού

4.7 Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες

4.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν στο πλάσμα και στους νεφρούς, που προέρχονταν από τα πειραματόζωα.

4.7.2 Αντιδραστήρια και μέθοδοι προσδιορισμού

Τα χημικά αντιδραστήρια 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine, DPPH:H), 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) αποκτήθηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Το τριχλωροξικό οξύ (TCA) και το διάλυμα H₂O₂ (30% w/v) αποκτήθηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany).

4.7.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού των TBARS

Για την ανίχνευση των TBARS, εφαρμόστηκε με κάποιες τροποποιήσεις η μέθοδος που παρουσιάστηκε από τον Keles και τους συνεργάτες του [113]. Συνοπτικά, 100 μL από το πλάσμα του αίματος αναμίχθηκε με 500 μL διαλύματος 35% TCA και 500 μL διαλύματος trishydroxymethylaminomethane hydrochloride (Tris—HCl) συγκέντρωσης 200 mM και pH 7.4. Το μίγμα επωάστηκε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ένα μL διαλύματος 2 M Na₂SO₄ και 55 mM διαλύματος θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν στο δείγμα και επωάστηκαν στους 95° C για 45 min. Τα δείγματα έπειτα αφέθηκαν σε παγόλουτρο για 5 min και έπειτα ανακινήθηκαν ισχυρά αφού προστέθηκε 1 mL διαλύματος 70% TCA. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 3 min και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 530 nm. Με μέτρηση τυφλού δείγματος αφαιρέθηκε και η απορρόφηση του υποστρώματος από κάθε δείγμα. Ο υπολογισμός των TBARS έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής αποσβεσης της malondialdehyde.

4.7.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (protein carbonyls) έγινε με βάση τη μέθοδο που προτάθηκε σε μελέτη του Patsoukis και συνεργάτες [114]. Συνοπτικά, 50 μL διαλύματος 20% TCA προστέθηκαν σε 50 μL πλάσματος και το μίγμα επωάστηκε σε παγόλουτρο για 15 min, ενώ έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 15,000 g για 5 min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και 500 μL διαλύματος

10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) σε διαλύτη 2.5 N υδροχλωρικό οξύ (HCl) προστέθηκαν σε κάθε δείγμα. Για το τυφλό δείγμα προστέθηκαν μόνο 500 μ L HCl 2.5 N. Τα δείγματα έπειτα επωάστηκαν σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h, με ενδιάμεσες ανακινήσεις κάθε 15 min και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και έπειτα 1 mL διαλύματος 10% TCA προστέθηκε σε κάθε δείγμα, ανακινήθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 15,000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και πάλι, ενώ 1 mL διαλύματος αιθανόλης:οξικού αιθυλεστέρα (1:1, v/v) προστέθηκε σε κάθε δείγμα, ανακινήθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 15,000 g για 5 min στους 4°C. Αυτό το βήμα επαναλήφθηκε δύο φορές. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και 1 mL διαλύματος 5 M ουρίας (pH 2.3) προστέθηκε, ανακινήθηκε και επωάστηκε στους 37° C για 15 min. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 3 min στους 4°C και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 375 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPH. Η συνολική πρωτεΐνη του πλάσματος μετρήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήριο Bradford (Sigma-Aldrich).

4.7.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος (TAC) χρησιμοποιήθηκε μέθοδος που προτάθηκε από τους Janaszewska και Bartosz [115]. Συνοπτικά, 20 μ L πλάσματος προστέθηκαν σε 480 μ L διαλύματος 10 mM sodium potassium phosphate (pH 7.4), ενώ προστέθηκαν επιπλέον 500 μ L διαλύματος 0.1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) free radical και έπειτα τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 3 min στα 20,000 g και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520 nm. Η συγκέντρωση των TAC εκφράστηκε ως mmol της ανοιγμένης DPPH σε 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH:H) από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος.

4.7.2.4 Μέθοδος προσδιορισμού της καταλάσης

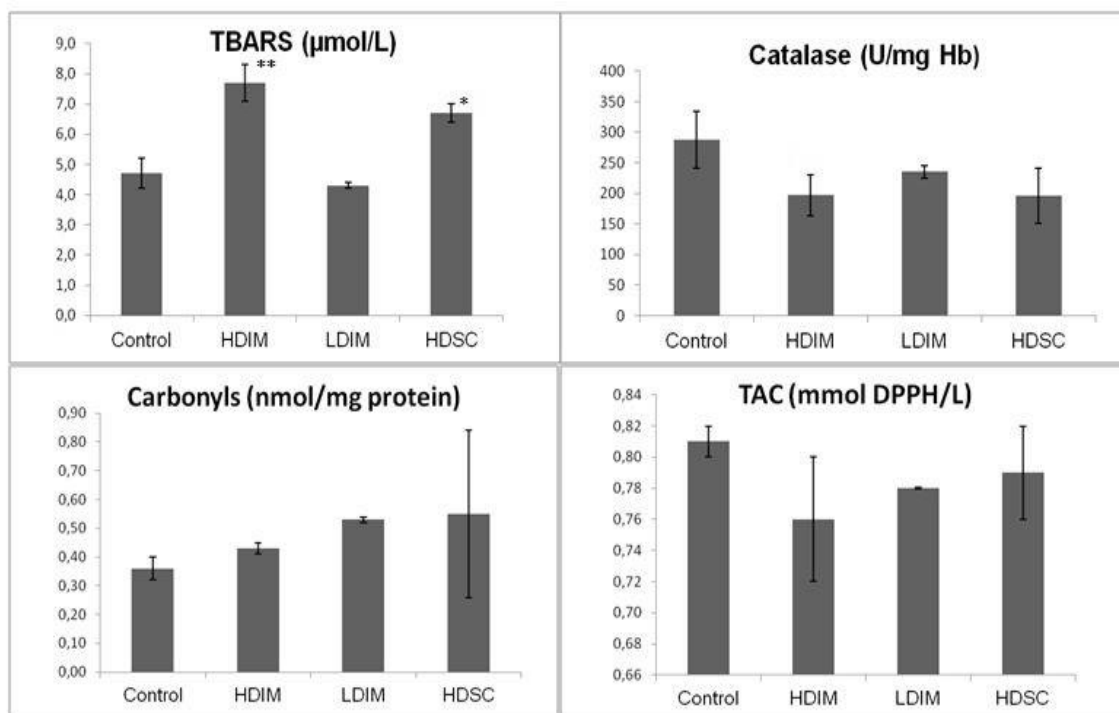
Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi [116]. Εν συντομία, 4 μ L erythrocyte lysate (diluted 1:10) προστέθηκαν σε 2991 μ L of 67 mM sodium potassium phosphate (pH 7,4) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °C για 10 min. 5 μ l 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) προστέθηκαν στα δείγματα και η αλλαγή στην απορρόφηση μετρήθηκε αμέσως στα 240 nm για 130s. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της καταλάσης έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του H₂O₂.

4.7.2.5 Μέθοδος προσδιορισμού GSH

Για τον προσδιορισμό της GSH χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Reddy [117]. 20μL erythrocyte lysate επεξεργάστηκαν με 5% TCA και αναμίχθηκαν με 660 μL 67 mM φωσφορικό κάλιο νάτριο (pH 8) και 330 μL 1 mM DTNB. Τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412 nm. Η συγκέντρωση της GSH υπολογίστηκε από καμπύλη βαθμονόμησης που προκύπτει από πρότυπα εμπορικά διαλύματα.

4.7.2.6 Αποτελέσματα των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα

Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων των TBARS ($p < 0,05$) στις δύο ομάδες υψηλής δόσης (HDIM, HDSC) και μη σημαντική μείωση των επιπέδων της καταλάσης ($p = 0,237$, $p = 0,238$ αντίστοιχα). Στην ομάδα χαμηλής δόσης (LDIM) τα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες παρέμειναν πρακτικά σταθερά. Στα επίπεδα των carbonyls και TAC δε παρουσιάστηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση σε καμία ομάδα χορήγησης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης τα επίπεδα των TBARS και της καταλάσης επέστρεψαν στα φυσιολογικά επίπεδα στην ομάδα HDIM, ενώ στην ομάδα HDSC, παρότι τα επίπεδα της καταλάσης επέστρεψαν σε φυσιολογικά επίπεδα, τα επίπεδα των TBARS αυξήθηκαν σημαντικά ($p = 0,01$). Στα επίπεδα των carbonyls και TAC δε παρουσιάστηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση σε καμία ομάδα χορήγησης. Συγκρίνοντας τους δύο διαφορετικούς τρόπους χορήγησης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Σημαντικό φαινόμενο δόσης-απόκρισης παρατηρήθηκε για τα TBARS, στον ενδομυϊκό τρόπο χορήγησης ($p = 0,01$).



** : $p < 0,01$, * : $p < 0,05$

Σχήμα 13: Δείκτες οξειδωτικού στρες στην καρδιά

4.7.2.7 Αποτελέσματα των δεικτών οξειδωτικού στρες στους νεφρούς

Από τον προσδιορισμό των δεικτών του οξειδωτικού στρες παρατηρείται μια γενικευμένο κατάσταση οξειδωτικού στρες, στα πειραματόζωα στα οποία έγινε χορήγηση της αναβολικής ουσίας. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης, τα επίπεδα των δεικτών παραμένουν πρακτικώς αμετάβλητα με μη σημαντική τάση για αύξηση στα TBARS και στα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Στις ομάδες υψηλής δόσης, τα επίπεδα της GSH και των TBARS φαίνεται πως επηρεάζονται. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη από 50% πτώση των επιπέδων της GSH στην ομάδα HDIM ($p=0,018$), ενώ στην ομάδα HDSC η αντίστοιχη πτώση ήταν πιο ήπια (29%, $p=0,046$). Διπλάσια αύξηση των επιπέδων των TBARS στα νεφρά παρατηρήθηκε στην ομάδα HDIM ($p=0,050$), ενώ η αύξηση που παρατηρήθηκε στην ομάδα HDSC ήταν ως 252%. Ο ατομικός συντελεστής διακύμανσης ήταν επίσης μεγάλος, (% CV 69.6). Στον παρακάτω Πίνακα (Πίνακας 20), συνοψίζονται τα αποτελέσματα των δεικτών του οξειδωτικού στρες στον ιστό των νεφρών.

Πίνακας 20: Δείκτες οξειδωτικού στρες στους νεφρούς

Δείκτες οξειδωτικού στρες	Control	LDIM	HDIM	HDSC
TAC (mmol DPPH/ mg protein)	0,5±0,1 (23,4)	0,5±0,1(14,3)	0,6±0,4 (63,7)	0,6±0,0 (0,262)
TBARS (nmol/mg protein)	17,7±4,1 (22,9)	27,0±3,7 (13,7)	35,4±7,2* (20,3)	41,8±29,1 (69,6)
GSH (μmol/mg protein)	0,14±0,01 (2,90)	0,12±0,01 (10,3)	0,06±0,02*(31,7)	0.10±0.01*(12.2)
Catalase (Units/mg protein)	454±239 (52,6)	451±49 (10,8)	523±343 (65,6)	543±261 (48.1)
Carbonyls (nmol/mg protein)	139±17 (12,1)	133±23 (17,5)	161±26 (16,4)	166±75 (45.1)

*: Στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, $p < 0.05$
 (): % CV (Coefficient of variation)

Η αύξηση των επιπέδων των TBARS στους νεφρούς συσχετίστηκε με την παρατηρούμενη πτώση της GSH στους νεφρούς ($r = -0.750$, $p = 0.020$) στην HDIM ομάδα, όπως επίσης και με την 20% αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους νεφρούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αποτελεί το γεγονός ότι τα επίπεδα των καρβονυλίων στον ιστό των νεφρών συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα των TBARS στο αίμα ($r = 0.667$, $p = 0.050$). Τα επίπεδα της καταλάσης βρέθηκαν να συσχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα των TBARS στους νεφρούς ($r = -0.667$, $p = 0.050$) ενώ συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα των GSH στους νεφρούς ($r = 0.648$, $p = 0.043$). Παρατηρείται επίσης παράλληλη αύξηση των επιπέδων των TBARS στους νεφρούς με την ενεργότητα της τελομεράσης στους νεφρούς ($r = 0.695$, $p = 0.038$). Ισχυρή αρνητική συσχέτιση παρατηρείται μεταξύ της ενεργότητας της τελομεράσης στους νεφρούς και στα επίπεδα της GSH στους νεφρούς και της TAC στο πλάσμα ($r = -0.853$, $p = 0.002$; $r = -0.900$, $p < 0.001$, αντίστοιχα). Οι σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων της ουρίας και της κρεατινίνης συνδέονται με τα επίπεδα της TAC στους νεφρούς, τα οποία δε φαίνεται να αυξάνονται σημαντικά στα ζώα που έλαβαν νανδρολόνη ($r = -0.851$, $p = 0.007$; $r = -0.878$, $p = 0.008$, αντίστοιχα).

Συζήτηση

Η κατάχρηση των αναβολικών στεροειδών αποτελεί μια διαδεδομένη πρακτική που συναντάται τόσο στον επαγγελματικό αθλητισμό όσο και στον ερασιτεχνικό. Παρότι το φαινόμενο αναζήτησης μέσων για τη βελτίωση της αθλητικής επίδοσης, συναντάται από την αρχαιότητα, οι παρενέργειες και ο ακριβής μηχανισμός δράσης των αναβολικών στεροειδών δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι γνώσεις πάνω στις βλάβες που προκαλούν τα αναβολικά στεροειδή στο μυοκάρδιο προέρχονται κυρίως μετά από υπερηχογραφικές μελέτες αθλητών που κάνουν χρήση αναβολικών για πολλά χρόνια, καθώς επίσης η χρήση γίνεται με συνδυασμό αναβολικών ουσιών.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως σκοπό να αξιολογήσει τις παρενέργειες που αποφέρει η μακροχρόνια χρήση της νανδρολόνης στη λειτουργία της καρδιάς, σε δόσεις παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούν οι αθλητές κατά τα λεγόμενα τους. Η διατριβή αυτή αποτελεί μια από τις πρώτες προσπάθειες για την εκτίμηση της λειτουργίας της καρδιάς με υπερηχογραφικές τεχνικές στα πειραματόζωα που έχουν λάβει την αναβολική ουσία. Στην προσπάθεια να εκτιμηθούν η συστολική, η διαστολική και η ολική λειτουργία της καρδιάς, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές και δείκτες, μερικές συμβατικές (PW Doppler) [118,119] και άλλοι της αιχμής, όπως TDI, MPI [120,121] και εκτιμήσεις MAPSE με ανατομικό M-Mode [122].

Η χορήγηση της αναβολικής ουσίας φαίνεται να συνδέεται με την αυξημένη μυοκαρδιακή μάζα λόγω έκκεντρης υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας (αύξηση τόσο στο πάχος του τοιχώματος του μυοκαρδίου όσο και στην διαστολική διάμετρο της αριστερής κοιλότητας). Οι αλλαγές αυτές συνδέονται με πιθανά καλύτερη συστολική λειτουργία της καρδιάς ή τουλάχιστον με μη χειροτέρευση της συστολικής λειτουργίας. Ανησυχητικό ωστόσο είναι το γεγονός ότι ο δείκτης της ολικής λειτουργίας του μυοκαρδίου (MPI) παρουσίασε σημαντική χειροτέρευση σε όλα τα πειραματόζωα στα οποία έγινε χορήγηση της νανδρολόνης. Η μεταβολή του δείκτη της ολικής λειτουργίας της καρδιάς υπονοεί αλλαγές στην ιστολογία και στις ιδιότητες χάλασης (relaxation properties) της καρδιάς του διευρυμένου μυοκαρδίου, μετά από τη χορήγηση της αναβολικής ουσίας, ιδιαίτερα στις υψηλές δόσεις. Πράγματι, εστιακή ίνωση και φλεγμονώδεις διηθήσεις παρατηρήθηκαν στον καρδιακό ιστό, προερχόμενο από τα πειραματόζωα των ομάδων υψηλής δόσης. Επομένως, η «βελτιωμένη» συστολική λειτουργία και η «βελτιωμένη μυοκαρδιακή» μάζα, επιτυγχάνονται σε βάρος της διαστολικής λειτουργίας της καρδιάς. Η μακροχρόνια σημασία των αλλαγών στις μηχανικές ιδιότητες του διευρυμένου μυοκαρδίου, δε δύναται να αξιολογηθεί με την παρούσα διατριβή. Εφ' όσον τα πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν, πριν την να έχουν αποκτή-

σει την μέγιστη μυοκαρδιακή μάζα, τα ευρήματα της διατριβής αυτής πιθανόν αντιπροσωπεύουν μια ήπια καρδιοτοξικότητα σε συνδυασμό με μια πιθανή παρεμπόδιση της φυσιολογικής ανάπτυξης του μυοκαρδίου. Υπάρχουν αναφορές στις οποίες έχει παρατηρηθεί παρεμπόδιση της φυσιολογικής ανάπτυξης του μυοκαρδίου μετά τη χορήγηση καρδιοτοξικών ουσιών, όπως στην περίπτωση των ανθρακυκλίνων, η χορήγηση των οποίων οδήγησε σε λέπτυνση των τοιχωμάτων των κοιλιών σε συνδυασμό με διαστολική και συστολική λειτουργία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες στις οποίες η χορήγηση της νανδρολόνης οδήγησε σε καρδιακή υπερτροφία της καρδιάς στα ποντίκια και συνδέθηκε με αυξημένη υπερτροφία των μυοκυττάρων και αυξημένη εναπόθεση κολλαγόνου στην καρδιά, χωρίς ή σε συνδυασμό με φυσική άσκηση [123-125]. Επιπλέον, από προηγούμενη μελέτη της ομάδας μας, η σύντομη χορήγηση χαμηλής δόσης αναβολικών στεροειδών σε πειραματόζωα οδήγησε σε σημαντική τοπική καρδιοτοξική βλάβη. Η χορήγηση της μεθαναμπόλης (methanabol) σε σύγκριση με την χορήγηση της τουριναμπόλης (turinabol) χορήγηση της συνδέθηκε με μια τάση για χειρότερη μυοκαρδιακή λειτουργία και μεγαλύτερη αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη της μυοκαρδιακής μάζας [126].

Η καρδιά αποτελεί το όργανο που επηρεάζεται περισσότερο από τη χορήγηση εξωγενών στεροειδών [84]. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η καρδιά είναι ευάλωτη στις βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες, λόγω της εγγενούς αυξημένης οξειδωτικής μεταβολικής δραστηριότητας και της εύθραυστης αντιοξειδωτικής αντίστασης, σε σύγκριση με τα άλλα μέρη του σώματος.

Ανεξάρτητα από την οδό χορήγησης της νανδρολόνης, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα TBARS στο πλάσμα, στις ομάδες υψηλών δόσεων. Τα TBARS αποτελούν δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης στο αίμα. Επιπλέον, στις ίδιες ομάδες παρατηρήθηκε μη σημαντικά μειωμένα επίπεδα της καταλάσης, του πιο σημαντικού αντιοξειδωτικού ενζύμου. Επιπλέον, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της TAC παραμένουν πρακτικά αμετάβλητα τόσο στην ομάδα χαμηλής όσο και στις ομάδες υψηλής δόσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν την έναρξη οξειδωτικού στρες σε τέτοιο βαθμό που δε μπορεί να αντισταθμιστεί από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Σε μια πρόσφατη μελέτη για τις επιδράσεις των υπερδοσολογιών νανδρολόνης στον οξειδοαναγωγικό μεταβολισμό της καρδιάς αρουραίων, που ασκούνται ή μη, παρουσιάστηκε ότι οι υψηλές δόσεις της αναβολικής ουσίας εμπόδισαν την καρδιοπροστασία που παρέχονται από την άσκηση, μπλοκάροντας τις θετικές επιπτώσεις στις αντιοξειδωτικές δράσεις των ενζύμων. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καθορίσει τους ακριβείς μηχανισμούς με τους οποίους η νανδρολόνη μεσολαβεί αυτές τις επιδράσεις στη φυσιολογία της καρδιάς και του μεταβολισμού οξειδοαναγωγής

[127]. Ομοίως, μια άλλη μελέτη σχετικά με τις επιδράσεις της τεστοστερόνης στη φυσιολογία της καρδιάς αρουραίων και στην οξειδοαναγωγική ομοιοστάση υπό μη ισχαιμικές συνθήκες, έδειξε ότι η τεστοστερόνη προωθεί την υπεροξειδωση των λιπιδίων με ένα δοσοεξαρτώμενο τρόπο, τόσο στα ζώα που ασκούνται όσο και σε αυτά που δεν ασκούνται. Επίσης, στα ζώα που δεν ασκούνται, οι υψηλές δόσεις τεστοστερόνης μειώνουν σημαντικά τις δραστηριότητες GPx και τις δραστηριότητες GR στην καρδιά, αλλά όχι την καταλάση. Ενώ, στους αρουραίους που ασκούνται, οι δραστηριότητες όλων αυτών των ενζύμων μειώνονται σημαντικά από αυτό το στεροειδές [128]. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν οι καρδιοτοξικές επιδράσεις που σχετίζονται με την κατάχρηση ΑΑΣ προκαλούνται από μειωμένη καρδιακή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Η τελομεράση είναι ένας κύριος στόχος για τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, ενώ ταυτόχρονα είναι ιδιαίτερα ευάλωτη στο οξειδωτικό στρες, δεδομένου ότι διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της σταθερού μήκους των τελομερών [129]. Η σημαντικά αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης που βρέθηκε στην καρδιά των ζώων στα οποία γίνονταν χορήγηση νανδρολόνης, το οποίο αντιστοιχεί σε μια επέκταση της διάρκειας ζωής των κυττάρων, θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελεί ένα συνεργιστικό μηχανισμό επιβίωσης [130,131]. Μια τέτοια προστατευτική λειτουργία έχει ήδη φανεί για την τελομεράση, η οποία υπό το οξειδωτικό στρες μεταφέρεται από τον πυρήνα και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ώστε να τα προστατεύσει από το οξειδωτικό στρες [132].

Το BNP είναι μια καρδιακή ορμόνη και αποτελεί έναν καθιερωμένο δείκτη, που χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση και στην πρόγνωση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα του BNP, τόσο πιο σοβαρή είναι η κατάσταση της καρδιακής ανεπάρκειας. Η εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας συνδέεται με την προοδευτική απώλεια των καρδιομυοκυττάρων, που κλινικά μπορούν να μετρηθούν με αυξημένα επίπεδα τροπονίνων στο αίμα. Η CPK εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και τύπους κυττάρων. Αυξημένα επίπεδα CPK στο αίμα συνδέονται με βλάβη ιστού, αναφερόμενοι κλινικά σε βλάβη είτε στο μυοκάρδιο είτε στο σκελετό. Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα CPK σε όλες τις ομάδες χορήγησης, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης. Η αύξηση των επιπέδων του CPK δε συμπίπτει με σημαντική αύξηση της τροπονίνης. Από το γεγονός αυτό προτείνεται ως κυρίαρχη η σκελετική προέλευση της CPK, πιθανόν λόγω μιας συνυπάρχουσας διαδικασίας θανάτου των σκελετικών μυοκυττάρων, αναγέννησης και υπερτροφίας κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης. Τα αυξημένα επίπεδα τροπονίνης και BNP που παραμένουν στην ομάδα HDSC κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης και τα μετρίως αυξημένα επίπεδα της

ομάδας HDIM θα μπορούσε να αποδοθεί ως μια σοβαρή ένδειξη καρδιακής ανεπάρκειας εις βάθος χρόνου. Η αύξηση της τροπονίνης κατά την περίοδο της αποτοξίνωσης αποτελεί ένα ανησυχητικό εύρημα, το οποίο πιθανόν μπορεί να ερμηνευθεί ως ότι τα αναβολικά στεροειδή ασκούν μια παρατεταμένη ή καθυστερημένη επιζήμια δράση στην καρδιά, ενώ η διαφοροποίηση στην καρδιοτοξικότητα μέσω της οδού χορήγησης είναι ένα εύρημα που απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Δεδομένου, ότι η γενιά των αθλητών που έκανε έντονη κατάχρηση αναβολικών στεροειδών, στις δεκαετίες του 1970 και του 1980, παρουσιάζει σήμερα τις πρώτες καρδιολογικές συνέπειές της, παρέχοντας μια εικόνα των ανεπιθύμητων καρδιακών παρενεργειών και του μηχανισμού τοξικότητας των αναβολικών στεροειδών, αποτελεί το πρώτο βήμα για την εφαρμογή ειδικών θεραπευτικών πρωτοκόλλων και γενικών μέτρων για τη προστασία και σωτηρία της λειτουργίας του μυοκαρδίου. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, ο παθοφυσιολογικός ρόλος του οξειδωτικού στρες στη συστολική και διαστολική καρδιακή ανεπάρκεια τονίστηκε μαζί με την δυνατότητα της αγγειοτενσίνης να μετατρέπει τους αναστολείς του ενζύμου και την άσκηση, για την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες. Στην ίδια κατεύθυνση, ελέγχονται επίσης καινοτόμα πεπτιδία [133]. Η έγκαιρη αναγνώριση της καρδιοτοξικότητας λόγω της χρήσης της νανδρολόνης θα μπορούσε να επιτρέψει την ταχεία εφαρμογή της κατάλληλης ειδικής θεραπείας.

Παράλληλα με τη μελέτη της καρδιοτοξικότητας, πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη μελέτη των επιπτώσεων της χορήγησης της νανδρολόνης στους νεφρούς.

Από τον προσδιορισμό των επιπέδων των βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με τη νεφρική λειτουργία (ουρία και κρεατινίνη) και των ηπατικών τρανσαμινάσεων, φαίνεται ότι η χορήγηση της νανδρολόνης προκάλεσε μια έντονη αύξηση των επιπέδων της ουρίας, της κρεατινίνης, της SGOT και SGPT, στα πειραματόζωα των ομάδων που η χορήγηση γινόταν ενδομυϊκά, πιθανότατα λόγω καλύτερης απορρόφησης [134].

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλη σχετική μελέτη, στην οποία η ενδομυϊκή χορήγηση της μπολντενόνης, ενός άλλου αναβολικού στεροειδούς, σε κουνέλια οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές στις βιοχημικές παραμέτρους της νεφρικής λειτουργίας [135]. Το ενδιαφέρον στην παρούσα μελέτη, είναι το γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα της ουρίας συνέχισαν να υφίστανται κατά τη διάρκεια της περιόδου αποτοξίνωσης, τονίζοντας ότι ο συνήθης τρόπος χορήγησης πιθανόν συμβάλλει σε μια πιο μόνιμη νεφρική διαταραχή. Σε αντίθεση, οι τιμές της κρεατινίνης επέστρεψαν σε φυσιολογικές τιμές μετά τη διακοπή της χορήγησης της νανδρολόνης.

Επιπλέον, ένα ακόμα ενδιαφέρον εύρημα της παρούσης μελέτης, ήταν το γεγονός ότι οι δείκτες του οξειδωτικού στρες παρείχαν όχι τόσο ξεκάθαρη εικόνα μεταξύ των ομάδων της ενδομυϊκής και υποδόριας χορήγησης, σε αντίθεση με τους βιοχημι-

κούς δείκτες στους οποίους η ομάδα ενδομυϊκής χορήγησης έχει υψηλότερα επίπεδα. Κατά την ιστολογική εκτίμηση των νεφρών φάνηκαν στοιχεία υπεραιμίας, εστιακής ίνωσης και φλεγμονής. Σε συνδυασμό με τις μεταβολές στα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν μεταβολές στην νεφρική λειτουργία και δομή. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη ενεργότητα τελομεράσης στους νεφρούς, ειδικά στις ομάδες της ενδομυϊκής χορήγησης, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό επιβίωσης.

Αναμένεται συνήθως ότι η μειωμένη συσταλτικότητα της καρδιάς μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια. Επιπλέον, ακόμη και η χρόνια διατακτική μυοκαρδιοπάθεια μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των νεφρών. Στην περίπτωση μας, το κλάσμα εξώθησης% στα κουνέλια που έλαβαν νανδρολόνη δεν μειώθηκε και μόνο οι δείκτες της ολικής λειτουργίας του μυοκαρδίου έχουν επιδεινωθεί στις ομάδες υψηλής δόσης. Παρ' όλα αυτά, σε ένα επίπεδο ιστού, τόσο στον καρδιακό όσο και στον νεφρικό ιστό παρατηρήθηκε ίνωση και φλεγμονή [136].

Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής είναι το γεγονός ότι το βάρος των νεφρών παρέμεινε αμετάβλητο, αν όχι μειώθηκε ειδικά στην ομάδα της υποδόριας χορήγησης. Σε αντίθεση με άλλη μελέτη, [137] στην οποία, τα ζώα στα οποία έγινε χορήγηση της νανδρολόνης παρουσίασαν αύξηση στο βάρος των νεφρών. Στην παρούσα μελέτη φαίνεται να αυξάνεται το ολικό βάρος των ζώων κατά τη διάρκεια της αποτοξίνωσης, ένα φαινόμενο που καταγράφεται επίσης και από τους αθλητές. Συγκεκριμένα, μια 25% αύξηση του βάρους του σώματος κατά την αναφερόμενη περίοδο παρατηρήθηκε λόγω της μακράς αναβολικής δράσης της νανδρολόνης, η οποία έγινε εμφανής μετά το τέλος της χορήγησης [138].

Ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η νεφροτοξική δραστηριότητα αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ερώτηση. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι οι νεφροί είναι επιρρεπείς στις βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, μετά τη χορήγηση των φαρμάκων με τοξικές δραστηριότητες για τα ζώα [95]. Στην παρούσα μελέτη, οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που επηρεάστηκαν περισσότερο ήταν τα TBARS, υποδεικνύοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων, και η GSH. Τα παραπάνω ευρήματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλης μελέτης, στην οποία έδειξαν ότι η μακροχρόνια χορήγηση νανδρολόνης προωθεί την οξειδωτική βλάβη σε CD1 ποντίκια που ασκούνται σε δύναμη [84]. Στην εν λόγω μελέτη, η οξειδωτική βλάβη στα νεφρά ποντικών που έλαβαν νανδρολόνη, φάνηκε από την αύξηση των επιπέδων μηλονοδιαλυδής (δείκτης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων) και από τη μείωση των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης με αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα του νεφρού να εξουδετερώνει το τοξικό υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα υπεροξειδία των λιπιδίων. Σε άλλη μελέτη,

αναφέρεται ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση στο ήπαρ, την καρδιά και τους νεφρούς των αρσενικών αρουραίων Wistar επηρεάστηκε σε μεγάλο βαθμό από τη χορήγηση ΑΑΣ, αλλά οι μηχανισμοί του οξειδωτικού στρες βρέθηκαν διαφορετικοί μεταξύ των τριών ιστών. Στο νεφρό, παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα των καρβονυλίων και μείωση των συνολικών υπολειμμάτων θειόλης και μειωμένη δραστικότητα καταλάσης, ενώ στο ήπαρ, το οποίο ήταν πιο επιρρεπές σε αλλαγές, η δραστικότητα της NOX ήταν αυξημένη και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD και καταλάση μειώθηκαν.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως η GSH μειώνεται σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια [139]. Η GSH είναι συνήθως το πρώτο ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο το οποίο θυσιάζεται για να αντισταθμίσει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών [140].

Ακόμη, στην ομάδα HDIM τα επίπεδα των TBARS στα νεφρά ήταν αυξημένα, υποστηρίζοντας την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στο πλάσμα. Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων των TBARS στα νεφρά συσχετίζεται σημαντικά με την παρατηρούμενη μείωση της GSH στα νεφρά, προτείνοντας ότι η GSH χρησιμοποιήθηκε για να αντισταθμίσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο νεφρό, ενδεικτικά της οξείδωσης πρωτεΐνης, δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη χορήγηση της νανδρολόνης σε οποιαδήποτε δόση, ωστόσο, συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα TBARS στο νεφρό. Μερικές φορές, η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η οξείδωση της πρωτεΐνης αλληλοσυσχετίζονται [141].

Βιβλιογραφία

1. Baron DA, Martin DM, Magd SA .Doping in sports and its spread to at-risk populations. An international review. World Psychiatry. 2007;(6):118–23.
2. <http://www.eskan.gr/pdfviewer.php?id=/res/file/pubs/monographia.pdf>
Σ.Αθανασέλης, Ε.Καμπερίδου, Ι.Λάιος, Σ.Χαρίτου, Ντόπινγκ, σύγχρονη θεώρηση του προβλήματος, ΕΣΚΑΝ.
3. Muller RK. History of Doping and Doping Control. Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195:1-23 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
4. McGrath JC, Cowan DA. Drugs in Sport. British Journal of Pharmacology. 2008;154:493–495.
5. Hemmersbach P, Torre R. Stimulants, narcotics and β -blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. J. Chromatogr. B: biomedical applications 1996;687: 221-238.
6. Verroken M. Drug use and abuse in sport. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2000;14(1): 1-23.
7. World Anti-Doping Agency, World Anti-Doping Code.
<https://W.A.D.A-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/W.A.D.A-2015-world-anti-doping-code.pdf>
8. World Anti-Doping Agency, World Anti-Doping List.
<https://W.A.D.A-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/W.A.D.A-2016-prohibited-list-en.pdf>
9. Bowers LD. The International Antidoping System and Why It Works. Clin Chem. 2009;55(8):1456–61.
10. Van Eenoo P, Delbeke FT. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control-New steroids and new insights. J Steroid Biochem Mol Biol. 2006;101(4–5):161–78.
11. Kam PCA, Yarrow M. Anabolic steroid abuse: Physiological and anaesthetic considerations. Anaesthesia. 2005;60(7):685–92.
12. Basaria S, Wahlstrom JT, Dobs AS. Clinical review 138: Anabolic-androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(11):5108–17.
13. Evans NA. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. Am J Sports Med. 2004;32(2):534–42.
14. Kuhn CM. Anabolic steroids. Recent Prog. Horm. Res. 2002;57:411-434.

15. Kicman AT, Gower DB. Anabolic steroids in sport: biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann. Clin. Biochem.* 2003;40:321-356.
16. Saudan C, Baume N, Robinson N, Avois L, Mangin P, Saugy M. Testosterone and doping control. *Br J Sports Med.* 2006;40 Suppl 1:i21-4.
17. Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sport Med.* 2004;34(8):513-54.
18. Claessens F, Verrijdt G, Haelens A, Callewaert L, Moehren U, D'Alesio A, et al. Molecular biology of the androgen responses. *Andrologia.* 2005;37(6):209-10.
19. Creutzberg EC, Schols AM. J. Anabolic steroids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 19;3:99243-253.
20. Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. *Toxicol Lett.* 2005;158(3):167-75.
21. Kuuranne T. Phase-II Metabolism of Androgens and its Relevance for Doping Control Analysis. *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology* 195:65-75 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
22. Gibson G. G., Skett P.: *Introduction to Drug Metabolism.* Chapman and Hall, London-New York.
23. Leinonen A.: *Novel mass spectrometric analysis methods for anabolic androgenic steroids in sports drug testing.* Helsinki University Printing House, Helsinki, 2006.
24. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev.* 2005;105(9):3352-70.
25. Nieschlag E, Behre H.M., Nieschlag S.: *Testosterone Action, Deficiency, Substitution.* 3rd Edition Cambridge University Press 2006.
26. Τσιτσιλώνης Σ, Περρέα Δ. Αναβολικά στεροειδή. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2009;26(5):601-610
27. Perry PJ, Yates WR, Williams RD, Andersen AE, MacIndoe JH, Lund BC, et al. Testosterone therapy in late-life major depression in males. *J. Clin. Psychiatry.* 2002;63:1096-1101
28. Seidman SN, Orr G, Raviv G, Levi R, Roose SP, Kravitz E, et al. Effects of Testosterone Replacement in Middle-Aged Men With Dysthymia. *J Clin Psychopharmacol.* 2009;29(3):216-21.
29. Seidman SN, Miyazaki M, Roose SP. Intramuscular Testosterone Supplementation to Selective Serotonin Reuptake Inhibitor in Treatment-Resistant Depressed Men. *J Clin Psychopharmacol.* 2005;25(6):584-8.

30. Orengo CA. Safety and Efficacy of Testosterone Gel 1% Augmentation in Depressed Men With Partial Response to Antidepressant Therapy. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2005;18(1):20–4.
31. Thevis M, Schanzer W. Synthetic Anabolic Agents: Steroids and Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators. *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology* 195:99-126 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
32. Hemmersbach P, Grosse J. Nandrolone. A Multi-Faceted Doping Agent. *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology* 195:128-154 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
33. Ayotte C. Significance of 19-norandrosterone in athletes' urine samples. *Br J Sports Med.* 2006;40 Suppl 1:i25–9.
34. Catlin DH, Hatton CK, Starcevic SH. Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes' urine. *Clin Chem.* 1997;43(7):1280–8.
35. Kicman AT. Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens. *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology* 195:25-64 Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010
36. Τουσίμης Δ. Στοιχεία Ανατομικής. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης. 1996
37. Θρασσυβουλίδης Α. Βιοχημικοί δείκτες εμφράγματος του μυοκαρδίου. Επίκαιρα Θέματα Κλινικής Βιοχημείας στη Σύγχρονη Κλινικοεργαστηριακή πράξη. Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας. Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών». 2007
38. Χατζηγεωργίου ΓΧ, Καρατασάκης Γ. Φυσιολογία-Παθοφυσιολογία καρδιαγγειακού συστήματος. 10^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο. Ελληνική εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας. 2004
39. Kaplan A, Jack R, Orheim KE, Toivola B, Lyon AW. Κλινική Χημεία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης. 2003
40. Αντωνάκος Γ. Νεφρική λειτουργία: Βασικοί εργαστηριακοί δείκτες αξιολόγησης. Επίκαιρα Θέματα Κλινικής Βιοχημείας στη Σύγχρονη Κλινικοεργαστηριακή πράξη. Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας. Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών». 2007
41. Μπουγάτσος Γ. Ανατομία των νεφρών. 11^ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο. Ελληνική εταιρεία Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας 2005.
42. Parkinson AB, Evans NA. Anabolic androgenic steroids: A survey of 500 users. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:644–651.

43. Deligiannis AP, Kouidi EI. Cardiovascular adverse effects of doping in sports. *Hell J Cardiol*. 2012;53(6):447–57.
44. Basaria S. Androgen abuse in athletes: Detection and consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1533–43.
45. Achar S, Rostamian A, Narayan SM. Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm. *Am J Cardiol*. 2010; 106(6): 893–901.
46. Payne JR, Kotwinski PJ, Montgomery HE. Cardiac effects of anabolic steroids. *Heart* 2004;90:473–475.
47. Lau DH, Stiles MK, John B, Shashidhar, Young GD, Sanders P Atrial fibrillation and anabolic steroid abuse. *Int J Cardiol* 2007;117:e86–e87.
48. Sharma S. Athlete's heart-effect of age, sex, ethnicity and sporting discipline *Exp Physiol*. 2003;88:665–669.
49. Liu P, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev*. 2003;24:313–340.
50. Di Bello V, Giorgi D, Bianchi M, Bertini A, Caputo MT, Valenti G, et al. Effects of anabolic-androgenic steroids on weight-lifters' myocardium: an ultrasonic videodensitometric study. *Med Sci Sport Exer*. 1999;31:514–521.
51. D'Andrea A, Caso P, Salerno G, Scarafile R, De Corato G, Mita C, et al. Left ventricular early myocardial dysfunction after chronic misuse of anabolic androgenic steroids: a Doppler myocardial and strain imaging analysis. *Br J Sports Med*. 2007;41(3):149–55.
52. Hartgens F, Cheriex EC, Kuipers H. Prospective Echocardiographic Assessment of Androgenic-Anabolic Steroids Effects on Cardiac Structure and Function in Strength Athletes. *Int J Sports Med* 2003;24(5): 344-351.
53. Krieg A, Scharhag J, Albers T, Kindermann W, Urhausen A. Cardiac tissue Doppler in steroid users. *Int J Sports Med*. 2007;28:638–643.
54. Dickerman R, Schaller F, Zachariah NY, McConathy WJ. Left ventricular size and function in elite bodybuilders using anabolic steroids. *Clin J Sport Med*. 1997;7:90–93.
55. Bagchus W, Smeets JM, Verheul HA, De Jager-Van Der Veen SM, Port A, Guert T. Pharmacokinetic evaluation of three different intramuscular doses of nandrolone decanoate: analysis of serum and urine samples in healthy men. *J Clin Endocr Metab*. 2005;90:2624–2630.
56. Urhausen A, Albers T, Kindermann W. Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Heart*. 2004;90:496–501.

57. Sader MA, Griffiths KA, McCredie RJ, Handelsman DJ, Celermajer DS. Androgenic anabolic steroids and arterial structure and function in male bodybuilders. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:224–230.
58. Lajarin F, Zaragoza R, Tovar I, Martinez-Hernandez P. Evolution of serum lipids in two male bodybuilders using anabolic steroids. *Clin Chem.* 1996;42:970–972.
59. Palatini P, Giada F, Garavelli G, Sinisi F, Mario L, Michieletto M, Baldo-Enzi G. Cardiovascular effects of anabolic steroids in weight-trained subjects. *J Clin Pharmacol.* 1996;36:1132–1140
60. Hartgens F, Rietjens G, Keizer HA, Kuipers H, Wolffenbuttel B. Effects of androgenic-anabolic steroids on apolipoproteins and lipoprotein (a). *Br J Sport Med.* 2004;38:253–259.
61. Lane H, Grace F, Smith JC, Morris K, Cockcroft J, Scanlon MF, Davies JS. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. *Eur J Clin Invest.* 2006;36:483–488.
62. Glazer G. Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels. A literature review. *Arch Intern Med* 1991;151:1925–1933.
63. Urhausen A, Torsten A, Wilfried K. Reversibility of the effects on blood cells, lipids, liver function and hormones in former anabolic-androgenic steroid abusers. *J Steroid Biochem.* 2003;84:369-375.
64. Yeater R, Reed C, Ullrich I, Morise A, Borsch M. Resistance trained athletes using or not using anabolic steroids compared to runners: effects on cardiorespiratory variables, body composition, and plasma lipids. *Br J Sport Med.* 1996;30:11-14.
65. Frati P, Busardò FP, Cipolloni L, Dominicis E De, Fineschi V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Related Deaths: Autoptic, Histopathological and Toxicological Findings. *Curr Neuropharmacol.* 2015;13(1):146–59.
66. McNutt RA, Ferenchick GS, Kirlin PC, Hamlin NJ. Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids. *Am J Cardiol.* 1988;62:164.
67. Hausmann R, Hammer S, Betz P. Performance enhancing drugs (doping agents) and sudden death-a case report and review of the literature. *Int J Legal Med.* 1998;111:261–264.
68. Dickerman RD, Schaller F, Prather I., McConathy W J. Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids. *Cardiology.* 1995;86(2): 172-3.

69. Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F, Paglicci RL, Turillazzi E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2001;125(2):253-255.
70. Luke JL, Farb A, Virmani R, Sample RH. Sudden cardiac death during exercise in a weight lifter using anabolic androgenic steroids: pathological and toxicological findings. *J Forensic Sci.* 1990;35(6):1441-7.
71. Kennedy M, Corrigan AB, Pilbeam ST. Myocardial infarction and cerebral haemorrhage in a young body builder taking anabolic steroids. *Aust N Z J Med.* 1993;23:713.
72. Dickerman RD, McConathy WJ, Schaller F, Zachariah NY. Cardiovascular complications and anabolic steroids. *Eur. Heart J.* 1996;17(12):1912.
73. Di Paolo M, Agozzino M, Toni C, Luciani AB, Molendini L, Scaglione M, et al. Sudden anabolic steroid abuse-related death in athletes. *Int J Cardiol.* 2007;114(1):114-7
74. Fineschi V, Riezzo I, Centini F, Silingardi E, Licata M, Beduschi G, Karch SB. Sudden cardiac death during anabolic steroid abuse: morphologic and toxicologic findings in two fatal cases of bodybuilders. *Int J Legal Med.* 2007; 121:48-53.
75. Thiblin I, Mobini-Far H, Frisk M. Sudden unexpected death in a female fitness athlete, with a possible connection to the use of anabolic androgenic steroids (AAS) and ephedrine. *Forensic Sci Int.* 2009;184(1-3):7-11.
76. Montisci M, El Mazloum R, Cecchetto G, Terranova C, Ferrara SD, Thiene G, et al. Anabolic androgenic steroids abuse and cardiac death in athletes: Morphological and toxicological findings in four fatal cases. *Forensic Sci Int.* 2012;217(1-3).
77. Daher EF, Silva Junior GB, Queiroz AL, Ramos LM, Santos SQ, Barreto DM et al. Acute kidney injury due to anabolic steroid and vitamin supplement abuse: report of two cases and a literature review. *International Urology and nephrology.* 2009;41:717-723.
78. Hageloch W, Appell HJ, Weicker H. [Rhabdomyolysis in a bodybuilder using anabolic steroids]. *Sportverletzung Sportschaden : Organ der Gesellschaft für Orthopädisch-Traumatologische Sportmedizin* 1988;2: 122-125.
79. Revai, T., Sapi, Z., Benedek, S., Kovacs, A., Kaszas, I., Viranyi, M. et al. Severe nephrotic syndrome in a young man taking anabolic steroid and creatine long term. *Orvosi hetilap* 2003;144:2425-2427.

80. Nasr J, Ahmad J. Severe cholestasis and renal failure associated with the use of the designer steroid Superdrol (methasteron): a case report and literature review. *Digestive diseases and sciences*. 2009;54:1144-1146.
81. Joyce JA. Anesthesia for athletes using performance enhancing drugs. *AANA J*. 1991;59:139-144.
82. Iliescu R, Cucchiarelli VE, Yanes LL, Iles JW, Reckelhoff JF. Impact of androgen-induced oxidative stress on hypertension in male SHR. *Am J Physiol Regul Integrative Comparative Physiol*. 2007;292:R731-735.
83. McGuire BB, Watson RW, Perez-Barriocanal F, Fitzpatrick JM, Docherty NG, Gender differences in the renin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney. *Kidney & blood pressure research*. 2007;30:67-80.
84. Riezzo I, Turillazzi E, Bello S, Cantatore S, Cerretani D, Di Paolo M, et al. Chronic nandrolone administration promotes oxidative stress, induction of pro-inflammatory cytokine and TNF-alpha mediated apoptosis in the kidneys of CD1 treated mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;280:97-106.
85. Herlitz LC, Markowitz GS, Farris AB, Schwimmer JA, Stokes MB, Kunis C et al. Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2010;21:163-172.
86. Wong LSM, Oeseburg H, De Boer RA, Van Gilst WH, Van Veldhuisen DJ, Van Der Harst P. Telomere biology in cardiovascular disease: The TERC-/- mouse as a model for heart failure and ageing. *Cardiovasc Res*. 2009;81(2):244-52.
87. Wong LS, de Boer RA, Samani NJ, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. Telomere biology in heart failure. *Eur. J. Heart Fail*. 2008;10:1049-1056.
88. Serrano AL, Andrés V. Telomeres and Cardiovascular Disease: Does Size Matter? *Circ Res*. 2004;94(5):575-84.
89. Fragkiadaki P, Tsoukalas D, Fragkiadoulaki I, Psycharakis C, Nikitovic D, Spandidos DA, et al. Telomerase activity in pregnancy complications (Review). *Mol Med Rep*. 2016;14(1):16-21.
90. Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol*; 2009;44(8):485-92.
91. Νικολαΐδου Χ, Μπουντούρης Γ. Το οξειδωτικό στρες στη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια. *Ελληνική Ιατρική* 2009;75(1):5-25

92. Cerretani D, Neri M, Cantatore S, Ciallella C, Riezzo I, Turillazzi E, et al. Looking for Organ Damages Due to Anabolic-androgenic Steroids (AAS): Is Oxidative Stress the Culprit? *Mini Rev Org Chem.* 2013;10(4):393–9.
93. Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp. Physiol.*, 2008;93(1):141-147.
94. Skogastierna C, Hotzen M, Rane A, Ekström L. A supraphysiological dose of testosterone induces nitric oxide production and oxidative stress. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2013;7:1-7.
95. Divya MK, Lincy L, Raghavamenon AC, Babu TD. Ameliorative effect of *Apo-dytes dimidiata* on cisplatin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Pharmaceutical biology.*2016; 1-9.
96. Σκοογ DA, Holler FJ, Nieman TA: *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης* 2002. Εκδόσεις Κωσταράκης.
97. Σίσκος Π.Α., Νικολέλης Δ.Π.: *Αναλυτικές μέθοδοι διαχωρισμού.* ΕΚΠΑ 1991.
98. Χατζηγιάννου Θ.Π., Κουππάρης Μ.Α.: *Ενόργανη Ανάλυση.* ΕΚΠΑ 2000.
99. Reinders J, Lewandrowski U, Moebius J. Challenges in mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics* 2004;4:3686-703.
100. Naylor S., Kumar R.: Emerging role of mass spectrometry in structural and functional proteomics. *Adv. Protein Chem.* 2003;65:217-48.
101. Villas-Boas SG., Mas S, Akesson M. Mass Spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom. Rev.* 2005;24:613-46
102. Smith R.M.: *Understanding Mass Spectra.* 2nd Ed. John Wiley & Sons 2004
103. Rivier L. Techniques for analytical testing of unconventional samples. *Bailliere's Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000;14(1):147-65.
104. Parr MK, Schänzer W. Detection of the misuse of steroids in doping control. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(3–5):528-37.
105. Klaus Mueller R, Grosse J, Lang R, Thieme D. Chromatographic techniques—the basis of doping control. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1995;674(1):1-11.
106. Badoud F, Guillarme D, Boccard J, Grata E, Saugy M, Rudaz S, et al. Analytical aspects in doping control: Challenges and perspectives. *Forensic Sci Int.* 2011;213(1–3):49–61.
107. Kiss A, Jacquet AL, Paise O, Flament-Waton MM, De Ceaurriz J, Bordes C, et al. Urinary signature of anabolic steroids and glucocorticoids in humans by LC-MS. *Talanta.* 2011;83(5):1769–73.

108. Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Rossi R, Bacci M. Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *J Appl Toxicol.* 2005;25(3):205–11.
109. Saugy M, Cardis C, Robinson N, Schweizer C. Test methods: Anabolics. *Bailliere's Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000;14(1):111–33.
110. Kintz P, Villain M, Cirimele V. Hair analysis for drug detection. *Ther Drug Monit.* 2006;28(3):442–6.
111. Kintz P, Cirimele V, Sachs H, Jeanneau T, Ludes B. Testing for anabolic steroids in hair from two bodybuilders. *Forensic Sci Int.* 1999;101(3):209–16.
112. Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int.* 1993;63(1–3):9–18.
113. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 2001;28:141–143.
114. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure, *Neurosci. Lett.* 2004;357:83–86.
115. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2002;62:231-236.
116. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods enzymol.* 1984;105:121-126.
117. Reddy CC, Tu CP, Burgess JR, Ho CY, Scholz RW, Massaro EJ. Evidence for the occurrence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsomes. *Biochemical and biophysical research communications.* 1981;101:970-978.
118. Fontes-Sousa AP, Bras-Silva C, Moura C, Areias JC, Leite-Moreira AF. M-mode and Doppler echocardiographic reference values for male New Zealand white rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 2006;67:1725–1729.
119. Plehn JF, Foster E, Grice WN, Huntington-Coats M, Apstein CS. Echocardiographic assessment of LV mass in rabbits: models of pressure and volume overload hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1993;265:2066–2072.
120. Moura C, Fontes-Sousa AP, Teixeira-Pinto A, Areias JC, Leite-Moreira AF. Agreement between echocardiographic techniques in assessment of the left ventricular myocardial performance index in rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 2009;70:464–471.
121. Stypmann J, Engelen MA, Breithardt AK, Milberg P, Rothenburger M, Breithardt OA et al. Doppler echocardiography and Tissue Doppler Imaging in

- the healthy rabbit: Differences of cardiac function during awake and anaesthetised examination. *Int.J. Cardiol.* 2006;115:164–170.
122. Germanakis I, Kalmanti M, Parthenakis F, Nikitovic D, Stiakaki E, Patrianakos A et al. Correlation of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide levels with left ventricle mass in children treated with anthracyclines. *Int. J. Cardiol.* 2006;108:212–215.
 123. Do Carmo EC, Fernandes T, Koike D, Da Silva ND, Mattos KC, Rosa KT et al. Anabolic steroid associated to physical training induces deleterious cardiac effects. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2011;43:1836–1848.
 124. Franquini JVM, Do Nascimento AM, De Lima EM, Brasil GA, Heringer OA, Dos Santos Cassaro KO, et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids* 2013;78:379-385.
 125. Tanno AP, Das Neves VJ, Rosa KT, Cunha TS, Giordano FCL, et al. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: Role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology. *Life Sci.* 2011;89,631-637.
 126. Germanakis I, Tsarouhas K, Fragkiadaki P, Tsitsimpikou C, Goutzourelas N, Champsas MC, Tsatsakis AM. Oxidative stress and myocardial dysfunction in young rabbits after short term anabolic steroids administration. *Food. Chem. Toxicol.* 2013;61:101–105.
 127. Chaves EA, Fortunato RS, Carvalho DP, Nascimento JHM, Oliveira MF, Exercise-induced cardioprotection is impaired by anabolic steroid treatment through a redox-dependent mechanism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013;138:267–272.
 128. Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Jagsz S, Sobczak A, Chrapusta SJ, Chalimoniuk M, et al. High-dose testosterone propionate treatment reverses the effects of endurance training on myocardial antioxidant defenses in adolescent male rats. *Cardiovasc. Toxicol.* 2011;11:118–127.
 129. Rentoukas E, Tsarouhas K, Kaplanis I, Korou E, Nikolaou M, Marathonitis G, et al. Connection between telomerase activity in PBMC and markers of inflammation and endothelial dysfunction in patients with metabolic syndrome. 2012;PLoS ONE 7:e35739.
 130. Lopez-Diazguerrero NE, Pirez-Figueroa GE, Martinez-Garduno CM, Alarcon-Aguilar A, Luna-Lopez A, Gutierrez-Ruiz MC, et al. Telomerase activity in response to mild oxidative stress. *Cell Biol. Int.* 2012; 36:409–413.

131. Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows down telomere shortening. *J. Biol. Chem.* 2003;278:6824-6830.
132. Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J. Cell Sci.* 2008;121:1046–1053.
133. Münzel T, Gori T, Keaney JF, Jr Maack C, Daiber A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implication. *Eur Heart J.* 2015;36:2555-2564.
134. Simons FE, Gu X, Simons KJ. Epinephrine absorption in adults: intramuscular versus subcutaneous injection. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(5):871-873.
135. Tousson E, El-Moghazy M, Massoud A, El-Atrash A, Sweef O, Akel A. Physiological and biochemical changes after boldenone injection in adult rabbits. *Toxicology and industrial health.* 2016;32:177-182.
136. Vasilaki F, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Germanakis I, Tzardi M, Kavvalakis M. Cardiotoxicity in rabbits after long-term nandrolone decanoate administration. *Toxicology letters* 2016;24:143-151.
137. Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Karbalay-Doust S, Noorafshan A. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *Micron.* 2006; 40:226-230.
138. Shahraki MR, Mirshekari H, Shahraki AR. Chronic Administration of High Doses of Nandrolone Decanoate on the Pituitary-Gonadal Axis in Male Rats. *Int J High Risk Behav Addict.* 2015;15,4(3):e24419.
139. Frankenfeld SP, Oliveira LP, Ortenzi VH, Rego-Monteiro IC., Chaves EA, Ferreira AC, et al. The anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate disrupts redox homeostasis in liver, heart and kidney of male Wistar rats. *PLoS One.* 2014;16:9(9).
140. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free radical biology & medicine.* 2014;66:75-87.
141. Piccolomini AF, Iskandar MM, Lands LC, Kubow S. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food & nutrition research.* 2012;56:17549.

Παραρτήματα

Π1. Λίστα συντμήσεων

Π2. Λίστα πινάκων

Π3. Λίστα εικόνων

Π4. Λίστα σχημάτων

Π1. Λίστα συντμήσεων

A-Z	
ALP	Alkaline Phospatase
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
BNP	B-type Natriuretic Peptide
CG	Chorionic Gonadotropin
CI	Chemical Ionization
CpK	Creatinine kinase
DHT	Dihydrotestosterone
DLI	Direct Liquid Intoduction,
EI	Electron Impact
EPO	Erythropoietin
ESI	Electrospray Ionization
ESI	Electro – Spray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
FD	Field Desorption
FI	Field Ionization
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GSH	Glutathione reduced
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
HDIM	High dose Intramuscular
HDL	High Density Lipoprotein
HDSC	High Dose Subcutaneous
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

IAAF	International Association of Athletics Federations
IGF	Insulin Growth Factor
IOC	International Olympic Committee
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDH	Lactate Dehydrogenase
LDIM	Low dose Intramuscular
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinizing Hormone
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
LV	Left Ventricular
MALDI	Matrix-Assisted Desorption/Ionization,
MDA	MalonDiAldehyde
MPI	Myocardial Performance Index
MS	Mass Spectrometry
N.A.D.O	National-Anti-Doping-Organizations
NOS	Nitrogen reactive Oxygen Species
PB	Particle Beam
PD	Plasma Desorption
PW	Pulsed Wave Doppler
ROS	Reactive Oxygen Species
SARMs	Selective Androgen Receptor Modulators
SERMs	Selective Estrogen Receptor Modulators
SGOT	Serum Glutamyl Oxaloacetic Transaminase
SGPT	Serum Glutamic Pyruvic Transaminase
SOD	Superoxide Dismutase

TAC	Total Antioxidant Capacity
TBARS	ThioBarbituric Acid Reactive Substances
TDI	Tissue Doppler Imaging
THP	Thermo – Spray
WADA	World-Anti-Doping-Agency
γGT	Gamma Glutamyl Transferase
NO	Nitrogen Monoxide
ΑΑΣ	Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή
Ε.Σ.Κ.Α.Ν	Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης του Ντόπινγκ
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΠΑΓΝΗ	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
8-OH-dG	8-Oxo-2'-deoxyGuanosine
19-NE	19-Noretiocholanolone
19-NA	19-Norandrosterone

Π2. Λίστα πινάκων

<u>Πίνακας 1:</u>	Ιστορική αναδρομή με τα σημαντικότερα γεγονότα ντόπιγγκ
<u>Πίνακας 2:</u>	Δομές ορισμένων ΑΑΣ
<u>Πίνακας 3:</u>	Διάκριση αντιδράσεων φάσης I και II
<u>Πίνακας 4:</u>	Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα ΑΑΣ
<u>Πίνακας 5:</u>	Περιπτώσεις ξαφνικών θανάτων συσχετιζόμενων με χρήση ΑΑΣ
<u>Πίνακας 6:</u>	Μέσο βάρος ζώων ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης, μέσο βάρος καρδιάς ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης και λόγος αυτών
<u>Πίνακας 7:</u>	Μέσο βάρος ζώων ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης, μέσο βάρος νεφρών ανά ομάδα και ανά περίοδο χορήγησης και λόγος αυτών
<u>Πίνακας 8:</u>	Χρόνοι ανάσχεσης και ιόντα των υπό προσδιορισμό ουσιών
<u>Πίνακας 9:</u>	Γραμμικότητα μεθόδου ανάλυσης ούρων
<u>Πίνακας 10:</u>	Γραμμικότητα μεθόδου ανάλυσης τρίχας
<u>Πίνακας 11:</u>	LOD και LOQ των αναλυτικών μεθόδων των ούρων και της τρίχας
<u>Πίνακας 12:</u>	Μέση ανάκτηση μεθόδων ούρων και τρίχας
<u>Πίνακας 13:</u>	Μέση συγκέντρωση 19-NE και 19-NA σε δείγματα ούρων προερχόμενα από τα πειραματόζωα
<u>Πίνακας 14:</u>	Μέση συγκέντρωση νανδρολόνης σε δείγματα τρίχας προερχόμενων από πειραματόζωα
<u>Πίνακας 15:</u>	Αποτελέσματα δεικτών υπερηχογραφικού ελέγχου στην περίοδο χορήγησης
<u>Πίνακας 16:</u>	Αποτελέσματα δεικτών υπερηχογραφικού ελέγχου στην περίοδο αποτοξίνωσης
<u>Πίνακας 17:</u>	Ιστοπαθολογικά ευρήματα των δειγμάτων καρδιάς
<u>Πίνακας 18:</u>	Ιστοπαθολογικά ευρήματα των δειγμάτων νεφρών
<u>Πίνακας 19:</u>	Αποτελέσματα βιοχημικών δεικτών
<u>Πίνακας 20:</u>	Δείκτες οξειδωτικού στρες στους νεφρούς

Π2. Λίστα εικόνων

- Εικόνα 1:** Αναλυτικά αποτελέσματα συγκεκριμένων αναβολικών στεροειδών από τα διαπιστευμένα αντι-ντόπινγκ εργαστήρια
- Εικόνα 2:** Δομή της καρδιάς
- Εικόνα 3:** Δομή του νεφρού
- Εικόνα 4:** Δράση της τελομεράσης
- Εικόνα 5:** Γραμμικός τετραπολικός αναλυτής
- Εικόνα 6:** Σύστημα LC/MS
- Εικόνα 7:** Ανατομία τρίχας
- Εικόνα 8:** Φυσιολογικός καρδιακός ιστός της ομάδας ελέγχου (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)
- Εικόνα 9:** Φλεγμονή του καρδιακού ιστού στην ομάδα HDSC (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)
- Εικόνα 10:** Ίνωση του καρδιακού ιστού στην ομάδα HDIM (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)
- Εικόνα 11:** Φλεγμονώδεις διηθήσεις, οίδημα και ίνωση του καρδιακού ιστού στις ομάδες HD (Masson Trichrome)
- Εικόνα 12:** Ίνωση του καρδιακού ιστού στις ομάδες HD (Masson Trichrome)
- Εικόνα 13:** Φυσιολογικός νεφρικός ιστός από την ομάδα ελέγχου (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)
- Εικόνα 14:** Εστιακή ίνωση και ήπια φλεγμονή του νεφρικού ιστού στην ομάδα HDIM (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)
- Εικόνα 15:** Αγγειακή συμφόρηση στην ομάδα HDSC (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)
- Εικόνα 16:** Ίνωση και αγγειοβρίθεια στον νεφρικό ιστό της ομάδας HDSC (ηωσίνη-αιματοξυλίνη)

Π4. Λίστα σχημάτων

- Σχήμα 1:** Δομή τεστοστερόνης
- Σχήμα 2:** Δομικές τροποποιήσεις της τεστοστερόνης
- Σχήμα 3:** Μηχανισμός δράσης των ΑΑΣ
- Σχήμα 4:** Πιθανές αντιδράσεις των φάσεων I και II του μεταβολισμού των ΑΑΣ
- Σχήμα 5:** Ο μεταβολισμός της τεστοστερόνης
- Σχήμα 6:** Δομή νανδρολόνης
- Σχήμα 7:** Μεταβολισμός νανδρολόνης
- Σχήμα 8:** Διάγραμμα πειραματικής πορείας
- Σχήμα 9:** Σύγκριση MPI στην ομάδα ελέγχου και στα πειραματόζωα που έλαβαν νανδρολόνη
- Σχήμα 10:** Σύγκριση Index Myocardial Mass (MMODE) στην ομάδα ελέγχου και στα πειραματόζωα που έλαβαν νανδρολόνη
- Σχήμα 11:** Σχετική ενεργότητα τελομεράσης στα δείγματα καρδιάς
- Σχήμα 12:** Σχετική ενεργότητα τελομεράσης στα δείγματα νεφρού
- Σχήμα 13:** Δείκτες οξειδωτικού στρες στην καρδιά