Krvni doping

Rožmanić, Carmen

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:387315

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO- MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

KRVNI DOPING

BLOOD DOPING

SEMINARSKI RAD

Carmen Rožmanić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor : doc. dr. sc. Zoran Tadić

Zagreb, 2015.

Sadržaj

1 Uvod 3

2 Krvna transfuzija 3

2.1 Kratka povijest krvne transfuzije 4

2.2 Testovi za otkrivanje krvne transfuzije 5

2.2.1 Testovi za otkrivanje homologne transfuzije 5

2.2.2 Testovi za otkrivanje autologne transfuzije 8

3 Druge tehnike krvnog dopinga 10

3.1 Eritropoetin 10

3.1.1 Testovi za otkrivanje eritropoetina 11

3.2 Tvari koje stimuliraju eritropoezu, a nisu srodne EPO 13

4 Zaključak 14

5 Literatura 15

6 Sažetak 16

7 Summary 16

1 Uvod

Želja za boljim rezultatom, slavom, osjećajem ponosa i financijskom dobiti godinama tjera sportaše da teže boljem, višem i jačem. No ponekad same pripreme i vježba nisu dovoljne pa se sportaši okreću zabranjenim načinima postizanja boljeg rezulata. Jedan od zabranjenih načina poboljšanja sportske izvedbe je i krvni doping. Krvni doping je sve ono čime sportaši povisuju cirkulirajuću razinu hemoglobina u krvi**,** čime se postiže povećani aerobni kapacitet i povećava dostupnost kisika mišićima. U krvni doping spadaju krvna transfuzija, tvari koje stimuliraju eritropoezu, nosači kisika slični hemoglobinu, prirodne ili umjetne visinske pripreme i inovativne genske terapije (Lippi i Banfi, 2006). Naime, na visokim nadmorskim visinama tlak zraka je niži te organizam u nedostatku kisika proizvodi više eritrocita. Sportaši koji neko vrijeme, neposredno prije natjecanja, borave na visokim nadmorskim visinama u prednosti su pred ostalima natjecateljima koji su iste pripreme odradili na nižim nadmorskim visinama. Kako bi otkrili tragove krvnog dopinga u tijelu sportaša, Međunarodni olimpijski odbor i Svjetska antidoping organizacija (WADA) pokušavaju osmisliti nove i unaprijediti stare testove. Dok se neke tehnike dopinga otkrivaju lakše**,** za neke, poput autologne transfuzije, testovi su još uvijek u procesu otkrivanja.

2 Krvna transfuzija

Već je od ranih 1960-ih godina poznato da povećani dovod količine kisika u mišićno tkivo znatno poboljšava sportaševu izvedbu i povećava mu izdržljivost. Proces umjetnog povećavanja koncentracije kisika koja dolazi u mišiće poznat je pod nazivom inducirana eritrocitemija, krvni *boosting* ili krvni doping i sastoji se od tehnika koje uvećavaju masu eritrocita, koja onda osigurava povećani prijenos kisika u mišiće i tako povećava izdržljivost. Eritrocitemija inducirana infuzijom 400-920 ml eritrocita efektivno povećava kapacitet u dugoprugaškim trkačkim disciplinama, kao posljedica povećanog dovoda kisika u radne mišiće (Lippi i Banfi, 2006). No, krvna transfuzija nije osmišljena kako bi sportaši varali na natjecanjima**,** već se izvorno počela koristiti za liječenje teških slučajeva akutne i kronične anemije. Pacijenti oboljeli od anemije imaju prirodno smanjenu mogućnost prijenosa kisika u krvi pa se ovim metodama liječenja pacijentima poveća kapacitet kisika koji se može prenostit krvlju.

Tradicionalna procedura za autolognu krvnu transfuziju je uzimanje 450 – 1800 ml krvi nekoliko tjedana prije natjecanja kako bi se uspostavila početna razina eritrocitne mase. Uzeta krv se odmah centrifugira i komponente plazme se vrate donoru,a stanični elementi (primarno eritrociti) se ohlade na 4°C ili zalede na -80°C. Tako pohranjeni eritrociti se reinfuziraju sportašu 1-7 dana prije natjecanja (Lippi i Banfi, 2006).

2.1 Kratka povijest krvne transfuzije

Najraniji dokaz o poboljšanom sportskom nastupu nakon krvne transfuzije zabilježen je 1947.godine, ali je prvi dokaz o krvnom dopingu zabilježen kasnije, 1972. godine kod finskog sportaša Lasse Virena, osvajača zlatne medalje na 5 000 i 10 000 metara na Olimpijskim igrama u Münchenu (Pottgiesser i Schumacher, 2013). Ova tehnika dopinga bila je iznimno popularna tijekom 1980-ih, za vrijeme Olimpijskih igara 1980. i 1984.godine, a koristili su je atletičari dugoprugaši, biciklisti i skijaši. Iako pouzdani test za otkrivanje krvne transfuzije tada nije postojao, Međunarodni olimpijski odbor je 1986. službeno zabranio krvni doping. Usporedno s korištenjem transfuzije razvijale su se i ostale tehnike povećanja krvnog kapaciteta za prijenos kisika, kao što su tvari koje stimuliraju eritropoezu koje su bile popularne 1990-ih. Nekoliko godina kasnije, nakon provedbe pouzdane strategije za otkrivanje dopinga pomoću rekombinantnog eritropoetina i njegovih analoga, krvna transfuzija se vratila 2002. godine na Olimpijskim igrama u Salt Lake Cityju, kada je diskvalificiran veliki broj skijaša, i 2004. kada su suspendirani profesionalni biciklisti koji su umalo umrli nakon što im je bila unesena loše pohranjena krv (Lippi i Banfi, 2006). Od tada Međunarodni olimpijski odbor i Svjetska antidoping organizacija (WADA) rade na stvaranju boljih tehnika za otkrivanje krvnog dopinga.



Slika 1. Biciklist (http://bostinno.streetwise.co/2014/07/09/tour-de-boston-at-these-x-indoor-cycling-studios/)

2.2 Testovi za otkrivanje krvne transfuzije

Korištenjem krvnog dopinga sportaši svoje tijelo stavljaju u veliki rizik. Pretjerana zlouporaba krvnog dopinga može dovesti do vrlo teških poremećaja. Kod teških tjelesnih napora kojima su podvrgnuti sportaši, povećanje hematokrita mijenja hemodinamična svojstva krvi. Krv postaje viskozna i zbog gubitka velike količine vode uslijed dehidratacije tijekom natjecanja i pretjerano opterećenje srca može dovesti do infarkta miokarda, moždanog udara i plućne embolije (Husnjak i Zorc, 2006). Testiranje krvi sportaša uvedeno je prvenstveno iz medicinskih razloga, kako bi ograničilo zlouporabe droga i drugih zabranjenih supstanci za umjetno povećanje kapaciteta za prijenos kisika i kako bi se osigurali pošteni i ravnopravni uvjeti natjecanja. Prvi testovi za doping nisu bili dovoljno precizni, jer su se morali oslanjati na umjetno određene proizvoljne pragove hematokrita i/ili hemoglobina. Tako su sportaši čiji su krvni testovi pokazali vrijednosti hemoglobina iznad 175 g/l za muškarce i 155 g/l za žene (Međunarodna skijaška federacija), a hematokrit u vrijednosti iznad 0,5 za muškarce i 0,47 za žene, s retikulocitima manjim od 2% (Međunarodna biciklistička unija) dobili zabranu nastupa na službenim natjecanjima. No, zbog mnogih nedostataka ovaj sustav otkrivanja dopinga je napušten, a razlozi uključuju teško tumačenje hematoloških parametara koji su posljedica široke individualne varijabilnosti i moguće pojave lažno pozitivnog testa zbog kojeg bi kaznili sportaše s prirodno povećanim vrijednostima (Lippi i Banfi, 2006). Ove zamke su ponukale znanstvenu zajednicu na razvoj prikladnije i sofisticiranije strategije za otkrivanje krvnog dopinga.

2.2.1 Testovi za otkrivanje homologne transfuzije

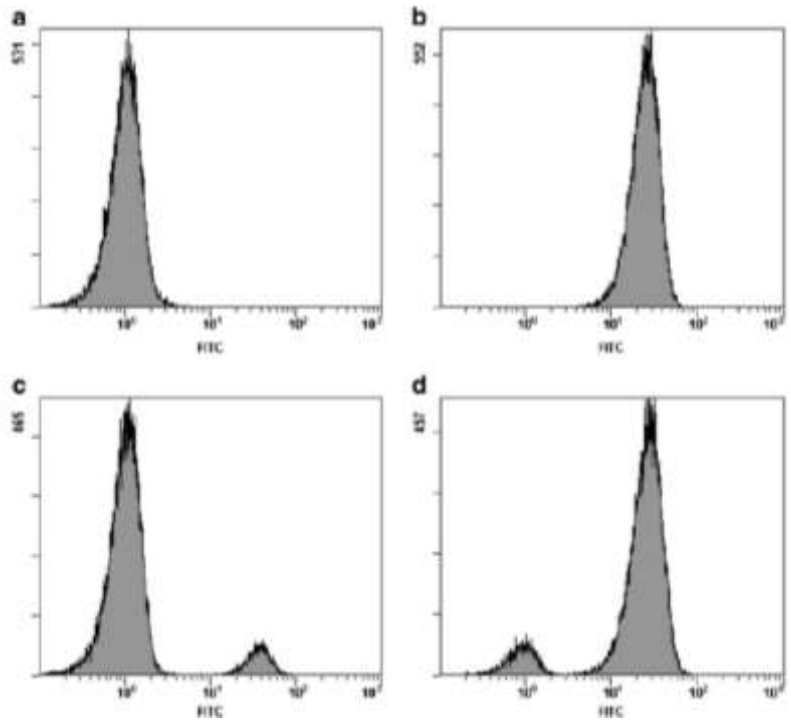
Trenutno dostupna metoda za otkrivanje homologne (alogeničke) transfuzije krvi temelji se na razlikama između eritrocita donatora i primatelja. Eritrociti su krvne stanice koje na svojoj površini imaju različite oligosaharide koji se razlikuju po svojoj biokemijskoj strukturi. Antigenski uzorak stanica je genetski kontroliran i eritrociti svakog pojedinca imaju identičan spektar antigena. Otkrivanje mješovite populacije eritrocita gdje je jedna populacija od primatelja a druga od donora ukazuje na homolognu transfuziju (Segura, Ventura i Pascual, 2011).

Danas se za otkrivanje transfuziranih eritrocita koristi precizna i visoko osjetljiva metoda protočne citometrije i enzimski antiglobinski test (*enzyme-linked antiglobulin test*).

Nekoliko je razloga zašto se upravo eritrociti koriste za otkrivanje transfuzije. Eritrociti, za razliku od drugih krvnih stanica, na svojoj površini imaju dobro poznate antigene koje prepoznaju specifična aloantitijela, imaju najduži životni vijek koji traje 110-120 dana, tako da se nakon transfuzije mogu otkriti 3-4 mjeseca i mogu se čuvati zamrznuti neodređeno vrijeme, a na rekonstituciji će ostati prikladni za protočnu citometriju. Smrznuti primjerci se mogu čuvati za dodatna ispitivanja, ukoliko se otkriju nove tehnike za proučavanje eritrocita (Arndt i Kumpel, 2008).

Glavna tehnika za otkrivanje homologne transfuzije je protočna citometrija, koja je za otkrivanje dopinga u sportu prvi puta korištena 2004. godine na Olimpijskim igrama u Ateni (Arndt i Kumpel, 2008). Protočna citometrija koristi standardne antiserume krvnih banaka, kombinirane s fluorescentno obilježenim sekundarnim antitijelima. Ova tehnika omogućuje otkrivanje malih populacija stanica (manjih od 5%) koje se razlikuju u barem jednom antigenu (Lippi i Banfi, 2006). Transfuzija jedne jedinice krvi rezultira pojavom 10% eritrocita donora u krvi primaoca**,** uz pretpostavku da je ukupni volumen krvi jednak pet litara. Prilikom homologne transfuzije, krv koja se donira mora biti kompatibilna u pogledu ABO krvnog sistema i Rh faktora, kao i kod normalne transfuzije, dok su ostale antigenske grupe zanemarive, jer njihovo miješanje neće izazvati zdravstvene poteškoće. Trenutno je poznato i opisano oko 300 antigena krvnih grupa. Najkorisniji antigeni u otkrivanju mješovite stanične populacije eritrocita su oni s umjerenom frekvencijom u populaciji, dok antigeni s visokom (prisutni u više od 99% pojedinaca) ili s niskom frekvencijom (odsutni u više od 99% pojedinaca) nisu informativni. Postupak mjerenja je prvi put opisan s dvanaest antigena (antigeni C, C, E, E, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, S i e), ali je kasnije usavršen, pa se broj antigena smanjio na osam (Pottgiesser i Schumacher, 2013).

Eritrociti koji posjeduju promatrani antigen, daju visoki fluorescentni signal koji ovisi prvenstveno o količini tog antigena na eritroctima, razrjeđenju antitijela i korištenom fluorokromu. Kada je ekspresija antigena slaba, broj veznih mjesta za protutijela je nizak i to dovodi do niske razine fluorescencije (sl. 2) (Segura i sur., 2011).



Slika 2. Uzorci eritrocita su se pomiješali s anti-Jka antitijelima i mješavinom FITC sekundranih antitijela za proučavanje prisutnosti antigena Jka i dobiveni su sljedeći rezultati: a jedinstvena eritrocitna populacija bez ekspresije, b jedinstvena eritrocitna populacija s Jka antigenom, c miješana eritrocitna populacija: glavna eritrocitna populacija bez ekspresije i manja populacija s ekspresijom (dva pika ukazuju na miješanu populaciju eritrocita), d glavna eritrocitna populacija s eskpresijom i manja bez ekspresije antigena. Preuzeto iz Pottgiesser i Schumacher, 2013

Kod rada s protočnom citometrijom treba izbjegavati aglutinaciju, jer se svaka stanica mora analizirati pojedinačno, pa se najčešće koriste primarna antitijela klase IgG koja ne mogu aglutinirati eritrocite. Fluorokromi koji se najviše koriste za označavanje sekundarnih protutijela su fikoeritrin (PE) i fluorescein izotiocijanat (FITC) koji emitira manje intenzivnu fluorescenciju u odnosu na PE. Nedostaci ovog postupka su uporaba krvi donora s istim antigenskim profilom kao i primatelja, iako je vjerojatnost istog donora niska, te postojanje pojedinaca sa prirodno miješanom populacijom eritrocita, što je posljedica hematopoetskog kimerizma. Serijsko testiranje jednostavno omogućuje otkrivanje razlike između prolazne (homologna transfuzija krvi) i trajne (kimerizam) situacije. Krvni kimerizam može biti dokazan i DNA analizom (Segura i sur., 2011).

2.2.2 Testovi za otkrivanje autologne transfuzije

Autologna transfuzija krvi je metoda dopinga koju je najteže otkriti, jer sportaš koristi vlastitu krv koja sadrži eritrocite s istim antigenima na površini. Ovakve eritrocite je nemoguće razlikovati od ostalih eritrocita u tijelu sportaša metodama koje se koriste za detekciju homologne transfuzije (Segura i Lundby, 2014).

2.2.2.1 Krvni testovi

Vađenje krvi je postupak koji sam po sebi uzrokuje promjenu eritropoetskih biljega. Kad se pohranjena krv kasnije vrati, ona ostavlja karakterističan trag parametara krvi. Ovaj pristup osigurava temelj za otkrivanje krvnog dopinga pomoću ABP-a (*Athlete Biological Passport*). Hematološki modul ABP-a koristi krvne biljege za identifikaciju svake promjene u eritropoezi. Parametri koji se promatraju u trenutnoj verziji po WADA- i su HCT, Hb, broj eritrocita, postotak retikulocita (RET%), srednji korpuskularni volumen (MCV), srednji korpuskularni hemoglobin (MCH) i korpuskularna koncentracija hemoglobina (MCHC) (Pottgiesser i Schumacher, 2013). Glavna teorija ovog koncepta je da svaki sportaš daje pojedinačne referentne vrijednosti koje omogućuju dugoročnu analizu primjenom različitih algoritama. Hematološki modul ABP-a omogućava identifikaciju naglih promjena hematoloških parametara koji se mijenjaju prilikom krvne transfuzije. Ključ ABP-a je individualna longitudinalna evaluacija hematoloških parametara pomoću kojih se može otkriti manipulacija eritropoeze. Određene su vrijednosti koje se ne smiju prijeći i uzimanje, transport i analiza uzoraka moraju pratiti specifične protokole. Ukoliko vrijednosti uzorka dobivene analizom sportaševe krvi prelaze određene granice, sportaša se sumnjiči za doping (Segura i Lundby, 2014).

Osim ABP metode postoje nove teorije koje bi mogle biti budućnost otkrivanja autologne transfuzije. Proučavajući ekspresije T limfocita prije i poslije autologne transfuzije pakiranih eritrocita (skladištenih 35 dana na 4°C) uočene su promjene ekspresije 90% više od 700 gena u 72 - 96 sati nakon transfuzije. Transfuzija stvara imunosni odgovor u T stanicama primatelja na staničnoj i molekularnoj razini jer utječe na gene koji su uključeni u aktivaciju limfocita, regulaciju endocitoze i površinskih receptora, imunološkog odgovora i procesa

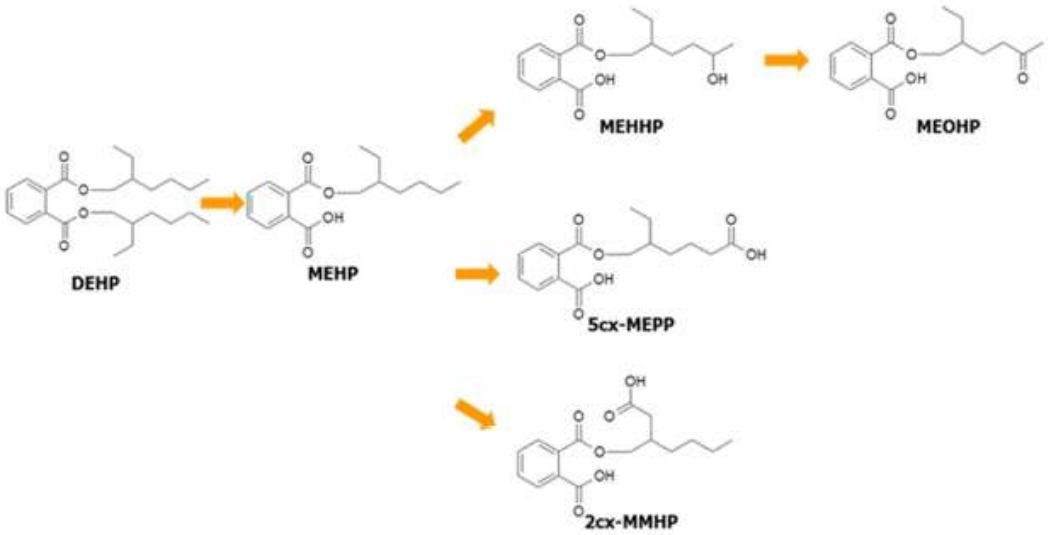
apoptoze. Pretpostavlja se da su ovi procesi odgovor na naglo izlaganje staničnim ostacima uzrokovano transfuzijom krvi (Mørkeberg, 2012). Mana ovog pristupa je osjetljivost T limfocita na biološke procese hemolize i infekcije koji mogu prouzročiti slične odgovore. Druga teorija se temelji na proučavanju micro RNA (miRNA), malih nekodirajućih RNA koje su značajne u transkripcijskoj i posttranskripcijskoj regulaciji genske ekspresije. Slobodne miRNA u krvi se mogu koristiti kao specifični i osjetljivi indikatori različitih fizioloških procesa i bolesti. Profili cirkulirajuće miRNA su se mijenjali nakon transfuzije autologne krvi, pa ti rezultati daju temelj za razvoj detekcije autologne transfuzije pomoću kombinacije hematoloških i genomskih biomarkera (Segura i Lundby, 2014).

Tako i sama veličina i oblik eritrocita mogu biti dokaz o krvnoj transfuziji. Eritrociti koji su bili pohranjeni nakon transfuzije prošli su kroz vezikulaciju, pa se relativna veličina transfuziranih stanica promijenila u odnosu na normalne. Koristeći kapilarnu elektroforetsku separaciju moguće je ustanoviti relativnu distribuciju veličine stanica u uzorku. Ovakvo odvajanje eritrocita omogućava brzu detekciju miješanih eritrocita. Efektivnost ove metode je dokazana i u uvjetima *in vitro* s krvnim uzorcima biciklista pomiješanim s pohranjenim eritrocitima. Pohranjeni eritrociti prolaze kroz razne fizičke i metaboličke promjene. Metaboličke promjene uključuju snižavanje pH, redukciju ATP-a i 2,3-difosfoglicerata i akumulaciju izvanstaničnog kalija, dok fizičke promjene uključuju gubitak membrane i promjene u obliku eritrocita, a dolazi i do gubitka određenih ugljikohidrata, proteina i membranskih lipida. Peroksiredoksin 2 (Prdx2) protein je u eritrocitima zdravih osoba smješten u citosolu, pa prisutnost Prdx2 u membrani može biti biomarker krvne transfuzije. Preliminarni rezultati su obećavali, no neki slučajevi su dokazali prisutnost Prdx2 i u membranama netransfuziranih eritrocita. Razni drugi proteini koji se nalaze u membrani, čija se brojnost ovisno o dužini pohrane može povećati odnosno smanjiti, mogu biti indikatori transfuzije. Ova istraživanja potvrđuju da se promjene proteoma mogu koristiti kao strategija za otkrivanje transfuzije (Segura i Lundby, 2014).

2.2.2.2 Testovi mokraće

Krv kao medij nije uvijek dostupna za testiranje pa se kao alternativa koristi mokraća. Tražeći indikatore autologne transfuzije u mokraći znanstvenici su nedavno otkrili povišenu razinu polivinil-klorida (PVC) od kojeg su izrađene vrećice za pohranu krvi i eritrocita.

Najkorišteniji plastifikator je di-2-etil-heksil-ftalat (DEHP). Prisutnost visoke količine metabolita DEHP (sl. 3) u mokraći potencijalni je indikator homologne i autologne krvne transfuzije. DEHP se upotrebljava kao aditiv u različitim plastičnim materijalima, pa je kao spoj ekološki sveprisutan i određena količina DEHP-a je prisutna u gotovo svakoj ljudskoj mokraći. Koncentracije DEHP metabolita su u početku istraživane kod tri skupine ispitanika: kontrolna skupina, sportaši i ispitanici koji primaju homolognu transfuziju krvi. Rezultati treće skupine ispitanika su pokazali značajno veće koncentracije DEHP metabolita nakon transfuzije krvi nego u normalno izloženih ispitanika i kod sportaša (Segura i sur., 2011).



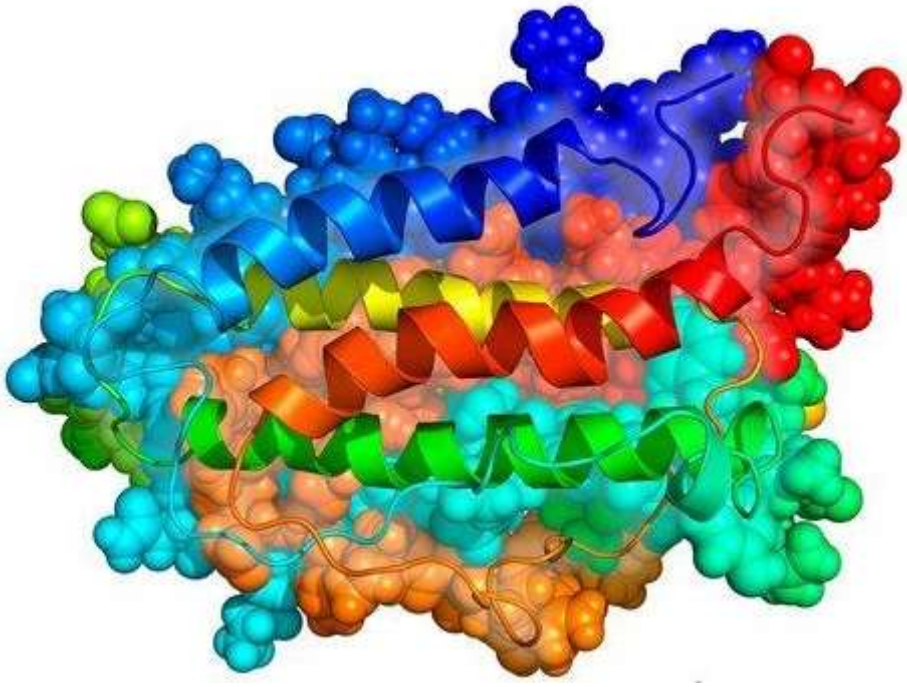
Slika 3. Metaboliti di-2-etil-heksil-ftalata (DEHP), preuzeto iz Segura i Lundby, 2014

3 Druge tehnike krvnog dopinga

3.1 Eritropoetin

Eritropoetin (EPO, Epo) je hematopoetski faktor rasta koji regulira eritropoezu stimulacijom proliferacije i diferencijacije nezrelih stanica eritrocitnog reda, a izlučuje se kao odgovor na hipoksiju u tkivima. Upotrebljava se u terapiji različitih vrsta anemija, prvenstveno u bubrežnih bolesnika na dijalizi i bolesnika s malignim bolestima. Prirodni eritropoetin je glikoprotein građen od približno 60 % proteina i 40 % ugljikohidrata (sl. 4). Relativna molekulska masa eritropoetina je 30 600 (Husnjak i Zorc, 2006)

EPO je prvi puta izoliran 1950-ih godina, umjetno je sintetiziran 1985., a stavljen je na svjetsko tržište između 1987. i 1989. Lako dostupan i iznimno učinkovit rekombinantni ljudski eritropoetin (rhEPO) 1990-ih godina masovno je korišten zbog svog iznimnog utjecaja na maksimalni unos kisika (povećanje 6-12%) (Pottgiesser i Schumacher, 2013).

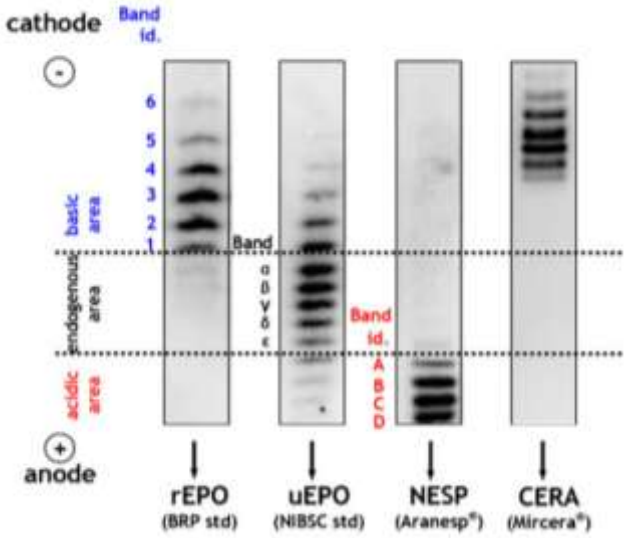


Slika 4 Kemijska struktura eritropoetina (http://erythropoietinproject.weebly.com/)

3.1.1 Testovi za otkrivanje eritropoetina

U početku testovi nisu mogli razlikovati prirodne (endogene) i umjetne (egzogene) rekombinantne verzije eritropoetina. Nakon nekoliko neuspješnih pokušaja, 2000. godine osmišljen je test za izravno otkrivanje rhEPO u urinu. Ovaj test oslanja se na razliku u glikozilaciji između endogene i egzogene EPO molekule, što je rezultiralo različitim karakteristikama pomicanja molekula tijekom izoelektričnog fokusiranja (IEF) (sl. 5). Rekombinantni EPO industrijski se proizvodi u bubrežnim stanicama ili stanicama jajnika hrčka. U DNA stanice hrčka se tehnologijom rekombinantne DNA ugrađuje nukleotidna sekvenca koja kodira stvaranje EPO i stvoreni EPO se pročišćava iz transgenih stanica. Zbog razlike u staničnim organelama nastaje mala posttranslacijska razlika u glikozilaciji između rhEPO (proizveden u stanicama hrčka) i endogenog EPO (nastao u stanicama ljudskog

bubrega), iako je sekvenca aminokiselina identična. RhEPO molekule imaju manji negativan naboj i zbog toga je pomicanje u električnom polju različito (Pottgiesser i Schumacher, 2013).



Slika 5. IEF različitih eritropoetina, rEPO (rekombinantni) i uEPO (endogeni standard), preuzeto iz Pottgiesser i Schumacher, 2013

Vrijeme u kojem se može otkriti rhEPO je relativno kratko i ovisi o doziranju i načinu primjene. Potkožne primjene kliničke doze rhEPO (npr. 50 IU/kg tjelesne težine) se mogu otkriti tijekom nekoliko dana, dok je intravensku primjenu i mikrodoziranje (500 IU) gotovo nemoguće izmjeriti, iako one stvaraju mjerljiv eritropoetski učinak. Kako bi zavarali testove i pomutili IEF sliku, sportaši danas koriste mješavine različitih rhEPO preparata, znajući da će tako stvoriti neobične obrasce koji će stvarati poteškoću u tumačenju nalaza, pa će test na rhEPO ostati negativan. Osim IEF metode postoji i SDS/SAR-PAGE (natrijev dodecil sulfat/sarkozil poliakrilamidni gel elektroforeza) metoda koja se oslanja na razliku u molekulskim masama različitih vrsta EPO, te je u stanju prepoznati različite rhEPO varijante. rhEPO je jedan od komercijalno najuspješnijih lijekova razvijenih tijekom posljednjih desetljeća, pa su po njegovom uzoru stvoreni mnogi slični preparati koji se zbog različitih molekulskih masa lako detektiraju pomoću istog SDS-PAGE testa (Pottgiesser i Schumacher, 2013).

3.2 Tvari koje stimuliraju eritropoezu, a nisu srodne EPO

Razvojem lijekova za liječenje anemije razvijaju se i nove vrste krvnog dopinga, ponajprije različite vrste tvari koje nisu srodne EPO, ali imaju isti učinak. To su uglavnom lijekovi koji su još uvijek u razvoju i tek prolaze klinička ispitivanja, što ih čini posebno opasnima za zdravlje onoga koji ih uzima. Jedan on najpoznatijih je peptid peginesatid koji strukturalno ne sliči eritropoetinu, ali je sposoban direktno inducirati eritropoezu. Peginesatid je donedavno imao odobrenje FDA (US Food and Drug Administration) i prodavao se kao lijek pod nazivom Omontys. Međutim, nakon reakcija preosjetljivosti koje su rezultirale smrću, lijek je povučen s tržišta u veljači 2013. Drugi način povećanja količine eritrocita je i stvaranje fuzijskih proteina. Takvi proteini imaju osobitosti oba gena od kojih potiču. U istraživanju EPO, stvoreni su fuzijski proteini koji pokazuju eritropoetski kapacitet. Postoji i nekoliko znanstveno dokazanih metoda o uspješnom transferu EPO gena preko virusnog vektora u mišićnu ili dermalnu stanicu. Tehnika je pokazala pouzdan porast svih eritropoetskih biljega (Lippin i sur., 2005).

Hipoksija inducibilni faktor (HIF) α1 je regulator EPO signala u organizmu. U normalnim uvjetima ovaj se protein odmah degradira djelovanjem prolil hidroksilaze, dok hipoksija inhibira sintezu prolil hidroksilaze, pa se inducira transkripcija eritropoetina, koji onda stimulira eritropoezu. Terapeutske strategije koje ublažavaju simptome anemije inhibiraju prolil hidroksilazu, pa se HIF1α ne razlaže. Slične tvari koje djeluju na ovom principu se razvijaju i trenutno su na stupnju kliničkih ispitivanja. Genska ekspresija EPO regulira se transkripcijskim faktorima kao što su GATA proteini, koji se vežu na određene sekvence EPO genskog promotora i inhibiraju transkripciju, pa negativno utječu na slijed reakcija koje potiče EPO, a njihova aktivnost može biti izmijenjena pomoću GATA inhibitora. Pošto većina ovih tvari nije prirodno prisutna u tijelu, njihovo otkrivanje nije problematično. EPO genski transfer se također može otkriti, jer se EPO iz transferiranog gena razlikuje od endogenog, pošto nisu nastali u istim stanicama. Endogeni EPO se stvara u fibroblastu bubrega, dok se EPO geni najčešće ubrizgavaju u mišićne stanice, pa se stvaraju male razlike u glikolizaciji tj. u molekulskoj masi (Pottgiesser i Schumacher, 2014).

4 Zaključak

Kako bi se očuvao integritet natjecanja i zdravlje sportaša, doping u sportu je zabranjen. Krvni doping uključuje bilo kakav postupak kojim se povećava količina kisika koju nosi krv i koristi se kao pomoć u aerobnim sportovima. Već je 1988. godine dokazano da povećana cirkulirajuća koncentracija kisika u krvi poboljšava sportaševu izvedbu (Berglund i sur., 1989). Krvna transfuzija i različite tvari za stimuliranje eritropoeze glavni su parametri krvnog dopinga. Kako se tehnike za otkrivanje dopinga unaprjeđuju, tako i sportaši unaprjeđuju načine varanja, pa se neprestano odvija utrka između sportaša i organizacije za borbu protiv dopinga. Posljednjih se godina, nakon otrkića tehnike za otkrivanje eritropoetina u tijelu, sportaši vraćaju starim metodama dopinga kao što je transfuzija. Transfuzija se koristila u samim početcima, ali je zabranjena 1986. pa je pala u zaborav otkrićem rhEPO (humanog rekombinantnog eritropetina) koji je imao izniman učinak i bio komercijalno dostupan. EPO je ubrzo postao lagan za otkrivanje metodom izoelektričnog fokusiranja (IEF) koja radi na principu razlike u glikozilaciji između endogene i egzogene EPO molekule. Homologna krvna transfuzija koja se otkriva pomoću protočne citometrije temelji se na otkrivanju mješovite populacije eritrocita, jednostavnija je za utvrđivanje od autologne kod koje se eritrociti ne mogu razlikovati na temelju razlike u antigenima. Pri radu s protočnom citometrijom treba biti pažljiv u odabiru odgovarajućih antitijela (Arndt i Kumpel, 2008). Postoji mogućnost da sportaš koristi krv s eritrocitima koji imaju iste antigene na površini, pa je otkrivanje takve transfuzije jednako otkrivanju autologne. Za otkrivanje autologne transfuzije ne postoji izravna metoda pa se koriste neizravne, poput ABS-a, proučavanje razlike u veličini i obliku eritrocita, proteinima, miRNA, ekspresiji T limfocita, no osim krvnih analiza, koje nisu uvijek moguće za provedbu, analiza mokraće može biti vrlo učinkovita u otkrivanju transfuzije. Indikatori transfuzije u mokraći su povišene razine polivinil klorida i njegovih metabolita (pogotovo metabolita DEHP) koji su sastavni dio vrećica u koje se pohranjuju eritrociti. Velika se pažnja pridaje ABS-u koji pruža najbolji uvid u sportaševu krvnu sliku kroz duži period i to daje podlogu za detekciju anomalija, pa se sportaši sa sumnjivim rezultatima mogu detaljnije pratiti. No i ova metoda ima manu, jer sportaš s abnormalnim vrijednostima može imati takve vrijednosti zbog treninga na višoj nadmorskoj visini (Segura i Lundby, 2014). Antidoping kontrola ima dobre temelje i nastavit će se razvijati, a cilj je pronalazak metode za brzo, efikasno i izravno otkrivanje krvnog dopinga.

5 Literatura

Arndt, P. A., Kumpel, B. M. (2008): Blood doping in athletes - Detection of allogeneic blood transfusions by flow cytofluorometry. American Journal of Hematology, **83(8)**: 657–667.

Berglund, B., Birgegård, G., Wide, L., Pihlstedt, P. (1989): Effects of blood transfusions on some hematological variables in endurance athletes. Medicine and Science in Sports and Exercise **21(6)**: 637-642.

Husnjak, I., Zorc, B. (2006): Eritropoetin, Farmakološki Glasnik **62**: 249-254.

Lippi, G., Banfi, G. (2006): Blood transfusions in athletes. Old dogmas, new tricks. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **44(12)**: 1395–1402.

Lippin, Y., Dranitzki-Elhalel, M., Brill-Almon, E., Mei-Zahav, C., Mizrachi, S., Liberman, Y., Iaina, A., Kaplan, E., Podjarny, E., Zeira, E., Harati, M., Casadevall, N., Shani, N., Galun, E. (2005): Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. Blood **106(7)**: 2280–2286.

Mørkeberg, J. (2012): Detection of Autologous Blood Transfusions in Athletes: A Historical Perspective. Transfusion Medicine Reviews **26(3)**: 199–208.

Pottgiesser, T., Schumacher, Y. O. (2013): Current strategies of blood doping detection Anti-doping Analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry **405(30)**: 9625–9639.

Segura, J., Lundby, C. (2014): Blood doping: potential of blood and urine sampling to detect autologous transfusion. British Journal of Sports Medicine **48(10)**: 837–841.

Segura, J., Ventura, R., Pascual, J. A. (2011): Current strategic approaches for the detection of blood doping practices. Forensic Science International **213(1-3)**: 42–48.

6 Sažetak

Krvni doping uključuje sve nedopuštene tehnike kojima se povećava dovod kisika u mišiće. To su krvna transfuzija, uzimanje tvari koje stimuliraju eritropoezu ili nosača kisika sličnih hemoglobinu, prirodne ili umjetne visinske pripreme i inovativne genske terapije. Krvna transfuzija se dijeli na homolognu, gdje primatelj dobiva eritrocite izolirane iz osobe donora, i autolognu, gdje su donor i primatelj eritrocita ista osoba. Otkrivanje krvnog dopinga temelji se na metodama protočne citometrije, ABP–u (*Athlete Biological Passport*), pronalasku povišene razine polivinil-klorida u mokraći, razlikama u veličini i obliku eritrocita, proteinima, miRNA i ekspresiji T limfocita. Cilj Svjetske antidoping organizacije i Međunarodnog olimpijskog odbora je usavršiti postojeće metode i pronaći nove koje će na što jednostavniji i ekonomičniji način otkriti korištenje krvnog dopinga.

7 Summary

Blood doping entails all illegal methods of increasing oxygen supply into the muscles. They include blood transfusion, use of substances that stimulate erythropoiesis or oxygen carrier substances similar to hemoglobin, natural or artificial high altitude training, and innovative gene therapy. Blood transfusion can be homologous, where the recipient receives erythrocytes isolated from a donor, or autologous, where the donor and the recipient of erythrocytes are the same person. Detection of blood doping is based on flow cytometry, ABP (Athlete Biological Passport), discovering elevated levels of polyvinyl-chloride in the urine, differences in the size and shape of erythrocytes, proteins, miRNA and expression of T lymphocytes. The goal of the World Anti-Doping Organization and the International Olympic Committee is to perfect the existing methods and develop new ones that will detect the use of blood doping in the simplest and most economical way.