

UDK 615.38:796

*Nina Đukanović, Visoka medicinska škola Milutin Milanković, Beograd, Srbija**Zoran Mašić,**Filip Radotić, Visoka škola za poslovnu ekonomiju i preduzetništvo, Beograd, Srbija**Žarko Kostovski, Fakultet za fizičku kulturu, Skoplje, Makedonija*

ERITROPOETIN KAO DOPING SREDSTVO

UVOD

Eritropoetin (EPO) je glikoproteinski hormon čija molekulska masa iznosi 30.400 Da, od čega 60% čini prosti polipeptidni lanac sa 165 aminokisjelina, a 40% su ugljeni hidrati. Glavno mjesto produkcije eritropoetina su tubulske intersticijske bubrežne ćelije, odnosno endotelne ćelije peritubulskih kapilara bubrega. Osim renalne produkcije, eritropoetin se dijelom stvara i u jetri (oko 10%), koja inače predstavlja primarni izvor eritropoetina u fetusu.

Istraživanja vezana za eritropoetin su pokazala cirkadijalni ritam oslobađanja ovog hormona sa minimalnim koncentracijama u 8h ujutru i maksimalnim vrednostima u 20h uveče.

FUNKCIJA I HOMEOSTAZA ERITROPOETINA

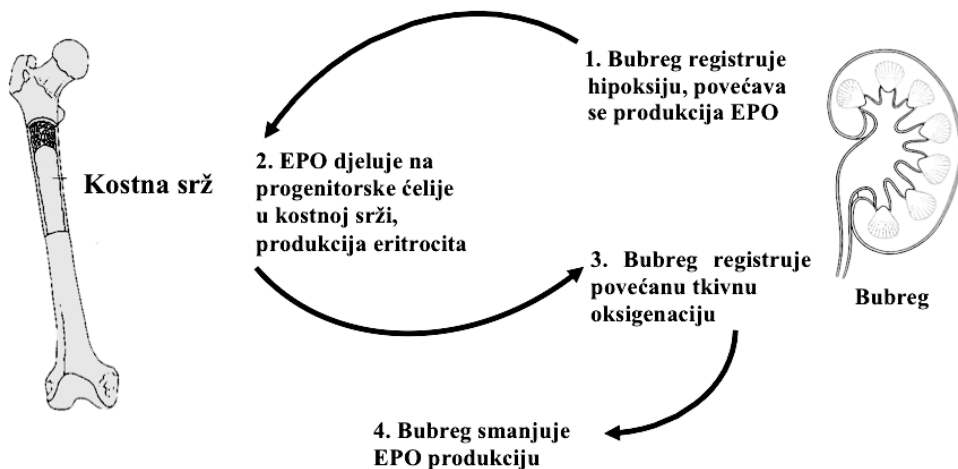
Osnovna uloga eritropoetina je regulacija procesa eritropoeze, tj. stvarnja crvenih krvnih zrnaca (eritrocita). Proces eritropoeze odvija se u više faza: faza diferencijacije, faza proliferacije, faza maturacije (sazrijevanja) i liberalizacija iz kostne srži u cirkulaciju, a stimulatívna uloga eritropoetina dokazana je na svim navedenim nivoima. U normalnim, fiziološkim, uslovima eritropoeza je strogo kontrolisana, tako da broj novonastalih ćelija odgovara broju nestalih ćelija (Steady-State).

Eritropoetin kao faktor rasta povezan sa drugim citokinima djeluje preko receptora povezanih sa tirozin kinazom, stimuliše produkciju proeritroblastu u kostnoj srži, odnosno razvoj eritrocita iz njihovih progenitorskih ćelija.

Fiziološki stimulus za oslobađanje eritropoetina je tkivna hipoksija, odnosno nesklad između potreba tkiva za kiseonikom i snabdevenosti tkiva kiseonikom. Homeostaza sekrecije eritropoetina i procesa eritropoeze regulisani su aktivnošću negativne povratne sprege, zahvaljujući kojoj imamo adekvatno dopremanje kiseonika tkivima. Naime, pojačani gubitak eritrocita, bilo zbog krvarenja, hemolize i sl., rezultira smanjenim dopremanjem kiseonika tkivima. Novonastala tkivna hipoksija registruje se od strane osjetljivih ćelija na eritropoetin u bubrežima, koje zatim proizvode i sekretuju ovaj hormon. Ciljno tkivo za eritropoetin je kostna srž, gdje se eritropoetin vezuje za specifične receptore na CFU-E (colony-forming units-erythroid – eritrodini prekursori koji se nalaze samo jedan ili dva nivoa iznad prvih morfološki prepoznatih eritroidnih prekursora - proeritroblastu) i proeritroblastima. Ove ćelije se nazivaju eritropoetin reagujuće ćelije (erythropoietin responsive cells - ERC) i ugradnjom eritropoetina povećava se njihova sposobnost preživljavanja do nivoa retikulocita, koji su dio populacije cirkulišućih eritrocita. Povećan broj eritrocita omogućava više

kiseonika tkivima, a više kiseonika tkivima registruju osjetljive ćelije koje smanjuju produkciju eritropoetina i uspostavlja se normalno stanje ravnoteže – steady state broja eritrocita.

Slika 1. Regulacija eritropoeze



Pored poznatih eritropoeznih efekata, smatra se da eritropoetin djeluje i na smanjenje volumena plazme preko renin-angiotenzin-aldosteron sistema. Ovaj mehanizam istovremenog povećanja eritropoeze i smanjenja volumena plazme čini se da je presudan u određivanju konačnog EPO efekta, koji rezultira povećanjem kapaciteta vezivanja kiseonika.

UPOTREBA ERITROPOETINA U SPORTU

Doping krvi je vještački proces povećavanja količine crvenih krvnih zrnaca u organizmu radi poboljšanja performansi sportista. Na listi zabranjenih doping sredstava među supstancama i metodama koje su uvijek zabranjene (na takmičenjima i van takmičenja) iz klase peptidnih hormona, faktora rasta i srodnih supstanci između ostalog se navode agensi koji stimulišu eritropoezu [npr. eritropoetin (EPO), darbepoetin (dEPO), stabilizatori hipoksijom indukovano faktora (HIF) metoksi polietilen glikol-epoetin beta (SERA), peginesatid (Hematid)].

Medicinski, eritropoetin ima terapijsku korist u liječenju nekih oblika anemije (naročito u sklopu bubrežne insuficijencije) stanja gdje je broj crvenih krvnih zrnaca nenormalno niseak. Crvena krvna zrnca sadrže hemoglobin, molekul koji transportuje kiseonik. Povećanjem broja crvenih krvnih zrnaca, a time i sadržaja hemoglobina, transport kiseonika krvlju je povišen.

S obzirom da se aerobna aktivnost oslanja na dostupnost kiseonika i njegovu upotrebu od strane mišića, sposobnost eritropoetina da poveća dopremanje kiseonika iz

krvi do mišića je prepoznata i eksploatisana u sportu. Dostupnost rekombinantnog eritropoetina u Evropi od 1987. godine omogućila je primjenu ovog ergogenog hormona, a zabrana njegovog korišćenja nije odvrtila sportiste od upotrebe eritropoetina, naročito u sportovima kao što su maraton, biciklizam, triatlon, nordijsko skijanje, i sl. gdje je izdržljivost jedan od ključnih elementa uspjeha. U skladu sa tim Medicinski Komitet MOK-a početkom 1990. godine (nakon ZOI u Kalgariju) je donio odluku o zabrani upotrebe ovog lijeka kod sportista, iako su prethodno, od 1985. godine, sve forme krvnog dopinga već bile zvanično zabranjene.

Istraživanja rađena na životinjskim modelima pokazala su da administracija rekombinantnog eritropoetina kod pacova uslovljava povećanje glikogena u mišićima, porast slobodnih masnih kiselina, kao i niže nivoe laktata u poređenju sa netretiranim kontrolama. Time se pokazalo da povećana mišićna raspoloživost kiseonika može uticati na tip energije koji se koristi tokom vežbanja, odnosno da administracija rekombinantnog eritropoetina može dovesti do manjeg doprinosa anaerobnog metabolizma u ispunjenju energetskih zahteva tokom fizičke aktivnosti.

Rezultati brojnih studija na ljudima pokazali su da doping krvi dovodi do prosječnog povećanja vrednosti hemoglobina za 7%, 5% povećanja u VO_2 max, povećanja vremena iscrpljenosti na 95% VO_2 max za 34% i 44 sekundi poboljšanje rezultata pri trčanju 5 milja na pokretnoj traci. Takođe, studije rađene sa rekombinantnim eritropoetinom došle su do sličnih rezultata, pa su npr. Birkeland i saradnici u svojoj dvostruko slijepoj, placebo kontrolisanoj studiji suplementacije eritropoetinom 4 nedelje, registrovali porast hematokrita sa 42,7% na 50,8% i povećanje VO_2 max 7%.

NEŽELJENI DOGAĐAJI

Upotreba eritropoetina sa sobom nosi i potencijalno ozbiljne zdravstvene rizike. Dokumentovani neželjeni događaji obuhvataju mišićne grčeve, infekcije gornjeg respiratornog trakta, glavobolje i fotofobije, hipertenzije, povećanje viskoznosti krvi i tromboze.

Patofiziološki supstrat za hipertenziju jeste povećanje eritrocitne mase u sadejstvu sa promjenom neurohumoralnih faktora koji rezultuju prevagom vazokonstriktornih supstanci, kao što su endotelin, angiotenzin II, norepinefrin i dr, nad vazodilatatornim prostaglandinima i azot oksidom (NO).

Tromboembolijski ishodi, u prvom redu duboke venske tromboze, plućne embolije i koronarne i cerebralne tromboze, posledica su povećane viskoznosti i povećanja trombogenosti krvi (porast broja trombocita, pojačana aktivacija i adhezija trombocita). Ovi tromboembolijski događaji u najtežim slučajevima mogu biti i fatalni.

Osim toga, dugotrajna primena rekombinantnog eritropoetina može dovesti do eritrocitne aplazije (PRCA – pure red cell aplasia) rijetkog sindroma aplazije udruženog sa malim brojem retikulocita, odsustvom eritroblasta u kostnoj srži i nalazom neutrališućih antieritropoetinskih antitijela.

DETEKCIJA PRIMJENE ERITROPOETINA

Anti doping kontrola eritropoetina obuhvata dvije grupe testova, i to putem uzorka krvi – indirektni metod i urina sportiste – direktni metod.

Model baziran na analizi makrocitnih hipohromnih eritrocita (procenat crvenih krvnih ćelija koje imaju koncentraciju hemoglobina ispod 28 pg i zapremina iznad 128 fl) uveden je 1993. godine. Tri godine nakon njega razvijen je metod koji se bazira na determinisanju odnosa solubilnog transferinskog receptora i feritina. Međutim, niska senzitivnost i/ili specifičnost ovih testova dovela je do razvoja multiparametarskog matematičkog modela za detekciju rekombinantnog eritropoetina, kako njegove trenutne primene (ON-model), tako i onog koji se uzimao ranije (OFF-model). Medicinska Komisija MOK-a je avgusta 2000. godine odobrila upotrebu ON-modela tokom Olimpijskih igara u Sidneju, tako da je ON-model korišćen kao skrining za odabir pacijenata kojima će se raditi test urina za potvrdu upotrebe eritropoetina.

Jedina trenutno prihvaćena direktna metoda detekcije rekombinantnog eritropoetina od strane Svjetske antidoping agencije (WADA) je „double blotting“ tehnika. Ovaj metod trpi određene kritike koje se odnose na nisku detekcionu moć, a kratko vrijeme poluživota eritropoetina otežava njegovu detekciju čak i 3 dana nakon poslednje injekcije, a po nekim autorima i 12-18h. Dodatno ističe se i mogućnost „lažno-pozitivnih“ rezultata koji mogu biti vezani za proteinuriju nakon vježbanja gdje proteini strukturno slični eritropoetinu mogu stvarati ukrštenu reakciju sa anti EPO antitijelima. S tim u vezi WADA je u stalnom kontaktu sa naučnim i stručnim institucijama radi dorade i unapređenja metoda za otkrivanje eritropoetina i razvoja jednog univerzalnog testa koji će nedvosmisleno otkrivati rekombinantni eritropoetin u uzorcima sportista. Važno je znati i da se uzorci mogu čuvati i kasnije ponovo analizirati, jer je zastarelost utvrđena Svetskim antidoping kodeksom 8 godina.

WADA je dodatno, vodeći računa o borbi protiv dopinga, 2009. godine uvela koncept „sportskog biološkog pasoša“ koji predstavlja individualni elektronski karton profesionalnog sportiste, u kome se nalaze podaci testiranja i rezultati u određenom vremenskom periodu. Osnovni cilj je monitoring sportskih bioloških varijabli radi indirektno detekcije doping sredstava zasnovane na longitudinalnoj bazi. Hematološki pasoš sportiste je modul sportskog biološkog pasoša u kojem se evidentiraju informacije o markerima eritropoeze izmerenih uzoraka krvi, a prate se sledeći parametri: hematokrit, hemoglobin, crvena krvna zrnca, procenat retikulocita, broj retikulocita, prosječni volumen eritrocita - MCV, prosječna količina hemoglobina u eritrocitu - MCH, prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima - MCHC. Pored toga i multiparametarski markeri OFF-skora, koji je kombinacija hemoglobina i procenta retikulocita, i abnormalni krvni profil skor (ABPS), koji je kombinacija hematokrita, hemoglobina, eritrocita, procenta retikulocita, MCV, MCH i MCHC.

Korak dalje u zaštiti od nedozvoljene upotrebe eritropoetina otišao je Internacionalni Biciklistički savez (UCI) koji na primer, određuje 15-dnevnu suspenziju od trke bilo kom sportisti koji ima hematokrit iznad 50% i koncentraciju hemoglobina iznad 17g/dL. Takođe, vrednosti OFF-skora preko 133 se smatraju dokazom dopinga, a normalne vrednosti se kreću u rasponu od 85 do 95.

ZAKLJUČAK

Danas savremeni sport predstavlja veoma popularno ciljno tržište za sve veću i tehnološki napredniju sportsku industriju. Osnovni cilj profesionalnih sportista, a danas čak i amatera, je da ostvare što bolje sportske rezultate na određenim sportskim takmičenjima.

Za postizanje pobjede na prestižnim takmičenjima su neophodne izuzetne psihofizičke sposobnosti, do kojih se nekad pored treninga dolazi i primjenom nedozvoljenih sredstava. Doping krvi, a posebno doping putem eritropoetina, predstavlja tehnički jednostvnu metodu koja je česta kod sportista, naročito u „sportovima izdržljivosti“.

Osnovna funkcija eritropoetina je regulacija procesa eritropoeze, tj. stvarnja crvenih krvnih zrnaca (eritrocita). Upotrebljava se za liječenje anemije, a kao doping sportistima privremeno omogućava kompetitivnu prednost, povećanjem vrednosti hemoglobina i kapaciteta vezivanja kiseonika, a time povećanje vremena iscrpljenosti i poboljšanje rezultata pri trčanju.

Borba protiv dopinga pored promocije i očuvanja duha fer-pleja ima za cilj i očuvanje zdravlja sportista. Među brojnim neželjenim dejstvima eritropoetina najznačajnije su tromboze koje često mogu biti i fatalne. Zabilježeno je više slučajeva naprasne smrti biciklista koji su zloupotrebljavali eritropoetin.

Napredak medicine i nauke uopšte, između ostalog omogućava stvaranje novih zabranjenih supstanci, kao i njihovo teže otkrivanje. Stoga je WADA u stalnom kontaktu sa odgovarajućim institucijama radi usavršavanja metoda dokazivanja rekombinantnog eritropoetina u uzorcima sportista, odnosno njegove nedvosmislene detekcije.

LITERATURA:

1. Asheden Mj, Varlet-Marie E, Lasne F, et al. The effect of microdose recombinant erythropoietin regimens in athletes. *Haematologica* 2006;91:1143-1144.
2. Bento R, Damasceno L, Neto F. Recombinant human erythropoietin in sports: a review. *Rev Bras Med Esporte* 2003;9(3):181-190.
3. Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, et al. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1238-1243.
4. Borrione P, Spaccamiglio A, Fagnani F, et al. Epo abuse in sport. *International SportMed Journal* 2009;10(1): 45-52.
5. Breidbach A, Catlin DH, Green GA, et al. Detection of recombinant human erythropoietin in urine by isoelectric focusing. *Clinical Chemistry* 2003;49:901-907.
6. Mašić Z, Đukanović N. Teorija sporta. Damnjanović i sinovi, Beograd 2008.
7. Mujović VM. Medicinska fiziologija, Compendium 1. AZ Book, Beograd 2004.

8. Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, et al. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 2001;86:128-137.
9. Ridge P. Erythropoietin and erythropoiesis. *Experimental Hematology* 2009;37:1007–1015.
10. Robinson N, Giraud S, Saudan C, et al. Erythropoietin and blood doping. *Br J Sports Med* 2006; 40(Suppl I): 30–34.
11. WADA: <http://www.wada-ama.org/en>
12. Wikipedia: <http://en.wikipedia.org/wiki>
13. International Cycling Union: <http://www.uci.ch>

ERYTHROPOIETIN AS DOPING AGENT

Doping is the use of prohibited substances and/or methods that improve the abilities of athletes. Erythropoietin (EPO), the kidney hormone, belongs to a group of substances that are classified as blood doping, and it can be found on the list of banned substances from 1990. year. Its application leads to an increase in the number of red blood cells, which enables better supply of oxygen, and thus improve the aerobic performance of athletes. Because of that, EPO is very popular in sports where the endurance is predominantly required like a marathon, cycling, triathlon, nordic skiing. Erythropoietin can cause some adverse events, primarily to increase blood viscosity, which is associated with a higher risk of various thromboembolic complications. In detection of EPO use two groups of tests are available, through a urine sample (direct method) and blood sample (indirect method).

Key words: *erythropoietin, usage, effects, doping.*