

Biljana Vitošević, Fakultet za sport i fizičko vaspitanje, Leposavić, Univerzitet u Prištini
Zdravko Vitošević, Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini, Kosovska Mitrovica

BIOTEHNOLOGIJA REKOMBINANTNIH HORMONA U DOPINGU

UVOD

Sve do ranih 70-godina prošlog veka, od svih ćelijskih molekula najteže se proučavala DNK. O nukleotidnoj sekvenci DNK moglo se zaključivati samo na osnovu indirektnih ispitivanja sekvencioniranjem proteina ili RNK, kao i genetičkim analizama. Međutim, danas je DNK molekul koji se lako analizira. Različitim tehnikama moguća je izolacija određenog gena, njegova modifikacija i vraćanje u ćelije, gde modifikovani gen postaje permanentni funkcionalni deo genoma. Dejstvom restrikcionih enzima seče se DNK, dobijaju se fragmenti sa komplementarnim krajevima koji su lepljivi ili kohezivni koji se dodaju vektoru pri čemu se spajanjem dva DNK fragmenata različitog porekla dobija rekombinovani DNK molekul (1). Kada se ćelija domaćin deli ona replikira svoju DNK, ali i vektorsku DNK koja sadrži stranu DNK.

Vektor ili replikon je molekul nosač koji je sposoban da sopstvenom replikacijom u organizmu domaćina proizvede svoje kopije. Kao vektori se koriste plazmidi, bakteriofagi, kozmidi (plazmidi kojima je uklonjen maksimum DNK da bi mogli da prime najveći mogući fragment strane DNK, ali ima i minimum vektorske DNK, koja mu omogućava replikaciju) i bakterijski i kvašćevi veštački hromozomi. Kolekcija rekombinovanih DNK molekula dobijenih iz specifičnog izvora nazvana je DNK biblioteka (genomska ili cDNK biblioteka).

Polimerazna lančana reakcija (PCR-engl. polymerase chain reaction) je in vitro metoda za brzu produkciju velikih količina ciljnih DNK fragmenata. Njena prednost je brzina, jer korišćenjem na toplotu otporne TagDNK polimeraze, izolovane iz bakterije *Thermophylus aquaticus*, koja se prirodno razvija na povišenim temperaturama, proizveće se PCR produkti za nekoliko sati. Nedostatak ove tehnike je potreba preciznog poznavanja nukleotidnih sekvenci koje se koriste kao matrice DNK fragmenata.

Tehnologija rekombinovane DNK omogućila je brzi napredak u stvaranju biosintetskih genskih produkata za lečenje nekih urođenih bolesti. Gen humanog hormona se zajedno sa odgovarajućim segmentima koji će omogućiti transkripciju i translaciju unosi u plazmid i klonira u mikroorganizmu kao što je *Escherichia coli*. Tako se može proizvesti velika količina hormona, ali je potrebno konstruisati veštački gen koji nije identičan prirodnom. Naime, sintetički proizveden gen za tu svrhu ne sme da sadrži umetnute nekodirajuće regione ili introne, koji se nalaze u većini strukturalnih gena eukariotskih organizama, pošto mikroorganizmi kao što je *E.coli* nemaju načina da izvrše obradu pre-iRNK posle transkripcije (2). Prednost ovako dobijenih biosintetičkih proizvoda je krajnje čist proizvod koji neće izazvati reakciju preosetljivosti i ne postoji rizik od hemijske i biološke kontaminacije.

Eksperimenti na animalnim modelima (tzv.transgene životinje) potvrdili su potencijalne efekte nekih od ovih hormona u povećanju fizičkih sposobnosti, što je

privuklo pažnju sportista, koji ovakvim manipulacijama pomeraju granice svojih takmičarskih mogućnosti.

ANIMALNI MODELI

Veliki broj hormona i gena koji ih kodiraju, a koji se dovode u vezu sa uticajem na fizičke sposobnosti sportista, prošli su prethodno demonstraciju na transgenim životinjama. Tako je Sweeny (4) upotrebljavajući uobičajenu tehniku u kojoj je normalna kopija gena splajsovana na nosač, kao što je virus, uneo u mišić miša gen za IGF-1 (insulinu-sličan faktor rasta 1), protein koji unapređuje rast i reparaciju ćelija. Miš je imao 15-40% veću masu mišića i i snaga mu je bila dva puta veća u odnosu na kontrolu. Barton-Davis i sar. (5) su napravili “super miša”, unošenjem istog gena u prednji mišić udova, pri čemu je konstatovano povećanje mišićne mase od 15% i 14% povećanje snage kod mladih adultnih životinja. Takođe je zabeleženo smanjenje gubitka mišićne mase kod starijih životinja i za 27% je bila veća snaga ovih životinja u odnosu na kontrolu. Za sportiste bi ovo značilo ne samo povećanje fizičke sposobnosti, već i duža sportska karijera (6). Unošenje i ekspresija gena PPAR-delta, transkripcionog faktora koji je uključen u energetske metabolizam i konverziju tipa II mišićnog vlakna (brza vlakna) u tip I (spora mišićna vlakna), kod miša, u studiji Wanga i sar. (7) pokazalo je rezistenciju na gojaznost i povećanje od 67-92% u prolaznom vremenu kod trčanja na duže staze.

Sva ova istraživanja i fascinantni rezultati u radu sa animalnim modelima, privukli su pažnju sportista, koji su tu videli mogućnost za povećanje svojih fizičkih sposobnosti.

Hormoni koji se najčešće dobijaju rekombinantnom tehnologijom su insulin, hormon rasta i eritropoetin. Iako im je namena pre svega terapijska, počela je njihova zloupotreba od strane sportista. Svetska Anti-Doping Agencija (WADA) zabranjuje upotrebu rekombinantnih proteina, i oni se klasifikuju kao doping sredstva (3).

INSULIN

Humani insulin je jedan od prvih proteina proizvedenih tehnikom rekombinacije DNK. Rekombinovana DNK koja odgovara A-lancu humanog insulina pripremljena je i uneta u plazmide koji su upotrebljeni za transformaciju ćelija *E. coli*. Ova bakterija je sintetisala lanac insulina koji je zatim prečišćen. Sličan proces je upotrebljen za dobijanje B lanca. A i B lanci su zatim pomešani i omogućeno im je da se saviju i formiraju disulfidne veze, proizvodeći molekul aktivnog insulina.

Insulin je, zajedno sa hormonom rasta i IGF-1 (insulinu-sličan hormon rasta 1) najznačajniji faktor u anaboličkim procesima. Ovi proteini deluju na sinergističan način. Insulin se smatra sredstvom koji povećava efekte treninga kod sportista, i to kroz:

- stimulaciju transporta glukoze u ćelijama za vreme povećanih fizioloških zahteva i sintezu i skladištenje velikih količina glikogena, koji mogu da povećaju mišićni rad za vreme takmičenja;

- unos aminokiselina i sintezu proteina u mišićnim ćelijama;
- povećanje opšte izdržljivosti;

- ubrzanje regenerativnih procesa;
- povećanje anaboličke aktivnosti hormona rasta;
- povećanje mišićne mase i sposobnosti kroz skladištenje glikogena i inhibiciju degradacije mišićnih proteina (8,9).

Statistički rezultati pokazuju da oko 25% sportista upotrebljavaju anaboličke androgene steroide u kombinaciji sa insulinom, jer smatraju da popravljaju i unapređuju njihove efekte. Za sprečavanje hipoglikemije pri uzimanju insulina, sportisti koriste produkte sa visokim sadržajem karbonata (10). Subkutana aplikacija insulina u kombinaciji sa ishranom sa visokim unosom ugljenih hidrata dovodi do povećanja veličine mišića i fizičke sposobnosti kod bodi bildera i dizača tegova, na primer, ne samo kroz povećanje skladištenja mišićnog glikogena, već i kroz inhibiciju razlaganja mišićnih proteina. Takođe je poznato da insulinom tretirani pacijenti sa dijabetesom imaju povećanje nemasne komponente tela u poređenju sa kontrolom (11). Neželjeni efekti uzimanja insulina od strane sportista uključuju hipoglikemiju i nadalje, ukoliko se ne tretira pravovremeno i komu.

HORMON RASTA

Zbog svojih anaboličkih i lipolitičkih efekata, a sa počecima proizvodnje rekombinantnog hormona rasta, počela je i zloupotreba hormona rasta u sportu. Njegova atraktivnost za sportiste potiče od saznanja da je efikasan pri povećanju mišićne mase i snage, da ga je teško detektovati standardnim doping testovima i da ukoliko se dobro dozira, nema značajnijih neželjenih efekata.

Njegov doprinos povećanju fizičkih sposobnosti je još diskutabilan. Iako se u literaturi navode njegovi pozitivni efekti na mišićnu masu, s obzirom da se često kombinuje sa anaboličkim steroidima, nije jasno da li su postignuti rezultati samo njegova zasluga (12). U sportovima snage hormon rasta se kombinuje sa metodama za povećanje transportne sposobnosti kiseonika, pa je njegova uloga i u povećanju snage nejasna. U genskom doping u često se koristi insulinu-sličan faktor rasta-1 (IGF-1), koji je medijator hormona rasta, odnosno gen koji ga kodira. Poznato je nekoliko mutacija na ovom genu koje mogu da utiču na povećanje mišićne mase, a utvrđena je i značajna povezanost između IGF-1 genotipa i povećanja dinamičke snage (13,14). Veoma je značajna i uloga IGF-1 u oštećenju mišića i procesima reparacije, gde utiče na aktivaciju satelitskih ćelija i proliferaciju koje zatim spajaju mišićna vlakna i dovode do njihove regeneracije.

U neželjene efekte korišćenja hormona rasta kao doping sredstva, spada akromegalija, koja prati preteranu upotrebu ovog hormona, uz rizik kardiomiopatije, dijabetesa, osteoporoze, poremećaja lipidnog profila.

ERITROPOETIN

Eritropoetin je glikoproteidni hormon koji se luči u jetri i bubrezima. On indukuje eritropoezu kroz stimulaciju receptora na matičnim ćelijama koštane srži, koji usmeravaju njihovu diferencijaciju u eritrocite.

Sposobnost eritropoetina da poveća kapacitet krvi za prenošenje kiseonika kod sportista, demonstrirana je prvi put 1991 godine, kada su proučavani efekti subkutanog unošenja niskih doza humanog eritropoetina na VO_{2max} . Rezultati su pokazali povećanje koncentracije hemoglobina i hematokrita za 10%, kao i povećanje VO_{2max} za 8% (15). Od tada se eritropoetin često zloupotrebljava od strane sportista, jer povećanje kapaciteta krvi za prenošenje kiseonika povećava izdržljivost sportista.

Posledice uzimanja eritropoetina su veoma ozbiljne. Sintetička forma ovog hormona namenjena je lečenju anemija, ali je masovno bila korišćena od strane sportista (posebno od strane biciklista, 1998 godine na Tour de France).

Povećanjem broja eritrocita, povećava se i viskoznost krvi, što zajedno sa dehidratacijom nastalom usled znojenja, povećava sklonost nastanka tromboza. Poznati rizici uključuju i infarkt miokarda, hipertenziju, plućnu emboliju itd.

METODE DETEKCIJE REKOMBINANTNIH PROTEINA U DOPINGU

Imuno-metode koje su trenutno široko u upotrebi, dale su slabe rezultate u detekciji rekombinantnih proteina, pa se stalno istražuju nove metode.

Smatra se da je doping rekombinantnim eritropoetinom prisutan kod 3-7% sportista iz sportova izdržljivosti (16). S obzirom da je eritropoetin glikoprotein koji se sastoji od 40% ugljenih hidrata, njegova glikolizacija je tkivno-specifična i kritična za biološku aktivnost, što je iskorišćeno za detekciju. Rekombinantne i endogene izoforme eritropoetina imaju različit stepen glikolizacije (17). Zbog stalne fluktuacije nivoa eritropoetina, merenje koncentracije eritropoetina nije pouzdan parameter za detekciju dopinga. Potencijalna zloupotreba rekombinantnog EPO se najbolje detektuje merenjem pet hematoloških parametara: koncentracija EPO u serumu, nivo hematokrita, procenat retikulocita, procenat makrocita i koncentracija serum-rastvorljivih transferrinskih receptora (18). Na osnovu ponašanja ovih parametara za vreme i posle tretmana sa rekombinantnim EPO, postoje dva modela: "ON" model koji se primenjuje za vreme i neposredno posle primene rEPO, dok se "OFF" model koristi posle izvesnog vremena nakon korišćenja rEPO (19,20). Ukoliko su ovi parametri neuobičajeni, koristi se izoelektrično fokusiranje uzoraka urina. U upotrebi su i tehnike kapilarne zonske elektroforeze, kao i upotreba monoklonalnih antitela. Naime, tehnike genetičkog inženjeringa su dovele do mogućnosti preoblikovanja ili dizajniranja antitela čoveka za specifične terapijske ili dijagnostičke svrhe, pa tako mogu da se konstruišu i rekombinantna antitela određenog proteina (21).

Direktna metoda detekcije rekombinantnog hormona rasta zasniva se na merenju različitih izoformi hormona. Posle uzimanja hormona rasta dolazi do promene u relativnim količinama ili proporciji dve izoforme u cirkulaciji: 20 i 22kDa. Povećanje u proporciji 22kDa:20kDa je baza za detekciju dopinga (22,23). Indirektni test se zasniva na upotrebi biomarkera (IGF-1 i prokolagen-III-P) i korišćenje selektivnih imunoesaja za njihovu analizu (senzitivni hemiluminiscentni esaji) (24,25). Druge potencijalne metode (drugi kolageni peptidi, piridinium i deokspiridinolin, upotreba izotopa ugljenika) su u fazi istraživanja.

ZAKLJUČAK

Sa sve većim razvojem rekombinantne tehnologije DNK, povećavaju se i mogućnosti potencijalnog dopinga. Sama priroda i današnje mesto kompetativnog sporta otvaraju mogućnost primene doping sredstava, a to posledično dovodi do pronalaženja efikasnih metoda detekcije. Upotreba “sportskog pasoša” koji će pratiti biološke parametre je u službi monitoringa zdravlja sportiste i predstavlja pomoć u detekciji zabranjenih supstanci, uz edukaciju sportista o njihovim neželjenim dejstvima.

LITERATURA

1. Turnpenney, P., Ellard, S., (2007). *Emery s elements of medical genetics*, Philadelphia, Elsevier Ltd.
2. Lieberman, M, Marks, AD, Smith C,(2007). *Marks essential medical biochemistry*, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
3. World Anti-Doping Agency; <http://www.wada-ama.org>.
4. Sweeny, L, Barton, E.R, Sweeny, H.L, Farrar, R.P.(2004). Viral expression of insulin-like growth factor 1 enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* 96: 1097-104.
5. Barton-Davis, ER, Shoturm,a DI, Musaro, A, Rosenthal, N, Sweeney, HL. (1998). Viral mediated expression of insulin-like growth factor 1 blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15603-7.
6. Azzazy, HME, Mansou,r MMH, Christensen, RH. (2009). Gene doping: Of mice and men, *Clinical Biochemistry* 42: 435-441.
7. Wang, Y.X, Zhang, C.L, Yu, R.T, Cho, H.K, Nelson, M.C, Bayuga-Ocampo, C.R, et al.(2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR-delta, *PLoS Biol* 2: e24.
8. Sonksen, P.H. (2001). Insulin, growth hormone and sport. *J Endocrinol.* 170(1): 13-25.
9. Krych, K, Gozdicka-Jozefiak, A. (2008). Doping in sport: new developments, *Human Movement*, vol.9(1): 62-75.
10. Evans., PJ, Lynch, R.M. (2003). Insulin as a drug of abuse in body building. *Br J Sports Med* 37: 356-367.
11. Sinha, A, Formica, C, Tsalamandris, S, et al. (1996). Effects of insulin on body composition in patients with insulin-dependent and non-dependent diabetes, *Diabetic Medicine*, vol.13(1): 40-46.
12. Collins, M. (2009). Genetics and sports. *Medicine and Sport Science*; vol.54:150-165.
13. Musaro, A, McCullagh, K, Paul, A, Houghton, L, Dobrowolny, G, Molinaro, M et al.(2001). Localised IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*; 27: 195-200.
14. Sweeney, HL.(2004). Gene Doping. *Sci Am* 21: 63-69.
15. Azzazy, H.M.E, Mansour, M.M.H, Christensen, R.H. (2005). Doping in the recombinant era: Strategies and counterstrategies, *Clinical Biochemistry* 38: 959-965.

16. Wilber, RL. (2002). Detection of DNA-recombinant human epoetin-alpha as a pharmacological ergogenic aid. *Sports Med* 32: 125-42.
17. Caldini, A, Moneti, G, Fanelli, A, Bruschetti, A, Mercurio, S, Pieraccini, G, et al. (2003). Epoetin alpha, epoetin beta and darbpoetin alpha: two-dimensional gel electrophoresis isoforms characterization and mass spectrometry analysis. *Proteomics* 3: 937-41.
18. Pascual, J.A, Belalcazar, V., de Bolos, C., Gutierrez, R., Llop, E., Segura, J. (2004). Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. *Ther Drug Monit* 26: 175-9.
19. Parisotto, R, Ashenden, MJ, Gore, CJ, Sharpe, K, Hopkins, W, Hahn, A.G. (2003). The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 88: 931-40.
20. Kazlauskas, R, Howe, C, Trout, G. (2002). Strategies for rhEPO detection in sport. *Clin J Sport Med* 12: 229-35.
21. Yan, J, Wang, S, Mi, JB, Guo, ZQ, Chang, WB. (2004). Production and characterization of anti-recombinant human erythropoietin (rhEPO) monoclonal antibody, *J Immunoassay Immunochem* 25: 91-101.
22. Wu, Z, Bidlingmaier, M, Dall, R, et al. (1999). Detection of doping with human growth hormone. *Lancet* 353:895.
23. Nelson, A.E and Ho, K.K. (2008). A robust test for growth hormone doping-present status and future prospects. *Asian Journal of Andrology*, 10: 416-425.
24. Bidlingmaier, M, Suhr, J, Ernst, A, Wu, Z, et al. (2009). High-Sensitivity Chemiluminescence Immunoassays for detection of Growth Hormone Doping in Sports. *Clinical Chemistry*, 55: 445-453.
25. Powrie, J.K, Basset, E.E, Rosen, T, Jorgensen, J.O, et al. (2007). Detection of growth hormone abuse in sport. *Growth Hormone & IGF Research*, 17: 220-226.

BIOTECHNOLOGY OF RECOMBINANT HORMONES IN DOPING

Recombinant DNA technology has allowed rapid progress in creating biosynthetic gene products for the treatment of many diseases. In this way it can produce large amounts of hormone, which is intended for the treatment of many pathological conditions. Recombinant hormones that are commonly used are insulin, growth hormone and erythropoietin. Precisely because of the availability of these recombinant hormones, it started their abuse by athletes. Experiments in animal models confirmed the potential effects of some of these hormones in increasing physical abilities, which attracted the attention of athletes who push the limits of their competitive capability by such manipulation. The risks of the use of recombinant hormones in doping include serious consequences for the health of athletes. Methods of detection of endogenous hormones from recombinant based on the use of a monoclonal antibodies, capillary zone electrophoresis and protein biomarkers.

Key words: recombinant hormones, sport, doping, detection