

# Krvni doping

---

**Paulić, Robin**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:741956>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Robin Paulić**

**Krvni doping**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti  
Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ozrena Jakšića i predan  
je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

2,3-BPG – 2,3-bisfosfoglicerat

ABP – Atletska biološka putovnica (engl. *Athlete's Biological Passport*)

EMP – tvari koje oponašaju EPO-peptide (engl. *erythropoietin-mimetic peptides*)

EPO – eritropoetin

EPOR – eritropoetinski receptor

HBOC – modificirani pripravci hemoglobina (engl. *haemoglobin-based oxygen carriers*)

HIF – hipoksijom inducibilni čimbenik (engl. *hipoxia-inducible factor*)

MOO – Međunarodni olimpijski odbor (engl. *International Olympic Committee, IOC*)

PFC – perfluorirane organske molekule (engl. *perfluorocarbons*)

PFOC – nosači kisika temeljeni na PFC molekulama (engl. *PFC-based oxygen carriers*)

rHuEPO – rekombinantni humani eritropoetin

TUE – terapijsko izuzeće (engl. *therapeutic use exemption*)

VO<sub>2max</sub> – maksimalni aerobni kapacitet

WADA – Svjetska antidopinška agencija (engl. *World Anti-Doping Agency*)

# SADRŽAJ

## SAŽETAK

## SUMMARY

1. UVOD.....	1
2. DOPING.....	2
2.1 KRVNI DOPING.....	3
3. FIZIOLOGIJA SPORTA.....	4
3.1 PRIJENOS KISIKA KRVLJU.....	4
3.2 DISOCIJACIJSKA KRIVULJA OKSIHEMOGLOBINA.....	4
3.3 UTROŠAK KISIKA.....	6
3.4 ENERGIJSKI KAPACITETI ZA MIŠIĆNU AKTIVNOST.....	7
3.5 MAKSIMALNI AEROBNI KAPACITET.....	8
4. SREDSTVA I METODE KRVNOG DOPINGA.....	10
4.1 POPIS ZABRANJENIH SREDSTAVA.....	10
4.2 KRVNE TRANSFUZIJE.....	11
4.3 ERITROPOETIN.....	12
4.4 REKOMBINANTNI ERITROPETINI.....	12
4.5 TVARI KOJE OPONAŠAJU EPO-PEPTIDE.....	14
4.6 AKTIVATORI HIPOKSIJOM INDUCIBILNIH ČIMBENIKA.....	14
4.7 INHIBITORI SIGNALA TGF- $\beta$ i GATA INHIBITORI.....	14
4.8 EFAPROKSIRAL.....	15
4.9 MODIFICIRANI PRIPRAVCI HEMOGLOBINA I SINTETSKI NOSAČI KISIKA.....	15
4.10 OSTALE METODE MANIPULACIJE KRVLJU.....	16
5. ZDRAVSTVENI UČINCI KRVNOG DOPINGA.....	17
5.1 UTJECAJ KRVNOG DOPINGA NA SPORTSKU IZVEDBU.....	17
5.2 UTJECAJ KRVNOG DOPINGA NA ZDRAVLJE.....	17
5.1 TERAPIJSKO IZUZEĆE.....	18
6. DETEKCIJA KRVNOG DOPINGA.....	20
6.1 DETEKCIJA KRVNE TRANSFUZIJE.....	20
6.2 DETEKCIJA DOPINGA TVARIMA KOJE UTJEČU NA ERITROPOEZU.....	23
7. ZAKLJUČAK.....	26
8. ZAHVALE.....	27
9. LITERATURA.....	29
10. ŽIVOTOPIS.....	34

# SAŽETAK

## **Krvni doping**

Robin Paulić

Krvni doping podrazumijeva nedopuštenu uporabu tvari i metoda koje utječu na eritropoezu te manipulaciju krvlju i krvnim pripravcima, u svrhu postizanja boljih sportskih rezultata. Kao i ostale vrste dopinga, kontrolira se prema međunarodnim smjernicama koje izdaje Svjetska antidopinška agencija, WADA. Cilj krvnog dopinga je povećati maksimalni aerobni kapacitet, ključan čimbenik u povećanju izdržljivosti. Najčešći oblici krvnog dopinga su krvne transfuzije i primjena rekombinantnog humanog eritropoetina, koji osim poboljšanja sportske izvedbe mogu imati i štetan utjecaj na zdravlje sportaša. Postoje brojne direktne i indirektne metode detekcije, a one se redovito osuvremenjuju radi što uspješnijeg otkrivanja i zaustavljanja dopinga.

**Ključne riječi:** krvni doping, transfuzije, eritropoetin

## **SUMMARY**

### **Blood doping**

Robin Paulić

Blood doping entails an illicit usage of substances and methods which affect erythropoiesis, and manipulation of blood and blood components, in order to achieve better sport's results. As same as other types of doping, it is controlled according to the international guidelines published by World Anti-Doping Agency, WADA. The goal of blood doping is to increase maximal aerobic capacity, the key factor of enhancing endurance. Most common types of blood doping are blood transfusions and recombinant human erythropoietin, which, in addition to improving athletic performance, can have an adverse impact on athlete's health. There are numerous direct and indirect methods of detection, and they are regularly updated for the most successful detection and stopping doping.

**Keywords:** blood doping, transfusion, erythropoietin

## 1. UVOD

Posebnost čovjeka kao vrste jest da se neprestano mijenja, ne samo evolucijski, već i samoinicijativno, pokušava se unaprijediti, usavršiti, olakšati si život i poboljšati ga sve naprednijim metodama. Iz rekreacije je iznikao sport, a tijekom povijesti ljudi su u sportu nastojali postići bolje rezultate, pomicati granice, mijenjajući svoju prehranu, navike, pa i koristeći medicinu. Doping, u vidu nedopuštene primjene tvari i metoda radi poboljšanja sportske izvedbe, star je kao i sam sport (1). S ciljem održavanja poštenih sportskih uvjeta, doping se međunarodno nastoji prepoznati i sankcionirati, promovirajući rezultate bez varanja. Jedna od kategorija dopinga je krvni doping, koji se razvija s napretkom medicine te se istovremeno radi na njegovoj što preciznijoj detekciji.



## 2. DOPING

Doping predstavlja kršenje jednog ili više antidopinških pravila postavljenih člancima 2.1 - 2.11 Svjetskog antidopinškog kodeksa (engl. *World Anti-Doping Code*) ažuriranog 2021. od strane Svjetske antidopinške agencije (WADA, engl. *World Anti-Doping Agency*). To obuhvaća prisutnost zabranjenih tvari, njihovih metabolita ili markera u uzorku sportaša (2.1), korištenje, pokušaj korištenja, posjedovanje, trgovanje ili pokušaj trgovanja zabranjenim tvarima ili metodama od strane sportaša ili članova sportaševa tima (2.2, 2.6, 2.7), sportaševo izbjegavanje, odbijanje davanja uzorka ili nepodvrgavanje prikupljanju uzorka (2.3), sportašev propust u podacima o lokaciji (2.4), ometanje ili pokušaj ometanja bilo kojeg dijela dopinške kontrole (2.5), primjenu ili pokušaj primjene zabranjene tvari ili metode od strane sportaša ili članova sportaševa tima drugom sportašu (2.8), sudioništvo ili pokušaj sudioništva u kršenju antidopinških pravila (2.9), zabranjeno udruživanje od strane sportaša ili druge osobe (2.10) te odvracanje od prijavljivanja ili osvetu zbog prijavljivanja potencijalnog kršenja antidopinških pravila nadležnim tijelima (2.11) (2). Sankcije za kršenje antidopinških pravila mogu biti u rasponu od upozorenja do doživotnih kazni (3). Prema WADA-inom Popisu zabranjenih sredstava iz 2021., ona se svrstavaju u tri kategorije: 1. tvari i metode koje su uvijek zabranjene (izvan i na natjecanjima), 2. tvari i metode zabranjene samo na natjecanju te 3. tvari zabranjene u pojedinim sportovima. U tvari i metode koje su uvijek zabranjene ubrajaju se neodobrene tvari (S0), anabolička sredstva (S1), peptidni hormoni, čimbenici rasta, slične tvari i mimetici (S2),  $\beta$ -2 agonisti (S3), hormoni i modulatori metabolizma (S4), diuretici i maskirna sredstva (S5), manipulacija krvlju i krvnim pripravcima (M1), kemijska i fizička manipulacija (M2) te genski i stanični doping (M3). Tvari i metode zabranjene samo na natjecanjima uključuju stimulanse (S6), narkotike (S7),

kanabinoide (S8) i glukokortikoide (S9), a tvari zabranjene u pojedinim sportovima odnose se na  $\beta$  blokatore (P1) (4,5).

## **2.1 KRVNI DOPING**

Krvni doping definira se kao zlouporaba određenih metoda i/ili tvari u svrhu povećanja kapaciteta prijenosa kisika krvlju, a radi poboljšanja u sportaševoj izdržljivosti i izvedbi (6,7). Odnosi se prvenstveno na kršenje antidopinških pravila vezano uz eritropoetin (EPO) i tvari koje utječu na eritropoezu (skupina S2), te uz manipulaciju krvlju i krvnim pripravcima (skupina M1). Prema istraživanju iz 2011. s 2737 uzoraka krvi elitnih sportaša različitih nacionalnosti, bila je procijenjena prevalencija krvnog dopinga od 14%, s većom prevalencijom u sportu koji zahtjeva izdržljivost (8). Prema istraživanju iz 2020., prevalencija dopinga na Svjetskom prvenstvu u atletici (engl. *World Athletics Championships*) 2011. iznosila je 18% (1808 uzoraka), a 2013. 15% (1875 uzoraka) (9).

### **3. FIZIOLOGIJA SPORTA**

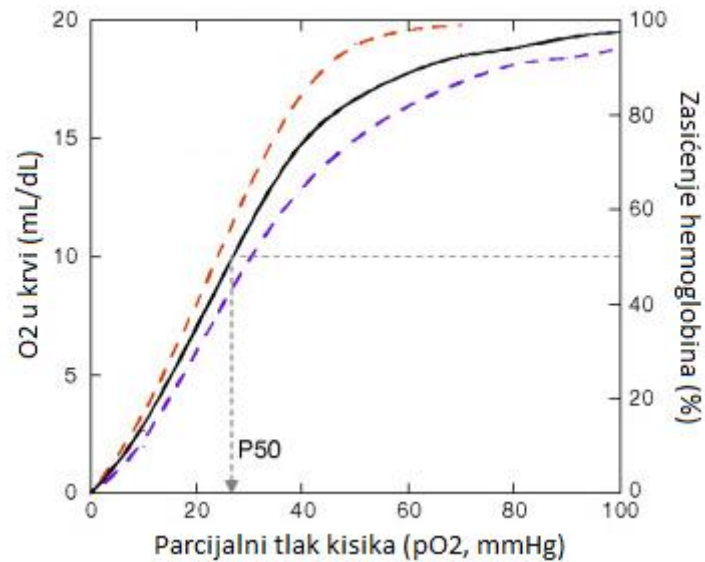
#### **3.1 PRIJENOS KISIKA KRVLJU**

Prijenos kisika ( $O_2$ ) jedna je od temeljnih funkcija eritrocita. Procesom oksigenacije, udahnuti kisik iz alveola pluća pasivno difundira u plućne kapilare, gdje se najvećim dijelom veže za hemoglobin u eritrocitima, tvoreći oksihemoglobin. Deoksigenacija se odvija u perifernim tkivima, kada se kisik otpušta iz eritrocita i difundira u različita tkiva, a hemoglobin na sebe veže ugljikov dioksid ( $CO_2$ ) iz stanica prilikom čega nastaje karbaminohemoglobin. Velik dio ugljikovog dioksida u eritrocitima na periferiji prelazi i u bikarbonatne ione ( $HCO_3^-$ ) putem enzima karboanhidraze, dok se u plućima ponovo dešava konverzija u ugljikov dioksid koji se, kao i onaj vezani s hemoglobinom, preko alveola otpušta u izdahnuti zrak (10). Osim prijenosa respiracijskih plinova, među važne uloge eritrocita spadaju i hemoglobinski pufer koji sudjeluje u održavanju acido-bazne ravnoteže, regulacija metabolita u cirkulaciji te vazodilatacija otpuštanjem dušikovog monoksida (NO) i adenozin-trifosfata (ATP), čime eritrociti mogu posredno smanjiti periferni vaskularni otpor i povećati lokalni protok krvi (10).

#### **3.2 DISOCIJACIJSKA KRIVULJA OKSIHEMOGLOBINA**

Hemoglobin (Hb) je globularni metaloprotein kvaterne strukture građen od 4 nekovalentno povezane podjedinice koje, uz proteinski dio, sadrže prostetičku skupinu hem. Svaki od 4 hema u molekuli hemoglobina ima po jedno vezno mjesto za kisik. S obzirom da je hemoglobin alosterički protein kojeg karakterizira svojstvo kooperativnosti, kada se jedna molekula kisika veže na jedan hem, dolazi do konformacijske promjene hemoglobina što olakšava vezanje drugih molekula kisika na preostala 3 hema (11). Svojstvo kooperativnosti dokazuje disocijacijska krivulja oksihemoglobina prikazana na slici 3.1, koja pokazuje kako s

porastom parcijalnog tlaka kisika u krvi, raste i postotak hemoglobina koji je vezao kisik (11,12).



**Slika 3.1** Disocijacijska krivulja oksihemoglobina. Prema McManus L, Mitchell RN (2014), figure 9, str. 3049 (13)

U kapilarama perifernih tkiva, poput kapilara mišića, ugljikov dioksid difundira iz stanica u krv, a to povećava koncentraciju ugljične kiseline ( $H_2CO_3$ ) te time i koncentraciju vodikovih iona ( $H^+$ ) u krvi, snižavajući pH krvi. Povećana koncentracija vodikovih iona dovodi do povećanog vezanja vodikovih iona za karboksilne skupine hemoglobina, uzrokujući konformacijsku promjenu hemoglobina što smanjuje njegov afinitet za kisik. Posljedično, kisik se slabije veže za hemoglobin već pri parcijalnom tlaku kisika pri kojem bi se vezao jače kada pH krvi ne bi bio snižen. Ovaj učinak sniženog pH krvi na vezanje kisika za hemoglobin naziva se Bohrovim efektom, i doprinosi boljem otpuštanju kisika iz krvi u periferna tkiva, a prikazuje se pomakom disocijacijske krivulje oksihemoglobina udesno i prema dolje (slika 3.1). Obrnut proces, poznat kao Haldaneov efekt, odvija se u kapilarama pluća, gdje uslijed povećanja parcijalnog tlaka kisika, odnosno sniženja parcijalnog tlaka ugljikovog dioksida i relativno povećanog pH krvi, dolazi do disocijacije vodikovih iona s

hemoglobina i povećanja afiniteta hemoglobina za kisik. To se prikazuje pomakom disocijacijske krivulje oksihemoglobina ulijevo i prema gore (slika 3.1) (12,14).

Osim promjene pH krvi, na pomak disocijacijske krivulje hemoglobina, odnosno na promjenu afiniteta hemoglobina na kisik utječe i promjena količine 2,3-bifosfoglicerata (2,3-BPG) u krvi te vrijednost temperature krvi. 2,3-BPG je molekula u eritrocitima koja djeluje kao alosterički modulator hemoglobina (15). Povećanje količine 2,3-BPG-a u krvi, primjerice uslijed višesatne hipoksije, uzrokuje smanjenje afiniteta hemoglobina za kisik, i pomiče disocijacijsku krivulju oksihemoglobina još više udesno. Isti učinak ima i povećanje vrijednosti temperature krvi, koje primjerice u mišićnom radu često iznosi i 2-3°C. Ovi čimbenici zajedno pridonose da se uslijed težeg mišićnog rada, pri određenom parcijalnom tlaku kisika u krvi, na periferiji otpušta više kisika nego pri istom parcijalnom tlaku kisika u normalnim uvjetima. Na taj način se fiziološki povećava doprema kisika mišićima uslijed težeg mišićnog rada (12,13,14).

### **3.3 UTROŠAK KISIKA**

Pri zasićenju hemoglobina kisikom od 97%, ukupna količina kisika vezanog za hemoglobin u normalnoj sistemske arterijskoj krvi iznosi oko gotovo 20 mL/dL. Pri prolasku kroz kapilare perifernih tkiva gdje je niži parcijalni tlak kisika i zasićenje hemoglobina kisikom oko 75%, količina kisika vezanog za hemoglobin smanjuje se u prosjeku na otprilike 15 mL/dL. Prema tome, u normalnim uvjetima svaka litra krvi donosi tkivima iz pluća oko 50 mL kisika (12,13).

U krajnje teškom mišićnom radu, parcijalni tlak kisika u mišićnoj intersticijskoj tekućini se može jako smanjiti, te količina kisika vezanog za hemoglobin u kapilarama mišića može iznositi oko 5 mL/dL. Svaka litra krvi u takvom krajnje teškom mišićnom radu stoga može mišićima iz pluća donijeti oko 150 mL kisika, što je tri puta veća količina kisika nego u

normalnim uvjetima. Kada se u obzir uzme i moguće povećanje srčanog minutnog volumena, u primjerice utreniranih maratonaca, za otprilike šest do sedam puta, ukupno povećanje količine kisika koju litra krvi prenese u mišićno tkivo u krajnjem mišićnom naporu u odnosu na normalne uvjete iznosi i dvadesetak puta (12,13).

### **3.4 ENERGIJSKI KAPACITETI ZA MIŠIĆNU AKTIVNOST**

Energija potrebna za mišićnu kontrakciju osigurava se iz nekoliko metaboličkih sustava, od kojih je primarni ATP. Količina ATP-a u mišićima čak i dobro utreniranih sportaša dovoljna je za održavanje maksimalne snage mišića u trajanju od oko 3 sekunde (dovoljno za otprilike polovicu sprinta na 50 m). Drugi važan metabolički sustav je fosfokreatin koji sadrži fosfatnu vezu sličnu onoj u ATP-u, te koji ponajprije služi za obnavljanje ATP-a. Stanični ATP i fosfokreatin zajedno mogu osigurati maksimalnu mišićnu snagu u trajanju od oko 8 do 10 sekundi (dovoljno za otprilike 100 m sprinta). Preostali važni izvori su glikogen, te oksidacijski metabolizam kojim se iskorištavaju ugljikohidrati, masti i proteini. Metabolizam glikogena, koji se može odvijati i anaerobno, bez kisika, u optimalnim uvjetima može osigurati dodatnih 1.3-1.6 minuta maksimalnog mišićnog rada. Od oksidacijskog metabolizma, za koji su potrebni aerobni uvjeti odnosno kisik, potječe više od 95% energije koju mišići iskorištavaju za neprekinutu, dugotrajnu kontrakciju. Ovisno o zastupljenosti glikolitičkih i oksidacijskih procesa kao izvora energije, mišićna vlakna mogu se svrstati u dva tipa, brza i spora (tablica 3.1). Svaki skeletni mišić u tijelu sastoji se od različitog omjera brzih i sporih mišićnih vlakana te drugih vlakana koja su miješanih svojstava. Tip II mišićnih vlakana se ponekad u literaturi navodi kao tip IIb, dok je tipIIa mišićnih vlakana prijelazna verzija između tipa I i tipa IIb. (12,16).

**Tablica 3.1** Razlike u tipovima mišićnih vlakana. Prilagođeno prema Guyton AC, Hall JE (2017), str. 1090 (12)

	Tip I: spora vlakna	Tip II: brza vlakna
<b>Mišić u kojem dominiraju</b>	crveni	bijeli
<b>Mioglobin (crvena boja)</b>	velika količina	manja količina
<b>Promjer</b>	manji	otprilike dvostruko veći
<b>Vaskularizacija</b>	razvijenija	manje razvijena
<b>Broj mitohondrija</b>	velik	manji
<b>(oksidacijski metabolizam)</b>		
<b>Glikolitički enzimi</b>	manja aktivnost	veća aktivnost
<b>Dominantan metabolizam</b>	aerobni	anaerobni
<b>Svojtvo</b>	izdržljivost	snaga
<b>Primjer mišića u kojem dominiraju</b>	m. soleus	m. gastrocnemius

### 3.5 MAKSIMALNI AEROBNI KAPACITET

U aerobnim sportskim disciplinama poput maratona, vožnje bicikla i skijanja na duge staze, čimbenici koji određuju sportsku izvedbu su doprema kisika do aktivnih mišića i njegovo iskorištavanje (17). Maksimalni primitak kisika, odnosno maksimalni aerobni kapacitet ( $VO_{2max}$ ) predstavlja veličinu potroška kisika pri maksimalnom aerobnom metabolizmu. Ograničen je individualnim svojstvima kardiorespiratornog sustava i može se izraziti Fickovom jednadžbom:

$$VO_{2max} = SMV \times avO_2,$$

gdje je  $VO_{2max}$  maksimalni aerobni kapacitet, SMV srčani minutni volumen, a  $avO_2$  arterijsko-venska razlika u količini kisika. Srčani minutni volumen umnožak je srčane

frekvencije i udarnog volumena srca. U tijeku maksimalnog mišićnog rada, i srčana frekvencija i udarni volumen rastu do oko 95% svojih maksimalnih vrijednosti, odnosno srčani minutni volumen raste do oko 90% svoje maksimalne vrijednosti. S obzirom da ne preostaje mogućnost da naraste puno više od svog kapaciteta, srčani minutni volumen ograničavajući je čimbenik u dopremi kisika. Treningom se doduše maksimalna vrijednost srčanog minutnog volumena može povećati i do 40% u odnosu na maksimalnu vrijednost u netrenirane osobe (12). Mogućnost manevriranja, odnosno povećanja maksimalnog aerobnog kapaciteta postoji u povećanju  $avO_2$ , odnosno povećanju količine kisika arterijske krvi. Količina kisika u krvi određuje se preko ukupne mase hemoglobina u krvi koja veže kisik (engl. *total circulating mass of haemoglobin*, tHb-mass). Povećanjem mase hemoglobina omogućuje se veći primitak kisika u tkiva i poboljšanje sportske izvedbe (18).



## 4. SREDSTVA I METODE KRVNOG DOPINGA

Mogućnosti manipulacija krvlju u svrhu poboljšanja fizičke izdržljivosti i sportske izvedbe mogle su se početi naslućivati još u 16. st., s prvim detaljnim opisom visinske bolesti (7). Istraživanje 1945. je potvrdilo kako hipoksija na visokim nadmorskim visinama potiče hematopoezu, a 1947. se istraživanjem pokazalo kako transfuzije eritrocita poboljšavaju izdržljivost pri fizičkom naporu u uvjetima simulirane hipoksije (1). Prema poznatim podacima, krvni se doping prakticirao od 1970-ih, a 1986. službeno ga je na Olimpijskim igrama zabranio Međunarodni olimpijski odbor (MOO, engl. *International Olympic Committee, IOC*) (19).

### 4.1 POPIS ZABRANJENIH SREDSTAVA

Sredstva i metode krvnog dopinga objavljuje WADA u Popisu zabranjenih sredstava, koji je obavezan „...međunarodni standard kao dio Svjetskog programa za borbu protiv dopinga. Popis se ažurira godišnje nakon opsežnog konzultativnog postupka kojim upravlja WADA.“ (6) Među ostalim, kao tvari koje su uvijek zabranjene, izvan i na natjecanjima, Popis iz 2021. u grupi S2 navodi eritropoetine (EPO) i tvari koje utječu na hematopoezu. To uključuje, ali ne isključivo: 1. agoniste eritropoetinskih receptora, npr. darbepoetine (dEPO), eritropoetine (EPO), tvari koje oponašaju EPO-peptide i tvari koje ih sadrže (npr. CNTO 530 i peginesatid), tvari koje sadrže EPO (EPO-Fc; metoksi-polietilen glikol-epoetin beta (CERA)); 2. aktivatore hipoksijom inducibilnih čimbenika (HIF), npr. daprodustat, IOX2, kobalt, ksenon, molidustat, roksadustat, vadadustat; 3. GATA inhibitore, npr. K-11706; 4. inhibitore signala transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF-  $\beta$ ), npr. luspatercept, sotatercept; i 5. agoniste nespecifičnih receptora cijeljenja tkiva, npr. EPO bez sijalinske kiseline, karbamilirani EPO (CEPO). Krvni doping obuhvaća i manipulaciju krvlju i krvnim pripravcima, čime je zabranjeno: 1. primjena ili ponovno uvođenje u tijelo bilo koje količine

autologne, alogene (homologne) ili heterologne krvi ili pripravaka eritrocita bilo kojeg porijekla u krvožilni sustav; 2. umjetno povećanje unosa, prijenosa ili opskrbe kisikom, uključujući, ali ne ograničavajući se na perfluorirane kemijske tvari, efaproksiral i modificirane pripravke hemoglobina (npr. zamjene za krv temeljene na hemoglobinu, mikroinkapsulirane pripravke hemoglobina, isključujući nadoknadu kisika inhalacijom); 3. bilo koji oblik intravaskularne manipulacije krvlju ili sastavnim dijelovima krvi fizikalnim ili kemijskim sredstvima (3).

## **4.2 KRVNE TRANSFUZIJE**

Krvna transfuzija je proces prijenosa krvi ili krvnog pripravka u cirkulacijski sustav osobe. Autologna ili auto-transfuzija predstavlja re-infuziju krvi ili krvnog pripravka u osobu iz koje je prethodno uzeta i pohranjena, dok se homologna, alogena ili alo-transfuzija odnosi na prijenos krvi jedne osobe u cirkulacijski sustav druge, uz preduvjet kompatibilnosti ABO i Rhesus D krvnih grupa (20). Heterologna transfuzija predstavlja prijenos krvi ili krvnog pripravka između cirkulacijskih sustava različitih vrsta.

Homologna transfuzija najranija je zabilježena metoda krvnog dopinga (7). Transfuzijom se neposredno postiže povećanje količine hemoglobina i time mogućnost dopreme veće količine kisika u tkiva (1). Postupak autologne transfuzije podrazumijeva uzimanje 1-4 jedinica sportaševe krvi, pri čemu 1 jedinica iznosi 450 mL krvi, nekoliko tjedana prije natjecanja. Nakon centrifugiranja, plazma se odmah vraća u cirkulaciju sportaša, dok se eritrociti mogu pohraniti na +4°C, s mogućim gubitkom i do 40% eritrocita, ili se mogu zamrznuti krioprezervacijom na -80°C, što omogućuje njihovo skladištenje i do 10 i više godina, s potencijalnim gubitkom od 10 do 15% pohranjenih eritrocita. Intravenozna re-infuzija se uglavnom vrši 1-7 dana prije natjecanja. (21).

### 4.3 ERITROPOETIN

Ljudski eritropoetin (HuEPO, engl. *human erythropoietin*) je glikoproteinski hormon koji uglavnom proizvode peritubularne stanice u bubregu (engl. *renal Epo producing cells*, REP) (22). Primarna uloga mu je stimulacija preživljavanja, sazrijevanja i diferencijacije eritroblasta, što potiče vezanjem za eritropetinski receptor (EPOR) na eritroidnim stanicama u koštanoj srži. Eritroidne stanice nastaju diferenciranjem iz pluripotentne matične stanice, preko multipotentne mijeloidne matične stanice (CFU<sub>GMM</sub>) – prvo primitivna eritroidna matična stanica (BFU<sub>E</sub>) i potom usmjerena zrela eritroidna matična stanica (CFU<sub>E</sub>), iz koje će se kasnije razviti pronormoblast, a daljnjom diobom i sazrijevanjem eritrociti i retikulociti (23). Vezanje eritropoetina na EPOR na eritroidnim stanicama aktivira niz unutarstaničnih signalnih puteva, poput JAK-STAT signalnog puta (engl. *Janus kinase 2; signal transducer and activator of transcription*). Proizvodnja endogenog eritropoetina regulirana je hipoksijom, koja aktivira transkripcijske faktore, tzv. hipoksijom inducibilne čimbenike (HIF, engl. *hipoxia-inducible factors*) (24). HIF-1 je heterodimer građen od alfa i beta podjedinice, a potiče ekspresiju nekoliko gena, među njima i *Epo* gen. U uvjetima normoksije, HIF-1 $\alpha$  se neprestano razgrađuje pomoću enzima HIF prolil hidroksilaze (HIF-PH), a *Epo* gen je suprimiran (25). S druge strane, u hipoksičnim uvjetima, o kisiku ovisna HIF prolil hidroksilaza se deaktivira, HIF-1 $\alpha$  podjedinica se dimerizira s HIF-1 $\beta$  podjedinicom i započinje se transkripcija *Epo* gena (24).

### 4.4 REKOMBINANTNI ERITROPETINI

Prva generacija rekombinantnih eritropoetina (rHuEPO) započeta je 1989. s komercijalnom dostupnošću epoetina alfa. Bio je odobren za terapiju anemije povezane s kroničnim zatajenjem bubrega, kemoterapijom ili antiretroviralnom terapijom. Kasnije su bili razvijeni i epoetin beta, delta i ostali, s neznatno drukčijom biološkom aktivnosti, a vrijeme poluživota u

prosjeku im iznosi do oko 24 sata ukoliko se primjene subkutano, te se mogu primjenjivati dnevno. Predstavnik druge generacije rHuEPO-a je darbepoetin alfa, koji ima dulje vrijeme poluživota od pripadnika prve generacije pa ga je stoga potrebno i rjeđe uzimati, otprilike jednom tjedno. Dulje vrijeme poluživota međutim u dopingu nije poželjno jer se sredstvo duže zadržava u organizmu i veća je vjerojatnost njegove detekcije. Dugodjelujući eritropoetin CERA (engl. *continuous erythropoietin receptor activator*), kao najznačajniji predstavnik treće generacije rHuEPO-a, očituje se još duljim vremenom poluživota nego darbepoetin alfa i rjeđom potrebom za upotrebom – na mjesečnoj razini ili rjeđe – te je mogućnost njegove detekcije izglednija (24).

Tipičan doping s rHuEPO sastoji se od dvije faze, od kojih prva započinje nekoliko tjedana prije natjecanja, a druga blizu ili za vrijeme natjecanja. Tijekom prve faze primjene rHuEPO, nastoji se povećati ukupna masa cirkulirajućeg hemoglobina većim dozama rHuEPO, a zbog rizika detekcije, vrijednosti krvnih parametara koje ukazuju na doping mogu se maskirati visinskim pripremama u hipoksičnim uvjetima. Visinske pripreme mogu povisiti razinu endogenog eritropoetina, njome prividno prikriti vrijednost rHuEPO u krvi i opravdati visoku razinu hemoglobina, otežavajući detekciju dopinga s rHuEPO. Druga faza primjene često podrazumijeva primjenu manjih doza rHuEPO radi kraćeg perioda moguće detekcije, posebno ukoliko se vrši tijekom natjecanja. Poluživot rHuEPO također ovisi i o načinu primjene, te primjerice intravenozna primjena epoetina alfa i beta naspram subkutane smanjuje njihov poluživot s 24, odnosno 19 sati, na 9, odnosno 7 sati i time dodatno skraćuje mogućnost detekcije. Uz intravenoznu primjenu rHuEPO, nerijetko se izaziva hiperhidracija uzimanjem velike količine vode, kako bi se dodatno maskirala detekcija rHuEPO u uzorku mokraće (26).

#### **4.5 TVARI KOJE OPONAŠAJU EPO-PEPTIDE**

Među tvari koje oponašaju EPO-peptide (engl. *erythropoietin-mimetic peptides*, EMP) pripada peginesatid, sintetski pegilirani dimer koji je bio odobren za subkutanu ili intravenoznu primjenu u terapiji anemije povezane s kroničnim bubrežnim zatajenjem. Nema sekvenci homolognih eritropoetinu pa ne može izazvati križnu reakciju, ali ima agonistički učinak eritropoetinu, vežući se na EPOR i potičući kaskadu sličnih signalnih puteva (24).

#### **4.6 AKTIVATORI HIPOKSIJOM INDUCIBILNIH ČIMBENIKA**

Aktivatori hipoksijom inducibilnih čimbenika zasnivaju se na inhibiciji enzima HIF protil hidrosilaze i stabilizaciji HIF-1 $\alpha$  podjedinice (24). Predstavnici su daprodustat, roksadustat, molidustat i vadadustat, oralni inhibitori HIF-PH, odobreni u terapiji renalne anemije (4,27). Oni djeluju kompetitivno naspram 2-oksoglutarata, kofaktora HIF-PH koji omogućuje njezino katalitičko djelovanje (24), a daprodustat i roksadustat su u fazi istraživanja nakon terapijske primjene u trajanju  $\leq 52$  tjedna također pokazali učinak snižavanja serumske razine hepcidina, čime povećavaju dostupnost iona željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) za eritropoezu (24,27). S obzirom da je i ion željeza, među ostalim, esencijalni kofaktor HIF protil hidrosilazi, metalni ioni poput iona kobalta ( $\text{Co}^{2+}$ ) mogu djelovati kompetitivno, odnosno oralna primjena soli kobalta može stabilizirati HIF i povećati ekspresiju *Epo* gena (24). Na Popis zabranjenih sredstava WADA je 2014. dodala i plemeniti plin ksenon, koji ne smanjuje razgradnju HIF-a, već potencijalno povećava translaciju, odnosno stvaranje HIF-1 $\alpha$  molekule (28).

#### **4.7 INHIBITORI SIGNALA TGF- $\beta$ i GATA INHIBITORI**

Članovi superobitelji transformirajućih čimbenika rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), poput aktivina, potencijalno mogu negativno utjecati na eritropoezu preko unutarstaničnog SMAD signalnog puta. Inhibitori signala TGF- $\beta$ , čiji su predstavnici sotatercept i luspatercept, sekvstriraju aktivin i tako mogu povećati proizvodnju eritropoetina (4,24). Pokazano je kako sotatercept

može povisiti serumsku koncentraciju hemoglobina u bolesnika u terminalnoj fazi kroničnog bubrežnog zatajenja (29). GATA transkripcijski čimbenici, za razliku od HIF-a, negativno reguliraju ekspresiju *Epo* gena i njihovom aktivacijom dolazi do smanjenja proizvodnje eritropoetina. K-11706 djeluje kao GATA inhibitor i ujedno pospješuje vezanje HIF-a za promotor *Epo* gena (30).

#### **4.8 EFAPROKSIRAL**

Efaproksiral (RSR13) je sintetički alosterički modulator hemoglobina koji, ne-kovalentnim vezanjem za hemoglobin, smanjuje afinitet hemoglobina za kisik u uvjetima niskog parcijalnog tlaka kisika na periferiji te tako povećava njegovo otpuštanje. Na taj način povećava  $VO_{2max}$  (31).

#### **4.9 MODIFICIRANI PRIPRAVCI HEMOGLOBINA I SINTETSKI NOSAČI KISIKA**

Modificirani pripravci hemoglobina (engl. *haemoglobin-based oxygen carriers*, HBOC) mogu se podijeliti na kemijski modificirane hemoglobine i enkapsulirane pripravke hemoglobina (32). Kemijski modificirani hemoglobini izvedeni su od izoliranog ljudskog, goveđeg, ili genetički proizvedenog hemoglobina, a uključuju primjerice hemoglobine modificirane površine, polimerizirani hemoglobin i druge (33). Oni se odlikuju minimalnom antigenom reaktivnošću, učinkovitijim otpuštanjem kisika zbog odsustva stanične membrane, ali i brzom razgradnjom te pojačanom ekstravazacijom, prilikom čega mogu sekvestrirati NO i izazvati vazokonstrikciju. Enkapsulirani pripravci hemoglobina trebali bi omogućiti dulje optjecanje cirkulacijom, veću stabilnost hemoglobina i ko-enkapsulaciju hemoglobina s drugim molekulama, poput 2,3-BPG-a, a kao stijenka se potencijalno može koristiti mikrometarski lipidni vezikul (32). Perfluorirane organske molekule (engl. *perfluorocarbons*, PFC) su hidrofobni i lipofobni halogenirani ugljikohidrati koji mogu vezati respiracijske plinove. Nosači kisika temeljeni na PFC molekulama (engl. *PFC-based oxygen carriers*, PFOC)

primjer su biokompatibilnih sintetskih nosača kisika, poput perfluorodekalina (PFD) i perfluorooktil bromida (PFOB). Lijekovi na bazi PFD-a odobreni su primjerice u Rusiji i Ukrajini u liječenju velikog gubitka krvi (34).

#### **4.10 OSTALE METODE MANIPULACIJE KRVLJU**

Određeni hormoni, uključujući testosteron, hormon rasta i angiotenzin II mogu stimulirati bubreg na proizvodnju eritropoetina. Genski doping s transferom *Epo* gena moguć je, ali nije još zabilježena njegova detekcija u praksi sportaša (17). Legalna varijanta krvnog dopinga, odnosno metoda povećanja eritropoeze koju WADA ne sankcionira, su visinske pripreme, u kojima hipoksični uvjeti stimuliraju lučenje endogenog eritropoetina (35). Jedna od alternativnih simulacija visinskih uvjeta nižeg tlaka zraka su tzv. hipoksični šatori/sobe, u kojima se održava snižen parcijalni tlak kisika u zraku ekvivalentan onome na nadmorskoj visini i do 4000 metara, a u kojima sportaši mogu provoditi po nekoliko sati dnevno, primjerice spavajući (36,37). Treninzi u hipoksičnim uvjetima i njihov utjecaj na krvne parametre predstavljaju poteškoću u detekciji primjene ilegalnih metoda dopinga (35). Iznimka je primjerice Italija, gdje je Ministarstvo zdravstva (tal. *Ministero della Salute*) od 2005. zakonom zabranilo metode korištenja hipoksičnih uvjeta u sportu, neovisno o WADA-inim pravilima (38).

## **5. ZDRAVSTVENI UČINCI KRVNOG DOPINGA**

### **5.1 UTJECAJ KRVNOG DOPINGA NA SPORTSKU IZVEDBU**

Povećanje maksimalnog aerobnog kapaciteta krvnim dopingom ovisno je o dozi, a u prosjeku iznosi oko 5-10% (39), pa i do 15% (40), ako se koncentracija hemoglobina povisi za 10% krvnom transfuzijom. Za isti postotak se  $VO_{2max}$  može smanjiti ako se koncentracija hemoglobina umanjuje za 10% hemodilucijom (41). Primjena rHuEPO može već u umjerenim dozama povisiti  $VO_{2max}$  za 6-8% (42). Osim poboljšanja sportske izvedbe u vježbama maksimalnog intenziteta, krvni doping povećava izdržljivost u vježbama submaksimalnog intenziteta (41,42). U prosjeku, procjenjuje se kako vrhunski sportaši krvnim dopingom, neovisno o metodi, mogu svoju izvedbu poboljšati za oko 3%. To primjerice odgovara 20-30 sekunda bržem završetku utrke na 5000 metara, 4 minute bržem završetku maratona, i više od 2 sata bržem završetku Tour de France (otprilike 3500 kilometara) (43).

### **5.2 UTJECAJ KRVNOG DOPINGA NA ZDRAVLJE**

Unatoč mogućnosti bolje sportske izvedbe, krvni doping nosi niz potencijalnih opasnosti za zdravlje. Homologna krvna transfuzija relativno je sigurna pod primjerenim uvjetima, no može dovesti do volumnog preopterećenja ili izazvati transfuzijsku reakciju zbog nepodudarnosti antigena davaoca i primatelja (7). Iako zdravstveno sigurnija od homologne, autologna krvna transfuzija također može uzrokovati ozbiljan morbiditet, prvenstveno zbog neispravnog rukovanja i skladištenja krvi (44). Među ostalim, sve krvne transfuzije nose rizik od nastanka flebitisa, zračne embolije, bakterijskih infekcija i sepse (45), a opasne viralne transmisije uključuju virus hepatitisa B i C, HIV, herpes viruse i citomegalovirus (44). Infuzija oštećenih eritrocita može u krvi gomilati slobodni hemoglobin te uzrokovati promjene u krvnom tlaku (21). Korištenje tvari koje utječu na eritropoezu povezano je s brojnim rizicima. Povećanje hematokrita dovodi do porasta viskoznosti krvi i povećanog



rizika od tromboembolijskih incidenata, poput moždanog i srčanog udara (45). Također, negativna povratna sprega suprimira lučenje endogenog eritropoetina što može rezultirati anemijom. Sama izrada sredstva može biti štetna – primjerice, epotin napravljen u nekontroliranim uvjetima može sadržavati bakterijski endotoksin (24). Uporaba tvari koje utječu na eritropoezu dovodi se i u vezu s povišenim vrijednostima krvnog tlaka (7). Intravenozna primjena peginesatida može uzrokovati ozbiljne reakcije preosjetljivosti (46). Premda su rizici primjene HIF aktivatora nedokazani i smatraju se sigurnima za terapiju anemije povezane s kroničnim bolestima, postoje sumnje kako mogu djelovati kancerogeno (7). Doping kobaltom ograničen je zbog njegove kardiotoksičnosti (7,24). Mučnina, iritacija sluznica, glavobolja, alergijska reakcija i renalna disfunkcija neke su od nuspojava terapije efaprosiralom (47). Modificirani pripravci hemoglobina povezuju se s potencijalnom sistemskom i plućnom hipertenzijom, gastrointestinalnim smetnjama, nefrotoksičnošću, neurotoksičnošću i povećanim mortalitetom (32), dok se perfluorirane organske molekule dovode u vezu s hipotenzijom te simptomima nalik gripi, poput slabosti, vrućice i mialgije (34,48). PFOC se mogu taložiti i u Kupfferovim stanicama jetre, reducirati detoksikaciju i utjecati na metabolizam glukoze i lipida, te je poznato kako PFD može uzrokovati smanjenje broja neutrofila i trombocita (34).

## **5.1 TERAPIJSKO IZUZEĆE**

„*Terapijsko izuzeće* omogućuje *sportašu* s medicinskim stanjem za koje je potrebno liječenje primjenu *zabranjene tvari* ili *zabranjene metode*, ali samo ukoliko su zadovoljeni uvjeti iz odredbe 4.4 i *Međunarodnog standarda za terapijska izuzeća*.“ (49) Prema odredbi 4.4 Svjetskog antidopinškog kodeksa, terapijsko izuzeće (engl. *Therapeutic use exemption*, TUE) omogućuje da se prisutnost zabranjene tvari ili njezinih metabolita/markera i/ili korištenje, pokušaj korištenja, posjedovanje, primjena ili pokušaj primjene zabranjene tvari ili zabranjene metode ne smatraju kršenjem antidopinških pravila (2). Sportaš može dobiti

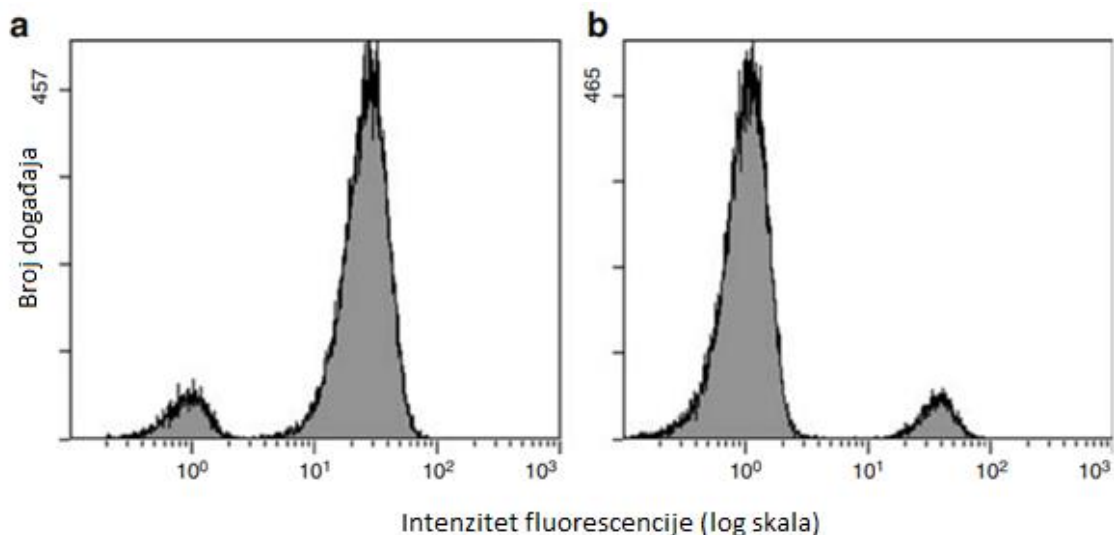
terapijsko izuzeće ako zadovoljava 4 uvjeta: 1. zabranjena tvar ili metoda potrebni su za liječenje dijagnosticiranog zdravstvenog stanja, 2. zabranjena tvar ili metoda najvjerojatnije neće omogućiti puno bolju sportsku izvedbu od one koju bi sportaš mogao postići bez zdravstvenog dijagnosticiranog problema, 3. ne postoji alternativna terapija, 4. potreba za korištenjem zabranjene tvari ili metode nije prouzrokovana prethodnim korištenjem zabranjenih tvari ili metoda (49). Prema podacima WADA-e za 2014. godinu, samo 0,2% ukupnih terapijskih izuzeća odnosilo se na primjenu manipulacije krvi i krvnih pripravaka, te 2% na primjenu tvari iz S2 skupine, u koju se ubrajaju i tvari koje utječu na eritropoezu (50).

## **6. DETEKCIJA KRVNOG DOPINGA**

Testiranje i istrage provode se u svrhu dobivanja analitičkog dokaza o kršenju odredbi Svjetskog antidopinškog kodeksa. „Svaki sportaš dužan je u bilo kojem trenutku i na bilo kojem mjestu dati uzorak organizaciji za borbu protiv dopinga koja je ovlaštena za testiranje tog sportaša.“ (2)

### **6.1 DETEKCIJA KRVNE TRANSFUZIJE**

Zlatni standard za otkrivanje homologne krvne transfuzije je protočna citometrija, a detekcija se zasniva na prisutnosti različitih antigena na površini eritrocita davatelja i primatelja. Postoji gotovo 300 različitih antigena krvnih grupa, a za uspjeh homologne transfuzije potrebno je samo preklapanje u ABO i Rh antigenima. Kombinacijom protočne citometrije s fluorescentnim označivanjem antitijela na određene antigene krvnih grupa može se odrediti postoji li ekspresija različitih antigena na eritrocitima sportaša, odnosno utvrditi primjena homologne transfuzije. Slika 6.1 prikazuje histograme dvaju uzoraka s miješanom slikom ekspresije eritrocitnog antigena Jk. Histogram pod a) prikazuje mješavinu eritrocita gdje većina populacije eksprimira Jk antigen, a histogram pod b) mješavinu eritrocita gdje većina populacije ne eksprimira Jk antigen. Prema WADA-inim smjernicama, više od jednog antitijela mora dati pozitivan signal miješane populacije eritrocita da bi se uzorak smatrao pozitivnim (20,51). Ovom se metodom može detektirati već manje od 5% antigenski različitih eritrocita, a homologna transfuzija primjerice samo jedne jedinice krvi (450 mL), pod pretpostavkom ukupnog volumena krvi od 5 L, dat će približno čak 10% antigenski različitih eritrocita od eritrocita primatelja (52).



**Slika 6.1** Histogrami s bimodalnim populacijama eritrocita od kojih neki eksprimiraju Jk antigen, a neki ne. Prema Giraud S, Sottas PE, Robinson N, Saugy M (2010), figure 2, str. 4 (20)

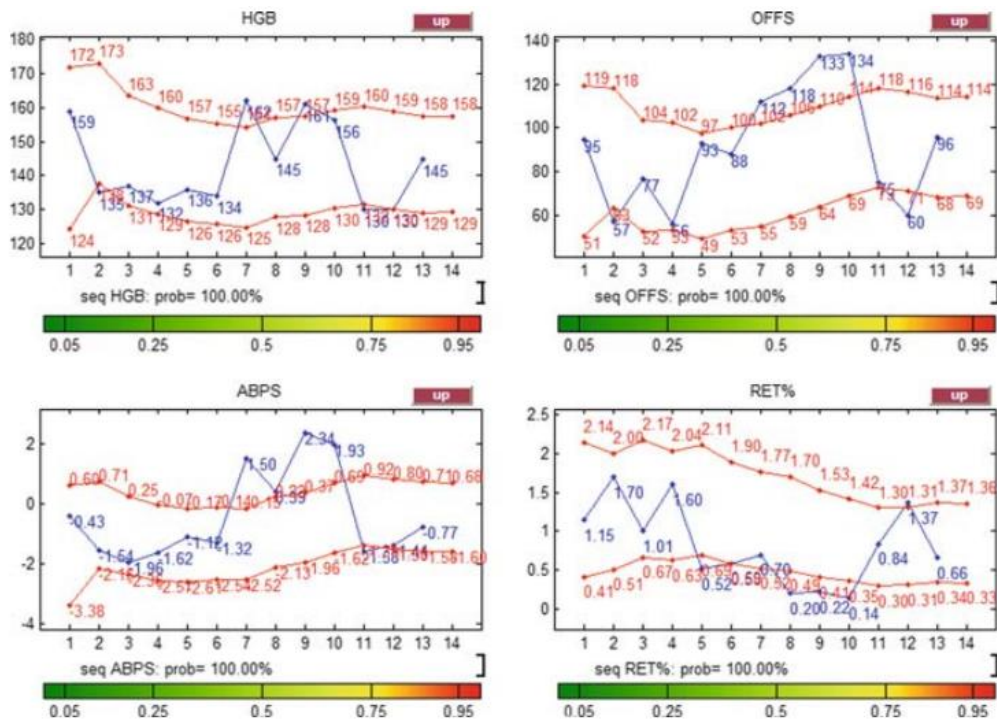
Autologna krvna transfuzija detektira se teže od homologne. U razvoju je niz direktnih testova na tvari u krvi koje su rezultat samog postupka vađenja krvi, njena pakiranja i ponovne transfuzije u krvotok (20). Jedna od metoda detekcije uključuje analizu cirkulirajuće mikroRNA (miRNA), inače unutarstanične molekula koja međuostalim utječe na stabilnost transportne, mRNA. Kada se nađe u cirkulaciji, miRNA može ukazivati na određena patološka stanja, poput toksičnog oštećenja jetre, ali i na primjenu autologne transfuzije (53). Nakon re-infuzije vlastite krvi, dolazi i do povećanja razine željeza u krvi, te posljedično do povišenja serumskih koncentracija jetrenog peptida hepcidina. Hepcidin sudjeluje u metabolizmu željeza na način da potiče hepatocite na razgradnju ferroportina, transmembranskog proteina koji inače povećava razine željeza u krvi. Povišene razine hepcidina kao odgovor na povišenje razina željeza autolognom transfuzijom stoga mogu poslužiti kao biomarker za njezinu detekciju (54). Osim uzoraka krvi, u uzorku urina direktno bi se mogli detektirati dietilheksil ftalat (DHEP, engl. *di-2-ethyl-hexyl-phthalate*) i njegovi metaboliti, podrijetla s vrećica u kojima se krv skladišti. Premda je DHEP kao aditiv

različitim plastičnim materijalima ubikvitaran i detektabilan u mokraći svih izloženih, u mokraći sportaša koji su primjenjivali autolognu transfuziju njegove koncentracije mogu biti izrazito povišene (52,55,56).

Detekcija autologne krvne transfuzije postiže se prvenstveno indirektnom metodom, putem hematološkog modula tzv. Atletske biološke putovnice (engl. *Athlete's Biological Passport*, ABP). Riječ je o individualnom elektroničkom dokumentu koji sadrži povijest sportaševih testova s biomarkerima, a osim hematološkog, postoje i steroidni i endokrinološki modul (57). ABP funkcionira po principu Bayesova teorema, koristeći prethodne vrijednosti sportaševih rezultata za određivanje individualnih referentnih raspona vrijednosti po kojima se može longitudinalno pratiti i evaluirati sportaša (5,24). Znatna odstupanja mjerenih parametara mogu ukazati na patološki proces ili na doping (20). Prema posljednjim WADA-inim izmjenama iz 2021., hematološki modul Atletske biološke putovnice obuhvaća slijedeće varijable: ABPS (engl. *Abnormal Blood Profile Score*), hematokrit (HCT), hemoglobin (HGB), udio nezrelih retikulocita (engl. *immature reticulocyte fraction*, IRF), prosječnu masu hemoglobina (engl. *mean corpuscular haemoglobin*, MCH), prosječnu koncentraciju hemoglobina (engl. *mean corpuscular haemoglobin concentration*, MCHC), prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*, MCV),  $OFF_{hr}$  Score (OFFS), trombocite (PLT), eritrocite (RBC), širinu distribucije volumena eritrocita (engl. *red blood cell distribution width*, RDW), broj i postotak retikulocita (RET#, RET%) te leukocite (WBC) (58). ABPS temelji se na sedam parametara (HCT, HGB, MCH, MCHC, MCV, RBC i RET%) radi preciznije detekcije krvnog dopinga nego ijedan parametar zasebno (59).  $OFF_{hr}$  Score zasniva se na specifičnom odnosu povećanja broja eritrocita (i razine hemoglobina) krvnim dopingom te posljedičnog smanjenja broja retikulocita negativnom povratnom spregom, a računa se prema formuli:

$$OFF_{hr} \text{ Score} = HGB \text{ (g/L)} - 60\sqrt{RET\%} \quad (60)$$

Slika 6.2 prikazuje longitudinalno praćenje četiriju parametra iz Atletske biološke putovnice (HGB, OFFS, ABPS, RET%) u muškog sportaša kroz 13 testova u 4 godine. Značajna varijabilnost u rezultatima ukazuje na doping (20).

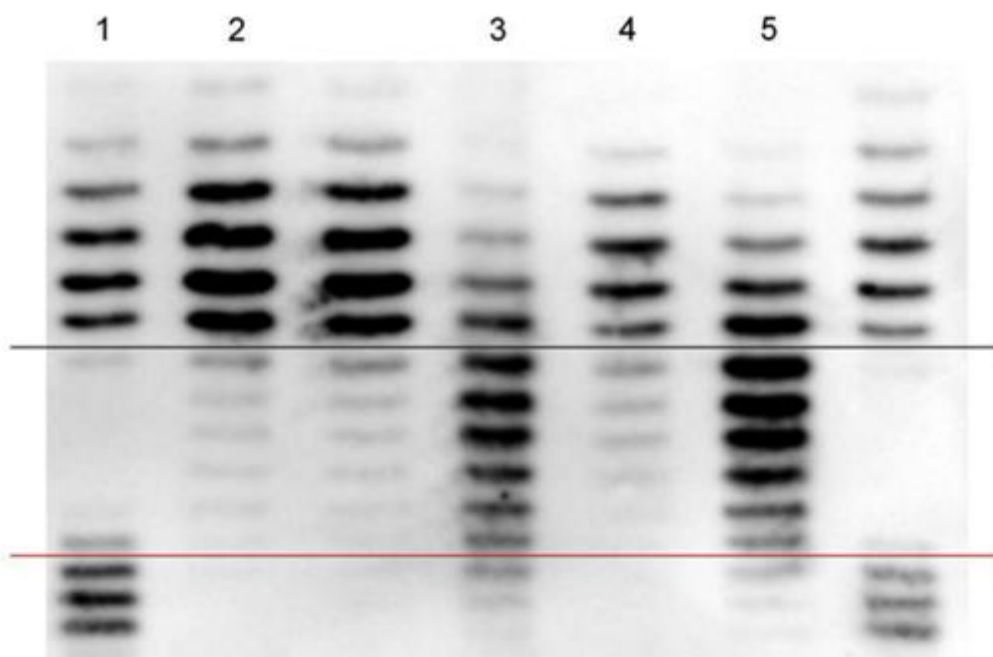


**Slika 6.2** Praćenje sportaša pozitivnog na homolognu transfuziju krvi . Prema Giraud S, Sottas PE, Robinson N, Saugy M (2010), figure 5, str. 8 (20)

## 6.2 DETEKCIJA DOPINGA TVARIMA KOJE UTJEČU NA ERITROPOEZU

Prve metode korištene za detekciju dopinga egzogenim eritropoetinom bile su izoelektrično fokusiranje (IEF) i natrijev dodecil sulfat/sarkozil-poliakrilamid gel elektroforeza (SDS/SAR-PAGE). Analiza uzorka mokraće IEF-om temelji se na različitoj glikozilaciji endogenog (EPO) i egzogenog (rHuEPO) eritropoetina. Premda im je slijed aminokiselina jednak, zbog razlika u glikozilaciji rHuEPO ima manje negativan naboj i manje kiselih izoformi nego urinarni EPO, i pomiče se drugačije u električnom polju. Slika 6.3 pokazuje IEF uzorka mokraće sportaša pozitivnog na epoetin beta i epoetin alfa (24). Detekcija tehnikom

SDS/SAR-PAGE zasniva se na različitim molekularnim masama – masenom spektrometrijom utvrđeno je kako je molekularna masa rHuEPO-a veća od molekularne mase endogenog eritropoetina. SDS-PAGE metoda koristi se za detekciju rHuEPO-a prve i druge generacije, a SAR-PAGE za detekciju rHuEPO-a treće generacije (CERA) u uzorku krvi (24).



**Slika 6.3** IEF 1. referentni marker koji odgovara mješavini epoetina beta i darbepoetina alfa; 2. pozitivan uzorak na epoetin beta; 3. endogeni EPO; 4. pozitivan uzorak na epoetin alfa/beta; 5. urinarni EPO standard. Prema Salamin O, Kuuranne T, Saugy M, Leuenberger N. (2017), figure 3, str. 6 (24)

Imunoesej uz pomoć membrana (engl. *membrane-assisted isoform immunoassay*, EPO WGA MAIIAI), također se temelji na razlikama u glikozilaciji eritropoetina, ali uključuje kromatografsko razdvajanje različitih vrsta eritropoetina s obzirom na njihove različite afinitete za vezanje na aglutinin pšenične klice (engl. *Wheat germ agglutinin*, WGA) (24). Kombinacijom tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) mogu se u urinu detektirati tvari

koje oponašaju EPO-peptide i HIF aktivatori (24), dok se za detekciju ksenona može koristiti masena spektrometrija spregnuta s plinskom kromatografijom (61). Primjena peginesatida se, osim s LC-MS/MS, može detektirati u uzorku krvi koristeći enzimsko vezani imunoapsorbirajući esej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), u kombinaciji sa SDS-PAGE i Western blottingom (46). Za otkrivanje uporabe inhibitora TGF- $\beta$  signala koriste se također SAR-PAGE i Western blotting (61), a efaproksiral se može precizno detektirati uz LC-MS/MS (31). Indirektnu metodu otkrivanja dopinga tvarima koje utječu na eritropoezu predstavlja hematološki modul Atletske biološke putovnice, a ključni parametri su koncentracija hemoglobina (HGB) i postotak retikulocita (RET%), uz OFF<sub>hr</sub> Score (61). OFF<sub>hr</sub> Score je važan jer može ukazati na doping s rHuEPO i tjednima nakon prestanka primjene (24). Postotak retikulocita bi se primjerice trebao smanjiti nakon primjene autologne transfuzije, ali smanjenje se može maskirati mikrodoziranje rHuEPO, koji stimulira eritropoezu u koštanoj srži (26). Poput detekcije autologne krvne transfuzije, i doping tvarima koje utječu na eritropoezu može rezultirati povišenjem serumske koncentracije hepcidina, što se može detektirati tekućinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (24). S obzirom da stimulacija stvaranja eritropoetina uključuje ekspresiju *Epo* gena, mogućnost detekcije krvnog dopinga predstavlja i određivanje specifične mRNA pomoću lančane reakcije polimeraze s reverznom transkriptazom (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) (24).



## **7. ZAKLJUČAK**

Krvni doping aktualna je kategorija dopinga. Povećanje izdržljivosti, odnosno maksimalnog aerobnog kapaciteta velika je prednost u brojnim sportskim natjecanjima. Premda postoje brojne metode za njegovu detekciju, one se stalno nadograđuju sukladno pronalaženju novih mogućnosti uporabe krvnog dopinga. Jedna od posrednih metoda otkrivanja, tzv. Atletska biološka putovnica, predstavlja kontinuirane napore da se uoče nepravilnosti, a ujedno i omogućuje zdravstvenu kontrolu sportaša.

## 8. ZAHVALE

Posebno zahvaljujem svome mentoru, prof. dr. sc. Ozrenu Jakšiću, na ljubaznosti, susretljivosti, izrazitom strpljenju i pomoći u pisanju rada.

Zahvaljujem Petru na optimizmu i energiji koje mi je davao, Stelli s kojom je sve uvijek ljepše, Matei na velikodušnosti i jer je prva razgovarala sa mnom kad sam pao godinu, Vasiliju koji je bio samo jedan video poziv dalje, Renati koja bi me se uvijek sjetila, Mateju, Andreju i Danielu, trojici mušketira koji su me bez pitanje prihvatili u svoje redove, Ani i Mireli na dragosti i šalama, bratiću Luki na povjerenju, kumi Nevenki koju smatram članom obitelji te cijeloj mojoj grupi na faksu u koju sam došao, gdje su svi pametni i lijepi, a posebno Borni, Eni, Martinu i Lani koji su me trpjeli i uključivali od početka do kraja.

Zahvaljujem svojim bakama Mariji i Sabini, i djedovima Pavlu i Stjepanu, kojih više nema, ali koje smo svi voljeli, i bez kojih nas ne bi bilo.

Zahvaljujem prijateljici Ana Mariji, na koju sam uvijek mogao računati. Na podršci, na društvu u odmorima u srednjoj školi i na zajedničkoj nenaklonosti prema tjelesnom odgoju, na svakom čekanju na kavi kada bih kasnio.

Zahvaljujem prijateljici Matei, koja nije odustajala od mene i koja me vukla iz vode koliko god puta sam tonuo. Na svim zrelim savjetima, lijepim trenucima i pomoći, bez kojih bih teže preživio fakultet.

Zahvaljujem svom bratu Alenu, koji je bio oslonac i prva linija obrane u naizgled strašnim situacijama. Na usmjeravanju na ispravan put, na smijehu i natprosječnim razmišljanjima, koje je dijelio bez ičega zauzvrat.

Zahvaljujem svojoj sestri Tesi, koja me uvijek tretirala kao sebi ravna, koliko god bila iznad mene. Na stalnom traženju dobrog u meni, na svim informativnim razgovorima, iskrenosti i opraštanju.

Zahvaljujem svome tati Damiru, na nepokolebljivom duhu i entuzijazmu, na stalnom radu da nam osigura najviše. Na svim vožnjama i borbama s nepravdama, na svakom putu kad bi se razvedrio samo jer sam ušao u prostoriju.

Svojoj mami Jadranki zahvaljujem jer je svaki trenutak pazila i olakšavala sve. I na satima čišćenja, kuhanja, rada u uredu i nespavanja od brige, na stavljanju potreba obitelji ispred svojih, na svakom „Laku noć“ koje je slala da se uvjeri da je sve u redu.

## 9. LITERATURA

1. Andrén-Sandberg Å. The history of doping and antidoping: A systematic collection of published scientific literature 2000-2015 [Internet]. Karolinska Institutet at Karolinska University Hospital; 2016. [Pristupljeno 15.06.2021.]. Dostupno na: <https://www.rf.se/globalassets/riksidrottsforbundet-rfantidoping/dokument/forskning-och-statistik/the-anti-doping-library-anti-doping-history.pdf>
2. World Anti-Doping Agency. World anti-doping code [Internet]. 2021. [Pristupljeno 10.05.2021]. Dostupno na: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021\\_wada\\_code.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf)
3. World Anti-Doping Agency. Anti-doping textbook [Internet]. 2019.[Pristupljeno 10.05.2021]. Dostupno na: <https://adel.wada-ama.org/en/node/335/take>
4. World Anti-Doping Agency. Prohibited list. [Internet] 2021. [Pristupljeno 10.05.2020.] Dostupno na: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf)
5. Dragčević D. Steroidi i doping. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet. 2020; urn:nbn:hr:105:034653
6. WADA (2021) [Pristupljeno na 10.05.2021] Dostupno na: <https://www.wada-ama.org/>
7. Atkinson TS, Kahn MJ. Blood doping: Then and now. A narrative review of the history, science and efficacy of blood doping in elite sport. Elsevier. 2020; 39:100632. doi: 10.1016/j.blre.2019.100632
8. Sottas PE, Robinson N, FIschetto G, Dolle G, Alonso JM, Saugy M. Prevalence of blood doping in samples collected from elite track and field athletes. Oxford Academic. 2011;57(5):762-769. doi: 10.1373/clinchem.2010.156067
9. Faiss R, Saugy R, Zollinger A, Robinson N, Schuetz F, Saugy M i sur. Prevalence estimate of blood doping in elite track and field athletes during two major international events. Frontiers in physiology. 2020. doi: 10.3389/fphys.2020.00160
10. Mairbäurl H. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. Frontiers in Physiology. 2013;4:322. doi: 10.3389/fphys.2013.00332
11. Lovrić J, Burger N, Delaš I, Foretić B, Kalanj Bogнар S, Karmelić I i sur. Priručnik za vježbe iz medicinske kemije i biokemije za studente medicine. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
12. Guyton AC, Hall JE. Andreis I, Kukulja Taradi S, Taradi M, ur. Medicinska fiziologija. 13. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.

13. McManus L, Mitchell RN. Pathobiology of human disease: A dynamic encyclopedia of disease Mechanisms. Elsevier; 2014;3049-3067 doi: 10.1016/B978-0-12-386456-7.06202-X
14. Benner A, Patel AK, Singh K. Physiology: Bohr effect. StatPearls Publishing LLC [Internet] 2021. [Pristupljeno 09.07.2021.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526028/>
15. Ploszczyca K, Czuba M, Chalimoniuk M, Gajda R, Baranowski M. Red blood cell 2,3-diphosphoglycerate decreases in response to a 30 km time trial under hypoxia in cyclists. *Frontiers in Physiology*. 2021. doi: 10.3389/fphys.2021.670977
16. Hua N, Takahashi H, Yee GM, Kitajima Y, Katagiri S, Kojima M i sur. Influence of muscle fiber type composition on early fat accumulation under high-fat diet challenge. *Plos one*. 2017; 12(8):e0182430. doi: 10.1371%2Fjournal.pone.0182430
17. Jelkmann W, Ludby C. Blood doping and its detection. Elsevier. 2011;118(9):2395-404. doi: 10.1182/blood-2011-02-303271
18. Otto JM, Montgomery HF, Richards T. Haemoglobin concentration and mass as determinants of exercise performance and of surgical outcome. *Extreme Physiology and Medicine*. 2013;2:33. doi: 10.1186%2F2046-7648-2-33
19. Fitch KD. Blood doping at the Olympic Games. *Edizioni Minerva Medica*. 2017;57(11):1526-32. doi: 10.23736/S0022-4707.17.06948-1
20. Giraud S, Sottas PE, Robinson N, Saugy M. Blood transfusion in sports. Springer. 2010. doi: 10.1007/978-3-540-79088-4\_13
21. Rodrigues de Oliveira CD, Valle de Bairros A, Yonamine M. Blood doping: Risks to athletes' health and strategies for detection. *Substance Use & Misuse*. 2014;49:1168-1181. doi: 10.3109/10826084.2014.903754
22. Souma T, Suzuki N, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2015. doi: 10.3389/fphys.2015.00167
23. Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Medicinsko-biokemijske smjernice. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
24. Salamin O, Kuuranne T, Saugy M, Leuenberger N. Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects. Elsevier. 2017;464(15):75-87. doi: 10.1016/j.mce.2017.01.033
25. Weidemann A, Johnson RS. Cell death and differentiation. Nature Publishing Group. 2008;15:621-627. doi: <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.12>
26. Morkeberg J. Blood manipulation: current challenges from an anti-doping perspective. ASH publications. 2013;2013(1):627-631. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.627

27. Dhillon S. Daprodustat: First approval. Springer Nature Switzerland AG. 2020;3:1-7. doi: 10.1007%2Fs40265-020-01384-y
28. Frampas C, Augsburg M, Varlet V. Xenon: From medical applications to doping uses. Elsevier. 2017;29(3). doi: 10.1016/j.toxac.2017.03.121
29. Coyne DW, Singh HN, Smith WT, Giuseppi AC, Connarn JN, Sherman ML i sur. Sotatecept safety and effects on hemoglobin, bone, and vascular calcification. *Kidney Int Rep.* 2019;4:1585-1597. doi: 10.1016/j.ekir.2019.08.001
30. Nakana Y, Imagawa S, Matsumoto K, Stockmann C, Obara N, Suzuki N i sur. Oral administration of K-11707 inhibits GATA binding activity, enhances hypoxia-inducible factor 1 binding activity, and restores indicators in an in vivo mouse model of anemia of chronic disease. *The American Society of Hematology.* 2004;104(13):4300-4307. doi: 10.1182/blood-2004-04-1631
31. Yi R, Sandhu J, Zhao S, Lam G, Loganathan D, Morrissey B. Detection of efaproxiral (RSR13) and its metabolites in equine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry,* 2014;49(1):57–67. doi:10.1002/jms.3304
32. Sen Gupta A. Hemoglobin-based oxygen carriers: current state-of-the-art and novel molecules. *Shock.* 2019;52(1):70–83. doi: 10.1097%2FSHK.0000000000001009
33. Haldar R, Gupta D, Chitranshi S, Singh MK, Sachan S. Artificial blood: A futuristic dimension of modern day transfusion sciences. *Bentham science.* 2019;17(1):11–16. doi: 10.2174%2F1871525717666190617120045
34. Jägers J, Wrobeln A, Ferenz KB. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology. Springer. 2020; 473:139–150. doi: 10.1126/science.78.2014.106
35. Sutehall S, Muniz-Pardos B, Lima G, Wang G, Malinsky FR, Bosch A. Altitude training and recombinant human erythropoietin: Consideration for doping detection. *Current Sports Medicine Reports.* 2019;18(4):97-104 doi: 10.1249/JSR.0000000000000577
36. Lippi G, Franchini M, Salvagno GL, Guidi GC. Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: Facts and speculation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 2006;43(4):349-391. doi: 10.1080/10408360600755313
37. Bejder J, Nordsborg NB. Specificity of „Live high – train low“ altitude training on exercise performance. *Exercise and Sport Sciences Reviews.* 2018;46(2):129-136. doi: 10.1249/JES.0000000000000144
38. Wilber RL. Application of altitude/hypoxic training by elite athletes. *Journal of human sport & exercise.* 2011;2(6). doi: 10.4100/jhse.2011.62.07
39. Cacic DL, Hervig T, Seghatchian J. Blood doping: The flip side of transfusion and transfusion alternatives. Elsevier. 2013;49(1):90-94. doi: 10.1016/j.transci.2013.05.014
40. Pommering TL. Erythropoietin and other blood-boosting methods. Elsevier. 2007;54(4):691-699. doi: 10.1016/j.pcl.2007.04.007

41. Lundboy C, Robach P, Saltin B. The evolving science of detection of „blood doping“. *BJP*. 2011. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01822.x
42. Sgro P, Sansone M, Sansone A, Romanelli F, Di Luigi L. Effects of erythropoietin abuse on exercise performance. *The Physician and Sportsmedicine* 2018;105-115. doi: 10.1080/00913847.2018.1402663
43. Malm CB, Khoo NS, Granlund I, Lindstedt E, Hult A. Autologous doping with cryopreserved red blood cells – Effects on physical performance and detection by multivariate statistics. *Plos One*. 2016;11(6):e0156157. doi: 10.1371/journal.pone.0156157
44. Towns CR, Gerrard DF. A fool’s game: Blood doping in sport. Elsevier. 2014;3(1):54-58. doi: 10.1016/j.peh.2014.11.001
45. Pope HG, Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance enhancing drugs: An endocrine society scientific statement. *Oxford academic*. 2014;35(3):341–375. doi: 10.1210%2Fer.2013-1058
46. Jelkmann W. Watch out for a revival of peginesatide in sports. *Wiley Analytical Science*. 2016;9(2):157-160. doi: 10.1002/dta.1979
47. Lippi G, Montagnana M, Franchini M. Ex-vivo red blood cells generation: A step ahead in transfusion medicine? Elsevier. 2011;22(1):16-19. doi: .1016/j.ejim.2010.08.001
48. Rodrigues de Oliveira CD, Valle de Bairros A, Yonamine M. Blood doping: Risks to athletes' health and strategies for detection. *Substance Use & Misuse*. 2014;49:1168-1181. doi: 10.3109/10826084.2014.903754
49. World Anti-Doping Agency. International standard: Therapeutic use exemptions [Internet] 2021. [Pristupljeno 10.06.2021.] Dostupno na: <https://www.wada-ama.org/en/resources/therapeutic-use-exemption-tue/international-standard-for-therapeutic-use-exemptions-istue>
50. Gerrard D, Pipe A. Therapeutic use exemptions. Karger. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000460700>
51. Rožmanić C. Krvni doping. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. 2015;urn:nbn:hr:217:387315
52. Segura J, Ventura R, Pascual JA. Current strategic approaches for the detection of blood doping practices. 2011;213:42-48. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.07.029
53. Leuenberger N, Schumacher YO, Pradervand S, Sander T, SaugyM, Pottgiesser T. Circulating microRNAs as biomarkers for detection of autologous blood transfusion. *Plos one*. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0066309

54. Leuenberger N, Barras L, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Lion N, i sur. Heparin as a new biomarker for detecting autologous blood transfusion. *AJH*. 2016;91(5):467-472. doi: 10.1002/ajh.24313
55. Voss SC, Jaganjac M, Al-Thani AM, Grivel JC, Raynaud CM, Al-Jaber H, i sur. Analysis of RBC-microparticles in stored whole blood bags – a promising marker to detect blood doping in sports? *Wiley Online Library*. 2017;9(11-12):1794-1798. doi: 10.1002/dta.2212
56. Salamin O, De Angelis S, Tissot JD, Saugy M, Leuenberger N. *Autologous Blood Transfusion in Sports: Emerging Biomarkers*. Elsevier. 2016;30(3):109-115. doi: 10.1016/j.tmr.2016.05.007
57. Mahendru D, Kumaravel J, Mahalmani VM, Medhi B. Athlete Biological Passport: Need and challenges. *Indian J Orthop*. 2020;54(3):264-270. doi: 10.1007/s43465-020-00040-7
58. World Anti-Doping Agency. *Athlete biological passport Operating guidelines* [Internet] 2021. [Pristupljeno 10.05.2021.] Dostupno na: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines\\_abp\\_v8\\_final.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v8_final.pdf)
59. Scütz F, Zollinger A. APBS: An R package for calculating the abnormal blood profile score. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1638. doi: 10.3389/fphys.2018.01638
60. Borno A, Aachman-Andersen NJ, Lundby C. Screening for recombinant human erythropoietin using [Hb], reticulocytes, the OFF-hr score, OFF-z score and Hb-z score: Status of the Blood Passport. *European Journal of Applied Physiology*. 2010;109:537-543. doi: 10.1007/s00421-010-1370-5
61. Jelkmann W. Erythropoietin: novelties in antidoping research. Elsevier. 2019;9:28-33. doi: 10.1016/j.coemr.2019.05.005



## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Robin Paulić

Datum i mjesto rođenja: 22. ožujka 1996., Osijek

### **OBRAZOVANJE:**

2014. – 2021. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2010. – 2014. Gimnazija Beli Manastir

2002. – 2010. Osnovna škola „Dr. Franjo Tuđman“, Beli Manastir

### **AKTIVNOSTI:**

2017. sudjelovanje na VI. Hrvatskom kongresu iz neuroznanosti u Osijeku

2016. – 2017. demonstrator na katedrama za Medicinsku biologiju, Medicinsku kemiju i biokemiju, Histologiju i embriologiju