

Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija

Erythropoietin, epoetins and detection

Klemen Španinger, Nataša Debeljak

Povzetek: Eritropoetin (EPO) je endogeni hormon, ki se sintetizira v posebnih epitelnih celicah v renalnih peritubulnih kapilarah. Je glavni faktor, ki vpliva na eritropoezo pri ljudeh in živalih. Glavna sinteza EPO poteka v ledvicah (90 %) nekaj pa ga sintetizirajo tudi jetra in možgani (10 %). Rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO), ki se uspešno uporablja v medicini, je prišel na tržišče v začetku devetdesetih let. Izboljšal je življenjski status bolnikov z ledvično odpovedjo in bolnikov z anemijami, ki so bili pred tem odvisni od transfuzij krvi. Vendar so po njem posegli tudi športniki različnih panog zaradi njegovega pozitivnega učinka pri premagovanju fizičnih naporov. EPO deluje kot vzpodbujevalec nastajanja rdečih krvnih celic in s tem poveča dostavo kisika v mišična tkiva. Zaradi tega ga je Mednarodni Olimpijski Komite leta 1987 uvrstil na seznam prepovedanih substanc v športu. Vendar pa sama tehnologija detekcije in ločevanja endogenega in eksogeno vnesenega EPO ni bila dostopna vse do leta 2000, ko so prvič uporabili metodo izoelektričnega fokusiranja oziroma IEF. Problem detekcije rHuEPO je njegova kompleksnost in velika strukturna podobnost naravnemu endogenemu EPO. Poleg tega je koncentracija EPO v človeških tekočinah zelo nizka.

Abstract: Erythropoietin (EPO) is an endogenous hormone synthesized in special epithelial cells in renal peritubular capillaries. It is the main factor in human and animal erythropoiesis. EPO is synthesised in kidney (90 %) and some in liver and other organs like brain (10 %). Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) used in medicine, was introduced to the market in early nineties. rHuEPO improved quality of life of patients with kidney failure and anaemic patients, which were receiving blood transfusion. However, because of its positive influence some athletes from different sports abuse it. EPO acts as a stimulus for production of red blood cells, leading to more efficient oxygen delivery to muscles. Therefore the International Olympic Comity banned it in 1987. Detection method that could differentiate between endogenous and exogenous EPO was developed in 2000, when the method called isoelectric focusing (IEF) was first used. The problem of detection of rHuEPO is its complexity and structural similarity to endogenous EPO and also the low concentration of EPO in human blood and urine.

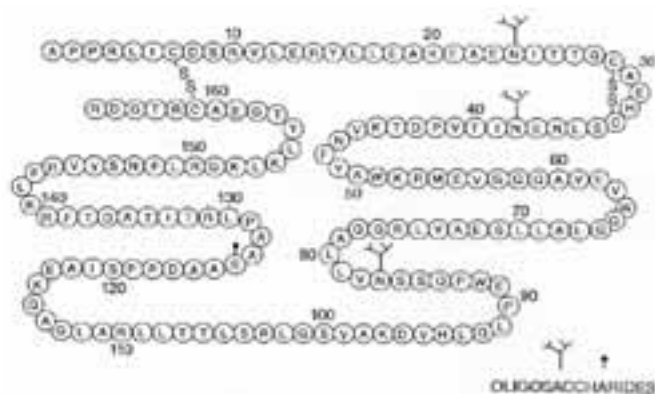
1 Endogeni eritropoetin

Eritropoetin (EPO) je glikoprotein z molekularno maso med 30-39 kDa. Glavno mesto sinteze endogenega EPO so ledvične celice (1, 2). Stimulus za samo sintezo EPO je hipoksija v tkivih. Povečana sinteza EPO v hipoksičnih ledvicah je dosežena tako, da se rekrutira večje število celic, ki sintetizirajo EPO protein. Celice, ki sintetizirajo EPO so podvrsta kortiko-intersticijskih celic (3). Sintetizira se v obliki prohormona s 193 dolgim aminokislinskim zaporedjem. Po cepitvi 27 aminokislinskega peptida z N-terminalnega konca in odstranitvi R166 na C-terminalnem koncu med postranslacijsko modifikacijo nastane končna oblika EPO; 165 aminokislinski protein v velikosti 30-34 kDa (4). EPO ima dve intramolekularni disulfidni vezi (C7-C161 in C29-C33) in 4 neodvisne sladkorne verige pripete na asparaginske ali serinske aminokislinske ostanke. Primarna struktura EPO je predstavljena na sliki 1. Polisaharidi predstavljajo kar 40 % molske mase proteina. Tri N-glikozidno vezane sladkorne verige na asparaginih (N24, N38 and N83) so pomembne pri biološki vlogi hormona *in vivo*, kot so biosinteza, sekrecija ter stabilizacija v obtoku. O-glikozidno vezana veriga na serinu (S126) nima znane vloge (5, 6). Polisaharidi so tudi pomembni dejavnik detekcije rHuEpa v krvi.

Izražanje EPO mRNA in proteina samega je uravnavano predvsem na nivoju transkripcije. Glavni regulator transkripcije je hipoksija. V regulacijo so vključeni transkripcijski faktorji GATA-2, NF-kappaB (negativna regulacija) ter HIF-2 in HNF-4alpha (pozitivna regulacija) (7, 8).

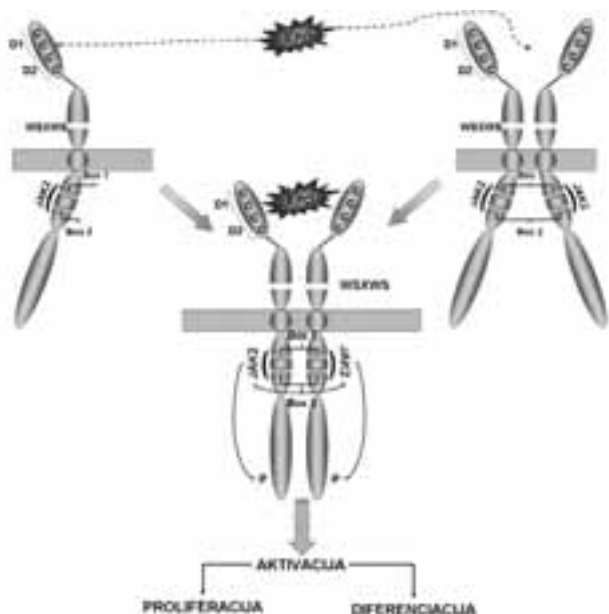
EPO je član citokinske družine, v katero spadajo rastni hormon, prolaktin, interleukini 2 do 7, granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (G-CSF) in drugi (9). Čeprav imajo ti proteini majhno sekvenčno homologijo, pa imajo podobno število eksonov in podobno strukturno obliko proteina. Imeli naj bi globularno obliko sestavljeno iz 4 alfa heliksov (9).

EPO se iz krvnega obtoka prenese v rdeči kostni mozeg. Povečano število eritrocitov opazimo 1 do 2 dni po tistem, ko se koncentracija EPO v plazmi zviša. Razpolovni čas EPO v krvnem obtoku je 6 do 8 ur (10, 11). EPO deluje na izvorne eritroidne celice (BFU-E; erythroid burst-forming units in CFU-E; erythroid colony-forming units). Te celice imajo posebne eritropoetinske receptorje (EPO-R). EPO-R je transmembranski glikoprotein z molekularno maso 55,2 kDa (12). Spada v družino citokinskih receptorjev in receptorjev za rastne faktorje. EPO po vezavi na EPO-R poveča možnost preživetja celice in s tem omogoči njeno nadaljnjo diferenciacijo v zrel eritrocit,



Slika 1: Primarna struktura EPO. Predstavljene sta dve disulfidni vezi, eno O- ter tri N- glikozilacijska mesta. Z dovoljenjem objavljeno po (5).

Figure 1: Primary structure of EPO. Shown are two disulfide bonds, one O- and three N-glycosylation sites. Published with permission (5).



Slika 2: Shema vezave eritropoetina na eritropoetinski receptor. Predlagani sta dve teoriji vezave EPO na EPO-R. Prva govori o tem, da se EPO veže na monomer, po vezavi EPO se na ta kompleks veže drugi monomerni EPO-R. Tako se tvori aktiviran dimer (slika 2 levo) (14). Druga teorija pa govori o že formiranem EPO-R dimeru, ki se aktivira ob vezavi EPO (slika 2 desno) (15).

Figure 2: Binding of erythropoietin to erythropoietin receptor. There are two possible theories of binding. The first theory proposes binding of EPO on monomer. After the binding another monomer of EPO-R binds to the complex. This forms an active dimer (figure 2 left) (14). Second theory is that EPO-R is already a formed dimer, which is activated after EPO binding (figure 2 right) (15).

sposoben prenosa kisika v tkiva. Ena molekula EPO se veže na dve molekuli EPO-R (Slika 2).

EPO in EPO-R sta prisotna tudi v nekrvotvornih tkivih, kot so možgani, jetra, srce, endotelijske celice, itd. EPO ima v omenjenih organih zaščitno vlogo, spodbuja celično delitev ter celice ščiti pred apoptozo. Mutacije EPO-R receptorjev v nekrvotvornih tkivih povezujejo z določenimi boleznimi (anemije, renalni rak) (13).

2 Rekombinantni eritropoetin

Humani rekombinantni eritropoetin (rHuEPO) se pridobiva tako, da cDNA za EPO vstavijo v genom ene izmed celičnih linij. Največkrat je to linija kitajskega hrčka (ovarijske celice kitajskega hrčka - chinese hamster ovary cells, CHO) (pridobivanje epoetina, epoetina β in darbepoetina) ali pa linija hrčka (Baby Hamster Kidney, BHK) (pridobivanje epoetina). Ti dve liniji omogočata pravilno tvorbo disulfidnih vezi ter glikozilacijo proteina, ki je pomembna za njegovo biološko funkcijo. Tako sintetiziran rHuEPO je v primerjavi z endogenim EPO identičen na nivoju peptidnega zaporedja, vendar pa je heterogen na nivoju pripetih sladkorjev. Klasifikacija epoetinov (epoetin alfa, epoetin beta, epoetin omega) temelji na metodi sinteze in pridobivanja rHuEPO. Čeprav se protein glikozilira v obeh celičnih linijah (CHO in BHK) in je glikozilacija zelo podobna kot pri endogenemu EPO, pa nekateri deli proteina ostanejo neglikozilirani zaradi odsotnosti specifičnih glukotransferaz (16).

Trenutno rHuEPO proizvajajo različni proizvajalci v različnih oblikah: epoetin α , β , δ , ω in darbepoetin (11). Ker se rHuEPO proizvaja s strani različnih proizvajalcev, v različnih delih sveta po različnih postopkih, z različnimi reagenti in materiali, se ti epoetini med seboj razlikujejo po glikozilaciji, kljub temu da se uporabljajo iste celične linije.

CERA in NESP sta modificirana epoetina, ki imata povečano biološko aktivnost. V razvoju je več novih oblik rHuEPO in eritropoezo stimulirajočih zdravil (17).

3 Epoetin alfa in epoetin beta

rHuEPO α in β sta na nivoju peptidnega zaporedja enaka endogenemu EPO, z manjšo razliko na nivoju pripetih sladkorjev. rHuEPO α je bil prvi komercialno dostopen rekombinantni epoetin leta 1985 v ZDA. Tako epoetin α kot epoetin β sta sintetizirana v CHO. Primerjava biološke aktivnosti epoetina β in α je pokazala, da je biološko bolj aktiven oziroma potenten epoetin β . Prav tako pa se epoetini razlikujejo v svojih izoformah. Razlike so posledica že predhodno omenjenih razlik v glikozilaciji (16). Tako lahko pri epoetinu β pri analizi IEF opazimo eno izoformo več v bazičnem območju kot pri epoetinu α , kar mu daje tudi bolj bazične lastnosti (Slika 5: epoetin β in epoetin α).

Poleg razlike v biološki aktivnosti in razlike v strukturi, je razlika med epoetinom α in epoetinom β tudi v farmakokinetičnih in farmakodinamičnih profilih (18). Zanimiv podatek je tudi, da so prostovoljci, ki so prejeli epoetin α v 56 % poročali o bolečini po subkutani aplikaciji, za razliko od tistih, ki so dobili epoetin β , ki so bolečino čutili v 5,6 % (18). Vendar pa si to lahko razlagamo z dejstvom, da sta pripravka vsebovala različne pomožne snovi, ki bi lahko vplivale na ta pojav (19, 20).

Na trgu se je pojavil tudi epoetin ζ , ki je biološko primerljivo zdravilo epoetinu α . Izoliran je, kot epoetin α , iz CHO celic. Zaradi spremenjene poti sinteze, se razlikuje od epoetina α po profilu glikozilacije. To je razvidno tudi pri analizi z izoelektričnim fokusiranjem kjer vidimo močnejši signal prve lise (Slika 5: epoetin ζ).

V nadaljevanju so podrobneje predstavljeni epoetini, ki so bili spremenjeni z namenom večje biološke aktivnosti in razpoložljivosti, to so NESP, CERA in epoetin δ .

4 NESP - oblika epoetina α

Darbepoetin α oziroma NESP (new erythropoiesis stimulating protein) je oblika epoetina α , ki ima daljšo razpolovno dobo v primerjavi z ostalimi epoetini (razen CERA). NESP ima mutiranih pet aminokisljin, kar omogoča vezavo dveh dodatnih N-glikoziliranih verig na mesto N30 in N88. Tako NESP vsebuje 5 N-vezanih verig ogljikovodikov in do 22 sialičnih kislin, s čemer se delež molske mase polisaharidov poveča na 51 % (21). Za primerjavo z ostalimi rHuEPO, ki imajo 3-N vezane ogljikovodikove verige in največ 14 sialičnih kislin ter 40 % delež polisaharidov. Dodatne ogljikove verige zmanjšajo afiniteto darbepoetina do EPO receptorja, podaljšajo serumski razpolovni čas ter povečajo biološko aktivnost. Ker je ta oblika epoetina tako dalj časa prisotna v krvnem obtoku, se lahko daje enkrat tedensko za razliko od ostalih oblik epoetinov (razen CERA), ki se dajejo 3-krat tedensko, da se doseže podoben klinični učinek (22, 23). Darbepoetin α se v pH gradientu pri metodi izoelektričnega fokusiranja nahaja v kislem območju in se tako močno razlikuje od ostalih oblik epoetinov, ki se nahajajo v bazičnem delu elektroferograma (Slika 5). Darbepoetin sestavljajo 4 dominantne izoforme združene v kislem delu elektroferograma (Slika 5; lise A-D v kislem območju reference).

5 CERA - oblika epoetina β

CERA (continuously erythropoiesis receptor activator) je nova oblika epoetina β . Njegova velikost je kar dvakrat večja od navadnih epoetinov in sicer 60 kDa. Temelji na EPO molekuli, ki pa je modificirana z vezavo polidisperznih polimerov. Metoksi polietilen glikolni (PEG) polimer je vezan na N-terminalno aminokisljino in -amino skupino lizina 52 in lizina 45. Posledično je razpolovni čas takega epoetina v telesu veliko daljši v primerjavi z rHuEpo in NESP, in sicer 135 ur po subkutani ali intravenozni aplikaciji. Na sam EPO-R se CERA veže počasneje z njega pa oddisociira hitreje, kar tudi vpliva na njegovo biološko uporabnost in framakokinetiko (9). Njegov elektroferogramski profil je v bazičnem delu in je celo bolj bazičen od ostalih epoetinov, kar nam omogoča njegovo ločitev od endogenega EPO. Vidimo lahko 6 izoform, od tega so prve 4 izoforme zelo močne in se skoraj ne prekrivajo z ostalimi epoetini (Slika 5; CERA). Najpomembnejša je prisotnost izoforme številka 3, ki ni prisotna ne pri epoetinih in prav tako ne v endogenem EPO.

6 Epoetin δ

Epoetin δ ali GA-EPO, kot ga imenujejo, se pridobiva v humani celični liniji, vendar pa ne v ledvičnih celicah (1). Kljub temu, da sinteza poteka v humanih fibrosarkomskih celicah, pa se glikozilacija EPO še vedno razlikuje od endogenega EPO (Slika 5). Vzrok temu je, da je

sama glikozilacija odvisna od encimov, ki so prisotni v Golgijevem aparatu celice. Tako te celice niso sposobne take glikozilacije kot celice v ledvicah. Njegov signal se pojavi v bazičnem delu elektroferograma. Opazimo lahko, da se od 7 izoform, 2 pojavita v endogenem delu elektroferograma, vendar pa je najmočnejši signal v bazičnem delu.

7 Epoetin ω

Epoetin ω je izoliran iz ledvičnih celic mladičkov hrčka (BHK). Je sialoglikoprotein z zmanjšanim številom O-vezanih sladkorjev, manjšo kislostjo in drugačno hidrofilitostjo kot ostali epoetini. Trži se predvsem v vzhodni Evropi in Latinski Ameriki in delu Azije. Nekatere študije so pokazale, da je potrebno dajati nižji odmerek epoetina ω napram epoetinu α , da dosežemo in vzdržujemo enako količino hemoglobina (24).

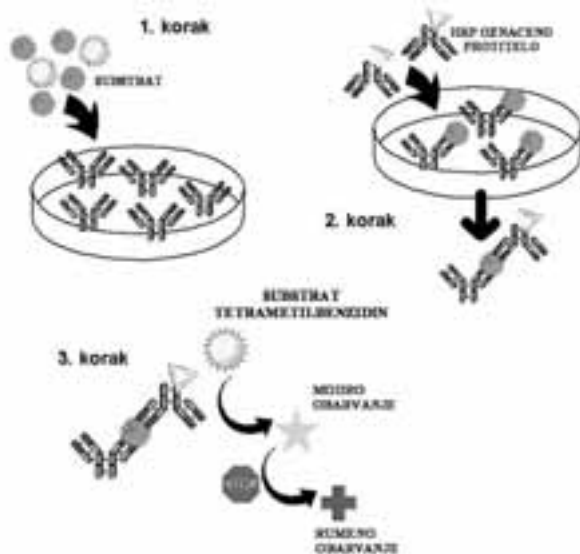
8 Detekcija eritropoetina

Ker se koncentracije EPO v telesu tekom dneva spreminjajo in močno nihajo in so razlike tudi na medindividualni ravni, samo merjenje koncentracije EPO z ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testom ni zanesljivo merilo. Še posebej pa to velja za protidopinške meritve, saj ELISA ne razlikuje med endogenim in rekombinantnim EPO proteinom. V te namene se poleg celokupne koncentracije eritropoetina v telesu določa še hematokrit, odstotek retikulocitov, odstotek makrocitov in koncentracija serumskega topnega transferinskega receptorja (sTfr) (1, 11). Vendar pa je to le osnova. Glavna metoda določevanja rHuEpa je izoelektrično fokusiranje (IEF).

9 Detekcija z ELISA

Encimskoimunski test ELISA je metoda, ki ni uporabna samo pri določevanju celokupne koncentracije epoetinov in endogenega EPO, temveč se uporablja tudi za določevanje drugih analitov. Temelji na detekciji proteina oziroma analita s specifičnimi protitelesi in encimsko barvno reakcijo. Koncentracija analita se določi glede na umeritveno krivuljo, ki jo dobimo iz meritev standardov znanih koncentracij. Sam postopek določevanja je sledeč. Naš vzorec, v primeru analiz EPO je to retantat urina ali plazma, naneseemo na mikrotitersko ploščico, katere dno je prevlečeno z EPO protitelesi (Slika 3). Poleg vzorca na mikrotitrski ploščici ločeno analiziramo tudi standarde in kontrole. Prvi nam služijo za določevanje umeritvene krivulje, drugi pa kot kontrola testa. Po inkubaciji prostorčke na ploščici izpraznimo in odstranimo nevezane proteine, EPO molekule pa ostanejo vezane na primarna EPO protitelesa. Dodamo sekundarna EPO specifična protitelesa, ki se vežejo na konjugat EPO-primarnih protiteles. Sekundarna protitelesa so označena z encimom peroksidazo (horseradish peroxidase, HRP), ki cepi substrat in vodi v nastanek barvnega produkta (Slika 3, korak 2). Temu sledi izpiranje ter dodajanje substrata za barvno reakcijo, ki jo po določenem času prekinemo (Slika 3, korak 3). Ko je barvna reakcija končana določimo količino nastalega produkta z merjenjem absorbance pri 450 nm. Izmerjena vrednost absorbance je sorazmerna količini EPO v vzorcu.

Sama metoda se pri detekciji rekombinantnih epoetinov uporablja izključno za določitev celokupne koncentracije EPO v vzorcu. S tem



Slika 3: Postopek detekcije eritropoetina z ELISA testom. 1. korak: vezava eritropoetina na primarna protitelesa, 2. korak: konjugacija primarnih protiteles z encimsko označenimi sekundarnimi protitelesi, 3. korak: detekcija.

Figure 3: Detection of erythropoietin using ELISA. 1. step: binding of erythropoietin on primary antibodies, 2. step: conjugation of primary antibodies with secondary enzyme labeled antibodies, 3. step: detection.

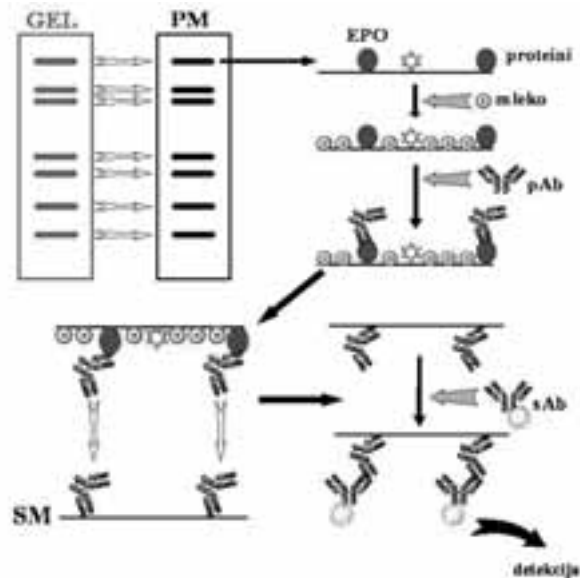
preprečimo prekomeren nanos vzorca na IEF gelu. S to metodo, kot že omenjeno, ne moremo ločiti med eksogenimi epoetini in endogenim EPO, ker se primarna EPO protitelesa vežejo na proteinski epotopin ne na sladkorni del, ki se razlikuje med EPO in izoformami.

10 Detekcija z izoelektričnim fokusiranjem

Osnova IEF je ločevanje izoform EPO molekul s pomočjo električnega toka na gelu s pH gradientom. Položaj izoforme v gelu s pH gradientom določa izoelektrična točka (pI). Izoforme epoetina so podrazred molekule epoetina, ki imajo različen nivo glikozilacije (število sialičnih kislin) in s tem različen naboj in pI. Izoelektrična točka (pI) je tisti pH, pri katerem je vrednost neto naboja molekule nič.

Izoforme so vidne na gelu kot signal v obliki pasu (Slika 5). Profil izoform je sestavljen iz pasov, njihovega števila, pozicije v pH gradientu in jakosti signala. Vse te karakteristike se razlikujejo med različnimi vrstami molekul z različnimi strukturnimi lastnostmi. Bolj kot je signal gost oziroma močan za določeno izoformo, več te izoforme je prisotne v našem vzorcu. Ločevanje EPO molekul poteka pri gradientu pH med 8 in 2 (Slika 5). Manj glikozilirane molekule imajo pI v bolj bazičnem območju (epoetini), bolj glikozilirane pa v kislem območju (NESP). Endogeni EPO ima večjo gostoto in število izoform v primerjavi z ostalimi rHuEPO. Izoforme endogenega EPO se nahajajo v endogenem in bazičnem območju (Slika 5, KS urin).

Metoda izoelektričnega fokusiranja za določevanje EPO, ki jo je razvila dr. Lasne (25), je bila prvič uporabljena leta 2000 na

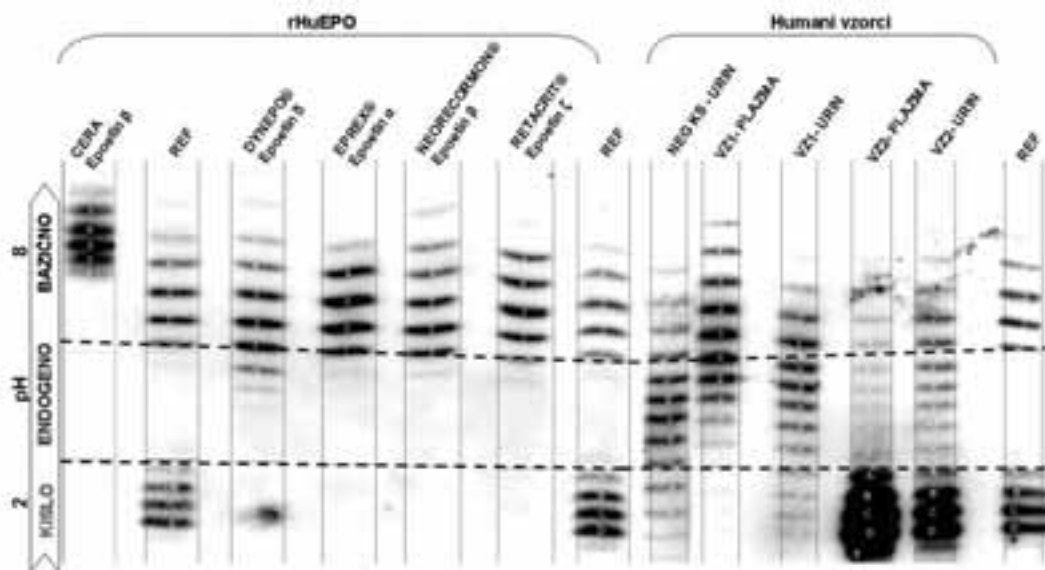


Slika 4: Postopek metode izoelektričnega fokusiranja z dvojnimi prenosom: prenos proteinov iz gela na primarno membrano (PM) ter nato na sekundarno membrano (SM). pAb, primarna protitelesa; sAb, sekundarna protitelesa; EPO, eritropoetin.

Figure 4: Isoelectric focusing with double blot: transfer of proteins on primary membrane (PM) following by second transfer on to secondary membrane (SM). pAb, primary antibodies; sAb, secondary antibodies; EPO, erythropoietin.

olimpijskih igrah v Sydneyu. Metoda temelji na 4 glavnih korakih: koncentriranja urina, ločevanje na gelu s pH gradientom, dvojni prenos in detekcija s kemoluminiscenco (1). Potek postopka je prikazan na sliki 4.

Urin pred nanosom na gel skoncentriramo in dodamo inhibitorje proteaz, da preprečimo razgradnjo EPO. Koncentriranje dosežemo z uporabo dveh različnih kolon z zamreženostjo 30 kDa. S tem urin skoncentriramo iz 20 mililitrov na nekaj mikrolitrov ter odstranimo večino proteinov z molekulska maso pod 30 kDa. Predhodno lahko uporabimo tudi ultrafiltracijo, da se znebimo morebitno prisotnih celic in bakterij. Ko imamo urin skoncentriran, izmerimo celokupno koncentracijo EPO s testom ELISA. S tem preprečimo prekomeren nanos na gel za IEF. Maksimalni nanos je 800 IU/l. Vzorce po potrebi razredčimo in nanosimo na gel za IEF, predhodno izpostavljenega električnemu toku v namen vzpostavitve pH gradienta. Gel je sestavljen iz amfolitov, uree, poliakrilamida in glukoze. Amfoliti so snovi, ki imajo specifični pH razpon. V EPO analizi se uporabljata v gelu dva, in sicer amfolit s pH območjem od 2-4 in od 4-6, ter amfolit 6-8 kot katodni elektrolit. S tem zagotovimo razpon gradienta gela od pH 2-8, ki je nujen za analizo trenutno dostopnih rekombinantnih epoetinov. Na gel poleg vzorcev nanosimo pozitivno in negativno kontrolo ter referenco (mešanico NESP in Epo standarda BRP – erythropoietin biological reference preparation), ki nam kasneje služijo za določevanje kislega, endogenega in bazičnega območja



Slika 5: Elektroferogram. rHuEPO, rekombinantni humani eritropoetin; CERA oblika rHuEPO; REF, referenca, mešanica epoetina alfa, beta in NESP, služi kot pozitivna kontrola; NEG-KS – vzorec urina zdrave osebe – negativna kontrola; VZ1 in VZ2 vzorci urina in krvi bolnikov z rakom, VZ2 je vzorec bolnika na terapiji z rekombinantnim humanim eritropoetinom (NESP).

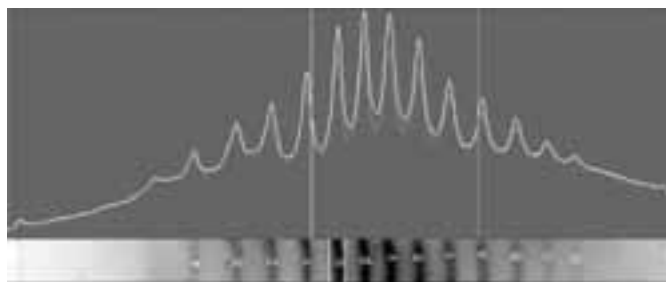
Figure 5: Electroferogram. rHuEPO, recombinant human erythropoietin; CERA, continuously erythropoiesis receptor activator, REF, reference, mixture of epoetin alpha, beta and NESP; NEG-KS – sample of urine – negative control; VZ1 and VZ2 samples of urine and blood from cancer patients, VZ2 sample of patient receiving rHuEPO (NESP).

elektroferograma (Slika 5). Po končanem fokusiranju sledi pol-suhi prenos proteinov na primarno PVDF (polyvinylidene fluoride) membrano v Tris/Glicinu. Proteini potujejo proti anodi, saj so negativno nabiti. Po končanem primarnem prenosu, membrano blokiramo v mleku ter nato dodamo primarna EPO protitelesa (monoklonska mišja protitelesa AE7A5). Da bi dosegli večjo specifičnost detekcije in boljše ločljivostjo, sledi drugi prenos, pri katerem prenesemo primarna protitelesa v kislem (ocetna kislina) na sekundarno PVDF membrano. Protitelesa so pozitivno nabita in potujejo proti katodi. Po drugem prenosu ponovno sledi blokiranje membrane z mlekom. Nato dodamo sekundarna protitelesa, ki so encimsko označena (biotinsko označena anti-mišja IgG), in nam služijo za streptavidin-peroksidazno detekcijo (26). Da bi se izognili

nescificnemu prenosu vedno položimo dodatno DURAPORE® membrano med PVDF membranama in med PVDF membrano in gelom (25).

Metoda ni primerna samo za določanje EPO v urinu temveč sedaj tudi za določanje EPO v plazmi. Protokol je podoben že opisanemu. Uveden je le dodaten korak imunoafinitetnega čiščenja s pomočjo monoklonalnih anti EPO protiteles (9C21D11) (27). Uporabi se lahko tudi pri urinskih vzorcih, ki imajo visoko koncentracijo ostalih proteinov (proteinurija). Visoka koncentracija proteinov lahko povzroči, da elektroferogram nima jasnih signalnih trakov, temveč vidimo ukrivljene trakove. To nam otežuje določevanje oziroma analizo slike. Po postopku imunoafinitetnega čiščenja pridobimo koncentrat, v katerem so bile odstranjene tudi vse proteaze in s tem ni potrebno dodajanje proteaznih inhibitorjev. Tako izključimo še en nepotreben poseg v sam vzorec (25, 27).

V primeru imunoafinitetne priprave krvnega in urinskega vzorca na elektroferogramu opazimo zamik trakov urinskega vzorca v primerjavi z krvnim vzorcem (Slika 5: VZ1 plazma in VZ1 urin). Do zamika urinskih vzorcev v kislno območje pride zaradi zakisanja EPO izoform v ledvicah. Do zamika ne pride v primeru proteinurije (28). Zamika urinskih vzorcev v kislno območje ne opazimo pri vzorcu bolnika, ki prejema cisplatinško kemoterapijo ter darbepoetin (Slika 5: VZ2) iz česar bi lahko sklepali na okvaro ledvic zaradi kemoterapije. Metoda IEF torej lahko služi kot diagnostično sredstvo detekcije količine endogenega EPO in delovanja ledvic pri rakavih bolnikih, ki prejemajo cisplatinško kemoterapijo.



Slika 6: Densitometrična analiza vzorca. Prikazana je analiza vzorca NEG-KS-urine (negativna kontrola) iz slike 5.

Figure 6: Densitometry of sample NEG-KS urine (negative control) from figure 5.

Ko razvijemo elektroferogram, sledi analiza le tega s pomočjo denzitometrije (Slika 6). S tem določimo relativno moč signala posameznih EPO izoform. Denzometrija je eden izmed pomembnih korakov pri določevanju pozitivnih in negativnih vzorcev pri dopinških testih.

11 Uporaba eritropoetina

Eritropoetin se uporablja kot terapija pri anemijah, ki so posledica kronične odpovedi ledvic, pri anemijah kot posledica kemoterapije pri bolnikih z rakavimi obolenji, pa tudi pri bolnikih z virusom HIV (29). EPO deluje tudi neuroprotektivno in tkivno zaščitno (epitelij, endometrij, srce itd.) (13).

Navadno se EPO daje intravensko, subkutano ali intraperitonealno. Način aplikacije je odvisen od farmakokinetičnih lastnosti oblike EPO ter od same praktičnosti.

Opaženo je bilo, da je učinek na eritropoezo večji pri rednem odmerjanju EPO v razdrobljenih odmerkih, kot pa dajanje velikega odmerka (30).

Maksimalna koncentracija izmerjena v krvnem obtoku je pri intravenskem dajanju zdravila dosežena v nekaj minutah, za razliko od subkutanega dajanja kjer lahko traja od 5 ur pa do 24 ur in več po dajanju (31).

Sekrecija rHuEPO v urin je pri zdravih prostovoljcih manjša od 1 % danega odmerka.

Jetra so udeležena pri razgradnji EPO, kjer se vrši desializacija oziroma odstranjevanje sialičnih kislin, kar je omejujoči dejavnik izločanja EPO (32). V urinu se pod kislimi pogoji ali pod vplivom proteaznih encimov lahko sialični ostanki hidrolizirajo. To vodi v spremembo profila v elektroferogramu (33), kar izkoriščajo športniki v namene prikrivanja dopinga.

12 Eritropoetin in doping

Povečana dostava kisika v mišična tkiva je zelo pomembna pri doseganju optimalnih sposobnosti atleta, predvsem njegove vzdržljivosti. Dokazano je bilo, da več metod povečuje oksigenacijo tkiv, med njimi tako imenovane višinske in hipoksične sobe, transfuzija krvi in vbrizgavanje humanega rekombinantnega eritropoetina (29). Ocenjuje se, da od 3-7 % vrhunskih atletov v vzdržljivostnih športih, kot sta kolesarstvo in atletika uporablja EPO v namene dopinga (34). Najnovejši primeri izhajajo iz predzadnjega Tour De France (2008) in olimpijskih iger v Pekingu, kjer so športniki zlorabljali novo obliko epoetina imenovanega CERA.

13 Eritropoetin in rakava obolenja

Epoetini vseh vrst se uporabljajo pri terapiji anemij, ki so posledica kemoterapij in obsevanj pacientov z rakom. Vendar pa kot vsaka učinkovina, imajo tudi epoetini neželene stranske učinke. Medtem ko je aplikacija rHuEPO močno zmanjšala potrebo po transfuziji, je povečala možnost pojava tromboemboličnih pojavov (35). Prav tako se pojavlja vprašanje ali je EPO-R prisoten na malignih rakavih celic, kar bi ob dajanju rHuEpo lahko povzročilo povečano razrast rakastega tkiva in s tem zmanjšalo možnost preživetja. To se je

pokazalo pri dveh študijah objavljenih v letu 2003, kjer so bile udeležene bolnice z rakom dojke (36, 37), in pacienti z rakom na vratu in glavi (38). Slabše preživetje je bilo kasneje pokazano pri več oblikah raka (39), pri čemer vseh razlik ne moremo razložiti z embolijami.

Točni mehanizmi, kako naj bi epoetini vplivali na rakavo tkivo še niso poznani. Nekatere hipoteze govorijo o spremenjeni signalizaciji, druge o vezavi epoetinov na druge vrste receptorje, v igri naj bi bili predvsem receptorji različnih interleukinov.

14 Zaključek

Rekombinantni eritropoetini so močno olajšali življenje prenekaterim bolnikom z rakom, kronično odpovedjo ledvic in anemijami. Vendar pa so ga za popolnoma druge namene pričeli uporabljati tudi športniki, predvsem kolesarji in atleti. Zaradi tega je bila svetovna protidopinška komisija WADA prisiljena razviti metodo, ki omogoča ločevanje različnih epoetinov. Izkazalo se je, da je najprimernejša metoda ločevanja z izoelektričnim fokusiranjem. Napačno je razmišljanje, da novih epoetinskih derivatov z izoelektričnim fokusiranjem ni mogoče določiti. Znanost stremi kljub temu k razvoju novih metod določevanja, ki temeljijo predvsem na masni spektroskopiji. Metoda IEF trenutno še ni v uporabi pri diagnostiki anemičnih bolnikov, vendar ima potencial za določanje vpliva rHuEpo in druge terapije na nivo izražanja in obliko endogenega EPO.

15 Zahvala

Zahvalil bi se dr. Francoise Lasne, Laurent Martin-u, Jean Antoine Martin-u in prof. dr. Jacques de Ceaurriz-u za šolanje na področju izoelektričnega fokusiranja eritropoetina in sprejem v nacionalnem protidopinškem laboratoriju Agence française de lutte contre le dopage - AFLD, Chatenay Malabry, Francija.

16 Literatura

1. Segura J, Pascual JA, Gutierrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388(7): 1521-9.
2. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 1997; 51(2): 393-401.
3. Thorling EB, Erslev AJ. The "tissue" tension of oxygen and its relation to hematocrit and erythropoiesis. *Blood* 1968; 31(3): 332-43.
4. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72(2): 449-89.
5. Romanowski RR, Sytkowski AJ. The molecular structure of human erythropoietin. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994; 8(5): 885-94.
6. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004; 43(8): 649-59.
7. Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33(10): 968-79.
8. Jelkmann W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods Enzymol* 2007; 435: 179-97.
9. Bunn HF. New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 2007; 109(3): 868-73.
10. Adamson JW. Regulation of red blood cell production. *Am J Med* 1996; 101(2A): 4S-6S.
11. Pascual JA, Belalcazar V, de Bolos C, Gutierrez R, Llop E, Segura J. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. *Ther Drug Monit* 2004; 26(2): 175-9.

12. Debeljak N, Sytkowski AJ, *EpoR. UCSD-Nature Molecule Pages 2007: A000863*. 2007.
13. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 2008; 141(1): 14-31.
14. Watowich SS. Activation of erythropoietin signaling by receptor dimerization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999; 31(10): 1075-1088.
15. Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. *Science* 1999; 283(5404): 987-990.
16. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 2001; 98(13): 3626-34.
17. Debeljak N, Sytkowski AJ. Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des* 2008; 14(13): 1302-10.
18. Halstenson CE, Macres M, Katz SA et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50(6): 702-12.
19. Veys N, Dhondt A, Lameire N. Pain at the injection site of subcutaneously administered erythropoietin: phosphate-buffered epoetin alpha compared to citrate-buffered epoetin alpha and epoetin beta. *Clin Nephrol* 1998; 49(1): 41-4.
20. Veys N, Vanholder R, Lameire N. Pain at the injection site of subcutaneously administered erythropoietin in maintenance hemodialysis patients: a comparison of two brands of erythropoietin. *Am J Nephrol* 1992; 12(1-2): 68-72.
21. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 Suppl 3: 3-13.
22. Locatelli F, Olivares J, Walker R et al. Novel erythropoiesis stimulating protein for treatment of anemia in chronic renal insufficiency. *Kidney Int* 2001; 60(2): 741-7.
23. Gaudard A, Varlet-Marie E, Bressolle F, Audran M. Drugs for increasing oxygen and their potential use in doping: a review. *Sports Med* 2003; 33(3): 187-212.
24. Bren A, Kandus A, Varl J et al. A comparison between epoetin omega and epoetin alfa in the correction of anemia in hemodialysis patients: a prospective, controlled crossover study. *Artif Organs* 2002; 26(2): 91-7.
25. Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis. *Electrophoresis* 2007; 28(12): 1875-81.
26. Lasne F. Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* 2001; 253(1-2): 125-31.
27. Lasne F, Martin L, Martin J, Ade Ceaurriz J. Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol* 2007; 41(3): 354-7.
28. van de Pol SMG, Doornaert PAH, de Bree R, Leemans CRx, Slotman B, JLangendijk JA. The significance of anemia in squamous cell head and neck cancer treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Oral Oncology*; In Press, Corrected Proof.
29. Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH. Doping in the recombinant era: Strategies and counterstrategies. *Clinical Biochemistry* 2005; 38(11): 959-965.
30. Gurney CW, Wackman N, Filmanowicz E. Studies on erythropoiesis. XVII. Some quantitative aspects of the erythropoietic response to erythropoietin. *Blood* 1961; 17: 531-46.
31. Goldberg MA. Erythropoiesis, erythropoietin, and iron metabolism in elective surgery: preoperative strategies for avoiding allogeneic blood exposure. *Am J Surg* 1995; 170(6A Suppl): 37S-43S.
32. Dunn CJ, Markham A. Epoetin beta. A review of its pharmacological properties and clinical use in the management of anaemia associated with chronic renal failure. *Drugs* 1996; 51(2): 299-318.
33. Belalcazar V, Gutierrez Gallego R, Llop E, Segura J, Pascual JA. Assessing the instability of the isoelectric focusing patterns of erythropoietin in urine. *Electrophoresis* 2006; 27(22): 4387-95.
34. Wilber RL. Detection of DNA-recombinant human epoetin-alfa as a pharmacological ergogenic aid. *Sports Med* 2002; 32(2): 125-42.
35. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(10): 708-14.
36. Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* 2003; 4(8): 459-60.
37. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M et al. Maintaining Normal Hemoglobin Levels With Epoetin Alfa in Mainly Nonanemic Patients With Metastatic Breast Cancer Receiving First-Line Chemotherapy: A Survival Study. *J Clin Oncol* 2005; 23(25): 5960-5972.
38. Henke M, Laszig R, Rube C et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 362(9392): 1255-60.
39. Machtay M, Pajak TF, Suntharalingam M et al. Radiotherapy With or Without Erythropoietin for Anemic Patients With Head and Neck Cancer: A Randomized Trial of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG 99-03). *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 2007; 69(4): 1008-1017.