

Možnosti uporabe genskega dopinga in problemi njegove detekcije

An overview of gene doping applications and problems of its detection

Lovro Žiberna, Klemen Žiberna, Borut Štrukelj, Irena Mlinarič-Raščan

Povzetek: Genski doping je neterapevtska uporaba celic, genov, genskih elementov ali modulacija genske ekspresije, katere cilj je izboljšati sposobnosti športnika. Namen vnosa genskega materiala v celice tarčnih tkiv je povečana ekspresija proteinov, ki regulirajo signalne poti in povzročijo izboljšanje želenih fizioloških parametrov. Vnosi genskih zapisov za eritropoetin, IGF-1, inhibitorje miostatina, VEGF in PPAR-delta v celice tarčnih tkiv živali izboljšajo aerobne sposobnosti, podaljšajo vzdržljivost in zvečajo mišično moč. Težave z učinkovitostjo in specifičnostjo prenosa genskega materiala v telo predstavljajo tveganje za organizem. Zaenkrat še ne poznamo primerne testa za detekcijo genskega dopinga, ki bi imel ustrezno občutljivost in specifičnost ter bi bil hkrati neinvaziven.

Ključne besede: genski doping, eritropoetin, IGF-1, miostatin, VEGF, PPAR-delta, detekcija dopinga

Abstract: Gene doping is defined as the non-therapeutic use of cells, genes, genetic elements, or of the modulation of gene expression, having the capacity to enhance athletic performance. The purpose of gene insertion into the target cells is to improve physiological abilities by vast production of protein that amplifies or inhibits certain signalling pathways. Insertion of genes for erythropoietin, IGF-1, myostatin inhibitors, VEGF and PPAR-delta in animals has shown major rise in aerobic capabilities, prolonged endurance and increased muscle strength. However, several problems with efficiency and specificity of gene transfer exist and call attention to safety and health concerns. Also, no adequate non-invasive and sensitive detection method exists for gene doping.

Keywords: gene doping, erythropoietin, IGF-1, myostatin, VEGF, PPAR-delta, doping detection

1 Uvod

Doping v svoji definiciji zajema uporabo snovi ali metod, ki so potencialno škodljive za športnikovo zdravje, vendar lahko izboljšajo dosežke, oziroma prisotnost prepovedanih snovi v organizmu, iz katere je razvidna uporaba prepovedane tehnike. Omejitev dopinga je pomembna iz etičnega in medicinskega vidika. Kontrolo in regulativo na tem področju izvajajo Mednarodni olimpijski komite (IOC), Svetovna antidopinška organizacija (WADA) in posamezne panožne mednarodne športne organizacije z namenom omogočiti enake tekmovalne pogoje vsem tekmovalcem in zagotoviti zdravje športnikom. Vsako leto sprejmejo listo prepovedanih substanc in metod. Genski doping se je na tem seznamu prvič pojavil leta 2003 in je uvrščen v skupino prepovedanih metod (1, 2).

Genski doping je definiran kot neterapevtska uporaba celic, genov, genskih elementov ali modulacija genske ekspresije, katere cilj je izboljšati sposobnosti športnika (1). Pri genskem dopingju gre za uporabo enakih metod dela kot pri genski terapiji s pomembno razliko, da je poseg namesto na bolniku opravljen na zdravem človeku, športniku. Glavni cilj je vstavev genov z zapisi za tarčne proteine v

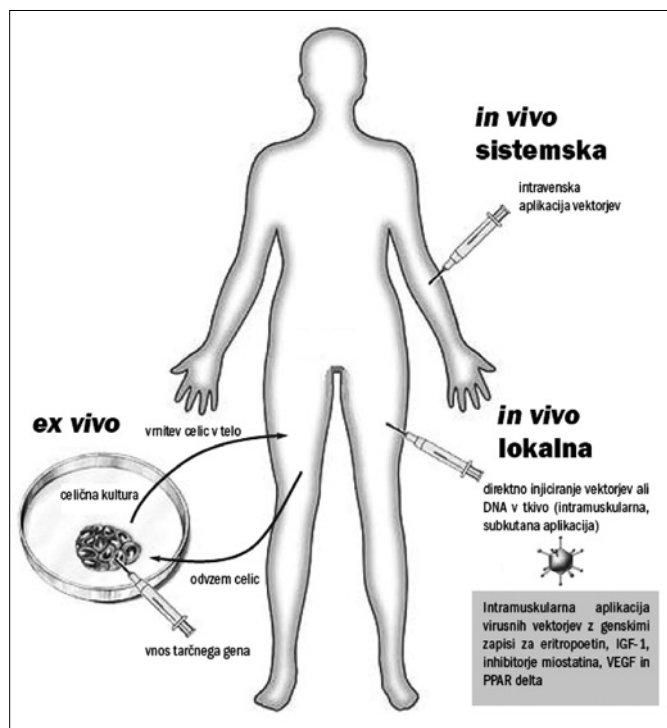
celice (tarčnega tkiva) z namenom doseči zadostno ekspresijo le-teh in posledično izboljšati delovanje celic in tkiv. Pomembno je poudariti, da za razliko od večine ostalih dopinških tehnik genski doping lahko povzroča trajne spremembe na celičnem nivoju.

2 Prenos genskega materiala v celico

Možnosti vnosa umetnega gena v telo so (slika 1):

- direktna injekcija DNA v tkivo (lokalna *in vivo* tehnika)
- uporaba virusnega vektorja (sistemska ali lokalna *in vivo* tehnika)
- vstavev zunaj telesa in vrnitev genetsko modificiranih celic nazaj v telo (*ex vivo* tehnika)

Za uspešnost vnosa želenega zapisa za gen v celično jedro se mora zapis bodisi integrirati v kromosom tarčne celice ali pa se ohraniti v celičnem jedru kot episom. Vstavljeni gen mora imeti dovolj veliko ekspresijo, če želimo dobiti zadostne količine terapevtskega proteina. Takšne gensko spremenjene celice postanejo rezervoar, ki izloča želen protein v svoje okolje ali v krvni obtok.



Slika 1. Shematični prikaz različnih možnosti vnosa umetnega gena v telo.

Figure 1. Representation of basic approaches for gene insertion into the human body.

Tabela 1. Vektorji, ki se uporabljajo za prenos genskega materiala v celice in njihove lastnosti.

Table 1. Survey of vectors for gene transfer with their properties.

Genski prenos	Vektor	Lastnosti
Nevirusni	Liposomi Z DNA pokriti zlati delci DNA proteinski kompleksi Gola DNA	- manj uspešna transdukcija - prehodna ekspresija - majhna imunogenost - lažja priprava
Virusni	Adenovirusi	- transfekcija mitotičnih in postmitotičnih celic - majhna citotoksičnost - pogost imunski odziv - velika kapaciteta za genski vložek (do 35 kb)
	Adeno-asociacijski virusi	- majhna toksičnost - majhna imunogenost - visoka perzistenca vstavljenega gena - majhna kapaciteta za genski vložek (<4,5 kb)
	Retrovirusi	- majhna toksičnost - majhna imunogenost - večinoma okuži samo mitotično aktivne celice (izjema rod <i>Lentivirus</i> , ki lahko ostane v citoplazmi mitotično mirujočih celic kot linearni episom in se vgradi kasneje) - majhna kapaciteta za genski vložek (<8 kb)
	Herpes simplex virusi	- okuži mitotične in postmitotične celice - visoka kapaciteta - pogost imunski odziv - perzistira v celicah v ČŽS

Za prenos genskega materiala v celice uporabljamo virusne ali nevirusne vektorje (tabela 1). Prednost nevirusnih vektorjev je v lažji pripravi, manjši toksičnosti kot tudi imunogenosti. Čeprav so razvili številne nove nevirusne vektorje, le-ti še vedno ostajajo v senci virusnih, saj njihovo uporabnost v genski terapiji omejujeta prehodna ekspresija in manj uspešen prenos DNA v celice.

Virusni vektorji predstavljajo le ogrodje virusnega genoma, saj se v procesu priprave odstranijo geni, ki omogočajo znotrajcelično razmnoževanje virusa in posledično smrt celice. Z odstranitvijo teh genov se ustvari prostor za vnos tarčnega zapisa za želeni gen v virusni genom. Uspešnost samega prenosa v tarčne celice je odvisna od sposobnosti virusa, da transficira celico. Večina virusov se pritrdi na celico preko receptorja ter prenese svoj dedni material v citoplazmo celice, ki nato potuje s pomočjo virusnih in/ali celičnih proteinov do celičnega jedra.

3 Nevarnosti vnosa genskega materiala v celico

Nevarnosti uporabe genske terapije so številne. Delimo jih na tveganje odvisno od uporabljenega vektorja in tveganje odvisno od kodiranega gena, ki ga prenašamo. Pri izboru virusnih vektorjev vedno obstaja nevarnost, da bi le-ti pridobili patogenost z možnimi rekombinacijami, do katerih lahko pride med uporabo v telesu. Uporaba retrovirusov, ki se naključno vgradijo v genom, lahko pripelje do prekinitve normalnega nukleotidnega zaporedja kakega pomembnega celičnega gena, kar lahko vodi v razvoj novih genskih boleznih, tudi raka.

Varnost genske terapije je relativno velika, saj je bilo zdravljenih že okoli 3000 pacientov. Kljub vsemu je zabeleženih že nekaj tragičnih zapletov. Znan je primer osemnajstletnega pacienta in letu 1999, ki se je odločil za gensko terapijo pomanjkanja ornitin-dekarboksilaze. Pri tem primeru je prišlo do prekomernega imunskega odziva na adenovirusni vektor, kar je pripeljalo do anafilaktičnega šoka in posledično do smrti (3). Ostali pogostejši stranski učinki genske terapije so gripi podobni simptomi: vročina, drget, mrazenje, občutek slabosti in neugodja, suh kašelj, izguba apetita ter bolečine v sklepah in mišicah.

4 Možnost uporabe genskega dopinga v vrhunskem športu

Strokovnjaki so prepričani, da se bo genski doping že v bližnji prihodnosti začel uporabljati za povečanje oksiforne kapacitete krvi zaradi povečane sinteze eritropoetina. Vse kaže tudi na to, da bo možno hitrejšo povečanje mišične mase ob hkratnem zmanjšanju količine maščevja s pomočjo rastnih dejavnikov (npr. IGF-1) in z inhibicijo zaviralcev rasti (npr. miostatina). Temu pa lahko sledi povečanje prekrvavitve skeletne in srčne mišičnine s povečanjem števila žil, ki jo bodo omogočili endotelni rastni dejavniki (VEGF). Vstavljanje genov za endorfine in enkefaline bi lahko izboljšalo protibolečinsko terapijo.

4.1 Eritropoetin (EPO)

Eritropoetin je hormon, ki ga v 90% izločajo ledvice in v 10% jetra in ostali organi. Povišana koncentracija eritropoetina v krvi stimulira eritropoezo v kostnem mozgu. To vodi do povečanega števila

eritrocitov v krvi in s tem povečanega hematokrita in koncentracije hemoglobina v krvi. Na ta način se poveča oksiforna kapaciteta krvi in s tem izboljša transport kisika do mišičnih tkiv, kar je ključnega pomena pri vzdržljivostnih športih.

Že leta 1997 so v skeletne mišice miši in primatov z adeno-virusnim vektorjem uspešno vnesli gen za eritropoetin, ki se je stabilno izločal tudi več kot eno leto (4). Hematokrit se je pri miših povečal z 0,49 pri kontrolni skupini na 0,81 v testni skupini. Nekontrolirana povečana sinteza eritropoetina je povzročila nastanek hude policitemije in povečane viskoznosti krvi. To je posledično privedlo do tromboze v različnih žilnih sistemih in s tem povezanih kliničnih slik (akutni miokardni infarkt, cerebrovaskularni inzulit, venska tromboza). Raziskovalci so morali v raziskavi, v kateri so vnesli gen za eritropoetin v skeletne mišice pavianov, z večkratno flebotomijo uravnnavati policitemijo (5).

Takšen način uravnnavanja ni priročen, saj je nenatančen in na dolgi rok neprimeren za uporabo na ljudeh. Z namenom, da bi dosegli boljši nadzor, so razvili regulatorne sisteme, pri katerih je ekspresija gena uravnnavana z umetno zgrajenim inducibilnim transkripcijskim dejavnikom. Gen za transkripcijski dejavnik je prav tako kot gen za eritropoetin umetno vnesen v celice s svojim vektorjem (npr. tetraciklinski inducibilni sistem, rapamicin inducibilni transkripcijski faktor (6)).

Še večjo nevarnost kot nenadzorovana policitemija pri vnosu gena za eritropoetin predstavlja imunski odziv tako na ektopično kot tudi na entopično secerniran eritropoetin. Tak odziv lahko privede do hude in ponavadi smrtne avtoimune anemije. V eni študiji so poročali, da so kar 3 od 9 opic z vnesenim genom za eritropoetin razvile protitelesa na endogeni in transgeni eritropoetin, pri tem sta dve opici umrli zaradi hude anemije (hematokrit je bil samo 0,25) (7).

3.2 Insulinu podoben rastni dejavnik 1 (IGF-1)

Insulinu podoben rastni dejavnik (IGF-1) se sintetizira v jetrih in v skeletni mišičnini ter ima anabolen učinek. V mišičnih celicah sintetizirani IGF-1 deluje avto- in parakrino. Njegovo izločanje se pospeši tako ob povečani koncentraciji ravnega hormona (GH) v krvi, kot tudi ob poškodbah mišičnega vlakna. IGF-1 pospešuje sintezo miofilamentov in ostalih proteinov v mišični celici in vzpodbuja proliferacijo satelitnih celic (8). Mišične satelitne celice spadajo med zarodne celice, ki obdajajo mišična vlakna. Ob porastu IGF-1 se z mitozo delijo in se zlijejo z mioцитi ter jim tako prispevajo svoje jedro in nove miofilamente. Na ta način potekata regeneracija in tudi hipertrofija mišičnega tkiva.

Zgoraj opisani mehanizmi uravnnavanja regeneracije mišičnih celic so osnova za raziskovanje vpliva povečane ekspresije gena IGF-1 na povečanje mišične mase. V ta namen so z adeno-asociacijskim virusom (AAV) v skeletne mišice miši vstavili gen za IGF-1 nadzorovan s pomočjo mišično specifičnega promotora (9). Rezultati študije so pokazali, da je prekomerna ekspresija IGF-1 v povprečju za 15% povečala mišično maso in za 14% povečala mišično moč mladih miši. Prav tako se je pokazalo, da prekomerna ekspresija IGF-1 zmanjša starostno pogojeno izgubo mišične mase. Stare miši z vnesenim genom za IGF-1 so imele v povprečju 27% večjo mišično moč kot kontrolna skupina enako starih miši.

Narejena je bila tudi raziskava, v kateri so ovrednotili, koliko prispeva k povečanju mišične mase vadba za moč in koliko prekomerna ekspresija IGF-1 v skeletni mišici (10). Prvi skupini podgan, ki je bila izpostavljena vadbi proti uporu, se je po 8 tednih v povprečju povečala mišična masa mišice *flexor hallucis longus* (FHL) za 23%. Drugi skupini podgan z vstavljenim genom za IGF-1 se je brez vadbe povečala mišična masa FHL za 15%. Tretji skupini podgan, ki so jim vstavili gen za IGF-1 in jih hkrati izpostavili vadbi proti uporu, pa se je mišična masa FHL povečala kar za 32%. Kombinacija vadbe za moč in prekomerna ekspresija gena IGF-1 se je izkazala za najučinkovitejši način pridobivanja mišične mase. Merili so tudi hitrost izgubljanja mišične mase FHL podgan po prekinitvi vadbe proti uporu pri mišičah z in brez vstavljenega gena IGF-1. Po 12 tednih mirovanja se je mišična masa FHL v podganah z vstavljenim genom za IGF-1 zmanjšala za 4,8%, medtem ko se je mišična masa FHL v podganah brez vstavljenega gena zmanjšala za 8,3%. Rezultati te raziskave nakazujejo realno možnost zlorab športnikov z vstavitvijo genov za IGF-1 v skeletne mišice z namenom izboljšati fizično pripravljenost kot tudi upočasniti izgubljanje mišične mase v času počitka med dvema sezonama.

Vstavljanje gena za IGF-1, ki deluje predvsem lokalno, povzroča manj neposrednih zapletov kot vstavljanje genskih zapisov za proteine, ki delujejo sistemsko. Velike količine izločenega IGF-1 se večinoma nahajajo v okolici celic, ki ga izločajo. Prav zato je veliko manjša verjetnost neželenega imunskega odziva, kot je bil to primer hude anemije pri opicah z vstavljenim genom za eritropoetin. Veliko nevarnost predstavlja možnost, da se virusni vektor z genom za IGF-1 po krvi odplavi in vgradi v druge vrste tkiv, od koder bi se IGF-1 prekomerno izločal v kri. Obstaja povezava med povišanimi serumskimi koncentracijami IGF-1 in povečanim relativnim tveganjem za razvoj različnih karcinomov, saj ima IGF-1 močne mitogene in antiapoptotične učinke na maligne celice (11). Poleg tega pa nenaravno hitro pridobivanje mišične mase kritično poveča obremenitve na tetive in kosti in tako povzroča skeletne deformacije ali celo zlome. Še posebej je to nevarno pri posameznikih, ki imajo že osteoporotične spremembe na kosteh.

3.3 Miostatin (GDF-8)

Miostatin (v preteklosti označen kot GDF-8) spada v skupino transformirajočih rastnih dejavnikov beta (TGF- β). Deluje kot negativni regulator mišične mase tako med samim embrionalnim razvojem kot tudi pri odraslem organizmu. Nukleotidno zaporedje gena za miostatin so določili leta 1997 s pomočjo znane vrste izrazito mišičastih bikov "Belgian Blue", ki imajo zaradi 11 baznih parov dolge delecije nefunkcionalen gen za miostatin (12). Živali, ki imajo okvarjen ali odstranjen gen za miostatin, so veliko večje in imajo 2- do 3- krat večjo mišično maso kot živali z intaktnim genom za miostatin. Mišična masa se poveča zaradi kombinacije hiperplazije in hipertrofije mišičnih celic (13). V letu 2004 so pri neverjetno mišičastem otroku, ki se je rodil bivši profesionalni sprinterki, dokazali mutacijo gena za miostatin s posledično popolno izgubo funkcije miostatina (14). To odkritje je vzpodbudilo nadaljnje raziskave, saj kaže na to, da miostatin pri človeku deluje zelo podobno kot pri miših in govedu.

Predvideva se, da bi maso posameznih mišic lahko povečali z vstavitvijo genov v satelitne celice ob mišičnih celicah, ki bi inhibirali

kompleksno signalno pot miostatina (15). Ker ti dodatno sintetizirani proteini delujejo le lokalno, je možnost sistemskih zapletov na račun imunskega sistema relativno majhna. Skrb predstavlja le dejstvo, da bi zaradi inhibicije miostatina in posledične hitre in množične proliferacije satelitnih celic, le-te sčasoma izgubile zmožnost delitve. V tem primeru bi se regenerativna zmožnost mišic kritično zmanjšala, kar bi privedlo do kronične mišične degeneracije.

3.4 Žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF)

Žilni endotelijski rastni dejavnik (VEGF) je glavni modulator zelo kompleksnega sistema regulacije angiogeneze v embriogenezi in tudi med samo rastjo organizma (16). Prav tako je antiapoptotski faktor za endotelijske celice, inducira izločanje NO iz endotelija, kar povzroči vazodilatacijo ter je odgovoren za tvorbo novih žil v času hipoksije.

Zaradi potencialno ugodnih učinkov angiogeneze pri bolnikih s periferno arterijsko boleznijo ali ishemično srčno boleznijo potekajo raziskave za zdravljenje teh bolezni z vstavljanjem gena za VEGF. Genska terapija z VEGF se pri bolnikih z žilnimi boleznimi ni izkazala kot dovolj učinkovita terapija. Kljub temu obstaja možnost, da bodo nekateri športniki v želji po večji prekrvavitvi srca in skeletnih mišic posegli po tej metodi (17, 18). V teh primerih obstaja nevarnost nastanka imunskega odziva in tvorbe protiteles proti VEGF zaradi njegovega prevelikega izločanja. To bi zmanjšalo njegovo delovanje in posledično bi hitreje nastale kronične žilne bolezni. Po drugi strani lahko prekomerno izločanje VEGF vodi do nastanka angiomov, retinopatij, psorize in drugih obolenj povezanih s patološko vaskularizacijo (19).

3.5 Agonisti PPAR Delta

PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) so proteini, ki spadajo v družino jedrnih receptorjev in delujejo kot transkripcijski dejavniki. Aktivacija PPAR poteka preko vezave ligandov, ki so večinoma metaboliti znotrajcelične presnove maščob. PPAR proteini obstajajo v treh izotipih: α , γ in δ (znan tudi kot β). Izotip PPAR δ poveča katabolizem maščobnih kislin in termogenezo z odklopniki v mitohondrijih v skeletni in srčni mišičnini ter v maščobnem tkivu. Prav tako zmanjšuje od makrofagov odvisne vnetne odzive (20).

Učinke PPAR δ na adipocite so preučevali v študiji transgenih miši z dodanim genskim zapisom za kontinuirano ekspresijo PPAR δ . Ugotovili so, da imajo transgene miši pri nespremenjeni dieti za 20% manjšo telesno težo in kar za 40% manj maščob v ingvinalnem predelu kot kontrolna skupina (21). Prav tako dieta z zelo visokim odstotkom maščob ni povzročila povečanja telesne teže, hipertrofije adipocitov ali hipertrigliceridemije. Do podobnih rezultatov so prišli tudi v študijah miši brez vstavljenega gena za PPAR δ , kjer pa so z injiciranjem PPAR δ agonista dosegli povečano aktivacijo PPAR δ (21, 22). Transgene miši z vstavljenim genom PPAR δ kot tudi običajne miši z injiciranim PPAR δ agonistom so imele v mišičnih vlaknih povečano ekspresijo genov za oksidacijo maščobnih kislin in povečano število mitohondrijev (23). Podvojilo se je tudi število počasnih mišičnih vlaken (tip 1) na račun zmanjšane števila hitrih mišičnih vlaken (tip 2). Posledično se je izrazilo izboljšala vzdržljivost teh miši, saj so lahko do popolne izčrpanosti pretele za 92% večjo razdaljo kot kontrolna skupina. Ugodni učinki PPAR δ na mišice in maščevje napovedujejo uporabo te tehnike predvsem v vzdržljivostnih športih.

3.6 Endorfini in enkefalini

Bolečino lahko opredelimo kot senzorično in čustveno doživetje, povezano z dejanskim ali potencialnim delovanjem dražljajev, ki okvarjajo tkiva. Telo lahko samo modulira stopnjo bolečine. Obstaja več vrst nevrotransmiterjev, ki sodelujejo na poteh za modulacijo nociceptivnega prenosa, pri čemer sta najbolj znana opioidna peptida endorfin in enkefalin.

Na modelu podgane s kronično konstriktivno poškodbo živca (*n. ischiadicus*) so uspešno zmanjšali bolečino z vstavitvijo plazmida v hrbtenjačo s pomočjo elektroporacije. Plazmid je vseboval gen za proopiomelanokortin (POMC), ki je povzročil povečanje koncentracije endorfinov v hrbtenjači in s tem dvig praga bolečine (24). V drugem eksperimentu pa so na modelu glodalca z lumbalno radikulopatijo prav tako uspešno zmanjšali bolečino z vstavitvijo genov za proenkefalin in glutamatno dekarboksilazo s pomočjo vektorja na osnovi herpes simplex virusa (25).

Te oblike genske terapije veliko obetajo za lajšanje bolečin pri bolnikih v terminalni fazi rakuve bolezni, a so še na začetku razvoja in daleč od pričetka kliničnih raziskav. Mišična izčrpanost po hudih telesnih naporih vodi v stanje metabolne acidoze, saj telo proizvede veliko energije v anaerobnih metabolnih procesih, katerih stranski produkt je laktat. Prekomerne količine le-tega in njegovo prepočasno odstranjevanje s Coriijevim ciklom povzročajo bolečino. Bolečina je celo pomembnejša od fizioloških omejitev telesa za nezmožnost dolgotrajnega vztrajanja na visoki intenzivnosti telesnega napora in prav zato vsakršno zmanjšanje občutenja bolečine izboljša zmogljivost športnika (26).

4 Detekcija uporabe genskega dopinga

Ustajene metode testiranja uporabe dopinga temeljijo predvsem na detekciji prepovedane snovi ali v vzorcu krvi ali v vzorcu urina. Genska terapija omogoča direktno aplikacijo genov v tarčna tkiva. S takim načinom aplikacije se izogne sistemskemu krvnemu obtoku in detekcija genskih vektorjev s sedanjimi metodami testiranja je praktično onemogočena (27).

Predvidevamo, da bo v začetni fazi najpogostejši način uporabe genskega dopinga lokalno injiciranje vektorjev v skeletne mišice. Značilnost te aplikacije je, da transformirani miociti izločajo proteinske produkte predvsem lokalno, kjer so fiziološki učinki tudi zaželeni. Možen način detekcije uporabe genskega dopinga je tako le iskanje morebitnih ostankov kemijskih snovi (v primeru uporabe nevirusnih vektorjev) ali ostankov virusnih vektorjev na mestu aplikacije. To pa je mogoče le z uporabo invazivnih metod kot je mišična biopsija. Mišična biopsija je invazivni kirurški poseg, ki poleg same poškodbe tkiva prinaša tudi možnost določenih perioperativnih zapletov, npr. preobčutljivostna reakcija na lokalne anestetike, okužba kirurške rane, postoperativna bolečina.

Številne oblike genskega dopinga ne potrebujejo direktnega injiciranja genov v točno določena tkiva, temveč jih je moč vgraditi v katero koli tkivo v telesu, npr. gen za eritropoetin. V teh primerih je mesto injiciranja praktično nemogoče ugotoviti. Upanje za detekcijo vzbuja raziskava, v kateri so ugotovili obstoj strukturnih razlik med nativnim

eritropoetinom (proizvedejo ga ledvične celice) in eritropoetinom, ki ga izločajo miociti po predhodni vstavitvi virusnega vektorja z genskim zapisom za eritropoetin (28). Do teh razlik pride zaradi drugačne post-translacijske modifikacije v različnem tipu celic. Na tem mestu je ustrezno vprašanje, ali morda ne obstaja v telesu tkivo, ki lahko izvede identične post-translacijske modifikacije kot to počno ledvične celice. Takšne celice bi namreč proizvajale nativnemu eritropoetinu identični protein in detekcija ne bi bila mogoča.

Trenutno poteka več raziskav, ki preučujejo korelacijo med aplikacijo določene oblike genskega dopinga in spremembami v profilu genske ekspresije z uporabo tehnologije mikromrež (27, 29). Preučujejo mRNA pri posameznikih, ki prejemajo gensko terapijo in jih primerjajo z rezultati kontrolne skupine (27). Razvoj poteka v smeri iskanja ustreznih proteinov, ki bi bili primerni za uporabo kot serumski biomarkerji za nadzor uporabe genskega dopinga (29). Potrebno bo tudi ugotoviti, kakšne spremembe genske ekspresije celic povzročajo intenzivna in večletna telesna obremenitev (v procesu treniranja) in v kakšnem časovnem okviru. Vprašljiv je predvsem prenos rezultatov raziskav, ki so izvedene na ljudeh, ki se le občasno ukvarjajo s športom, na vrhunske športnike.

Raziskava, ki je preučevala *in vitro* vpliv IGF-1 na celično kulturo mišičnih satelitnih celic C2C12, je pokazala, da pride do kompleksnih vzorcev spreminjanja genske ekspresije v različnih družinah genov. Podobne rezultate so dobili tudi, kadar so *in vivo* injicirali IGF-1 v različne organe. Študija je še vedno v teku, saj želijo opažene genetske in proteomske spremembe natančno definirati, tako da bi lahko služile kot dokaz uporabe IGF-1 kot genskega dopinga (30).

V teku je tudi razvijanje neinvazivnih molekularnih slikovnih metod za detekcijo genskega dopinga. Veliko se pričakuje od razvoja metode detekcije specifične mRNA v tkivih, kjer le-ta normalno ne nastaja, npr. detekcija mRNA za eritropoetin v miocitih. Princip zaznave mRNA temelji na hibridizaciji s primernimi protismernimi (angl. *antisense*) oligonukleotidnimi sondami, ki so ustrezno označene, da omogočajo detekcijo z uporabo pozitronske emisijske tomografije (PET oz. SPECT, *Single Photon Emission Computed Tomography*) tehnologije. Glavni izziv predstavlja konstrukcija ustreznih stabilnih oligonukleotidov, ki jih ne bodo razgradile RNaze H. Temu problemu se poskušajo izogniti z oblikovanjem peptidnih nukleinskih kislin (PNA), ki so visoko stabilne, imajo dobre farmakokinetične lastnosti in dobro penetracijo v celice (31, 32).

Kot je razvidno iz opisanega, zaenkrat še ne poznamo primerne testa za detekcijo genskega dopinga, ki bi imel ustrezno občutljivost in specifičnost ter bil hkrati neinvaziven.

5 Zaključek

Podatkov o morebitni prisotnosti genskega dopinga med športniki zaenkrat še ni. Rezultati doseženi na živalskih modelih dokazujejo, da bo z uporabo genskih tehnologij mogoče poseči v izboljšanje telesne sposobnosti športnika. Slednje seveda ni etično sprejemljivo, bo pa izredno zahtevno take posege identificirati. Odločitev o načinu in tipu uporabe genskega dopinga bi bila odvisna od posamezne športne discipline. Take odločitve bi temeljile na poznavanju kineziologije in obremenitvene fiziologije določenega športa ter na natančnem poznavanju telesne zgradbe in fizioloških parametrov posameznega

športnika. Cilji uporabe genskega dopinga bi bili izboljšanje fizioloških parametrov kot so povečanje oksiforne kapacitete krvi, izboljšanje prekrvavitve mišičnih tkiv, povečanje količine encimov za aerobno pridobivanje energije, zmanjšanje deleža maščobnega tkiva in doseganje želenega razmerja med počasnimi in hitrimi mišičnimi vlakni. To bi omogočilo podaljšan čas telesne obremenitve ali v aerobnem ali v anaerobnem območju in tudi večjo maksimalno mišično moč posameznih mišičnih skupin.

Posamezne raziskave na živalskih modelih, kjer je prišlo do resnih zapletov, nakazujejo potencialno nevarnost genskega dopinga za zdravje športnika. Nevarnost je predvsem v nepredvidljivosti obnašanja vnesenih vektorjev v telesu kot tudi v nepredvidljivosti odziva organizma. Genski doping predstavlja neetičen poseg v organizem športnika, ki ga zaradi neustreznih detekcijskih tehnik trenutno še ni mogoče slediti.

6 Literatura

1. The World Anti-Doping Code: The 2007 Prohibited List: International List. WADA, 2006.
2. Kuipers, H. and G. Ruijsch van Dugteren. The prohibited list and cheating in sport. *Int J Sports Med* 2006; 27: 80-82.
3. Raper, S.E., et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148-158.
4. Svensson, E.C., et al. Long-term erythropoietin expression in rodents and non-human primates following intramuscular injection of a replication-defective adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1797-1806.
5. Zhou, S., et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates. *Gene Ther* 1998; 5: 665-670.
6. Rivera, V.M., et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; 105: 1424-1430.
7. Chenuaud, P., et al. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 2004; 103: 3303-3304.
8. Barton-Davis, E.R., D.I. Shoturma, and H.L. Sweeney. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1999; 167: 301-305.
9. Barton-Davis, E.R., et al. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15603-15607.
10. Lee, S., et al. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* 2004; 96: 1097-1104.
11. Yakar, S., D. Leroith, and P. Brodt. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 407-420.
12. McPherron, A.C. and S.J. Lee. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12457-12461.
13. McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.J. Lee. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997; 387: 83-90.

14. Schuelke, M., et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 2004; 350: 2682-2688.
15. Lee, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 61-86.
16. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
17. Yla-Herttuala, S. and K. Alitalo. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003; 9: 694-701.
18. Markkanen, J.E., et al. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart—gene therapy. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 656-664.
19. Tammela, T., et al. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 550-563.
20. Barish, G.D., V.A. Narkar, and R.M. Evans. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 590-597.
21. Wang, Y.X., et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003; 113: 159-170.
22. Tanaka, T., et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15924-15929.
23. Wang, Y.X., et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2004; 2: e294.
24. Lin, C.R., et al. Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats. *Gene Ther* 2002; 9: 1247-1253.
25. Lee, J.Y., D.J. Fink, and M. Mata. Vector-mediated gene transfer to express inhibitory neurotransmitters in dorsal root ganglion reduces pain in a rodent model of lumbar radiculopathy. *Spine* 2006; 31: 1555-1558.
26. Sgherza, A.L., et al. Effect of naloxone on perceived exertion and exercise capacity during maximal cycle ergometry. *J Appl Physiol* 2002; 93: 2023-2028.
27. Roberts, C. Surrogate Markers For Transgene Expression - Global Gene Expression Analysis. In: *WADA Stockholm Symposium on Gene Doping*, 2005.
28. Lasne, F., et al. "Genetic Doping" with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther* 2004; 10: 409-410.
29. King, C. Proteomics as a Tool to Detect Gene Doping: An Introduction to Protein Expression Profiling. In: *WADA Stockholm Symposium on Gene Doping*, 2005.
30. Friedmann, T., et al. The effect of IGF-1 on Gene Expression and on the Proteome of Muscle Satellite Cells. In: *WADA Stockholm Symposium on Gene Doping*, 2005.
31. Segura, J., J. Pacual, and Z. Nikolovski. Non-invasive Molecular Imaging of Gene Expression Useful for Doping Control: Pilot Study in Animals after Erythropoietin Gene Transfer. 2004; Institution Municipal Investigacio Medica, Pharmacology Research Unit: Barcelona, Spain.
32. Zinn, K., T. Chaudhuri, and S. Frank. Potential for Non-Invasive Imaging in Anti-Doping Efforts. In: *WADA Stockholm Symposium on Gene Doping*, 2005.