

SEED Hematologia



Walka z dopingiem i rola parametrów związanych z retikulocytami

Wyniki sportowe

Sprawność fizyczna i wyniki sportowe, zwłaszcza w sportach wytrzymałościowych, wymagają odpowiedniego przygotowania również na poziomie komórek mięśniowych, które do prawidłowego funkcjonowania potrzebują tlenu, a ich wydajność może być ograniczona przez jego niedobór. W związku z tym celem treningu jest nie tylko nauka samej techniki przy niewielkiej utracie energii oraz zbudowanie masy mięśniowej, ale także zapewnienie mięśniom optymalnego zaopatrzenia w tlen.

Cel ten może być osiągnięty poprzez:

- Trening wytrzymałościowy, nazywany również treningiem tlenowym, mający na celu zwiększenie maksymalnego poboru tlenu (VO_{2max} – pułap tlenowy) poprzez wpływ m.in. na rzut serca, który warunkuje transport natlenowanej krwi do mięśni.
- Dostarczenie organizmowi wystarczającej ilości żelaza, wspomagającego optymalny proces erytropoezy.
- Trening wysokościowy (powyżej 1800 m n.p.m.) mający na celu zwiększenie liczby krwinek czerwonych (RBC), które uczestniczą w transporcie tlenu do komórek mięśni.

Wpływ treningu wysokościowego na organizm

Na dużych wysokościach ciśnienie powietrza jest niższe niż na poziomie morza. Oznacza to, że powietrze jest włączane do płuc pod mniejszym ciśnieniem, a zatem mniej tlenu dostępne jest w procesie wymiany gazowej. Życie i trening w takich warunkach oznacza, że organizm ma mniejszą dostępność tlenu. To niedotlenienie jest wykrywane przez nerki, których komórki syntezują i uwalniają erytropoetynę (EPO). Odpowiedź ta ma na celu nasilenie procesu erytropoezy, a tym samym zwiększenie liczby krwinek czerwonych i zawartej w nich hemoglobiny [1]. W ten sposób brak dostatecznej ilości tlenu jest częściowo rekompensowany przez zwiększenie zdolności transportowej, aby mięśnie otrzymywały odpowiednią ilość tlenu. Po powrocie na normalną wysokość, obecna erytrocytoza powoduje, że komórki mięśniowe nadal otrzymują dodatkową ilość tlenu – w związku z czym mięśnie pracują lepiej, co jest nie tylko zaletą podczas zawodów, ale może także zwiększyć wydajność treningu. W takich warunkach organizm powoli reguluje proces erytropoezy, co można zaobserwować poprzez zmniejszenie liczby retikulocytów.

Trening w sztucznej hipoksji i doping krwi

Ogólnym efektem treningu wysokościowego jest zwiększenie liczby czerwonych krwinek, a tym samym poprawy zdolności transportu tlenu, prowadzącej do poprawy wyników sportowych. Ustalenie odpowiedniego planu treningowego przed zawodami, pomaga w uzyskaniu zwiększonej wydolności. Alternatywnie, podobne efekty można uzyskać poprzez zmniejszenie zawartości tlenu we wdychanym powietrzu, np. podczas snu lub treningu [2]. Taki trening nazywany jest „sztucznym treningiem wysokościowym” [ang. *artificial altitude training*].

Inną metodą zwiększania zdolności transportu tlenu, stosowaną już od lat 80. ubiegłego wieku, jest doping krwi [3-6]. Krótkotrwałe zwiększenie liczby czerwonych krwinek uzyskuje się poprzez autologiczne przetoczenie krwi (autotransfuzję) [7] lub poprzez przyjmowanie substancji o działaniu podobnym do erytropoetyny [7-10]. Ta ostatnia forma dopingiu jest także określana jako „doping EPO” lub „doping z użyciem substancji podobnych do EPO”.

Doping EPO określa się jako nadużywanie substancji, która jest identyczna do ludzkiej erytropoetyny, jest jej rekombinatem (ang. *Recombinant Human Erythropoietin* – rhEPO) lub wykazuje takie same działanie. Sportowiec przyjmując taką substancję, spodziewa się pozytywnych efektów, które są porównywalne lub przewyższają te uzyskane podczas treningu w hipoksji wysokościowej [5]. W takich warunkach następuje sztuczna stymulacja erythropoezy i wytworzenie dodatkowych retikulocytów, a w konsekwencji zwiększenie liczby krwinek czerwonych we krwi obwodowej [11].

Historia stosowania dopingiu EPO

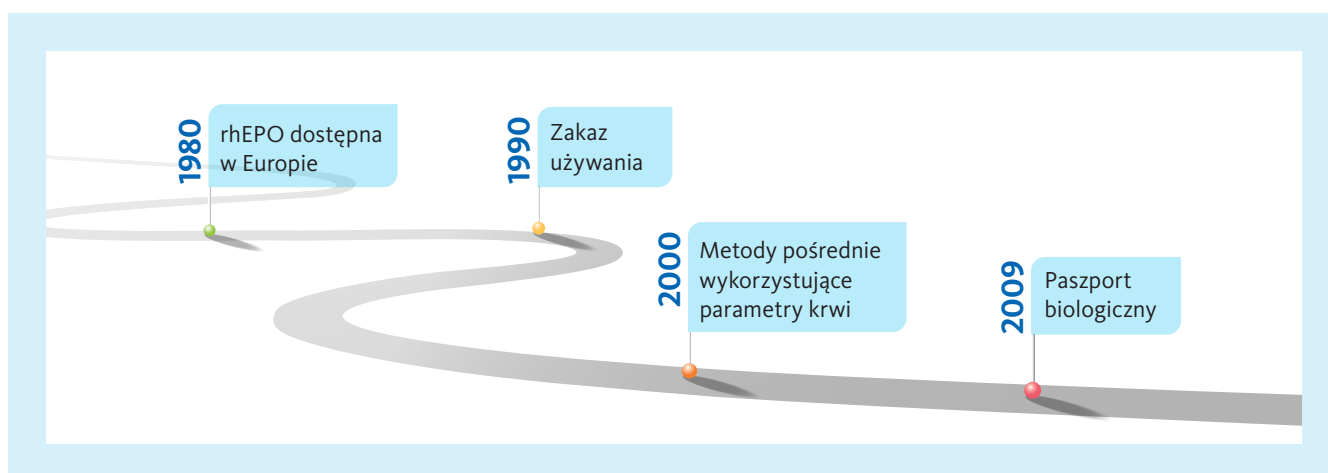
Rekombinowana ludzka erytropoetyna (rhEPO) stała się dostępna na terenie Europy w latach 80. ubiegłego wieku, a jej stosowanie w sporcie zostało zakazane już na początku lat 90. Aby wprowadzić ten zakaz należało jednak udowodnić, że substancje podobne do

EPO były nadużywane. Bezpośrednie metody oznaczania oraz wykrywania nie zostały jednak w pełni opracowane, zwłaszcza w latach 90 [12]. Nawet obecnie wykrywanie EPO w moczu jest czasochłonne i kosztowne dla laboratoriów [9,13], a jej stymulujące działanie na erythropoezę jest nadal obecne, nawet po wydaleniu jej z moczem. Dlatego opracowano metody pośrednie. Od początku XXI wieku w ramach tych metod bada się określone parametry krwi i ich zmiany w czasie (krótko- i długoterminowe). Procedura ta została znacznie udoskonalona dzięki utworzeniu Światowej Agencji Antydopingowej (ang. *World Anti-Doping Agency* – WADA) i wprowadzeniu przez nią w 2009 roku Paszportu Biologicznego (ang. *Athletic Biological Passport* – ABP) (patrz Ryc.1) [14].

Światowa Agencja Antydopingowa (WADA)

Latem 1998 roku w kolarstwie doszło do licznych przypadków dopingiu. Międzynarodowy Komitet Olimpijski podjął inicjatywę i promował utworzenie niezależnego organu zajmującego się walką z dopingiem. W 1999 roku powstała WADA, finansowana w równych częściach przez ruch sportowy i rządy na całym świecie. Najbardziej znaczącym osiągnięciem jest opracowanie i nadzorowanie Światowego Kodeksu Antydopingowego (ang. *World Anti-Doping Code*). Jest to dokument, który ujednocila i standaryzuje każde działania antydopingowe we wszystkich krajach i wszelkich dyscyplinach sportu. Aby zapewnić skuteczne przestrzeganie Światowego Kodeksu Antydopingowego, WADA opracowała w 2009 roku dla sportowców Paszport Biologiczny.

Więcej informacji na temat WADA, historii jej powstania i aktualnych zadaniach, można znaleźć na [oficjalnej stronie internetowej](#).



Ryc. 1 Historia stosowania dopingiu EPO

Wykrywanie dopingu krwi

Od początku stosowania dopingu krwi, znalezienie odpowiedniego dowodu stanowiło wyzwanie, ponieważ rekombinowana i endogenna erytropoetyna wykazują nieznaczne różnice [12–13, 15]. Ponadto istnieją substancje, które pośrednio zwiększają poziom lub działanie endogennej EPO, np. stabilizatory czynnika indukującego hipoksję (ang. *Hypoxia-inducible Factor – HIF*) prowadząc do zwiększenia transkrypcji fizjologicznej EPO [16]. Stabilizatory HIF są zabronione, podobnie jak stosowanie rhEPO, ale można je wykryć dużym nakładem pracy, wykorzystując chromatografię cieczową ze spektrometrią mas [10]. Chociaż obecnie możliwe jest bezpośrednie wykrywanie substancji podobnych do EPO w moczu za pomocą kosztownych i czasochłonnych metod Wester bolt [13], to efekt – tj. zwiększona liczba krwinek czerwonych – może być nadal obecny, nawet jeśli substancja została już wydalona lub rozłożona. Mimo to sportowcy są wielokrotnie przyłapywani i skazywani za stosowanie dopingu we krwi. Jak to możliwe?

Podczas dojrzewania prekursorów krwinek czerwonych w szpiku kostnym, jądrzaste krwinki czerwone (NRBC) przekształcają się w retikulocyty, które przedostają się do krwi obwodowej. Poprzez degradację retikulum endoplazmatycznego i odpowiadającemu mu RNA, retikulocyty przekształcają się w ciągu czterech dni w dojrzałe erytrocyty. Pozostają one w szpiku kostnym przez 3 dni, następnie przedostają się do krwi obwodowej, gdzie w ciągu jednego dnia dojrzewają [17], stając się krwinkami czerwonymi. W wyniku używania substancji podobnych do EPO powstaje więcej retikulocytów, które są uwalniane do krwi. Odsetek tych komórek wzrasta w stosunku do całkowitej liczby RBC. Wzrost ten można dokładnie zmierzyć za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego.

Tab. 1 Wykorzystywane parametry w module hematologicznym APB

Parametr		Jednostka
Hemoglobina	HGB	g/dl
Hematokryt	HCT	%
Niedojrzała frakcja retikulocytów	IRF	%
Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej	MCH	pg
Średnia stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej	MCHC	g/dl
Średnia objętość krwinek czerwonych	MCV	fl
OFF-Score	–	–
Płytki krwi	PLT	10 ³ /μl
Szerokość rozkładu objętości krwinek czerwonych (odchylenie standardowe)	RDW-SD	fl
Krwinki czerwone	RBC	10 ⁶ /μl
Retikulocyty – wartość bezwzględna	RET	10 ⁶ /μl
Odsetek retikulocytów	RET%	%
Krwinki białe	WBC	10 ³ /μl

Parametr RET% wskazuje procentową proporcję retikulocytów do RBC, zaś RET# oznacza ich bezwzględną liczbę na jednostkę objętości. Wykorzystanie fluorescencyjnej cytometrii przepływowej umożliwia dodatkowo podział retikulocytów na trzy frakcje, odpowiadające etapom ich dojrzewania. Etapy te są określane na podstawie intensywności światła fluorescencyjnego, wprost proporcjonalnie odzwierciedlającego zawartość RNA. W ten sposób uzyskuje się dodatkowe parametry, takie jak frakcja niedojrzałych retikulocytów (IRF) (patrz ryc. 2) [17].

Niezwykle wysoki wzrost wskaźnika RET% może stanowić pośredni dowód na stosowanie substancji zabronionych o działaniu podobnym do EPO [18].

Każdy środek stymulujący erytropoezę wywołuje typowy wzorec dopingu, obejmujący stymulację powstawania retikulocytów. Następstwem tego jest zwiększenie stężenia hemoglobiny i zahamowanie RET% w odpowiedzi na sztuczne podwyższenie stężenia hemoglobiny [19].

Aby można było wyciągnąć ostateczne wnioski w sprawie ewentualnego dopingu, należy zadbać o to, by wyniki pomiarów krwi były niezależne od danego laboratorium, jego personelu oraz warunków transportu, takich jak czas i temperatura. Wymaga to również wysokiej dokładności od analizatora hematologicznego.

Paszport Biologiczny (ABP)

Program ABP stale monitoruje pewne parametry biologiczne sportowców. W określonych odstępach czasu lub przy określonych okolicznościach (np. podczas zawodów) próbki pobrane od sportowców są badane w akredytowanych laboratoriach i rejestrowane w systemie ABP. W ten sposób można udowodnić skutki nadużywania substancji podobnych do EPO w dłuższym okresie czasu.

Włączenie ABP do swoich programów antydopingowych leży w gestii poszczególnych lokalnych organizacji antydopingowych. WADA odegrała wiodącą rolę w opracowaniu ABP. Już pierwsza wersja z grudnia 2009 roku zawierała i wykorzystywała parametry hematologiczne w celu ustalenia spersonalizowanego profilu dla każdego sportowca, a tym samym w celu wykrycia ewentualnego dopingu. Obecnie ABP zawiera 12 markerów hematologicznych oraz obliczony wskaźnik OFF-score. Wytyczne ABP określają także, na co należy zwrócić uwagę podczas pobierania próbek materiału oraz w jakich warunkach należy go transportować i badać [21].

Po przeprowadzeniu analizy, wartości parametrów krwi są gromadzone w centralnie i przetwarzane w celu ich analizy. Do tego celu wykorzystuje się system ADAMS (ang. *Anti-Doping Administration & Management System*). Jego obsługa jest szczegółowo opisana na [stronie internetowej WADA](#).

Stabilność parametrów retikulocytowych

Aby zapewnić wszystkim sportowcom uczciwe zawody, porównywalne muszą być nie tylko warunki sportowe, ale także kontrole antydopingowe i warunki pomiarowe w laboratorium. Zaś oceniane parametry muszą być niezależne od czynników zewnętrznych. Oznacza to z jednej strony, że jeśli próbka mierzona jest w różnych laboratoriach, o różnych porach dnia, temperaturach pomieszczenia lub na różnych urządzeniach z tej samej serii analizatorów, to wyniki pomiaru muszą mieć prawie taką samą wartość. Z drugiej strony, parametry oceniane w laboratorium muszą pozostać stabilne, nawet w obliczu czynników zewnętrznych, takich jak różny czas transportu lub warunki przechowywania.

WADA podejmuje wiele wysiłków w celu osiągnięcia harmonizacji między laboratoriami, takich jak zapewnienie akredytacji zgodnie z warunkami określonymi przez WADA. Warunki te opisane są przez Światowy Kodeks Antydopingowy, który jest dokumentem harmonizującym politykę antydopingową, zasady i przepisy obowiązujące w organizacjach sportowych i wśród władz publicznych na całym świecie, w tym procedury badawcze, począwszy od pobierania próbek krwi, poprzez transport, aż po analizę w laboratorium [22]. Ponadto prowadzone są obserwacje mające na celu zapewnienie, że możliwa różnica w pomiarach jest korygowana w Paszporcie Biologicznym, np. przy zmianie serii analizatorów [18, 23].

Stabilność biologiczna parametrów retikulocytarnych (RET#, RET%) mierzonych przy użyciu analizatorów serii XE i XT została udowodniona w wielu publikacjach [24–26], a także naukowo zweryfikowana w przypadku serii XN [25].

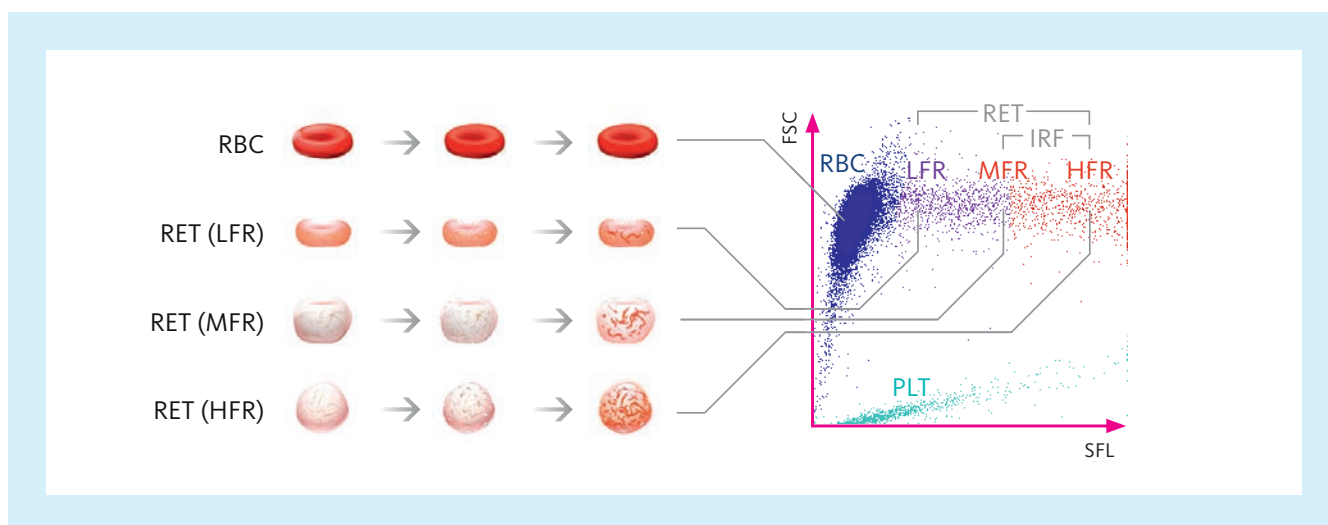


Technologie pomiaru w kanale RET

Oprócz bezwzględnej liczby retikulocytów (RET#), zastosowanie fluorescencyjnej cytometrii przepływowej w kanale RET, dostarcza informacji na temat etapów dojrzewania retikulocytów.

W pierwszym etapie, błony komórkowe są perforowane przez odczynnik CELLPACK DFL, a komórki pozostają w głównej mierze niezmienione. W drugim kroku, zawarte w komórkach kwasy nukleinowe są wybarwiane fluorescencyjnym barwnikiem zawartym w odczynniku Fluorocell RET, przy czym intensywność tego sygnału jest proporcjonalna do zawartości kwasów nukleinowych. Ponieważ zawartość RNA zmniejsza się wraz z dojrzewaniem retikulocytów, określone są trzy parametry, które odpowiadają etapom dojrzewania. Retikulocyty emitują wyższy sygnał fluorescencji niż dojrzałe krwinki czerwone, które nie zawierają już RNA. Z kolei sygnał fluorescencji retikulocytów jest znacznie niższy niż krwinek białych.

W zależności od intensywności fluorescencji retikulocyty dzieli się na trzy kategorie, reprezentujące różne stadia dojrzałości: LFR (niski współczynnik fluorescencji), MFR (średni współczynnik fluorescencji), HFR (wysoki współczynnik fluorescencji). IFR (frakcja niedojrzałych retikulocytów) odzwierciedla sumę parametrów MFR i HFR.



Ryc. 2 Skatergram RET obrazujący etapy dojrzewania retikulocytów: LFR, MFR i HFR

Wnioski

Walka z dopingiem zawsze będzie polegała na wyścigu między nowymi substancjami a odpowiednimi metodami ich wykrywania. Za pomocą parametrów retikulocytów, IRF i hemoglobiny można jednak określić stan erythropoezy niezależnie od substancji. W tym kontekście krótkoterminowe i długoterminowe monitorowanie tych parametrów stanowi naukowo uzasadnioną metodę wykrywania dopingingu we krwi.

Typowe wzorce stosowania dopingingu obejmują w pierwszym etapie zwiększenie wartości parametru RET% jako odpowiedzi na stosowanie środków stymulujących erythropoezę. Zaś w drugim etapie następuje zwiększenie stężenia HGB i towarzyszące temu zmniejszenie RET%. Paszport Biologiczny może również wykryć pobranie krwi w celu późniejszej autotransfuzji, charakteryzującej się zmniejszeniem stężenia HGB i zwiększeniem RET% oraz IRF.

Aby zapewnić rzetelność procedur antydopingowych, próbki krwi sportowców mogą być analizowane wyłącznie w laboratoriach akredytowanym przez WADA. Na całym świecie jest ich 30 i wszystkie z nich korzystają z tej samej technologii analizatorów. Wybór analizatora był w dużej mierze oparty na fakcie, że zmniejszenie wariacji analitycznej ma pozytywny wpływ na czułość ABP, gdzie analizatory Sysmex wykazywały najniższą wariację analityczną dla RET% [19].

Źródła

- [1] **Richard C et al. (2020):** *Transferrin Receptors in Erythropoiesis.* *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 19; 21(24): 9713–29.
- [2] **Voss SC et al. (2020):** *A novel mixed living high training low intervention and the hematological module of the athlete biological passport.* *Drug Test Anal.* 2020 Mar; 12(3): 323–30.
- [3] **Audran M et al. (1999):** *Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control.* *Med Sci Sports Exerc.* 1999 May; 31(5): 639–45.
- [4] **Connes P et al. (2003):** *Faster oxygen uptake kinetics at the onset of submaximal cycling exercise following 4 weeks recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) treatment.* *Pflügers Arch.* 2003 Nov; 447(2): 231–38.
- [5] **Haile DW et al. (2019):** *Effects of EPO on Blood Parameters and Running Performance in Kenyan Athletes.* *Med Sci Sports Exerc.* 2019 Feb; 51(2): 299–307.
- [6] **Jeppesen JS et al. (2021):** *Immature reticulocytes are sensitive and specific to low-dose erythropoietin treatment at sea level and altitude.* *Drug Test Anal.* 2021 Jul; 13(7): 1331–40.
- [7] **Bejder J et al. (2019):** *Time trial performance is sensitive to low-volume autologous blood Transfusion.* *Med Sci Sports Exerc.* 2019; 51(4): 692–700.
- [8] **Lundby C et al. (2008):** *Does recombinant human Epo increase exercise capacity by means other than augmenting oxygen transport?* *J Appl Physiol (1985).* 2008; 105(2): 581–7.
- [9] **Salamin O et al. (2018):** *Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects.* *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Mar 15; 464: 75–87.
- [10] **Philip M et al. (2021):** *Metabolic studies of hypoxia-inducible factor stabilisers IOX2, IOX3 and IOX4 (in vitro) for doping control.* *Drug Test Anal.* 2021 Apr; 13(4): 794–816.
- [11] **Sgrò P et al. (2018):** *Effects of erythropoietin abuse on exercise performance.* *Phys Sportsmed.* 2018 Feb; 46(1): 105–15.
- [12] **Ekbom BT et al. (2000):** *Blood boosting and sport.* *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000 Mar; 14(1): 89–98.
- [13] **Yasuoka Y et al. (2020):** *Differentiation of endogenous erythropoietin and exogenous ESAs by Western blotting.* *Heliyon.* 2020 Nov 3; 6(11): e05389–94.
- [14] **Mahendru D et al. (2020):** *Athlete Biological Passport: Need and Challenges.* *Indian J Orthop.* 2020 Jan 31; 54(3): 264–70.
- [15] **Parisotto R et al. (2000):** *A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes.* *Haematologica.* 2000 Jun; 85(6): 564–72.
- [16] **Tomc J et al. (2021):** *Molecular Insights into the Oxygen-Sensing Pathway and Erythropoietin Expression Regulation in Erythropoiesis.* *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 30; 22(13): 7074–90.
- [17] **SEED Reticulocytes: Sysmex; SEED Haematology – The importance of reticulocyte detection.** (19.8.2021)
- [18] **Naud JF et al. (2019):** *Standardization of reticulocyte counts in the athlete biological passport.* *Int J Lab Hematol.* 2019 Jun; 41(3): 387–91.
- [19] **Akin R 2021:** *Interview of Dr Rein Akin, Scientist at WADA, in 2021 with Sysmex* <https://www.sysmex-europe.com/n/academy/knowledge-centre/expert-voices/haematology/the-fight-against-doping-in-sports-continues.html> (19.8.2021)
- [20] **ABP 2021:** *Athletic Biological Passport operating guidelines. V08, April 2021,* <https://www.wada-ama.org/en/resources/athlete-biological-passport/athlete-biological-passport-abp-operating-guidelines>
- [21] **ABP 2021:** <https://www.wada-ama.org/en/athlete-biological-passport/> (13.09.2021)
- [22] **World Anti-Doping Code 2021:** <https://www.wada-ama.org/en/resources/the-code/world-anti-doping-code> (19.08.2021)
- [23] **Daves M et al. (2015):** *Sample stability for complete blood cell count using the Sysmex XN haematological analyser.* *Blood Transfus.* 2015 Oct; 13(4): 576–82.
- [24] **Robinson N et al. (2011):** *Stability and robustness of blood variables in an antidoping context.* *Int J Lab Hematol.* 2011 Apr; 33(2): 146–53.
- [25] **Ashenden M et al. (2013):** *Stability of athlete passport parameters during extended storage.* *Int J Lab Hematol.* 2013 Apr; 35(2): 183–92.
- [26] **Ashenden M et al. (2014):** *Stability of athlete blood passport parameters during air freight.* *Int J Lab Hematol.* 2014 Oct; 36(5): 505–13.