

Genski doping



Pripravil:
Doc. dr. Tadej Malovrh
Predsednik Komisije za
antidoping pri AZS

Hiter razvoj molekularne biologije ter mednarodni interdisciplinarni projekt »Človeški genom« sta omogočila natančnejši vpogled v človekovo dedno snov in njene gene, ki kodirajo ogromno število življenjsko pomembnih proteinov. Vzporedno s takim znanjem so se razvile tudi tehnike za manipulacijo z dednim materialom v živi celici. Tehnologija je bila razvita predvsem v raziskovalne namene izključno s ciljem, da bi lahko v prihodnosti zdravili nekatere bolezni, pri katerih so okvarjeni določeni geni.

Spodbudni rezultati raziskav pa so kmalu pritegnili tudi ljudi iz športnega področja, ki so zaznali številne koristi, ki bi jih taka genska manipulacija lahko prinesla za povečevanje določenih telesnih zmogljivosti in seveda za doseganje boljših rezultatov v različnih športih. Manipulacijo z dednim materialom na področju športa z namenom povečevanja telesnih zmogljivosti imenujemo genski doping. Ta nova oblika dopinga je za razliko od »klasičnega dopinga« šele na začetku uporabe in se zelo hitro razvija, za njegovo dokazovanje še ni razvitih zadovoljivih in uporabnih tehnik, prav tako pa je izjemno malo znanega o pričakovanih in predvidenih neželenih stranskih učinkih.

Uvod

Šport se vse bolj oddaljuje od svojega osnovnega namena, ki poudarja doprinos k mentalnemu in fizičnemu počutju in boljšemu zdravju ter splošnemu zadovoljstvu. Danes je postal šport eden od načinov služenja denarja, pot k slavi in uspešnosti, ki za seboj pušča ravno nasprotje prvotnega pomena športa.

Življenje vrhunkega športnika je vse prej kakor uživanje, saj ga zaznamujejo velika odrekanja, naporni treningi, utrujenost, bolečine in velikokrat tudi neuspeh na tekmovanjih. Pri tem postane razumljivo, da si človek poskuša najti enostavnejšo pot za doseganje postavljenih ciljev in pri tem grede nekateri tako daleč, da poskušajo pridobiti prednost pred ostalimi tudi na način, ki ni dovoljen in je v veliki večini primerov tudi zdravju škodljiv. Tukaj govorimo o dopingu, pojavu, ki spominja na otroško igro roparja in žandarja, kjer je žandar vedno en korak za roparjem. Danes doping skorajda ne pozna meja in vedno se z zamikom odkrivajo ter dokazujejo nove substance ali metode, ki jih športniki zlorabljajo. Napori, ki so vloženi v dokazovanje dopinga so velikokrat poplačani, saj prisilijo uporabnike k njegovi opustitvi. Na drugi strani pa ustvarjalci in uporabniki dopinga vedno najdejo korak prednosti pred tistimi, ki se borimo proti dopingu. Na pojav dopinga lahko sedaj gledamo dvoplastno, kako na skriti način pridobiti prednost pred tekmeci in kako uporabiti tak način dopinga, ki ga zasledovalci ne morejo dokazati ali pa se ga lahko uspešno prikrije. Ideje in znanje snovalci dopinga iščejo predvsem v dosežkih medicinske, farmacevtske, veterinarske in biološke znanosti. V tem obdobju je zelo nazoren primer ravno genski doping, ki se zelo hitro razvija in ima svoj izvor v ideji genske terapije. Sama genska terapija se šele razvija, pa so ustvarjalci dopinga že zaslutili velike možnosti, ki jih ideja lahko prinese kot doping v športu. Za dokazovanje genskega dopinga namreč še nimamo primernih in standardiziranih metod, WADA (World Antidoping Agency) tako išče in k sodelovanju vabi strokovnjake, ki bi jih razvili. Snovalci in bodoči uporabniki genskega dopinga se zavedajo vpliva na telesne zmogljivosti, ki so lahko veliko večje kot pri klasičnem dopingu, ne zavedajo pa se strokovno pričakovanih in predvidenih stranskih učinkov in učinkov na človekovo zdravje, ki bodo lahko katastrofalni. Najuglednejši strokovnjaki namreč predvidevajo, da se bo genski doping pojavil že na olimpi-

jskih igrah leta 2008, med snovalci genskega dopinga pa predstavljajo največjo grožnjo brezposelni ruski strokovnjaki iz področja molekularne biologije in medicine, ki so in bodo podprti s strani raznih bogatih privržencev, ki jemljejo šport zgolj kot posel.

Geni in proteini

Za razumevanje principa genskega dopinga, njegovih učinkov in tudi neželenih posledic njegove uporabe, je potrebno omeniti nekaj osnovnega o genetiki in molekularni biologiji. Prav vse telesne lastnosti so zapisane v dedni snovi imenovani DNK (dezoksiribonukleinska kislina), ki se nahaja v jedru celice. Dedna informacija, ki jo nosi DNK je organizirana v obliki genov, ki so v bistvu daljši, na določen način urejeni, odseki DNK, ki so zloženi v kromosomih. Vsak od mnogih genov, ki so bili pri človeku odkriti v sklopu projekta »Človeški genom«, nosi informacijo za izdelavo ustreznega proteina, ki ga v določenem življenjskem obdobju ali ciklu proizvede celica. Celica ga uporabi bodisi za lastno izgradnjo ali pri njeni življenjski regulaciji, lahko ga izloči v svojo neposredno okolico ali pa v telesne tekočine, kot so kri, limfa ali izločki žlez. Z izrazom protein na splošno poimenujemo vse encime, hormone, prenašalce in druge strukture sestavljene iz aminokislin, ki so pomembne za delovanje posamezne celice in s tem celotnega organizma. Organizem namreč lahko kot celota funkcionira le v sozvočju časovno pravilno proizvedenih proteinov in njihovega delovanja. Razumljivo je, da mora biti pravilna tudi dedna informacija za vsak protein. Včasih se zgodi, da se dedna informacija tako ali drugače okvari in nastanejo nepravilni produkti genov in organizem kot celota zboli, kar na splošno imenujemo genetska bolezen. Sodobna medicina se v zadnjem času proti takim boleznim bori z gensko terapijo, kjer se v bolnih celicah na določen način poskuša najprej odkriti nato pa nadomestiti okvarjene gene z zdravimi funkcionalnimi geni, pripravljenimi umetno v laboratoriju.

Od genske terapije do genskega dopinga

Z gensko terapijo danes lahko vstavimo ali nadomestimo okvarjene ali manjkajoče gene v celici tako, da celica proizvaja protein, ki ima določen učinek in organizem lahko normalno deluje. Osnovni princip metode je v tem, da se sintetično v laboratoriju pripravi gen, ki je identičen naravnemu genu (genski konstrukt). Tako pripravljen delček DNK se potem uporabi v enem od sistemov za vnos v celico. V celico lahko genske konstrukte vnašamo s pomočjo posebej pripravljenih virusov (Retrovirusi, Adenovirusi), ki ne povzročajo bolezni, vendar imajo ohranjene vse mehanizme za virusno razmnoževanje. Tem virusom del dednega materiala, ki je odgovoren za nastanek bolezni zamenjamo z želenim genskim konstruktom. Ta način vnosa nam omogoča, da se genski konstrukt vnese v dedni material tiste vrste celic, ki so dovzetne za virus. Na drugi strani pa je slabost sistema v tem, da je težko nadzorovati razmnoževanje virusa in s tem tudi genskega konstrukta, kajti z vsako repliko virusa nastane tudi replika gena. Drugi način pa je direktno vstavljanje v tkivo, oz. celice. V ta namen se uporablja na poseben način obdelan genski konstrukt, ki se ga vnese na želeno mesto z injekcijo, s pomočjo pritiska t.i. genske pištole, lahko pa konstrukt vežemo na molekulo, specifično za določeni celični receptor, ki jo vezano nanj potem celica prevzame v svojo notranjost. Metode lahko izvajamo direktno v tkivo organizma ali pa tkivo kirurško odvezamo, vstavimo konstrukt v laboratoriju in ga nato ponovno vstavimo nazaj na mesto odvzema. Pri direktnem vstavljanju tako genski konstrukt deluje le na mestu injiciranja. Prav vse omenjene metode se lahko uporabljajo tudi pri genskem dopingu, glede na svoje dobre in slabe strani ter glede na sistemski ali lokalni učinek, ki ga želimo doseči. Metode nadomeščanja genov, poznane iz genskega zdravljenja se namreč lahko uporabljajo tudi za dodajanje genov k popolnoma funkcionalni dedni snovi z namenom, da se organizmu ojača ali doda neka lastnost, ki jo pogojuje določen protein, kot produkt vstavljenega konstrukta, kar je osnovni princip genskega dopinga.

Kaj prinaša genski doping

Snovalci genskega dopinga morajo dobro poznati gene oz. njihove produkte, ki imajo značilen vpliv na telesne zmogljivosti pomembne v določenem

športu. Te podatke lahko dobijo v strokovni literaturi, ki opisuje fiziologijo npr. hormonov ali pa iz različnih znanstvenih opisov, kjer so živali ali pa tudi ljudje kazali neobičajne značilnosti. V takšnih opisih se navadno razkrije, kaj povzroča opazovano značilnost in če gre pri tem za določeno genetsko posebnost, je lahko primer zanimiv za idejo o genskem dopingu. Ko je enkrat poznan gen za nek hormon ali značilnost je potrebno opraviti še poskuse genske manipulacije na živalskem modelu in če se pri tem izkaže, da preneseni genski konstrukt pričakovano vpliva na telesno značilnost živali, ostane le vprašanje časa, kdaj se bo princip uporabil v genskem dopingu pri človeku. Danes je genski doping pri človeku potencialno najbolj verjeten za spodaj opisane gene ali primere.

Kako človeku povečati lastno sintezo EPO, ki bo vplivala na aerobne zmogljivosti športnika in se pri tem izogniti pozitivnemu rezultatu pri klasičnem dokazovanju EPO. Pri vstavljanju genskega konstrukta za EPO so v opičjem modelu rezultati dokaj spodbudni, gledano z namenom zdravljenja anemij različnega porekla. Vstavljeni gen za EPO je namreč imel pri opicah učinek, vendar se je pri nekaterih živalih hematokrit preveč povečal, celo do življenjsko nevarnih mej, na drugi strani pa so nekatere živali razvile močan imunski odgovor proti EPO in ga s tem inaktivirale, kar se je pokazalo kot huda anemija. Pri EPO pa snovalci dopinga iščejo tudi možnost vstavljanja naravno mutiranega gena za EPO receptorje. S tem bi pridobili zelo občutljiv organizem za EPO, kjer bi že ob normalnih koncentracijah EPO v organizmu dosegli močan učinek povečanja števila eritrocitov in s tem hematokrita. Tako naravno mutacijo gena za EPO receptorje so odkrili pri finski družini iz katere izhaja večkratni prvak in olimpijski zmagovalec iz leta 1964 v teku na smučeh Eero Mäntyranta. Preden so pri njem in njegovi družini dokazali spremenjen gen je bil po krivici obdolžen jemanja dopinga, saj je imel ob standardnih treningih toliko večje aerobne sposobnosti pred tekmeči.

Pri vzdržljivostnih športih, kot sta kolesarjenje in tek na dolge proge, je za genski doping zelo zanimivo odkritje gena PPAR-Delta. To je regulacijski gen za izražanje več drugih genov, ki okrepijo in povečujejo količino počasi krčljivih mišičnih vlaken, ki so bolj vzdržljiva. V poskusih na miših so znanstveniki ugotovili, da so miši z vstavljenim genom

PPAR-Delta dvakrat bolj vzdržljive pri teku kot poskusna skupina živali. Miši, s temi lastnostmi so poimenovali kar maratonske miši (marathon mouse), za katere pa se je izkazalo tudi to, da kljub zelo kalorični hrani ne pridobivajo na telesni masi in celo izrabijo maščobne rezerve. Poskusi so obetavni tudi za zdravljenje prekomerno debelih ljudi.

Ko je mišična celica poškodovana, kar se dogaja tudi pri intenzivnem treningu, t.i. satelitske celice pomagajo pri popraviljanju nastale škode. Popravljen mišična celica je debelejša in močnejša. Te procese popraviljanja deloma nadzoruje protein imenovan inzulinu podobni rastni faktor (Insulin-like Growth Factor 1; IGF-1), ki stimulira razmnoževanje satelitskih celic. Procese uravnoveša nasprotno delujoči faktor, imenovan miostatin, ki zavira razmnoževanje satelitskih celic. Belo belgijsko govedo ima mutacijo na genu za miostatin, ki izraža nefunkcionalni protein miostatin, kar ima za posledico nenadzorovano rast mišičnega tkiva in izgubo maščobnih zalog, kar daje izgled suhe »definirane« in dvojne omišičenosti živali. V poskusih na podganah in miših so se izkazali izvrstni rezultati, saj so vse živali, ki so dobile gene za IGF-1 povečale svojo mišično maso, če pa so bile izpostavljene še treningu, se je masa povečala celo do 30 % ter moč za 50 %, prav tako pa se je moč tudi dlje ohranjala v primerjavi z netreniranimi živalmi. Pri tem je potrebno omeniti predvsem dejstvo, da so bili poskusi usmerjeni izključno za zdravljenje nekaterih hudih mišičnih distrofij pri ljudeh in ljubiteljskih živalih. Hiperprodukcija IGF-1 in opisan efekt pa je tako zopet ena od idej za genski doping športnikom, ki potrebujejo veliko mišične mase. Med vsemi znanstvenimi dosežki genske manipulacije je prav to odkritje povzročilo največje povpraševanje med športniki in trenerji.

Z odkrivanjem genetskih osnov za izjemne telesne zmogljivosti sprinterjev se odpira še ena možnost genskega dopinga, ki se bo morda nekoč uporabljal za športe, kjer je potrebna velika moč in hitrost. Pri izrazitih sprinterjih je bil odkrit gen ACTN3 R veliko bolj pogosto kot pri vzdržljivostnih športnikih. Omenjeni gen nosi zapis za protein a-aktinin-3 za katerega se sklepa, da aktivira hitro krčljiva mišična vlakna in s tem takim ljudem daje dodatno moč in hitrost. Taki ljudje imajo torej genetsko predispozicijo in če bi nekdo razvil genski doping v tej smeri, bi lahko močno vplival na telesne zmogljivosti prejemnika.

Nevarnosti genskega dopinga

Pri uporabi genskega dopinga gre torej za manipulacijo z dednim materialom, kar pa je precej grob poseg v dedno snov celice. Danes žal še ne poznamo metode, s katero bi lahko vstavili del dedne snovi na točno določeno mesto genoma. Z do sedaj poznanimi načini vstavljanja dedne snovi v celico dobimo bolj ali manj naključno zeleni rezultat. Glede na pomen pravilno urejene dedne snovi za življenje lahko sklepamo, da vsakršna napaka nastala pri genski manipulaciji lahko povzroči veliko škodo organizmu. Škoda ali stranski, neželeni učinki genskega dopinga so projekcija stranskih učinkov poznanih iz poskusov na živalih, iz genske terapije in iz t.i. uporabe DNK cepiv. V poskusih, kjer so dednemu materialu živali dodajali nove gene za EPO se je izkazalo, da se je živalim močno povečalo število eritrocitov (hematokrit), tako da so morali živalim spuščati kri ali pa dodajati zdravila za redčenje krvi, da so jih lahko ohranili pri življenju. V istem poskusu pa so se pokazali tudi nasprotni učinki, saj se je pri nekaterih živalih razvil močan imunski odziv na EPO ter posledično njegova inaktivacija, kar pa je privedlo do hude anemije. Pri uporabi genske terapije v zdravljenju nekaterih dednih boleznih imunskega sistema so se po začetnih spodbudnih rezultatih zdravljenja pojavili zapleti v obliki rakavih obolenj, zlasti limfomov. Ker še ni tako veliko opravljenih dokazov o stranskih neželenih učinkih genske manipulacije, ostaja veliko nerešenih vprašanj iz katerih lahko slutimo tudi na nastanek neželenih stranskih učinkov genskega dopinga. Pri tehnikah genskega zdravljenja in tudi dopinga natančno ne vemo, v katere in v koliko celic smo vstavili genski konstrukt za nek protein, ne poznamo posledic dolgotrajnega izražanja vstavljenega gena v neki celici, prav tako ne vemo, kakšen bi lahko bil dolgoročen učinek, če vstavimo več kopij enega gena v celico. Domneva se, da bo v takih primerih pri nastanku neželenih učinkov igral pomembno vlogo med drugim tudi imunski sistem, lahko se pojavijo različne nefunkcionalnosti tkiv ali organov, ne gre pa zanemariti dejstva, da bodo vstavljeni geni v celici prebudili tudi rakave gene, kar pa se je že potrdilo v nekaterih raziskavah.

Dokazovanje genskega dopinga

Genski doping se zlorablja za doseganje tistih učinkov, ki jih pogojujejo predvsem proteinski hormoni in podobne

substanc ali pa se izrablja za izražanje večjega števila določenih receptorjev na celici. S tem se poveča dovzetnost in občutljivost celice na substance, ki se vežejo na te receptorje, kar se kaže npr. v hitrejšem razmnoževanju, krčljivosti, moči kontrakcije, hitrejši spremembi električnega potenciala celice, vztrajnosti ipd. Ker so taki produkti genskih konstruktov popolnoma identični naravnim, telesu lastnim, je genski doping, oz. na novo nastale proteine danes praktično še nemogoče dokazati in razločevati od lastnih. To je trenutno ena od bistvenih prednosti in interes genskega dopinga pred »klasičnim dopingom«. Ena od možnosti dokazovanja genskega dopinga je določanje koncentracije določenega proteina v telesu, drugi način je odvzem vzorcev sumljivo spremenjenega tkiva, npr. mišice, z biopsijo, tretji načina pa je dokazovanje imunskega odziva proti virusnim prenašalcem genskega konstrukt ali proti samemu produktu. Vse omenjene možnosti zahtevajo precej invazivno vzorčenje, saj sta jemanje krvi ali tkivna biopsija etično še vedno vprašljiva in sta grob poseg v zasebnost športnika, lahko pa tudi poškodba, zaradi katere bi športnik lahko utrpel tekmovalni neuspeh. Ravno na področju dokazovanja genskega dopinga bo morala WADA ter različni strokovnjaki narediti hiter in velik korak naprej, kajti le tako bi lahko dokazovanje dohitelo uporabo genskega dopinga, saj sta trenutno oba pola še v razvoju. Genski doping je na Listi prepovedanih snovi in tehnik obravnavan pod poglavjem Prepovedane metode, M3: Genski doping.

Zaključek

K sreči dokazov o genskem dopingu pri človeku še ni, vendar pa so precej jasno izražene želje nekaterih športnikov, da bi bili pripravljene uporabljati tudi genski doping za izboljšanje svojih rezultatov. Lep dokaz za to so številni klici in elektronska pošta z vprašanji vodji raziskav Sweeneyu po objavi rezultatov, kjer je s pomočjo genskega konstrukt za IGF-1 pri podganah povečal njihovo mišično moč. Kljub temu, da strokovnjaki opozarjajo na nevarnosti pri genskem doping, se bo le ta najverjetneje kmalu pojavil v športu. Večina uporabnikov bodo mladi ljudje, na katerih se bodo pokazale posledice in če pomislimo, da se je na področju genske manipulacije vse skupaj začelo zaradi zdravljenja genetskih boleznih, bo zloraba tega znanja v namene dopinga marsikateremu znanstveniku povzročila

slabo vest. Največ, kar se lahko v tem trenutku naredi v boju proti genskemu doping, je osveščanje športnikov in njihovih spremljevalcev o škodljivosti takega početja ter o moralnih in etičnih načelih, kar ji je sploh še ostalo v današnjem modernem športu.

Literatura

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing Inc., 1994.
- Aschwanden C. Gene cheats. *New Scientist* 2000; 24-9.
- Barton-Davis E, Shotoruma D, Musaro A, et al. Viral mediated expression of insulin like growth factor 1 blocks the ageing-related loss of skeletal muscle function. *Proc Nat Acad Sci* 1998; 95: 15603-7.
- Berne RM and Levy MN. Physiology. St. Louis, Baltimore, Boston Carlsbad, Chichago Minneapolis, New York: Mosby, 1998.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; 288 (5466): 669-72.
- Corbett M, Dungleon G, Robinson CS, et al. Transgenic mice expressing a mutation in β -tropomyosin reveal a pathological phenotype consistent with human nemaline myopathy. *Hum Mol Gen* 2001; 10: 317-28.
- Eklblom B. Blood doping and erythropoietin: the effects of variation in haemoglobin concentration and other related factors on physical performance. *Amer J of Sports Med* 1996; 24 (6): S40-S42.
- Gao GP, Alvira M, Wang L, Calcedo R, Johnston J and Wilson JM. Novel Adeno-Associated Viruses from Rhesus Monkeys as Vectors for Human Gene Therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11854-9.
- Kobinger GP, Louboutin JP, Barton ER, Sweeney HL and Wilson JM. Correction of the Dystrophic Phenotype by In Vivo Targeting of Muscle Progenitor Cells. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1441-9.
- Lee S, Barton ER, Sweeney HL and Farrar RP. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol* 96 (3): 1097-104.
- Lin J, Wu H, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002; 418: 797-801.
- Rankinen T, Perusse L, Rauramaa R, et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2001 update. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 1219-33.
- Rivera VM, Gao GP, Grant RL, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 2005; 105 (4): 1424-30.
- Sawka MN, Joyner MJ, Miles DS, et al. American College of Sports Medicine position stand: the use of blood doping as an ergogenic aid. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28:i-viii.
- Svensson E, Black H, Dugger D, 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: 1797-806.
- Varnavski AN, Zhang Y, Schnell M, et al. Preexisting Immunity to Adenovirus in Rhesus Monkeys Fails to Prevent Vector-Induced Toxicity. *J Virol* 2002; 76: 5711-19.
- Voet D and Voet JG. Biochemistry. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc., 1995.