

Wykorzystanie technik „omics” w nowoczesnej analizie antydopingowej

Aleksandra Biedroń¹, Paulina Malinowska¹, Maciej Gawlik²

¹ Studentki, Oddział Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

² Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Adres do korespondencji: Maciej Gawlik, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: mfgawlik@cyf-kr.edu.pl

Wprowadzenie

Światowa Agencja Antydopingowa WADA (ang. *World Anti-Doping Agency*) stawia czoła problemowi dopingowi wśród sportowców, którzy wbrew uczciwej konkurencji i zasadom gry *fair play* stosują coraz bardziej nowoczesne i wyrafinowane metody dopingowania z wykorzystaniem farmakologii i narzędzi genetycznych, aby osiągnąć lepsze wyniki niż ich przeciwnicy. Przekłada się to na konieczność wzmożenia wysiłków badawczych związanych z nowoczesnymi metodami molekularnymi, łącznie znanymi jako techniki „omics”. Pozwalają one na skuteczniejsze wykrywanie niedozwolonych substancji u osób stosujących doping oraz zwalczanie tego zjawiska [1]. W tej pracy skupimy się na ich omówieniu.

Przyczyny wprowadzenia technik „omics” do analizy toksykologicznej i antydopingowej u sportowców

Postęp technologii syntezy oraz dystrybucja internetowa ułatwiły dostęp do nowych leków, które są największym, potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia sportowców, z uwagi na ich wątpliwe i często nielegalne źródło. Wiele z nich produkowanych jest w nieakredytowanych laboratoriach, a brak przeprowadzanych badań klinicznych uniemożliwia określenie stopnia bezpieczeństwa ich przyjmowania. Stanowią one również problem we współczesnej analizie antydopingowej, ze względu na to, że jest ona skierowana przeciwko znanym dotychczas zakazanym lekom i metabolitom [2].

Utilizing of „omics” techniques in modern anti-doping

analysis · The development speed of doping makes the current detection methods not good enough. Especially treacherous seem to be direct methods due to their short detection window. The „omics” techniques, which are rapidly developing in recent times, have come to the rescue. They are widely used in many fields of science and have also been appreciated in the fight against doping. Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics seem to be ideal techniques for discovering biomarkers of the abuse of substances prohibited by World Anti-doping Agency (WADA). In this thesis, an overview of selected projects is presented and future strategies of more effective usage of „omics” techniques in anti-doping control are discussed. Their main aim was to extend detection window of recombinant erythropoietin, autologous blood transfusion, growth hormone or anabolic – androgenic steroids as well as detection of gene modifications.

Keywords: „omics” techniques, doping, anti-doping control, toxicological analysis.

© Farm Pol, 2019, 75(7): 403–408

Kolejnym powodem konieczności wprowadzenia bardziej precyzyjnych metod jest stosowanie przez sportowców mikrodawków substancji niedozwolonych, aby uniknąć nieprawidłowych fluktuacji biomarkerów stosowanego dopingowania, tym samym redukując możliwość jego wykrycia w czasie kontroli [1].

Równie ważnym aspektem generującym problemy w wykryciu potencjalnych oszustw sportowych jest krótkie okno detekcji stosowanych substancji, które uniemożliwia bezpośrednie wykrycie zakazanych manipulacji parametrami wydolnościowymi organizmu.

Charakterystyka technik „omics”

Techniki „omics” łączą w sobie między innymi genomikę, transkryptomikę, proteomikę i metabolomikę. Głównym założeniem ich stosowania jest niecelowana identyfikacja oraz analiza genów, a także ich produktów obecnych w materiale biologicznym. Powyższe techniki dostarczyły nowych możliwości w wykrywaniu biomarkerów i identyfikacji cząsteczek sygnałowych związanych ze wzrostem, śmiercią czy metabolizmem komórki. Ich wykorzystanie umożliwia dziś dokonanie kompletnej oceny aktywności funkcjonalnej struktur genetycznych, białek, lipidów czy całych szlaków biochemicznych. Dzięki temu możliwa jest analiza różnic pomiędzy osobnikami bądź gatunkami, co wcześniej było nieosiągalne [3]. Techniki te odgrywają znaczącą rolę w konstruowaniu odpowiedzi na pytania na temat reakcji zachodzących wewnątrz komórki, organu lub tkanki, czynników odgrywających kluczową rolę w procesie biologicznym oraz różnic w zachowaniu danej biomolekuły [4]. Badania nad technologiami omicznymi są znacząco wspierane przez WADA, która dąży do ujednoczenia procedur analitycznych [1].

Genomika

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) jest źródłem informacji biologicznej żywych komórek, która jest wyznaczona poprzez sekwencje jego nukleotydów. Całość DNA obecnego w komórce tworzy genom, a nauka zajmująca się jego analizą nazywana jest genomiką [5]. Jej najważniejszymi narzędziami są bioinformatyka i testy z wykorzystaniem mikromacierzy. Zastosowanie metod komputerowych w badaniach genetycznych stworzyło możliwość budowy baz danych w celu zebrania i zmapowania wszystkich interakcji DNA – białko. Dzięki temu zidentyfikowano korelacje genotyp – fenotyp, wykorzystywane w badaniach genomicznych [6]. Poznanie całego genomu człowieka umożliwiło rozwój genomiki funkcjonalnej, głównie skupiającej się na wzorze ekspresji genów w różnych warunkach [3].

Transkryptomika

Genom tworzą geny, które zawierają informację wymaganą do syntezy białek. Proces ten musi zostać poprzedzony transkrypcją DNA na RNA, zwłaszcza matrycowy RNA (mRNA), w celu późniejszej translacji. Cały układ transkryptów komórki, zawierający zarówno RNA kodujące, jak i niekodujące, jest nazywany transkryptomem. W skład RNA niekodującego wchodzi: miRNA (ang. *micro RNA*), siRNA (ang. *short interfering RNA*), piRNA (ang. *piwi-interacting RNA*), oraz lncRNA (ang. *long non-coding RNA*), które zaangażowane są w mechanizmy epigenetyczne. Ingerują one w regulację ekspresji genów

na poziomie transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym. Wydaje się, że odgrywają rolę w procesach upakowania DNA w formę heterochromatyny, metylacji DNA oraz inhibicji sekwencji genów.

Technologie odgrywające zasadniczą rolę w transkryptomice to mikromacierze DNA, SAGE (ang. *serial analysis of gene expression*) oraz NGS (ang. *next generation sequencing*). Jeżeli pojawiają się trudności w ilościowej ocenie analizowanego materiału, dodatkowo wykorzystywana jest technologia nazywana ilościową, łańcuchową reakcją polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). W kontekście badań antidopingowych transkryptomika wykorzystywana jest przede wszystkim do detekcji stosowania hormonów peptydowych (hGH, IGF-1, Epo), steroidowych oraz dopingów genowego [5, 6].

Proteomika

Proteomika zajmuje się analizą białek (protein), które są produktem ekspresji genów. Podczas gdy genom jest względnie niezmienny w ciągu całego życia organizmu, proteom (zestaw białek) charakteryzuje się wysoką dynamiką związaną z odpowiedzią na bodźce środowiska wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowego. Stanowi on efekt ekspresji genomu oraz posttranslacyjnych modyfikacji białek pojedynczego genu, co zapewnia jego różnorodność [4]. Poza identyfikacją i oceną ilościową białek, proteomika skupia się również na określeniu ich lokalizacji, modyfikacji, aktywności biologicznej, a także funkcji [7]. Do analizy proteomu wykorzystuje się elektroforezę dwuwymiarową w żelu akrylamidowym (2D-PAGE), co pozwala np. na separację endogennej i rekombinowanej erytropoetyny. Inne metody separacji, które cechuje wyższa rozdzielczość to ogniskowanie izoelektryczne (IEF) oraz metody chromatograficzne, takie jak: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia kolumnowa (CC) czy chromatografia powinowactwa (AC). Wykorzystuje się również spektrometrię mas z jonizacją przez desorpcję laserową w stałej matrycy z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF-MS) oraz tandemowy spektrometr mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI-MS/MS), które w kontroli antidopingowej służą do detekcji i oceny m.in. insulinopodobnego hormonu wzrostu (IGFs), insuliny, gonadoliberyny czy peptydów uwalniających hormon wzrostu [5, 8].

Metabolomika

Stan metaboliczny jest wynikiem odkodowania informacji genetycznej z genomu, co prowadzi do syntezy konkretnego białka oraz wpływu czynników środowiskowych na komórkę [9]. Analogicznie do wcześniej omówionych terminów jak

genom, transkryptom i proteom, pojęcie metabolom odnosi się do wszystkich metabolitów obecnych w komórce. Nawiązuje do małych molekuł zarówno endogennych, jak i egzogennych, takich jak aminokwasy, kwasy tłuszczowe, węglowodany, hormony i inne cząsteczki sygnałowe. Celem metabolomiki jest ich jakościowa oraz ilościowa charakterystyka. Naukowcy wyróżniają również metabonomikę, w obrębie której bierze się pod uwagę dynamiczne zmiany oraz fluktuacje metabolitów. Analiza metabolomu (zwłaszcza moczu oraz surowicy krwi) jest stosowana w celu detekcji fizjologicznych zmian będących skutkiem wpływu substancji egzogennych bądź ich metabolitów. W analizie metabolomu stosuje się głównie magnetyczny rezonans jądrowy (1H NMR) oraz spektrometrię mas połączoną z chromatografią gazową (GC-MS) lub cieczową (LC-MS). W kontroli dopingu metabolomikę można wykorzystać do analizy profilu steroidowego w moczu lub czynników wzmagających erytropoezę [3, 5].

Wykrywanie dopingu

Poniżej zostały przedstawione wybrane przykłady metod analizy antydopingowej z wykorzystaniem technik „omics”.

Doping krwi

Erytropoetyna i substancje stymulujące erytropoezę

Erytropoetyna jest hormonem, który wzmacnia proces produkcji krwinek czerwonych w szpiku (erytropoezę), co prowadzi do zwiększenia wydolności organizmu poprzez lepsze dotlenienie tkanek. Niektórzy sportowcy wykorzystują to działanie, decydując się na stymulację swojego organizmu ludzką rekombinowaną erytropoetyną (rHuEPO) lub środkami wzmagającymi erytropoezę, takimi jak peptydowy agonista receptora erytropoetyny (EMP), stabilizatory czynnika indukowanego hipoksją (HIF), inhibitory czynnika transkrypcji (GATA-2) czy inhibitory hematopoetycznej fosfatazy komórkowej (HCP) [1, 5]. Okno detekcji bezpośrednich metod wykrywających rHuEPO jest krótkie, a jej struktura jest na tyle podobna do endogennego hormonu, że trudno je rozróżnić. W 2016 r. Jérôme Durussel wraz ze wsp. wykazali istnienie zmian w ekspresji genów powodowanych jej podażą, szczególnie genów kodujących informacje o budowie i funkcji erytrocytów. Należą do nich *SLC4A1*, *HBD*, *CA1*, *BPGM*, a także *ALAS2*, *SNCA*, *FECH* regulujące odpowiednio transport tlenu i dwutlenku węgla oraz syntezę hemu, *EPB42*, *TMOD1*, *GYPE*, *RBM38* odpowiedzialne za organizację i spójność błony komórkowej erytrocytów, *BCL2L*, *SELENBP1* biorące udział w syntezie reaktywnych formy tlenu

(ang. *Reactive Oxygen Species, ROS*), potencjalnie powodujące apoptozę komórek, *GUK1* i *GMPR* regulujące metabolizm puryn oraz *FBXO7* – cykl komórkowy i różnicowanie komórek krwi podczas erytropoezy. Wyróżniono także geny o nieznannej funkcji, ale według wcześniejszych doniesień istotne w biologii krwinki czerwonej: *TRIM58*, *CSDA*, *DCAF12*, *FAM46C*, *STRADB*, *ADIPOR1*, *PITHD1*, *UBXN6* [10].

Inne doniesienia mówią o detekcji krążącego we krwi miRNA. Są to jednoniciowe cząsteczki niekodujące o długości 19–25 nukleotydów. Występują w dużej ilości również w ślinie czy moczu. Pełnią one funkcję posttranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów. Leuenberger i wsp. zaprezentowali w 2011 r. wyniki mówiące o znacznym wzroście krążącego miR-144 po podaży hormonu [11].

Przykładem substancji stymulującej erytropoezę jest Roxadustat, który należy do grupy stabilizatorów HIF i stosowany jest w leczeniu anemii. Widnieje on na liście substancji zakazanych przez WADA. W porównaniu do innych leków dopingujących mających wpływ na stan hipoksji, Roxadustat wykazuje dłuższe działanie. Obecnie testy kontroli antydopingowej wykorzystują metodę LC-MS/MS nie tylko do jego bezpośredniego wykrycia w moczu, ale także jego metabolitów sprzężonych z kwasem glukuronowym [12].

Hansson wraz ze wsp. badali inne metabolity, będące potencjalnymi markerami dopingowania z użyciem Roxadustatu. Analizy te były wykonywane *in vitro* na kilku modelach: ludzkich komórkach wątroby, mikrosomach wątrobowych ludzkich oraz końskich, frakcji S9, a także próbie kontroli dopingowej – moczu. Lek oraz jego metabolity oceniono za pomocą ukierunkowanej metabolomiki, stosując UHPLC sprzężoną z kwadrupolowym spektrometrem mas z czasem przelotu (Q-TOF). Po inkubacji mikrosomów obydwóch rodzajów ze środkiem dopingującym wykryto metabolit M4b powstały na skutek utlenienia. W moczu zaobserwowano jedynie glukoronid leku, jednak fakt, że przebadana została pojedyncza próbka, dla której ciężko było ustalić dokładny czas i dawkę zastosowania Roxadustatu nie wyklucza możliwości wystąpienia innych metabolitów [13].

Transfuzje krwi

Celem transfuzji krwi jest wzrost ogólnej liczby erytrocytów, przy jednoczesnym braku pobudzenia endogennej erytropoezy. Podczas gdy testy wykrywające allogeniczne przetoczenia krwi zostały zakretyowane i pozwalają na łatwą, szybką i specyficzną analizę obecności więcej niż jednej populacji erytrocytów (w tym celu wykorzystywana jest cytometria przepływowa), to metody detekcji transfuzji autologicznych nadal stanowią wyzwanie.

Leuenerberger i wsp. przeanalizowali poziomy krążących miRNA po autologicznej transfuzji krwi. Najwyższe stężenie miały miR-30b, miR-30c oraz miR-26b, jednakże ich ekspresja dotyczyła głównie leukocytów usuwanych w czasie przygotowania preparatów krwinek czerwonych, co ogranicza możliwość detekcji transkryptomów [14].

W badaniach proteomicznych przeprowadzonych z wykorzystaniem metody 2D-PAGE zaobserwowano zmiany w białkach błonowych spowodowane przechowywaniem czerwonych krwinek. Wynikały one głównie z reakcji utlenienia. Wśród dotkniętych tym procesem białek były: β -aktyna, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, ankirylna oraz α - i β -spektryna [15].

W badaniach nad możliwością wykorzystania cytofluorymetrii przepływowej w detekcji transfuzji autologicznej jednym z aspektów była ocena ekspresji białek powierzchniowych, takich jak CD47, CD55, CD59 i glikoforyny A. Wykazano jej spadek po 20 dniach przechowywania w związku z procesem starzenia i apoptozy [16].

Czynniki wzrostu

Hormon wzrostu (GH) jest to białko, które stymuluje metabolizm węglowodanów i kwasów tłuszczowych oraz ma wpływ anaboliczny na białka mięśni szkieletowych. W medycynie używany jest do leczenia chorób związanych z zaburzeniem wzrostu, natomiast w sporcie nadużywany w celu poprawy wydajności, siły czy przyrostu tkanki mięśniowej w sportach sylwetkowych [17].

W kontroli dopingiu hormonem wzrostu przydatna okazuje się analiza ilościowa mRNA genów kodujących GH i somatoliberynę (GHRH), a także genów odpowiadających za funkcje metaboliczne wynikające z działania tego hormonu.

Jednak znacznie większą rolę odgrywają badania proteomiczne. W warunkach fizjologicznych GH jest mieszkanką różnych izoform, z których największą część stanowi frakcja o masie 22 kDa (70-75%), a druga w kolejności ma masę 20 kDa (5-10%). Pozostałe to modyfikacje posttranslacyjne oraz fragmenty hormonu. Preparaty syntetycznego GH najczęściej stanowią frakcję białka o masie 22 kDa. Ich stosowanie powoduje zahamowanie wydzielania endogennego hormonu, co prowadzi do zaburzenia stosunku stężeń izoform we krwi, dzięki czemu można wykryć nadużycie.

Do oceny stymulacji hormonem wykorzystuje się metody immunochemiczne opierające się na analizie stosunku stężeń izoform oraz testy pośrednie wykrywające biomarkery powiązane z jego przyjmowaniem, a wśród nich: IGF-1 oraz N-końcowy peptyd prokolagenu typu III (P-III-NP). Są one jednak obciążone ryzykiem reakcji krzyżowych oraz małą specyficznością, szczególnie w przypadku

niskich stężeń. Dodatkowo problem stanowi okno detekcji, ze względu na krótki okres półtrwania izoform GH.

W celu osiągnięcia lepszych efektów tego typu badań, Such-Sanmartin i wsp. zalecają zastosowanie metody MSIA (ang. *mass spectrometry immunoassay*), która łączy ze sobą immunochemię i spektrometrię, pozwalając na eliminację interferencji wynikających z reakcji krzyżowych w metodach immunochemicznych [5, 18].

Anaboliki steroidowe

Sterydy anaboliczne, inaczej sterydy anaboliczno-androgenne (AAS), są syntetycznymi pochodnymi testosteronu, o wzmocnionym działaniu, uzyskanym dzięki wprowadzeniu modyfikacji. Ich stosowanie prowadzi do rozległego wzrostu masy mięśniowej, co jest wykorzystywane w celu poprawy wyników, szczególnie przez zawodników sportów siłowych i sylwetkowych. Środki te mogą okazać się bardzo niebezpieczne, gdyż ich działanie prowadzi do wielu poważnych efektów ubocznych, takich jak uszkodzenie wątroby, bezpłodność czy przedwczesna śmierć spowodowana chorobami układu krążenia. Na okres detekcji ma wpływ między innymi sposób podawania. W przypadku przyjmowania parenteralnego wynosi on do miesiąca, natomiast ustnego zaledwie dwa tygodnie.

Procedury przesiewowe dla AAS w akredytowanych laboratoriach WADA opierają się głównie na GC-MS, jednak coraz bardziej istotne stają się LC-MS oraz spektrometria masowa izotopów węgla IRMS (ang. *isotope-ratio mass spectrometry*). Dotyczy to zarówno detekcji hormonów, jak i ich metabolitów [19, 20]. Znaczącą rolę w usprawnieniu metod detekcji odgrywa poszukiwanie specyficznych markerów wskazujących na stosowanie dopingiu. Zgodnie z zaleceniami WADA są to: 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol, 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol, a także etiocholanolon. Zalecany profil steroidowy zawiera również testosteron, androsteron, epitestosteron oraz stosunki poszczególnych analitów [21].

Prowadzono również badania nad zmianami proteomu wynikającymi ze stosowania AAS. W badaniach przeprowadzonych na koniach wykazano wzrost ekspresji klasteryny oraz α 2-glikoproteiny bogatej w leucynę. Natomiast badania nad wpływem dihydrotestosteronu na receptory androgenowe, prowadzone na limfocytarnych liniach komórkowych, pozwoliły wytypować co najmniej pięć białek, które mogą być z nimi powiązane [5].

Doping genowy

Doping genowy polega na modulacji ekspresji genów, ale także na wprowadzaniu do komórki transgenów, które następnie mogą ulegać ekspresji.

WADA definiuje doping genowy jako „nieterapeutyczne wykorzystanie komórek, genów, elementów genetycznych lub modulacje ekspresji genów, które mają zdolność poprawy wyników sportowych” [22]. Identyfikacja sportowców stosujących tę metodę dopingu jest bardzo trudna, ponieważ wykrycie w próbkach krwi czy moczu efektów użycia wielu z terapii bazujących na technologiach genetycznych jest mało prawdopodobne. Białka wytwarzane przez wprowadzony gen są identyczne z białkami produkowanymi przez gen wcześniej niezmodyfikowany. Dodatkowo, gen może ulegać ekspresji tylko lokalnie, w tkance, do której został wprowadzony poprzez wkłucie. Rodzi to problemy natury etycznej i ekonomicznej, ponieważ testy potwierdzające wykorzystanie tej metody dopingu wymagają biopsji, są zbyt inwazyjne i drogie. Dlatego istotna jest stała indywidualna obserwacja markerów dopingu i ich fluktuacji u każdego sportowca [23].

Testy wykorzystywane w detekcji dopingu genowego to m.in. mikromacierze, za pomocą których porównuje się ekspresję mRNA w komórkach sportowca w stosunku do komórek osobników z grupy kontrolnej. Obserwacji podlega spadek lub wzrost ekspresji genów. Według Brzezińskiej i wsp. [24] przykładowo opracowanie chipu mikromacierzy dla genu EPO umożliwi monitorowanie zmodyfikowanej ekspresji około 100 genów zależnych od tego hormonu.

Niewielkie różnice strukturalne między białkami endogennymi a ich egzogennymi rekombinowanymi odpowiednikami pozwalają na zastosowanie profilowania proteomicznego. W tym celu stosuje się metodę SELDI-TOF, która ma szczególne zastosowanie do pośredniej identyfikacji hormonu wzrostu [25].

Duże nadzieje rodzi sekwencjonowanie NGS, które dostarcza znacznie więcej informacji niż dotychczas wykorzystywane techniki biologii molekularnej. Dzięki niemu możemy wykryć zmiany w genomie powstałe między innymi na skutek wprowadzenia plazmidowego i wirusowego DNA, w obrębie DNA kodującego, jak i niekodującego. De Boer i wsp. [26] opracowali ukierunkowany test, oparty na NGS, wykrywający połączenia ekson-ekson potencjalnie wprowadzonych kopii genów dopingowych (copyDNA): IGF1, IGF2, GH1, GH2, EPO. Test jest odporny na modulacje (np. mutacje milczące), których celem jest uniknięcie wykrycia. Twórcy wykorzystali adaptory (syntetyczne DNA o znanej sekwencji) zdolne do ligacji we fragmentach dwuniciowych, co eliminuje interferencje pochodzące od RNA, które również może zawierać połączenia ekson-ekson. Czulość testu wynosi 1296 copyDNA na 1000 ng genomowego DNA, jednak zmienna liczba kopii

zmodyfikowanego genu krążącego w krwioobieg sportowców oraz ciągłe dążenie do jej zmniejszenia, przy zachowanym pożądanym efekcie, sprawia, że nie wiemy jak czule muszą być metody detekcji.

Stale rozwijające się techniki umożliwiają wzmocnienie lub osłabienie ekspresji dowolnego genu. Tempo ich rozwoju, przewyższające tempo rozwoju metod analitycznych, sprawia, że detekcja dopingu genowego opierającego się na modyfikacjach genomu stanowi wyzwanie w świecie sportu [17].

Podsumowanie

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań dotyczących kontroli antydopingowej z wykorzystaniem technik „omics” w celu wypracowania nowego, unikalnego, specyficznego i wrażliwego modelu postępowania w detekcji substancji zakazanych, stanowiącego alternatywę dla tradycyjnych metod. Techniki te są stale doskonałe, aby dorównywać postępowi technologii dopingowej. Wiele prób podjętych w celu wprowadzenia ich do rutynowej kontroli nie zostało zrealizowanych, co wynika ze złożoności ludzkiego genomu, transkryptomu, proteomu i metabolomu oraz ich korelacji między sobą. W związku z tym, istnieje potrzeba prowadzenia dużych wielośrodkowych programów badawczych, wykorzystujących wspólne biobanki informacji o ludzkim genomie, jego ekspresji, a także wpływu dopingu na ten proces. Z pomocą w opracowaniu tak dużych zbiorów danych i ich precyzyjnej oceny przychodzą stale udoskonalane metody statystyczne i obliczeniowe. Kluczową rolę pełnią laboratoria skupiające się na odkrywaniu nowych substancji pozwalających osiągać lepsze wyniki w sportach, które następnie są umieszczane na liście tworzonej przez WADA. Znajomość tych substancji pozwala na prowadzenie badań mających na celu identyfikację markerów, umożliwiających potwierdzenie ich stosowania. Badania nad technikami „omics” są wspierane finansowo przez WADA, gdyż ze względu na możliwość bardziej wnikliwej analizy zmian, powodowanych przez środki dopingujące, stanowią one przyszłość w walce z zawodnikami naruszającymi zasady gry *fair play* i mogłyby zapewnić uczciwość i sprawiedliwość w sporcie.

Otrzymano: 2019.07.26 · Zaakceptowano: 2019.07.31

Piśmiennictwo

1. Wang G., Karanikolou A., Verdouka I., Friedmann T., Pitsiladis Y.: Next Generation “Omics” Approaches in the “fight” against blood doping. W: Rabin O., Pitsiladis Y. Acute Topics in Anti-Doping. First Ed. Bazylea: Karger Medical and Scientific Publishers 2017, 119-128.

2. Friedmann T., Flenker U., Georgakopoulos C., Alsayrafi M., Sottas P.E., Williams S.A., Gill R.D.: Evolving concepts and techniques for anti-doping. *Bioanalysis* 2012, 4(13): 1667–1680.
3. Debnath M., Prasad G.B.K.S., Bisen P.S.: *Omics Technology*. W: Debnath M., Prasad G.B.K.S., Bisen P.S.: *Molecular diagnostics: promises and possibilities*. First Ed. Dordrecht: Springer 2010, 11–31.
4. Shiryayeva L.: *Doctoral thesis: Proteomics and metabolomics in biological and medical applications*. First Ed. Umea: VMC, KBC, Umeå University, 2011.
5. Reichel C.: OMICS-strategies and methods in the fight against doping. *Forensic Science International* 2011, 213(1–3): 20–34.
6. Vignaux J.-J., André A.: *Biomarkers in Precision Medicine: The Era of Omics*. W: André A.: *Digital Medicine*. First Ed. Cham: Springer 2019, 59–66.
7. Fields S.: Proteomics in genomics. *Science* 2001, 291(5507): 1221–1224.
8. Bączek T.: *Rozprawa habilitacyjna: Usprawnienie identyfikacji peptydów w proteomice z wykorzystaniem chemometrycznej analizy danych*. Wyd. 1. Gdańsk, Akademia Medyczna w Gdańsku, 2006.
9. Kaddurah-Daouk R.: Metabolic profiling of patients with schizophrenia. *PLoS Medicine* 2006, 3(8):e363: 1222–1223.
10. Durussel J., Haile D.W., Mooses K., Daskalaki E., Beattie W., Mooses M., Mekonen W., Ongaro N., Anjila E., Patel R.K., Padmanabhan N., McBride M. W., McClure J.D., Pitsiladis Y.P.: Blood transcriptional signature of recombinant human erythropoietin administration and implications for antidoping strategies. *Physiological Genomics* 2016, 48(3): 202–209.
11. Leuenberger N., Jan N., Pradervand S., Robinson N., Saugy M.: Circulating microRNAs as long-term biomarkers for the detection of erythropoiesis-stimulating agent abuse. *Drug Testing and Analysis* 2011, 3(11–12): 771–776.
12. Eichner D., Van Wagoner R.M., Brenner M., Chou J., Leigh S., Wright L.R., Flippin L.A., Martinelli M., Krug O., Schänzer W., Thevis M.: Implementation of the prolyl hydroxylase inhibitor Roxadustat (FG-4592) and its main metabolites into routine doping controls. *Drug Testing and Analysis* 2017(9): 1768–1778.
13. Hansson A., Thevis M., Cox H., Miller G., Eichner D., Bondesson U., & Hedeland M.: Investigation of the metabolites of the HIF stabilizer FG-4592 (roxadustat) in five different in vitro models and in a human doping control sample using high resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017, 134: 228–236..
14. Leuenberger N., Schumacher Y.O., Pradervand S., Sander T., Saugy M., Pottgiesser T.: Circulating microRNAs as biomarkers for detection of autologous blood transfusion. *PLoS one* 2013, 8(6):e66309: 1–9.
15. D'Amici G.M., Rinalducci S., Zolla L.: Proteomic analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *Journal of Proteome Research* 2007, 6(8): 3242–3255.
16. Donati F., Acciarini R., De Benedittis L., de la Torre X., Pirri D., Prete M., Stampella A., Vernucci E., Botte F.: Detecting Autologous Blood Transfusion in Doping Control: Biomarkers of Blood Aging and Storage Measured by Flow Cytometry. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2018, 19(2): 124–135.
17. Mazzeo F., Altavilla G., D'elia F., Raiola G.: Development of Doping in sports: overview and analysis. *Journal of Physical Education and Sport* 2018, 18(3): 1669–1677.
18. Such-Sanmartín G., Bache N., Bosch J., Gutiérrez-Gallego R., Segura J., Jensen O.N.: Detection and differentiation of 22 kDa and 20 kDa Growth Hormone proteoforms in human plasma by LC-MS/MS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics* 2015, 1854(4): 284–290.
19. Mazzeo F., Ascione A.: Anabolic androgenic steroids and doping in sport. *Sports Medicine Journal/Medicina Sportivă* 2013, 9(1), 2009–2020.
20. Mazzeo F.: Anabolic steroid use in sports and in physical activity: overview and analysis. *Sport Mont.* 2018, 16(3): 113–118.
21. WADA Technical Document – TD2018EAAS: Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018eaas_final_eng.pdf (dostęp: 26.07.2019).
22. WADA: World Antidoping Code 2015. <https://www.wada-ama.org> (dostęp: 26.07.2019).
23. Mazzeo F., Volpe R.A.: From gene doping to athlete biological passport. *Sport Science* 2016, 9(2): 97–103.
24. Brzezińska E., Domańska D., Jegier A.: Gene doping in sport – perspectives and risks. *Biology of Sport* 2014, 31(4): 251–259.
25. Li X, Zhang P.: Advances in Anti-Doping Analytical Approaches: Challenges and Solutions. *Current Pharmaceutical Analysis* 2019, 14(3): 167–174.
26. de Boer E.N., van der Wouden P.E., Johansson L.F., van Diemen C.C., Haisma H.J.: A next-generation sequencing method for gene doping detection that distinguishes low levels of plasmid DNA against a background of genomic DNA. *Gene Therapy* 2019, doi: 10.1038/s41434-019-0091-6.