

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Význam erythropoetinu a jeho stanovení

Bakalářská práce

2021

Terezie Garláthyová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Terezie Garláthyová**  
Osobní číslo: **C18161**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Význam erythropoetinu a jeho stanovení**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Proveďte literární rešerši zabývající se erythropoetinem, jeho významem v medicíně a ve sportu. Zaměřte se také na možnosti stanovení erythropoetinu v biologických matricích.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Význam erythropoetinu a jeho stanovení jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 7. 2021

Terezie Garláthyová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomášovi Bajerovi, Ph. D. za veškeré cenné připomínky a rady při tvorbě tohoto textu.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá erythropoetinem, jeho využitím a analýzou. První část je věnována historii objevení erythropoetinu, jeho struktuře a vlivu na lidský organismus. Dále je práce zaměřena na využití klinické a obsahuje i analýzu erythropoetinu se zaměřením na sportovní sféru.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

erythropoetin, rekombinantní erythropoetin, erythropoéza, doping, cyklistika, elektroforéza

## **TITLE**

Importance of erythropoietin and its analysis

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with erythropoietin, its use and analysis. The first part is devoted to the history of the Discovery of erythropoietin, its structure and its effect on the human body. Furthermore, the work focuses on the clinical use and includes analysis of erythropoietin with a focus on the sports sphere.

## **KEYWORDS**

erythropoietin, recombinant erythropoietin, erythropoiesis, doping, cycling, electrophoresis

# Obsah

SEZNAM ZKRATEK .....	9
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
Úvod.....	14
1. Historie objevování erythropoetinu .....	15
2. Erythropoetin z biologického a chemického hlediska .....	20
2.1. Struktura erythropoetinu .....	20
2.2. Epo z genetického hlediska.....	22
2.3. Produkce erythropoetinu .....	23
2.4. Erythropoetinový receptor Epo-R.....	24
2.4.1. Struktura receptoru .....	25
2.5. Epo a Epo-R.....	25
2.5.1. Aktivace receptoru .....	25
2.5.2. Přenos signálu .....	26
2.5.3. Terminace signálu.....	27
2.6. Erythropoéza.....	28
3. Erythropoetin jako léčivo.....	32
3.1. Izoformy erythropoetinu .....	32
3.1.1. Erythropoetin alfa, beta, omega, delta, darbepoetin, CERA.....	32
3.2. Dávkování a způsob podání.....	33
3.3. Primární a sekundární účinky .....	34
3.4. Vedlejší účinky .....	34
3.4.1. Vliv rhEpo na červené krvinky.....	34
3.4.2. PRCA.....	35
3.5. Léčba anémie způsobené chronickým selháním ledvin.....	35
3.5.1. Rezistence léčby .....	36
3.6. Léčba anémie vyvolané nemocí AIDS .....	36
3.7. Předoperační péče .....	37
4. Erythropoetin ve sportu .....	39
4.1. Skandál Festina týmu.....	41
4.2. Lance Armstrong .....	42
5. Analýza tělních tekutin na přítomnost rhEpo .....	45
5.1. Nepřímé metody .....	45

5.1.1.	Hematokritový a hemoglobinový test.....	45
5.1.2.	Hypochromní makrocyty .....	46
5.1.3.	Počet retikulocytů .....	46
5.2.	Přímé metody .....	46
5.2.1.	Elektroforetické metody .....	46
5.2.1.1.	IEF-PAGE (isoelectric focusing-polyacrylamide gel electrophoresis) .....	47
5.2.1.2.	SDS-PAGE/ SAR-PAGE (sodium dodecyl sulphate/ sarcosyl-polyacrylamide gel electrophoresis).....	49
5.2.1.3.	2D – elektroforéza .....	51
5.2.2.	Imunochemické metody .....	52
5.2.2.1.	EPO WGA MAIIA (Membrane-asisted isoform immunoassay) .....	52
Závěr .....		54
SEZNAM LITERATURY .....		55



## SEZNAM ZKRATEK

AIDS	acquired immunie deficiency syndrome získaný syndrom imunitního deficitu
BFU-E	burst forming unit-erythropoiesis nezralá krevní buňka v kostní dřeni
BHK buňky	ledvinové buňky mláděte křečka čínského
CERA	Continuous Erythropoietin Receptor Activator aktivátor receptoru pro erythropoetin
CFU-E	colony forming unit-erythroid unipotentní kmenová buňka, z níž vzniká erytroid
COS buňky	buňky získané z ledvin opice
Epo	erythropoetin
Epo-R	erythropoetinový receptor
ESF	erythropoiesis stimulating factor faktor stimulující erytropoézu
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G-CSF/CSF3	granulocyte colony stimulating factor cytokin stimulující kolonii granulocytů
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor cytokin stimulující kolonii makrofágů
Hb/HGB	hemoglobin
HCP	hematopoietic cell phosphatase hematopoetická buněčná fosfatáza
HCT	hematokrit
HIF	hypoxia inducible factor faktor transkripce indukovaný hypoxií

HNF	hepatocyte nuclear factor, jaterní jaderný faktor, transkripční faktor
HRE	hypoxie response factor; sekvence, na kterou reaguje HIF
CHO	buňky ovarií křečka čínského
IEF-PAGE	isoelectric focusing-polyacrylamide gel electrophoresis izoelektrická fokusace na polyakrylamidovém gelu
INN	International nonproprietary name mezinárodní nechráněný název
IOC	International Olympic Comitee, mezinárodní olympijský výbor
IPG	immobilized pH gradient, imobilizovaný akrylamidový gel s pH gradientem
JAK2	Janusova kináza
NIBSC	National Institute for Biological Standard and Control
PRCA	Pure Red Cells Aplasia aplazie červených krvinek
rhEpo	rekombinantní erytropoetin
SAR-PAGE	sarcosyl polyacrylamide gel electrophoresis elektroforéza na polyakrylamidovém gelu se sarkosylem
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným
SH2	Src-homology 2 domain strukturní doména vázající se na fosforylovaný tyrosin
SHP1, SHP2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1 (2) tyrosin fosfatáza
Src	nereceptorická tyrosinkináza
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5 převodník signálu a aktivátor transkripce 5
TPO	trombopoetin
USADA	United States Anti-doping Agency, Americká antidopingová agentura

WADA World Anti-doping Agency, Světová antidopingová agentura

WGA MAIIA wheat germ agglutinin membrane-assisted isoform immunoassay

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1 Primární struktura lidského erythropoetinu.
- Obrázek 2 Terciární struktura lidského erythropoetinu.
- Obrázek 3 Vzhled genu pro transkripci erythropoetinu.
- Obrázek 4 Cyklus produkce erythropoetinu.
- Obrázek 5 Struktura erythropoetinového receptoru.
- Obrázek 6 Druhy aktivace erythropoetinového receptoru.
- Obrázek 7 Schéma interakce erythropoetinu a erythropoetinového receptoru.
- Obrázek 8 Schéma fosforylace, transkripce a následné defosforylace.
- Obrázek 9 Schéma vývoje erytrocytu.
- Obrázek 10 Mechanismus účinku erythropoetinu na erythropoézu.
- Obrázek 11 Bazofilní erytroblast rané vývojové stádium erytrocytů.
- Obrázek 12 Retikulocyt, poslední vývojové stádium erytrocytů.
- Obrázek 13 Rozdělení jednotlivých erythropoetinů při pH 2–6.
- Obrázek 14 Ukázka pozitivního nálezu pomocí IEF metody zakončené imunoblottingem.
- Obrázek 15 Zobrazení (a) negativní kontroly, (b) pozitivní kontroly (Epoetin delta, Dynepo), (c) odebraný vzorek, který se jeví jako pozitivní na Dynepo.
- Obrázek 16 Porovnání pracovních postupů metod IEF-PAGE a SDS/SAR-PAGE.
- Obrázek 17 Kit pro MAIIA analýzu.

## SEZNAM TABULEK

- Tabulka č. 1      Druhy rekombinantního erythropoetinu a jejich farmakologický profil.
- Tabulka č. 2      Krevní doping ve sportu; chronologicky.
- Tabulka č. 3      Přehled rekombinantních erythropoetinů a jejich molekulárních hmotností.

## Úvod

Erytropoetin je glykoproteinový hormon produkován primárně ledvinami, který má hlavní podíl na regulaci tvorby červených krvinek. Tento hormon není zásobní, tudíž je potřeba prvotní signál pro jeho tvorbu, čímž bývá nejčastěji hypoxie, tedy nedostatek kyslíku v těle. Kvůli jeho tvorbě až při určitém signálu se z něj stala doplňková, dokonce dopingová látka, využívaná při sportu, zejména v cyklistice. Cyklisté si tak uměle navodí tvorbu erytrocytů, které následně pojmu více kyslíku, a tak se méně zadýchají a podávají lepší fyzický výkon, zejména v náročném terénu. Užívání této látky při sportu bylo roku 1990 zakázáno.

Mimo jiné se erytropoetin alfa stal jedním z nejvíce užívaných léků, které byly vytvořeny prostřednictvím technologie rekombinantní DNA, ve které je téměř identická forma a látka, které se přirozeně vyskytuje v těle, v tomto případě erytropoetin, vytvořena pomocí replikace lidské DNA v laboratoři. Používá se na léčbu anémie čili nedostatku červených krvinek způsobenou jak hematologickými poruchami, tak i anémie způsobené onemocněním AIDS, či na léčbu pacientů s rakovinou, kteří jsou anemičtí po chemoterapiích, nebo také na léčbu chronického onemocnění ledvin.

# 1. Historie objevování erythropoetinu

Objev erythropoetinu (Epo) se nedá připsat jen jednomu vědci či vědecké skupině v jeden rok, nýbrž trvalo téměř celé století, než bylo možné látku identifikovat, určit chemické i fyziologické vlastnosti a v neposlední řadě ji i extrahovat.

Zpočátku, v první polovině 19. století, si lékaři a vědci začali všimnout jistých změn v tělesných pochodech při anemických stavech či při dlouhodobém pobytu lidí ve vyšších nadmořských výškách, tedy v horských vesničkách. Až roku 1836 byly anglickým lékařem a nefrologem Richardem Brightem popsány první symptomy anémie ve vztahu se selháním ledvin.

Dále roku 1863 francouzský lékař a fyziolog Denis Jourdanet, popsal souvislosti mezi nadprodukcí erytrocytů a lidmi žijícími ve vyšších nadmořských výškách. Studium výškové nemoci a hypoxie se zabýval během svého pobytu v Mexiku, kde pozoroval pacienty, kteří vykazovali známky „horské nemoci“. Jejich symptomy ve vysoké nadmořské výšce byly podobné anémii rovné výšce hladiny moře, včetně rychlého pulsu, závratí a občasných omdlívání. Tyto symptomy byly připisovány nízké hladině kyslíku v krvi, a tak první pojmenování pro tento stav bylo „*anoxyhémie*“ a „*anémie barométrique*“ čímž byl i vyjádřen vztah nadmořské výšky a anémie na v nížinách, prakticky by se dalo říci na úrovni moře. Mimo jiné se Jourdanet zabýval i charakteristikou populace Mexika v různých nadmořských výškách. Ve svých studiích došel i k závěru, že pacienti s plicním onemocněním, zejména s tuberkulózou, vykazují zlepšení průběhu nemoci ve výškách nad 2000 m. n. m., a tak zavedl „*aérothérapie*“, kdy pacienti byli léčeni v komorách s nízkým tlakem, které pomohly k simulaci stejných podmínek jako na horách. Své poznatky publikoval ve dvou knihách: *Influence de la pression de l'air sur la vie de l'homme: climats d'altitude et climats de montagnes* (volně přeloženo: *Vliv tlaku vzduchu na lidský život: výškové podnebí a podnebí hor* (1875) a *L'air raréfié dans ses rapports avec l'homme sain et avec l'homme malade* (volně přeloženo: *Řídký vzduch ve vztahu ke zdravému a nemocnému jedinci*). [5]

Mezi další pozorovatele změn erythropoézy ve vysokých nadmořských výškách patří Francois – Gilbert Viault, který v roce 1890 při dvoutýdenním putování v Peru, z nížiny na úrovni moře, do hor Morococha (4200 m. n. m.), zaznamenal u sebe samotného zvýšení počtu erytrocytů z  $5 \cdot 10^6$  na  $7,1 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ . Hodnoty dalších pěti účastníků putování se dokonce pohybovaly od  $7,1 \cdot 10^6$  až do  $8 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ . Toto jednoduché pozorování tak bylo další názornou

ukázkou masivního nárustu erytrocytů, tedy zvýšení erythropoézy, u člověka, který se krátkou dobu pohyboval ve vysokých nadmořských výškách a trpěl hypoxií. Během přechodu do dalšího tisíciletí se mechanismus, který je základem tohoto jevu, stal předmětem vášnivých debat. [5,6]

Poprvé se tento jev pokusil vysvětlit švýcarský lékař a přírodovědec Friedrich Miescher, který je známý hlavně pro objev DNA. Domníval se, že pokles napětí kyslíku v kostní dřeni poskytoval přímý stimul buňkám tvořícím erytrocyty. O půl století později byla tato teorie vyvrácena pečlivě provedenými měřeními saturace kyslíkem ve vzorcích kostní dřene pacientů s erytrocytózou, jak primární, tak sekundární. Tato měření provedli nezávisle na sobě Berk (1948) a Friedrich Stohlman (1954). [6]

Do roku 1906 se pouze debatovalo o neznámé látce, která způsobuje nárůst červených krvinek v těle, ale nebylo specifikováno, o jakou látku se jedná. To vše ale změnili francouzští lékaři Paul Carnot a Clotilde-Camille DeFlandre kteří ze svých pozorování indikovali, že se jedná právě o humorální faktor, který spojuje anemickou hypoxii a následnou zvýšenou produkci erytrocytů. Erythropoetin tak dostal v jejich práci *Sur l'activité hemopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang* (volně přeloženo: O hemopoetické/krvetvorné aktivitě séra během regenerace krve) název hemopoetin. Jejich pokus se skládal z pozorování navýšení počtu erytrocytů v krvi zdravých králíků po podání séra získaného z krve králíků s anemií. Bohužel všechny následné pokusy o reprodukci experimentu byly neúspěšné, a tak jiní vědci začali pochybovat o jejich teorii. [6,7,8]

Roku 1938 publikoval vědec Yu-Tin Tei článek, ve kterém byly popsány zejména chemické vlastnosti erythropoetinu. Dle jeho zjištění se jednalo o krvetvornou substanci nacházející se v séru anemických zvířat, která je rozpustná v alkoholu, etheru, chloroformu a acetonu a tepelně stabilní ve 100 °C po dobu 30 minut. Tyto vlastnosti byly zjištěny zkoumáním periferní krve zvířat, kterým bylo anemické sérum podáno. [9,10]

Výzkum Carnota, DeFlandra a Yu-Tin Teie modifikoval vědec Newton Krumdieck ve své práci *Erythropoetic Substance in the Serum of Anemic Animals* z roku 1943. Nezabýval se ale studiem periferní krve, nýbrž kostní dřene, kde dochází k tvorbě erytrocytů. Kromě erytrocytů počítal i retikulocyty, což jsou prvotní vývojové buňky erytrocytů. Právě jejich počet se během 5 dnů zvýšil až o 7 %. Experiment opět probíhal vpíchnutím séra anemických králíků zdravým jedincům. [10,11]



Za další důležitou práci se dá považovat výzkum Kurta R. Riesmanna a Gerharda Ruhenstroth-Bauera, která byla publikována roku 1950. Riesmann se ve svém výzkumu snažil potvrdit již dříve zjištěné poznatky a to, že erytropoéza souvisí i s nízkou hladinou kyslíku v krvi. Jeho výzkum probíhal na parabiotických<sup>1</sup> párech krys, které měly propojené cévní kapiláry, a byly 5 týdnů umístěny ve speciálních dýchacích komorách, kde jeden jedinec vdechoval směs vzduchu se sníženým objemem kyslíku, zatímco druhý měl k dispozici normální vzduch. Díky propojení tak cirkulovala krev z jednoho zvířete do druhého. Oběma jedincům byla po terapii diagnostikována retikulocytóza, zvýšená hladina hemoglobinu a normoblastická hyperplazie v kostní dřeni, tj. nové nezralé erytrocyty (normoblasty) byly větší než obvykle. Tento výsledek dovedl Riesmanna k závěru, že hypoxie podněcuje krvetvorbu, čímž byly potvrzeny dřívější domněnky i studie. [10, 11]

Jak již bylo výše zmíněno, práce Carnota a DeFlandra nepřišla vědecké společnosti důvěryhodná, ale právě vědci Krumdieck, Riesmann a Allan Erslev, přispěli k potvrzení jejich teorie. Allan Erslev roku 1953 publikoval práci, ve které ještě více podpořil pokus provedený již zmíněnými vědci. V replikaci jejich pokusu použil větší objem plazmy anemických králíků (50 ml), čímž byl nárůst retikulocytů v kostní dřeni prokazatelnější. Dosud byly používány objemy v rozsahu 0,5–10 ml. Dnes se uvádí, že Erslev předpověděl potenciální lékařskou hodnotu, pokud by byl faktor, jenž ovlivňuje erytropoézu, extrahován. [6, 11, 12]

Často přehlíženou prací je výzkum finské University of Helsinky z roku 1948 pod vedením lékařek Evy Bonsdorff a Eevy Jalavisto. Tyto ženy předběhly dobu svými výzkumy, při nichž si zkombinovali vystavení pozorovaných králíků nízkému tlaku, tudíž vyvolání hypoxie a následnou aplikaci plazmy těchto králíků zdravým jedincům tohoto druhu. Jak lze již předpokládat, byl pozorován nárůst erytrocytů. Ve své práci *A humoral Mechanism in Anoxic Erythrocytosis* (volně přeloženo: Humorální mechanismus u anoxické erytrocytózy) diskutovaly o látkách „erythropoetinech“, které způsobují erytropoézu, později se jim také podařilo aktivní substanci poprvé izolovat. [6, 7, 14]

V roce 1957 vědecký tým L. O. Jacobsona byl poprvé schopen identifikovat místo tvorby erythropoetinu. Výzkum probíhal poněkud morbidním, ale bohužel nutným způsobem. Pokusným krysám byly vyndávány orgány, aby se zjistilo, který orgán je schopen produkce látky, která by podpořila tvorbu nových krvinek, je-li u zvířete vyvolané krvácení či injekčně

---

<sup>1</sup> Parabióza – spojení dvou živých organismů tak, aby tvořili jeden fyziologický systém.

vpraven chlorid kobaltitý ( $\text{CoCl}_3$ )<sup>2</sup>. Závěrem výzkumu bylo, že erythropoetin je produkován v ledvinách a jeho produkce je závislá na hladině kyslíku v krvi. [15, 16]

O pár let později roku 1964 byla produkce erythropoetinu zkoumána i na člověku, a to týmem pod vedením Davida G. Nathana. Výzkum probíhal na 6 pacientech, kteří byli před nebo po transplantaci ledvin, nebo byli na dlouhodobé hemodialýze. Někteří pacienti, i přesto, že byli po nějakou dobu bez ledviny, vykazovali známky erythropoézy. Z toho vyplývá, že tvorba erythropoetinu neprobíhá pouze v ledvinách. [17]

Po několika mnoholetých pokusech bylo možné roku 1977 konstatovat, že byl poprvé purifikován erythropoetin. Takaji Miyake a kol. jej extrahovali z moči pacientů (cca 2550 litrů), kteří trpěli aplastickou anémií. Celý proces se skládal ze sedmi kroků, a to například z iontově-výměnné chromatografie, precipitace alkoholem, gelové filtrace, adsorpční chromatografie a elektroforézy při dvou různých hodnotách pH. Tento postup vedl k získání produktu s obsahem 70 400 jednotek bílkovin/mg ve 21 % výtěžku. Čistý hormon vykazoval elektroforetickou aktivitu v polyakrylamidovém gelu při pH 9, v přítomnosti dodecyl síranu sodného ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ) při pH 7 a v přítomnosti Tritonu X-100<sup>3</sup> při pH 6. Co ovšem zůstalo nevysvětlené, byl výkaz různé mobility dvou frakcí o stejném potenciálu a velikosti molekuly při elektroforéze s pH 9. Rozdíl v molekulách taktéž nebyl nalezen. [18, 19]

V roce 1985 se dvěma vědeckým skupinám nezávisle na sobě povedlo izolovat a naklonovat lidský erythropoetin. Oba týmy měli své práce založené na izolaci aminokyselin erythropoetinu a jejich následné reprodukci. Kolektiv Kennetha Jacobse izoloval a analyzoval erythropoetin z moče pacientů trpících aplastickou anémií. Po podrobné analýze za pomoci reakce s trypsinem, chromatografie v systému s obrácenými fázemi a mikrosequenční analýzy, bylo zjištěno pořadí aminokyselin v molekule. Na základě aminokyselinových sekvencí vytvořil oligonukleotidy, díky nimž správně analyzoval mRNA z jater dospělého člověka. Oligonukleotidy sloužily k zachycení sekvencí mRNA kódujících erythropoetin. Z takto získaných sekvencí bylo možné získat celou sekvenci komplementární DNA erythropoetinu. Ověření funkčnosti takto naklonované DNA bylo prokázáno na COS<sup>4</sup> buňkách, kde po inserci sekvence proběhla syntéza erythropoetinu. [19]

---

<sup>2</sup> Kobalt vyvolává erythropoézu.

<sup>3</sup> Povrchově aktivní látka, nejčastěji používaný detergent.

<sup>4</sup> COS buňky-buňky z tkáně ledvin opice.

Kolektiv Fu-Kuen Lina provedl podobný postup s obměnou, že izoloval a klonoval aminokyselinové sekvence různých bakteriofágů z lidské genomické knihovny. Pro kontrolu správnosti klonování proběhla inserce genomu erythropoetinu do vaječnickových buněk křečka čínského. Správnost byla potvrzena produkcí erythropoetinu. [20]

Během dalších let se rozvíjelo studium erythropoetinu jakožto léčiva na anemii a chronické selhání ledvin. V roce 1989 byl FDA<sup>5</sup> schválen rekombinantní lidský erythropoetin jako lék na renální anemii. Bohužel s rozvojem léčiv a rozšíření znalostí o efektech erythropoetinu se jeho účinků začalo zneužívat, hlavně mezi sportovci.

---

<sup>5</sup> Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv.

## 2. Erythropoetin z biologického a chemického hlediska

### 2.1. Struktura erythropoetinu

Erythropoetin je esenciální glykoproteinový hormon, který je jedním z hlavních faktorů regulace erythropoézy, podporuje přežití, proliferaci a diferenciaci mladých erythroidů v kostní dřeni. Vyskytuje se ve více izoformách; sérový a močový erythropoetin nebo erythropoetiny odebrané z organismu za různých fyziologických podmínek. Patří do rodiny cytokinů.

Erythropoetin, s atomovou hmotností 34 kDa, je složen ze 166 aminokyselin poskládaných do 4 helikálních řetězců ( $\alpha$ - $\delta$  nebo A–D) se dvěma disulfidickými vazbami. (Obrázek 1 a 2) První z těchto disulfidických vazeb se vyskytuje mezi aminokyselinami cysteinem 7 a 161, čímž spojuje N- a karboxylový konec molekuly, a vytváří tak dlouhou smyčku. Druhá se nachází mezi cysteinem 29 a 33. Jeho hmotnost 34 kDa je dána z 40 % uhlovodíky (sacharidy), které jsou potřeba pro erythropoézu *in vivo*, tedy v živém organismu, zatímco větší část, 60% molekuly, tvoří peptidy, které nahrazují receptory pro uměle vyvolanou erythropoézu *in vitro*. Lidský erythropoetin má ve své molekule 4 glykosylované oblasti, tři jsou N-vazebné, jedna je O-vazebná. N-vazebné oligosacharidy jsou navázané na aminokyselinu asparagin v polohách 24, 38, a 83 a jsou důležité ve stabilizaci erythropoetinu v oběhu krve. O-vazebný oligosacharid na Serin-126 je zcela bezvýznamný. [7,13, 21, 22, 30]

Oligosacharidové struktury erythropoetinu obsahují 3 fruktózy, 10 manóz, 13 galaktóz, 16 N-acetylglukóz a 13 kyselin sialových, které jsou navázané buď na dusík asparaginu nebo na kyslík serinu. O-vazebný sacharid je tvořen převážně disialylovým<sup>6</sup> řetězcem. N-vazebné řetězce jsou z většiny tetraantenární<sup>7</sup> (80%), menšinu tvoří tri- nebo i biantenární. Všechny tyto sacharidy mají na konci kyselinu sialovou. Stavba sacharidových řetězců se liší na každém vazebném místě. Na pozici aminokyseliny Asparagin-38 nalezneme velké množství kyseliny sialové. V poloze Asparagin-24 nalezneme spíše biantenární strukturu oproti poloze Asparagin-38, kde je mimo jiné i více kyseliny sialové. Oproti tomu řetězce na pozici Asparagin-83 jsou tetraantenární bez polylaktosamylových repetící. [22]

Sacharidy jsou důležité pro biologickou aktivitu hormonu *in vivo*, zajišťují totiž bezpečný vstup erythropoetinu do cílové struktury. Úplná deglykosylace ale ruší jeho

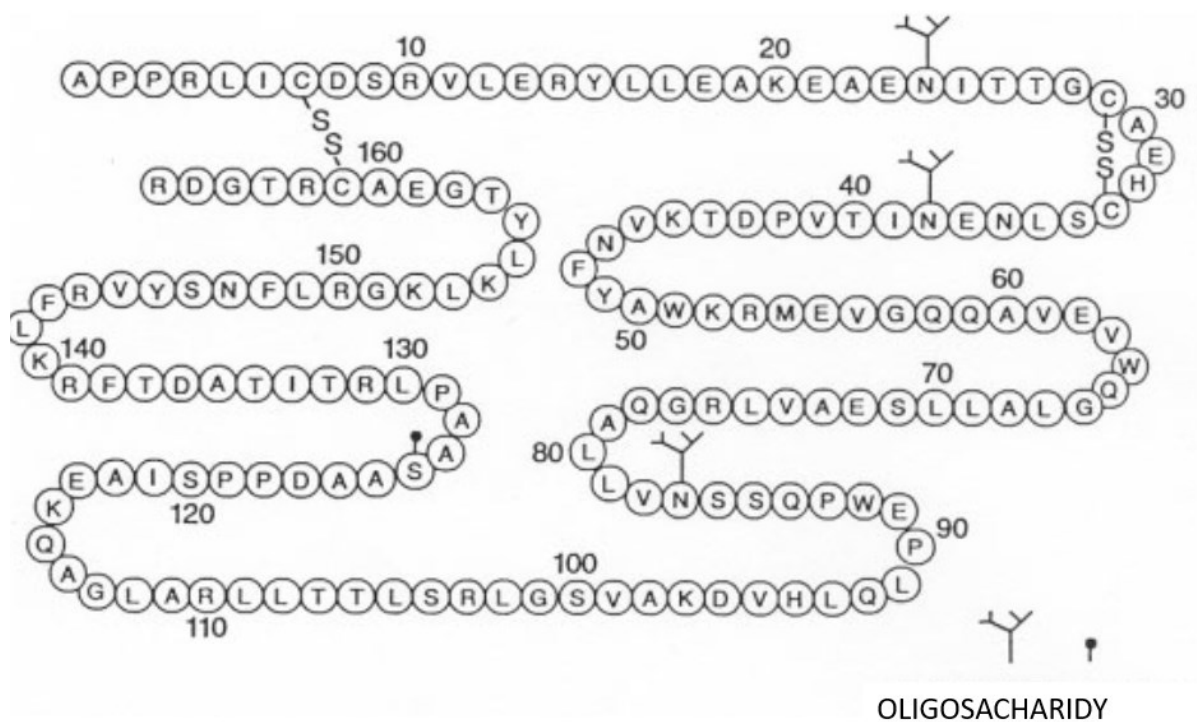
---

<sup>6</sup> Derivát od kyseliny sialové.

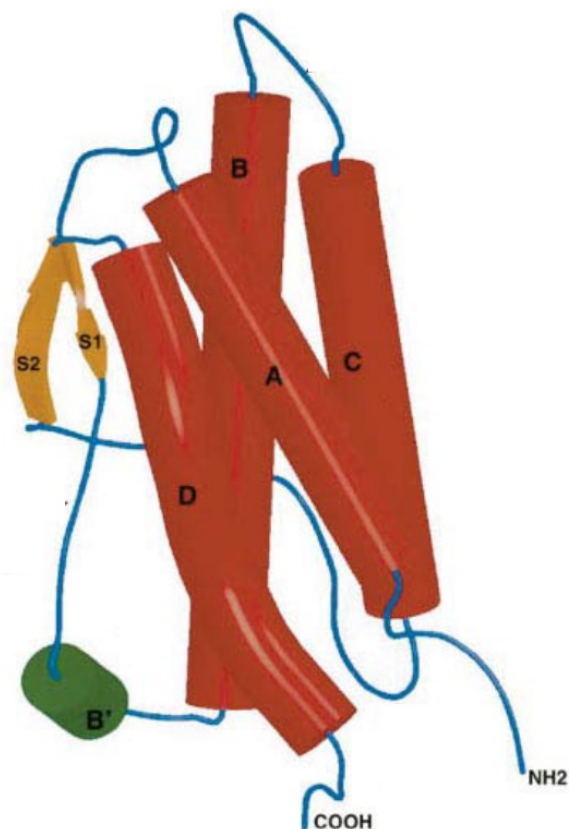
<sup>7</sup> Popis uhlovodíku, který má na neredukujícím konci 4 (3, 2..) nevětvené oligosacharidové řetězce, často zakončeny sialovou kyselinou. [44]

biologickou aktivitu *in vivo* a odstraněním koncových sialových kyselin se hormon inaktivuje, protože dochází ke zkrácení jeho biologické aktivity z 6 hodin na pár minut. Odstraněním sialových kyselin dojde k odhalení galaktózových zbytků, které se navážou na asialo-glykoproteinové receptory a dojde k přečištění z krevního oběhu. Všechny tyto reakce probíhají v játrech. Jak a kde jsou tyto modifikované molekuly a plně deglykosylované molekuly erythropoetinu odstraněny z oběhu zatím není známo. [22, 23]

Pokud by ale byla řeč o erythropoéze *in vitro*, jsou sacharidy zcela postradatelné, nemají žádný vztah k vazbě erythropoetinu na receptor nebo k následné buněčné signalizaci, mohou tyto dva kroky i inhibovat. Odstranění koncových sialových kyselin dokonce dvojnásobně zvyšuje biologickou aktivitu a afinitu k receptorům, úplným odstraněním oligosacharidů dojde i ke zvýšení termální stability. [16, 23]



Obrázek 1: Primární struktura lidského erythropoetinu. Jsou zde zobrazeny i 2 disulfidické vazby mezi cysteiny Cystein-7 a Cystein-161, dále pak Cystein-29 a Cystein-33. Převzato z [16].



Obrázek 2: Terciární struktura erythropoetinu složená ze 4 helikálních řetězců. Převzato z [16].

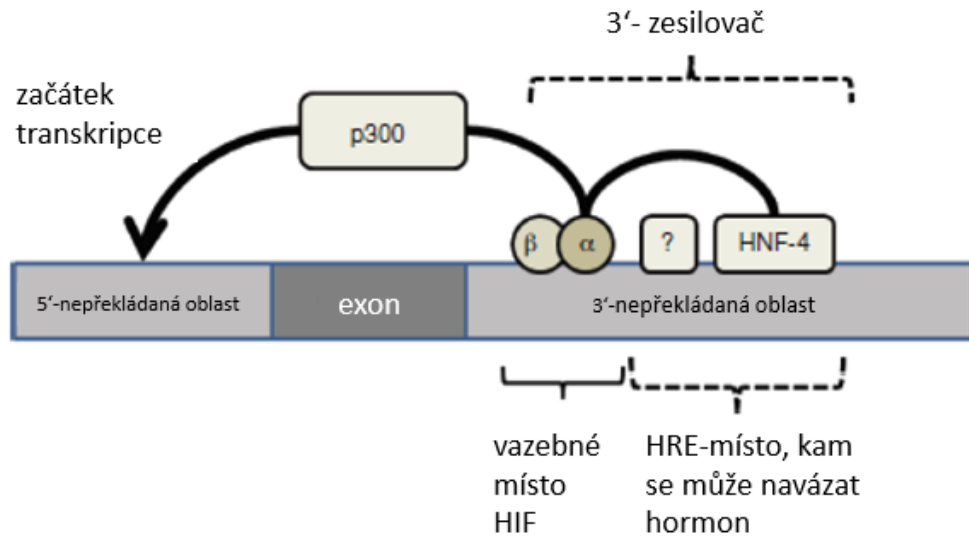
## 2.2. Epo z genetického hlediska

Jak již bylo zmíněno nukleotidová sekvence erythropoetinu byla objevena roku 1985 vědcem Jacobsem a jeho týmem, který demonstroval produkci erythropoetinu po vložení genomu do opičích ledvinových buněk. Nezávisle na něm i vědec Lin a jeho kolektiv taktéž provedli úspěšnou izolaci a naklonování sekvence nukleotidů, kterou následně ověřili na vaječnickových buňkách křečků čínských.

Kód pro lidský genom erythropoetinu je lokalizován na chromozomu 7, uprostřed dlouhého raménka v oblasti q11–q22 → 7q22. Kód nám udává pořadí 193 aminokyselin v řetězci. Je složen z pěti exonů a čtyř intronů. První intron obsahuje mezidruhové homologie, je tedy stejný u více druhů, zatímco druhý, třetí a čtvrtý intron se mezi druhy liší. Liší se někdy i lokalizace genu, například u myši je gen lokalizován na 5. chromozomu.

Gen erythropoetinu obsahuje více transkripčních začátků. Co se týče vyvolání syntézy erythropoetinu v lidské tkáni, tak bylo zjištěno, že je potřeba různých částí erythropoetinového genu pro syntézu v játrech a ledvinách. Zesilovací oblast genu (enhancer) hraje hlavní roli

v regulaci tvorby erythropoetinu během hypoxie. Oblast 3' zajišťuje vazbu HIF (hypoxia-inducible factor, transkripční faktor indukovaný hypoxií), který se usadí blíže 5' konci, dále vazbu HNF 4 (hepatocyte nuclear factor, jaterní jaderný faktor). Syntéza v játrech je vyvolaná v oblasti 3' a renální exprese erythropoetinu opět v sekci 5'. (Obrázek č. 3) Promotor erythropoetinu je inhibován GATA-2 a nukleárním faktorem, které snižují expresi erythropoetinu při zánětlivých onemocněních. [11, 22]

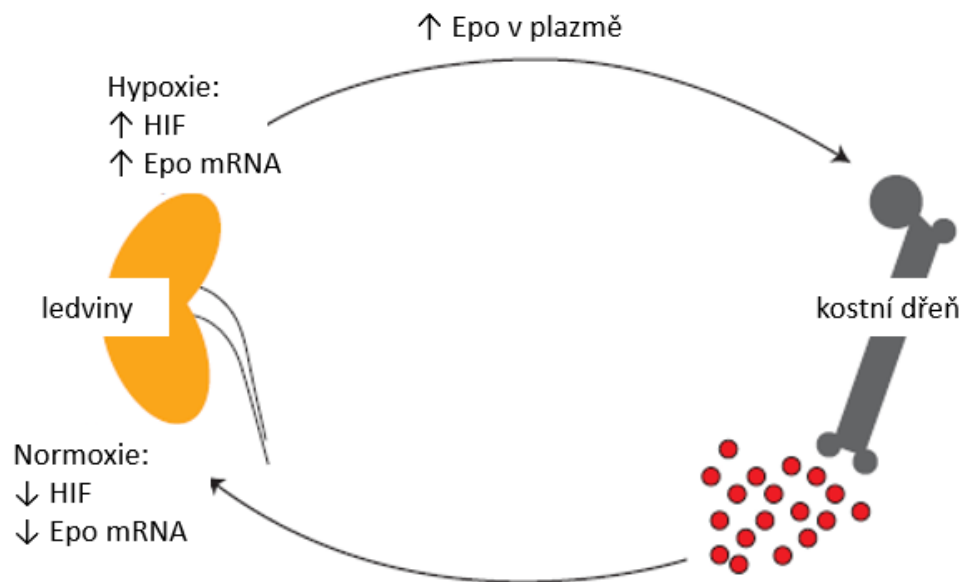


Obrázek. 3: Vzhled genu pro transkripci erythropoetinu. Převzato a přeloženo z [22].

### 2.3. Produkce erythropoetinu

Jako hlavní orgán produkující erythropoetin u dospělých lidí bývají označovány ledviny, konkrétně peritubulární fibroblasty v dřeni ledvin. Mezi další orgány produkující erythropoetinovou mRNA, již ale v menší míře, patří játra, slezina, kostní dřeň, plíce, varlata, enterocyty, prsní žlázy, mozek (astrocyty a neurony). V prenatálním věku a u plodu jsou hlavním místem produkce erythropoetinu hepatocyty v játrech, to pak malé míře (10–20 %) zůstává i v dospělosti. Koncentrace produkce erythropoetinu se exponenciálně zvyšuje s klesající hodnotou hemoglobinu. Dalším faktorem pro signál vyvolávající syntézu erythropoetinu je parciální tlak kyslíku ( $pO_2$ ) v tkáních, který je závislý na parciálním tlaku kyslíku v tepnách, koncentraci hemoglobinu (Hb) a afinitě vazby Hb- $O_2$ , tedy schopnosti vazby těchto dvou molekul. [16, 24, 30]

Erythropoetin není zásobním hormonem, tudíž jeho syntéza musí být rychlá. Dojde-li v těle k poklesu kyslíku v krvi, proběhne rychlá syntéza na úrovni mRNA. Syntéza probíhá ve velkém množství, takže v plazmatické koncentraci lze pozorovat „píky“ rychlého nárůstu koncentrace erythropoetinu. Hypoxie způsobuje produkci transkripčního faktoru pro erythropoetin, tzv. HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). HIF-1 proniká do jádra ledvinové buňky a váže se na specifickou sekvenci označovanou jako HRE (hypoxia-responsive element) a spustit tak transkripci genů pro erythropoetin. Exprese erythropoetinu může být také stimulována GATA antagonisty, které zabraňují GATA-2 inhibici erythropoetinového promotoru. [24, 31, 32]



Obrázek. 4: Cyklus produkce erythropoetinu. Znárodnuje vliv hladiny kyslíku na produkci jednotlivých faktorů. Převzato a přeloženo z [22].

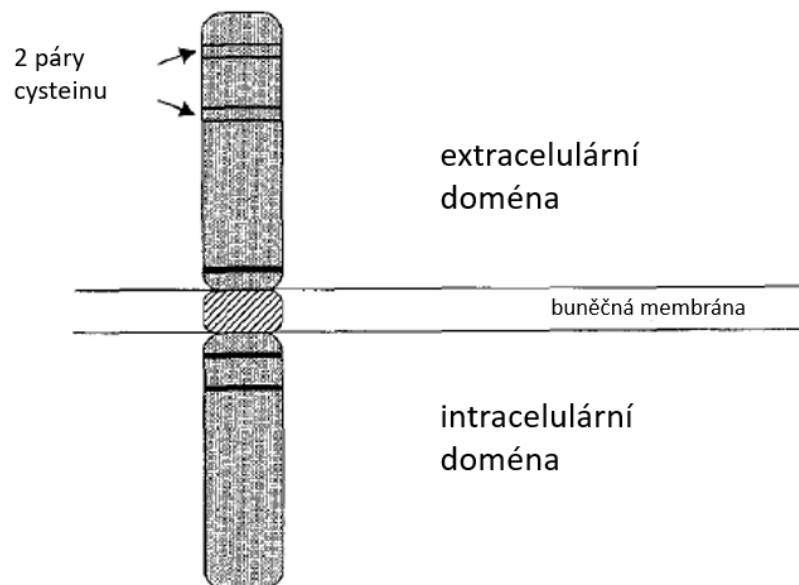
## 2.4. Erythropoetinový receptor Epo-R

K plnění funkcí erythropoetinu a aby mohlo docházet k iniciaci tvorby nových červených krvinek v kostní dřeni, je nutné, aby se molekula navázala na svůj receptor, Epo-R. Ačkoliv je erythropoetin jedním z faktorů, který napomáhá tvorbě erytrocytů, slouží také i k prevenci apoptózy buněk. Erythropoetinový receptor je produkován buňkami vývojové linie erytrocytů mezi stádiem CFU-E (cell forming unit-erythroid) buněk a proerytroblasty. Retikulocyty a dospělé erytrocyty již Epo-R nemají. Dalším místem, kde se mohou erythropoetinové receptory nacházet jsou endotel, ledviny, kostní svaly, srdce, mozek a buňky sítnice. [25, 26]



### 2.4.1. Struktura receptoru

Epo-R je membránový protein o hmotnosti 66 kDa, který je tvořen 507 aminokyselinami. Ve své molekule obsahuje prolaktin, faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF nebo také CSF3), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF nebo také CSF2), trombopoetin, leptin a některé interleukiny (IL-2-7, IL-9, 11, 12, 15). Jedná se o transmembránový receptor, nacházející se na povrchu membrány nezralých erytrocytů. Intracelulární a extracelulární části se od sebe liší svými vlastnostmi. Extracelulární část má na starost vazbu erythropoetinu na receptor, intracelulární zajišťuje rozvod signálu dále do buňky. (Obrázek 5). [25, 26]



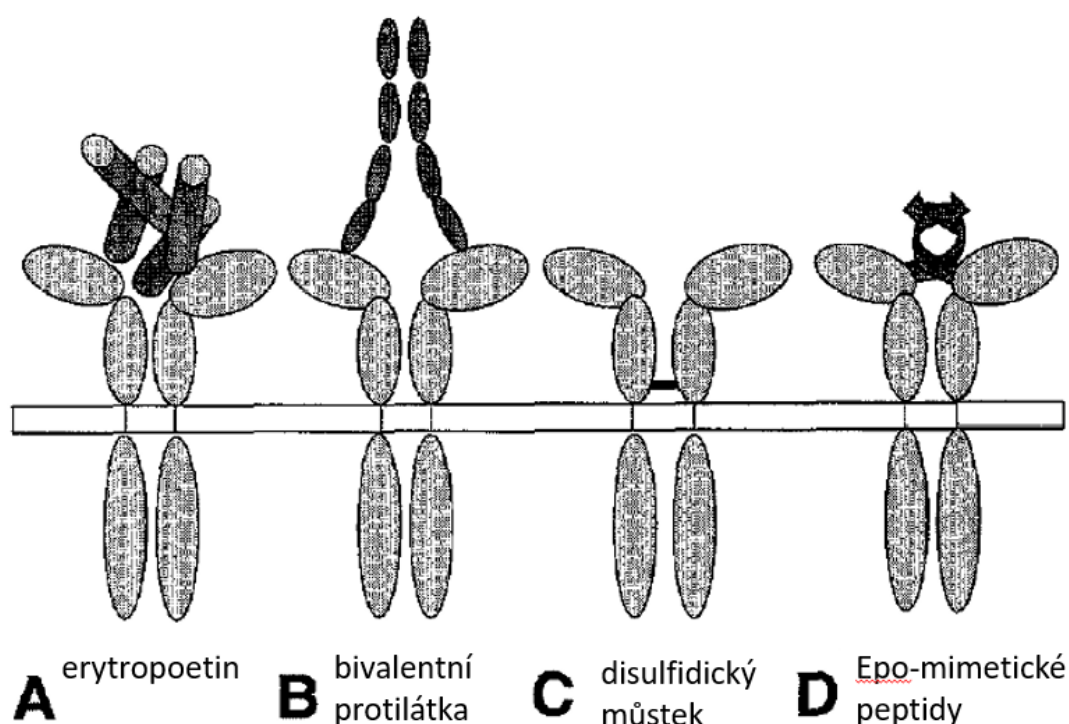
Obrázek 5: Struktura erythropoetinového receptoru. Převzato a přeloženo z [25].

## 2.5. Epo a Epo-R

### 2.5.1. Aktivace receptoru

Aktivace receptoru může proběhnout čtyřmi různými způsoby (Obrázek 6). Navázáním molekuly erythropoetinu na receptor, vazbou bivalentních protilátek, vznikem disulfidického můstku nebo vazbou receptoru s Epo-mimetickým peptidem. Příkladem bivalentní protilátky je IgG (imunoglobulin typu G, monovalentní protilátka). Disulfidický můstek může vznik díky

mutaci jedné z aminokyselin Epo-R. Epo-mimetický peptid obsahuje 20 aminokyselin a nemá žádnou sekvenční korelaci s erythropoetinem, a přesto je schopen vazby s receptorem. [25, 30]



Obrázek 6: Druhy aktivace erythropoetinového receptoru. Převzato a přeloženo z [25].

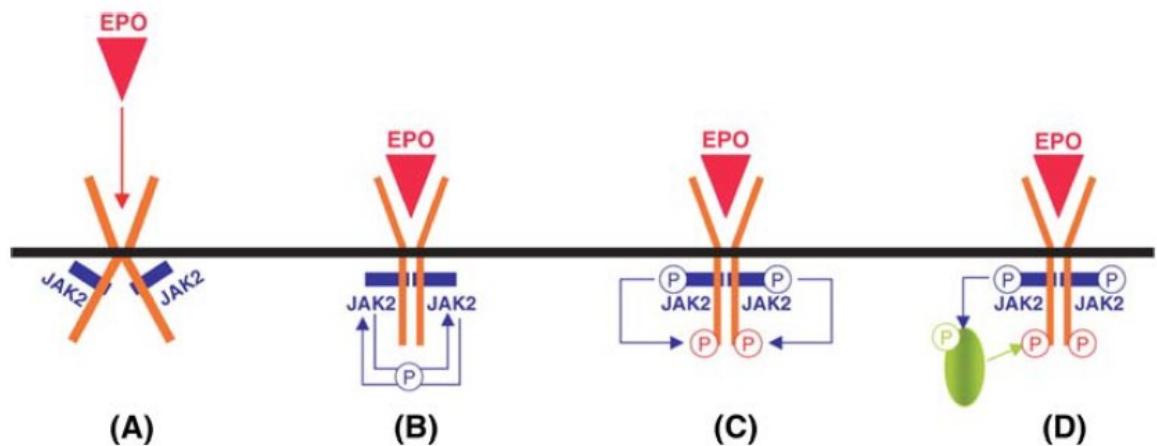
### 2.5.2. Přenos signálu

Po vazbě s erythropoetinem dochází ke konformačním změnám na receptoru a intracelulárně uložených JAK2 molekulách (Janusovy protein kinázy). Receptor je dimerizován, kinázy jsou k sobě přiblíženy a je tak umožněna transfosforylace následovaná aktivací kináz. Aktivované JAK2 molekuly fosforylují tyrozinové zbytky a jiné proteiny na receptoru, vše ale probíhá intracelulárně. Fosforylované tyroziny pak fungují jako vazebný partner pro různé intracelulární proteiny obsahující SH2<sup>8</sup> doménu (Src-homology 2; src = tyrozinokináza). Příkladem jsou SHP1, SHP2<sup>9</sup>, fosfatidylinozitol-3-kináza a jeden z přenašečů signálu a aktivátor transkripce – STAT5. STAT5 po fosforylaci mění svou molekulu do podoby dimeru, který putuje do jádra buňky. V jádru se naváže na specifické

<sup>8</sup> Strukturální doména, která se váže na fosforylovaný tyrozin.

<sup>9</sup> Tyrozinové fosfatázy.

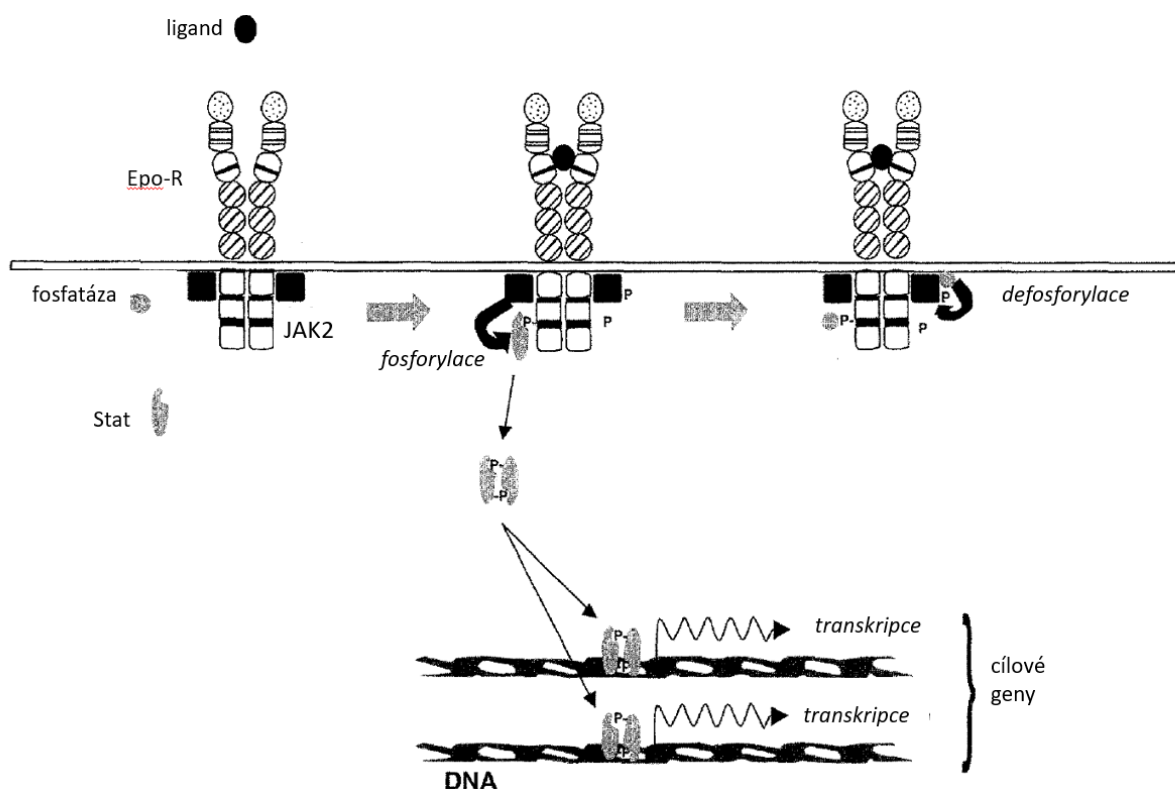
regulační sekvence a aktivují transkripci určité sekvence genů, které mají „za úkol“ zahájit diferenciaci erythroidů. [25, 26, 27]



Obrázek 7: Schéma interakce erythropoetinu a erythropoetinového receptoru. A-konformační změny, B-transfosforylace JAK2 molekul, C-fosforylace tyrozinových zbytků, D-znázornění vazby a fosforylace signálních molekul. Převzato z [26].

### 2.5.3. Terminace signálu

Tak jako fosforylace aktivuje přenos vzruchu v receptoru, tak defosforylace ukončuje přenos signálu v buňce. Fosfatáza označovaná jako hematopoetická buněčná fosfatáza (HCP-hematopoietic cell phosphatase) působí jako negativní regulátor, inhibitor. HCP je aktivována vazbou na fosfotyrosin 429 na Epo-R. Po aktivaci defosforyluje JAK2. Defosforylace JAK 2 inaktivuje kinázu tím, že zpomaluje signalizační kaskádu. Vše je znázorněno na Obrázku 8. [26]



Obrázek 8: Schéma fosforylace, transkripce a následné defosforylace. Převzato a přeloženo z [25].

## 2.6. Erytropoéza

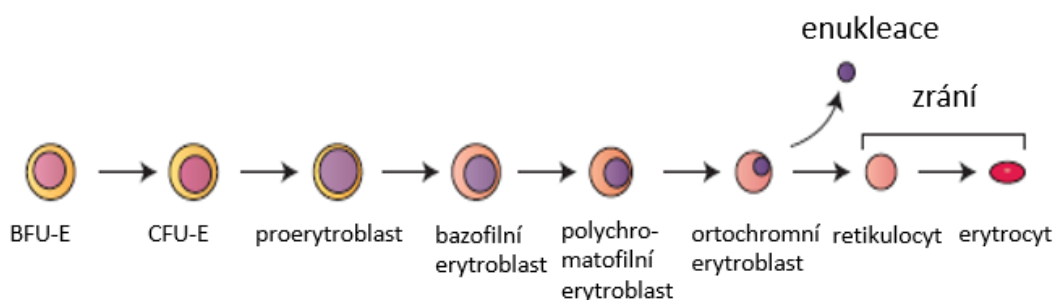
Je obecně známo, že erytropoéza neboli vznik červených krvinek jsou řízeny humorálně, hormonem erythropoetinem a faktorem ESF (erythropoiesis stimulating factor). Dalšími důležitými faktory jsou interleukiny (IL-3) a cytokiny (trombopoetin TPO, cytokin GM-CSF a stem cell faktor). Zvýšená produkce erythropoetinu může zvýšit uvolňování nezralých červených krvinek, retikulocytů, do oběhu, a tak po nějakém čase dochází ke zvýšení tvorby červených krvinek, vlivem dozrávání retikulocytů. [28]

Erytropoéza probíhá v kostní dřeni z kmenových buněk. Postupuje z nezralých krevních buněk BFU-E (burst forming unit-erythropoiesis), přes unipotentní<sup>10</sup> kmenové buňky CFU-E (cell forming unit-erythroid) buňky, až k diferencovatelným proerytoblastům. Další vývoj je následující: bazofilní, polychromatofilní a oxyfilní erytoblasty, bezjaderné retikulocyty.

<sup>10</sup> Buňky, které umožňují vznik jednoho buněčného typu.

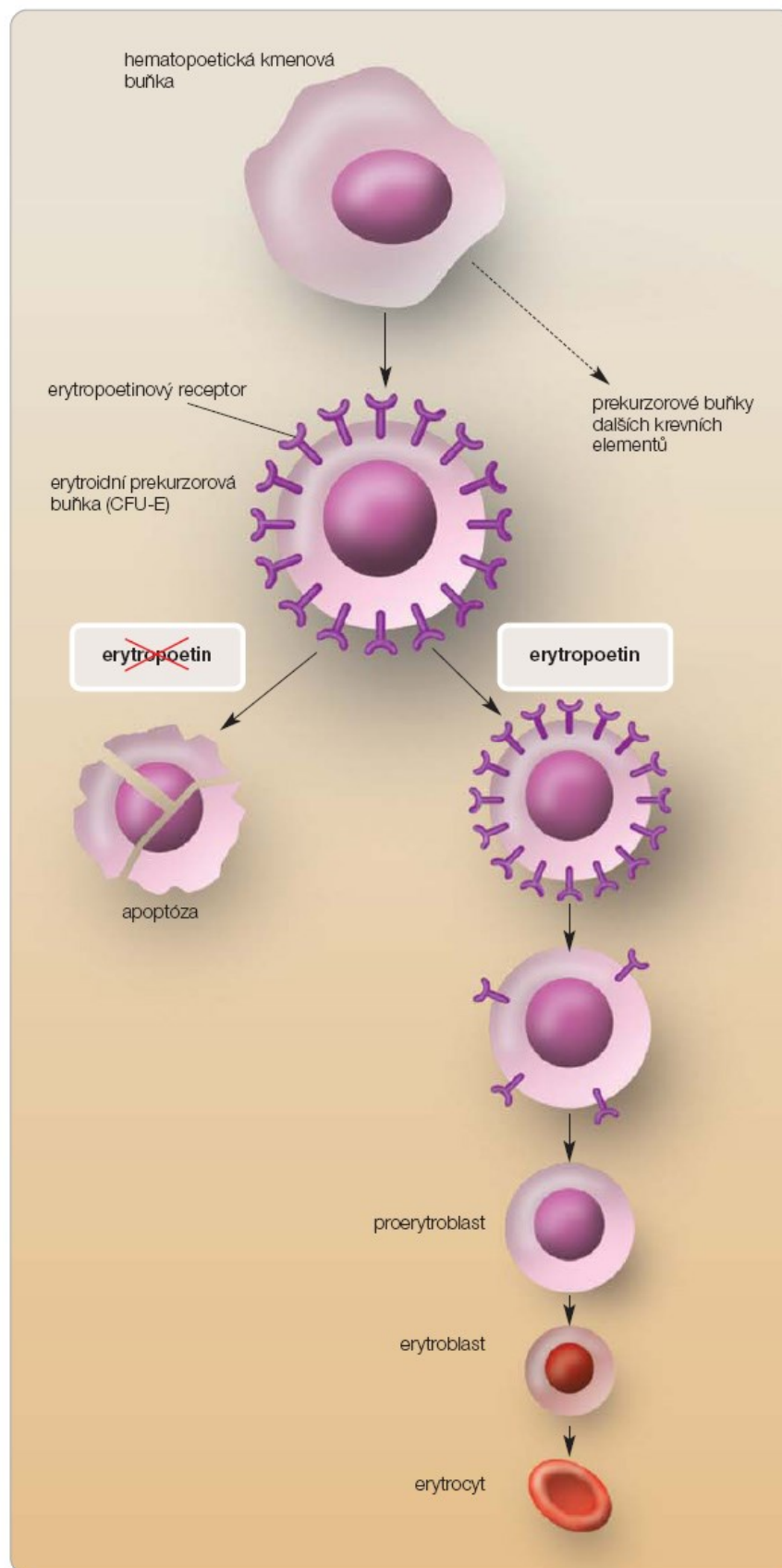
Bezjaderné retikulocyty jsou z kostní dřeně uvolňovány do oběhu, kde následně dojde k jejich dozrávání. Výskyt jaderných retikulocytů v krvi je označován jako patologický. [33]

Vývoj červených krvinek je v tomto pořadí a morfologii (Obrázek 9). BFU-E buňky jsou nezralé blasty s možným výskytem pseudopodických výběžků, které se postupně diferencují v CFU-E blasty. CFU-E buňky jsou buňky, jejichž proliferace je plně závislá na erythropoetinu a na jejich povrchu je obsaženo nejvíce erythropoetinových receptorů z celé vývojové linie erytrocytů. Následuje proerytroblast, což je buňka, která již je viditelná ve světelném mikroskopu. Lze zde pozorovat syntézu hemoglobinu, ribozomy a počáteční strukturu Golgiho komplexu. Z proerytroblastu probíhá diferenciace na bazofilní erytroblast. Bazofilní erytroblast je menší než proerytroblast a již u něj dochází k pyknotizaci jader (svraštění jádra bez poškození ostatních organel). Barva je bazofilní (sytě modrá), přecházející v polychromatofilní (šedá). Polychromatofilní erytroblast je poslední vývojové stádium, které je schopno buněčného dělení. Jádro je kondenzováno a zbarvení cytoplazmy je šedé. Ortochromní (oxyfilní) erytroblasty se již nedělí a v jejich jádře neprobíhá syntéza DNA. Extruzí<sup>11</sup> jádra se mění v retikulocyty. Tento jev se nazývá enukleace. Retikulocyty jsou buňky větší než erytrocyty a mají nepravidelný tvar (Obrázek 12). Prochází z kostní dřeně do oběhu díky jejich schopnosti pohybu. Přechod probíhá přes endoteliární póry dřeňových sinusoid. V krevním náteru jsou velmi dobře rozlišitelné barvením kresolovou modří. Poslední stádium vývoje jsou normocyty (erytrocyty). Jsou to tvarem bikonkávní, již bezjaderné buňky. Velikostně jsou menší než ostatní vývojová stádia. Normocyty jsou schopné přenášet kyslík do tkání, ve větší míře než oxyfilní erytroblasty. [33]

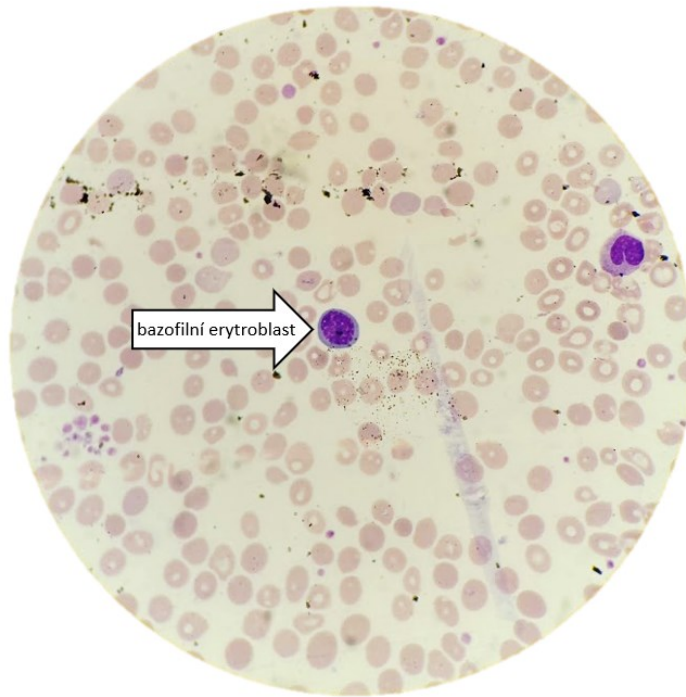


Obrázek 9: Schéma vývoje erytrocytu. Převzato a volně přeloženo z [22].

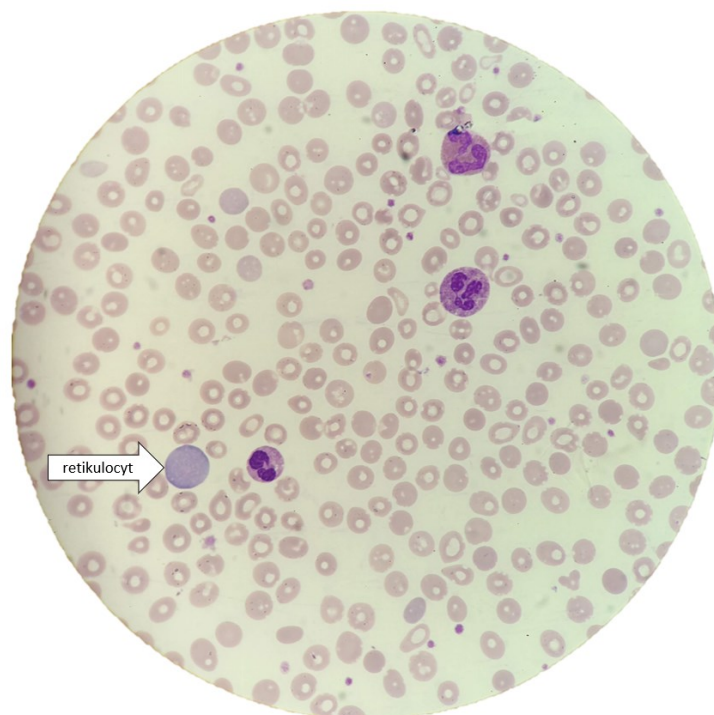
<sup>11</sup> „Vytlačení“ jádra z buňky za pomoci aktinových filament.



Obrázek 10: Mechanismus účinku erythropoetinu na erythropoézu. Převzato z [43]



Obrázek 11: Bazofilní erytroblast rané vývojové stádium erytrocytů. Lze pozorovat velké jádro a bazicky zabarvenou cytoplazmu. Barveno roztoky May-Grünwald a Giemsa-Romanowsky, zvětšení 1000x. Autorská tvorba.



Obrázek 12: Retikulocyt, poslední vývojové stádium erytrocytů. V buňce není žádné jádro, cytoplazma zabarvená do modrošeda, mírně bazicky. Barveno roztoky May-Grünwald a Giemsa-Romanowsky, zvětšení 1000x. Autorská tvorba.

### 3. Erythropoetin jako léčivo

Úspěšné klonování a exprese lidského genomu erythropoetinu v 80. letech postavilo základní stavební kámen pro využití erythropoetinu ve farmaceutickém průmyslu. Dostupnost rekombinantního erythropoetinu (rhEpo) umožnila nové terapeutické možnosti v léčbě mnoha nemocí. K léčbě se užívají izoformy rekombinantního erythropoetinu; erythropoetin alfa, erythropoetin beta, darbepoetin a další. [11, 16]

Erythropoetin se dá využít k léčbě různých druhů anémie, a to například v důsledku: chronického selhání ledvin, HIV infekce, brzkého porodu – nedonošení dítěte (nedostatečný vývoj krvinek), chronického zánětu, rakoviny a léčbě chemoterapií, myelodysplastického syndromu a další. Kromě anémie se dá využít i při předoperační přípravě nebo při velké ztrátě krve během operace. Pacienti, kteří trpí na vysoký tlak nebo kvůli diagnóze mají zvýšené predispozice k polycytémii, zvláště po užití léku, erythropoetin nesmí užívat.[16]

#### 3.1. Izoformy erythropoetinu

Jak již bylo zmíněno, máme fyziologický endogenní erythropoetin a naklonovaný rekombinantní erythropoetin. Dle WHO (World Health Organisation) se pro odvozené látky či izoformy, které nejsou patentově chráněny, musí užívat nechráněný generický název (INN-International nonproprietary name). U erythropoetinu je tomu takto: název krevních faktorů erythropoetinového typu musí mít stejný kořen -poetin. Erythropoetiny, které mají stejné pořadí aminokyselin jako lidský erythropoetin, jsou nazývány epoetiny (př. Epoetin alfa). Pokud se pořadí aminokyselin liší, používá se ještě jakákoliv předpona, nejčastěji určena objevitelem, či společností, která látku poté vyrábí (př. Darbepoetin). Dodatečné řecké písmeno značí rozdíly v glykosylaci. [2]

##### 3.1.1. Erythropoetin alfa, beta, omega, delta, darbepoetin, CERA

Erythropoetin alfa a beta, nazývané též epoetin alfa a beta, jsou izoformy rekombinantního erythropoetinu (rhEpo), které jsou syntetizovány ve vaječnicích křečka čínskému (CHO buňky). Liší se od sebe izoelektrickou fokusací. Epoetin beta je na rozdíl od epoetinu alfa více bazický a má větší biologickou aktivitu *in vivo*.



Epoetin alfa patřil mezi první rekombinantní formy erythropoetinu. Od roku 1989 byl komerčně vyráběn a stal se tak dostupný pro celý svět. Nalezneme jej pod názvy Epogen, Procrit, Eprex, Erypo, Espo, v závislosti na území. V ČR je užíván Eprex.

Epoetin beta byl vyvinut a následně produkován v roce 1990 Boehringerem Mannheimem pod názvem Recormon. Později byl prodán Hoffmanovi La Roche, který jej roku 1997 přejmenoval na NeoRecormon. Tento lék není dostupný v USA. [2]

Epoetin omega je syntetizován z ledvinových buněk mladého křečka čínského (BHK). Komerčně je k dostání pod názvem Epomax. Bazicita je v porovnání s epoetinem beta větší.

Epoetin delta je extrahován z lidských buněk, konkrétně z buněčné linie fibrosarkomů. Ze všech léčiv má nejlepší farmakokinetický profil, ale na druhou stranu díky své velké podobnosti s erythropoetinem je těžší jej dokázat u sportovců.

Darbepoetin je hyperglykosylovaný rhEpo. Na rozdíl od endogenního erythropoetinu, který má 3 N-glykosylované oblasti, jich darbepoetin má 5. Tohoto se při výrobě dosáhlo pomocí site-directed mutagenesis, což je metoda molekulární biologie, k provádění změn na DNA genomu v určitých úsecích. Při výrobě dochází k obměně 5 aminokyselin, které jsou poté zodpovědné za přibytěk glykosylovaných míst. Díky této odlišnosti má darbepoetin delší biologický poločas. Získává se stejně jako epoetin alfa a beta, z CHO buněk. Komerčně je dostupný pod názvy Aranesp a Nespo. Kořen slova NESP je odvozen od Novel Erythropoiesis stimulating protein (protein stimulující erytropoézu). Běžně se ale můžeme setkat pouze s názvem Nesp.

CERA neboli Continuous Erythropoietin Receptor Activator patří mezi molekuly, které jsou získávány klonováním třetí generace, a nese triviální název methoxy polyethylen glykol-epoetin beta. Vzniká připojením polyethylenglykolu (PEG) k epoetinu beta, pomocí specifické aminokyselinové skupiny. Je tvořen dlouhým polymerním řetězcem. Jeho biologický poločas je šestkrát delší než u darbepoetinu, a dokonce dvacetkrát delší než u epoetinu alfa a beta. Komerčně je dostupný i pod názvem MIRCERA. [29]

### 3.2. Dávkování a způsob podání

Frekvence podávání léku pacientovi závisí na biologickém poločasu, proto je nejčastější dávkování u erythropoetinu alfa (biologický poločas 19 hodin), méně časté u darbepoetinu (biologický poločas 73 hodin) a nejméně časté pak u CERA (biologický poločas 139 hodin).

Množství léku v dávce je uvedeno v Tabulce č. 1. Způsob podání jsou subkutánní (s.c.), což je podkožní, intravenózní (i.v.) neboli žilní a intraperitoneální (i.p.) do dutiny břišní. Léčba erytropoetinem trvá převážně 12 týdnů. První známky pozitivního účinku léčby lze pozorovat 4 týdny od začátku léčby, a to, pokud je zaznamenáno mírné zvýšení hematokritu. Nedojde-li k tomuto zlepšení, je možné zvýšit dávku. Je doporučeno užívat i doplňky železa, ale parenterálně, protože absorpce železa podávaného orálně není tak vysoká, aby stačila na požadavky kostní dřeně pod vlivem rhEpo. [16, 29]

### 3.3. Primární a sekundární účinky

Jak již bylo v této práci mnohokrát zmíněno, erytropoetin pomáhá k navýšení počtu červených krvinek a většímu okysličení tkání. To však nejsou jeho hlavní účinky, napomáhá také k lepšímu fyzickému výkonu, a proto byl zpočátku zneužíván sportovci. U hypotenzních pacientů napomáhá zvýšit krevní tlak a snižuje náchylnost k omdlávání a únavu. Dále zlepšuje funkci centrálního nervového a endokrinního systému, s čímž pak souvisí i zlepšení v sexuálním životě. Napomáhá k redukci hypertrofie levé komory, i k jejímu zmenšení, potýká-li se pacient s problémem se zvětšením celého srdce. Velkou výhodou je i to, že snižuje riziko aloimunizace<sup>12</sup> nového orgánu při transplantacích. [2]

### 3.4. Vedlejší účinky

Vedlejší účinky léčby rekombinantním erytropoetinem se vyskytují velmi málo, a to převážně jen u pacientů, kteří trpí na selhání ledvin. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří vysoký tlak a hyperviskozita krve, které mohou vést až k záchvatům a tromboembolií<sup>13</sup> nebo také příznaky připomínající chřipku, které ale do 24 hodin pravděpodobně odezní. Dále se může objevit hyperkalémie (zvýšené množství draslíku), kožní vyrážka nebo aplazie červených krvinek (PRCA). [16, 29]

#### 3.4.1. Vliv rhEpo na červené krvinky

Farmakologicky stimulovaná erythropoéza může způsobovat i deficit železa, i přesto, že jsou v organismu jeho zásoby. Míra využití železa je vyšší než schopnost kostní dřeně uvolňovat jej z jeho zásobní formy. Tento případ se odborně nazývá funkční deficit železa. Je způsoben produkcí erytrocytů s nízkým obsahem hemoglobinu a jeho koncentrací

---

<sup>12</sup> Imunizace buňkami jiného jedince.

<sup>13</sup> Krevní sraženina se uvolní do krve a způsobí ucpaní cévy.

(hypochromní buňky). Dnešní moderní přístroje již běžně užívané v laboratořích založené na analýze pomocí průtokové cytometrie, např. DxH 900 (Beckman Coulter), jsou schopny změřit koncentraci hemoglobinu MCHC (g/l) v jedné krvince a přepočítat ji na obsah hemoglobinu v retikulocyty. Zvažují-li doktoři výskyt funkčního deficitu železa, je pro ně důvěryhodnější ukazatel zvýšený počet hypochromních červených krvinek s koncentrací hemoglobinu  $<280 \text{ g/l}^{14}$  a retikulocyty s obsahem hemoglobinu  $<28 \text{ pg}^{15}$ , než koncentrace ferritinu a saturace transferrinu. Sportovci, kteří ilegálně berou rhEpo, obvykle dávku 30 IU/kg, a navozují si tak erytropoézu, často užívají i dvakrát týdně doplněk železa, aby u nich nedošlo k poznatelné změně stavby erytrocytů. V důsledku toho však dochází ke zvýšení počtu nezralých retikulocyty a doping může být i tak odhalen. [24]

#### 3.4.2. PRCA

Během let 1998–2002 bylo zaznamenáno bezmála 300 případů pacientů, u kterých došlo k výskytu aplazie červených krvinek (Pure Red Cell Aplasia; PRCA). Většina těchto pacientů měla v séru protilátky proti erytropoetinu anti-Epo, které blokovaly účinek jak rhEpo, tak vlastního endogenního erytropoetinu. Tato abnormalita se vyskytla pouze u subkutánního podání epoetinu alfa. Zajímavostí ale je, že právě v těchto letech došlo k úpravě technologického postupu výroby léku, a tak je tento raritní výskyt přisuzován právě této změně. Bez ohledu na novou úpravu postupu produkce léku i nadále výrobci doporučují zvážit i tuto možnost, zvláště, pokud dojde k poklesu hladiny hemoglobinu a erytrocytů. Důkaz PRCA je prováděn z nálezu v kostní dřeni a průkazu protilátek. Při pozitivním nálezu musí být léčba erytropoetinem ukončena, v horších případech je nutné nasadit i imunosupresiva (kortikosteroidy, cyklofosfamid). [16, 35]

### 3.5. Léčba anémie způsobené chronickým selháním ledvin

Chronické selhání ledvin je definováno jako strukturální nebo funkční postižení ledvin trvající déle než 3 měsíce. Tělo se v tomto stavu nedokáže zbavit odpadních látek organismu z důvodu snížené tvorby moči, čímž dochází k hromadění toxinů, tvorbě otoků a poruše homeostázy. Anémie při tomto onemocnění bývá způsobena nedostatkem erytropoetinu a železa s poruchou jeho metabolismu. Nedostatek erytropoetinu je relativní,

---

<sup>14</sup> Referenční hodnota: MCHC: 320–360 g/l.

<sup>15</sup> Referenční hodnota HGB v retikulocytech: 28,5–34,5 pg.

protože jeho hodnoty v plazmě jsou v normě, ale k tomu, aby organismus udržel počet erytrocytů je potřeba vyšší hladina. K léčbě se užívají doplňky železa a erythropoézu stimulující přípravky, jako konkrétně rhEpo. [34, 35]

Dříve než byl objeven rhEpo, byla renální anémie léčena krevními transfuzemi v kombinaci spolu s androgenní terapií. Tato léčba byla úspěšná a stále má v dnešní době najde využití, ovšem za speciálních podmínek. Není doporučena pro ženy, protože dochází k mnoha vedlejším účinkům. Bohužel, než bylo rhEpo dostupné jako léčivo, bylo známo jen velmi málo o tom, zda by jakákoliv forma erythropoetinu mohla pomoci v léčbě této nemoci, všechny dosavadní studie byly prováděny na zvířatech. První klinické studie na pacientech byly publikovány již pět let po naklonování lidského genu erythropoetinu. Z počátku byly užívány jak nízké, tak velmi vysoké dávky, a to v rozsahu 10–150 IU/kg nebo až 1500 IU/kg třikrát týdně, i přesto ale byl u obou druhů dávek pozorován nárůst hemoglobinu a redukce nutnosti krevní transfuze. [16]

### 3.5.1. Rezistence léčby

Jak již bylo zmíněno výše, není-li pozorováno zvýšení hematokritu do 4 týdnů, je možné dávku navýšit. Není-li ale klinická odezva ani na dávku 300 IU/kg/týden, jedná se o rezistenci na erythropoetin. Častou příčinou bývá deficit železa, proto by mělo být doplněno ještě před začátkem zahájení léčby. Jako další příklad rezistence bývá zánět, infekce či malnutrice dialyzovaných pacientů. Infekce či zánět může vzniknout z biofilmu na dialyzační kanyle. Další zdroje infekce mohou být periodontitida, chronická obstrukční uropatie nebo kalcifylaxe. Malnutrice může být známkou i nedostatečné dialýzy. [35]

## 3.6. Léčba anémie vyvolané nemocí AIDS

AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome, volně přeloženo získaný syndrom imunitního deficitu, je způsoben virem HIV, který postihuje pouze lidský organismus a napadá imunitní systém, konkrétně CD4 buňky. CD4 buňky hrají v lidském těle velmi důležitou roli, jsou to pomocné T lymfocyty, které uvolňují cytokiny, jež aktivují ostatní imunitní buňky a regulují tak imunitní odpověď. Buňky jsou postupně ochromeny a organismus se již nemůže nijak bránit. Dále jsou napadeny makrofágy, které se podílí na fagocytóze a také jsou jedny z prvních buněk, jež přichází do styku s virem či jinými patologickými činiteli. Je přenášen pohlavním stykem, krví nebo z těhotné matky na dítě. Existují 2 typy HIV viru, kterými se může člověk nakazit. Oba mají pravděpodobně původ jako mutace virů opic či lidoopů. [45]

Anémie je nemoc, která často AIDS doprovází. Je způsobena jak negativním vlivem napadených bílých krvinek, tak samotnou léčbou. Potlačení funkce kostní dřeně může být zapříčiněno infekcemi, nádory, cytokiny a nedostatkem nutričních živin. Léčba probíhá Zidovudinem, u kterého bylo prokázáno, že velmi přispívá k anemickému stavu. V brzkém stádiu infekce bývá dávka 400–800 mg, přičemž 2–20 % pacientů začne prokazovat lehce anemický stav. Anémii lze i u onemocnění AIDS léčit transfúzí, ale bohužel zde může potenciálně docházet k imunosupresi. Lymfocyty a alternace metabolismu prostaglandinu E mohou hrát roli jak v imunosupresi, tak ve zhoršení samotné nemoci.

Další možnost léčby anémie je pomocí rhEpo. Zatím se léčba prokázala jako efektivní, ale aby ji pacient mohl podstoupit musí hodnota endogenního erythropoetinu být menší než 500 mU/ml. Pokud pacient současně nebere lék Zidovudin, je léčba rhEpo téměř neúčinná. Doporučená dávka rhEpo je 100–200 IU/kg týdně po dobu 12 týdnů. [16]

### 3.7. Předoperační péče

U některých operací je třeba, aby byla pacientovi odebrána jeho vlastní krev, která mu poté bude zpětně po operaci darována, jakožto součást pooperační léčby. Může se ale stát, že pacient z důvodu nedostatečného času nebo jiných zdravotních důvodů nemůže vlastní krev darovat, ani přijmout, a tak se terapie rhEpo nabízí jako ideální řešení, aby nedošlo k nedostatku krve. Užívá se převážně při ortopedických operacích. Postup terapie, například při transplantaci kyčle, je následující; 10 dnů před a 4 dny po operaci je subkutánně aplikováno 300 IU/kg rhEpo, po operaci je pozorováno snížení nároků na krevní transfuzi. Spolu s rhEpo je doporučeno doplňovat i železo, protože endogenní zásoby železa nedokážou být tak rychle využity a nestačí k zajištění náhlé velké potřeby kostní dřeně.

Bylo i zvažováno užití této terapie i při operacích srdce a cév, ale je to stále předmětem klinických studií. Je zde risk výskytu trombóz, na druhou stranu existují ale i studie, které tvrdí, že terapie rhEpo může být i v těchto případech bezpečná. Teorie vycházející z těchto studií tvrdí, že rhEpo je schopno zvýšit extrahovatelnost kyslíku z tkání a snižovat tak možnost laktátové acidózy. Působí na 2,3-disfosfoglycerát obsažený v červených krvinkách, který napomáhá uvolňování kyslíku z krvinek. Tím, že je podáván rhEpo, je v organismu mnoho mladých červených krvinek, neocytů, a pokud by z nich nebyl uvolňován kyslík v dostatečné míře, mohlo by dojít k tvorbě kyseliny mléčné ve svalech, včetně srdečního. [16]

Tabulka č. 1: Druhy rekombinantního erythropoetinu a jejich farmakologický profil.

	Erythropoetin alfa	Erythropoetin beta	Darbepoetin alfa	CERA
zdroj	CHO	CHO	CHO	
molekulární hmotnost [Da]	36 000	>34 000	44 000	69 000
konjugace s glykolem	ne	ne	ne	ano
glykosylovaná místa	3	3	5	-
způsob podání	s. c., i.v., i. p.	s. c., i.v., i. p.	s. c., i. v.	s. c., i. v.
biologický poločas; s. c., [hod]	19	20	73	139
biologická dostupnost; s. c., [%]	20	23–42	37	62
dávka	50–150 IU/kg	20–80 IU/kg	0,45 µg/kg	0,6–1,2 µg/kg
dávkování	1–3krát/týdně	1–3krát/týdně	jednou týdně, jednou za 2 týdny	jednou za 2 týdny, jednou měsíčně
lék užívaný v ČR	Eprex	NeoRecormon	Aranesp	Mircera

## 4. Erythropoetin ve sportu

Základní princip a důvody proč se vůbec erythropoetin ve sportu začal objevovat a užívat je velmi jasný a stručný: zvýšení fyzického výkonu a výdrže, navýšením počtu červených krvinek, které budou schopny pojmout více kyslíku. Skvělým ukazatelem všech těchto změn, které v těle proběhnou, je  $VO_2 \text{ max}$ , což je veličina, která nám udává hodnotu maximálního objemu kyslíku, který je člověk schopen využít během jedné minuty. Měří se v ml  $O_2$  spotřebovaného za minutu na kilogram tělesné váhy [ $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ]. [2, 37]

Myšlenka, že lidské tělo reaguje na nedostatek okysličení tkání ve vysokých nadmořských výškách tvorbou erythropoetinu, byla vyslovena již v 19. století. Aplikace této teorie byla neúmyslně provedena i v roce 1968 na olympijských hrách v Mexico City. Mexico City leží 2240 m. n. m., což představuje mírný hypoxický stimul na organismus jedinců, kteří jsou zvyklí na život v nížinách. Dle mého názoru, podmínky pro pořádání olympijských her nebyly pro všechny sportovce férové. Vzhledem k tomu, že lidé, kteří žijí a trénují v této nadmořské výšce jsou již adaptovaní na změnu tlaku kyslíku ve vzduchu a jejich organismus již má dostatek červených krvinek a nedochází u nich k hypoxii, mají značnou výhodu oproti ostatním. Nadmořská výška 2240 m. n. m. není obvyklá, a tak na těchto hrách excelovali sportovci, kteří trénovali v obdobných podmínkách. Taktéž nepadly světové rekordy ve výkonnostních disciplínách, ale pouze v „krátkých“ závodech, jako je běh do 400 m nebo cokoliv, co nevyžadovalo výkon delší jak 1 minutu. Rozdílly ve výkonech a méně úspěchů jednotlivých zemí ale daly podnět k novému způsobu trénování. [37]

Během dalších let proběhlo mnoho studií, jak zefektivnit trénink, aby došlo ke zvýšení výkonu a správnému okysličení těla, tedy aby měl sportovec dostatek červených krvinek již při startu, v jakýchkoliv podmínkách. Jedna ze studií vědců Levina a Stray-Gundersena se zabývala tréninkem jedinců ve třech skupinách, rozlišených dle nadmořské výšky jejich pobytu a tréninku. Skupina „*high-high*“ pobývala i trénovala v nadmořské výšce 2500 m. n. m., skupina „*low-low*“ byla v nadmořské výšce 1250 m. n. m., skupina „*high-low*“ pobývala ve vyšší nadmořské výšce a trénovala v nižší. Skupina, která nadmořské výšky kombinovala, vykazovala výrazné zlepšení výkonu a zvýšení hladiny erythropoetinu a hemoglobinu. V další studii Stray – Gundersen už aplikoval systém „*high-low*“ pobytu a tréninku. Na začátku a na konci studie, po 27 dnech si sportovci zaběhli trať o délce 3 km a jejich časy byly porovnány.  $VO_2 \text{ max}$  se zvýšila z hodnoty  $72,1 \pm 1,5$  na hodnotu  $74,4 \pm 1,5$   $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  a hladina

erythropoetinu byla již po 20 hodinách pobytu ve 2500 m. n. m. dvakrát vyšší, než bývá normálně v nížinách. U většiny atletů došlo k takovému zlepšení, že se jejich počáteční a konečné výkony velmi lišily, a tak už nebylo pochyb o účinnosti takového typu tréninku. [37]

Než bylo rhEpo klinicky dostupné, jako stimulant erythropoézy či přímo doplněk k erytrocytům, používaly se jako doping autologní nebo homologní transfuze krve. Typický postup pro autologní transfuzi je pomocí flebotomie, následně se krev zmrazí pod glycerolem a sportovec má 12 týdnů na to, aby se mu z odběru vrátil hemoglobin do normálu. Dva dny před závodem se sportovci zavede infuze a je tak připraven na výkon. Transfuze homologní krve s sebou přináší větší risk, z důvodu možné imunitní reakce. První spekulace o krevním dopingu se začaly objevovat v roce 1976, údajně totiž letadlo, které přepravovalo zavazadla a sportovce, obsahovalo i lednici s krví. První potvrzený případ krevního dopingu byl v roce 1980 na olympijských hrách v Moskvě, kdy se finský závodník dobrovolně přiznal, po tom, co zvítězil v závodě na 5 a 10 km. V roce 1984 byl krevní doping potvrzen u 7 cyklistů z USA. Jeden z nich si nechal dát vlastní krev a 3 měsíce před letními olympijskými hrami v Los Angeles a na závodě překonal svůj vlastní osobní rekord. Ostatní z týmu se tuto informaci dozvěděli pozdě, nestihla by proběhnout 12týdenní obnova krve, a tak jim byla podána krev cizího dárce, přímo na motelovém pokoji. Čtyři ze sedmi cyklistů se umístili na stupních vítězů. Při vyšetřování se cyklisté hájili tím, že IOC seznam zakázaných látek (International Olympic Committee, mezinárodní olympijský výbor) krev neobsahuje. Následně byla krev na tento seznam přidána. Další případ krevního dopingu se objevil pouze u lyžaře z USA roku 1987.

Krevní doping byl zakázán, a tak bylo nadmíru jasné, že jakmile bude dostupná látka, která bude mít podobné vlastnosti, ihned bude zneužita. Přesné datum začátku užívání rhEpo není známo, ale je jisté, že co byl dostupný za léčebnými účely roku 1987, hned započalo jeho zneužívání. Již v roce 1988 na zimních olympijských hrách v Calgary padlo první podezření. Ke konci 80. let došlo k záhadným úmrtím 20 elitních cyklistů z Belgie. Proběhlo řádné vyšetřování s podezřením na roli erythropoetinu v této tragické události, ale veřejně nejsou známy žádné informace. Kromě cyklistiky se začal užívat i při běžeckém lyžování, atletice, triatlonu, dokonce i ve fotbale. V roce 1990 již byly rekombinantní erythropoetin a jeho analogy připsány na IOC seznam zakázaných látek a také na WADA Prohibited List (World Anti-Doping Agency, Světová antidopingová agentura). [37]

I přes zákaz se jeho spotřeba stále více rozrůstala, sportovci byli málokdy odhaleni, protože v 90. letech nebyl dostupný test, který by prokázal užití rhEpo. Jednak bylo těžké rhEpo



rozpoznat od endogenního erythropoetinu, ale také je-li rhEpo podáván intravenózně, ale i subkutánně, má poměrně krátký biologický poločas (i. v.  $8,5 \pm 2,4$  hodin, s. c.  $19,4 \pm 10,7$  hodin), takže než by podezřelý sportovec došel na testy, mohlo být rhEpo už odbouráno. První test byl objeven v roce 2000, vědci F. Lasne a J. de Ceaurriz, kteří si jeho účinnost potvrdili analýzou vzorků moči účastníků cyklistické Tour de France. Poprvé byl test oficiálně použit na olympijských hrách v Sydney. Do té doby bylo pouze zakázáno startovat s hematokritem vyšším než 50 %. [2, 36, 37]

#### 4.1. Skandál Festina týmu

Ačkoliv se během let přišlo na nespočet závažných případů užívání dopingových látek nejen v cyklistice, tak aféra z roku 1998 je podle všeho asi jednou z největších, hned po přiznání Lance Armstronga. V červenci 1998 při cestě, na Tour de France bylo auto týmu Festina, v té době jednoho z nejlepších francouzských cyklistických týmů, podrobena kontrole na francouzsko – belgických hranicích. Bohužel se v kufru auta našlo přes stovky dopingových látek, včetně erythropoetinu. V té době to vzbudilo velký rozruch v celé soutěži Tour de France a tým Festina byl ze soutěže vyřazen. Tato událost ale nabrala až celosvětového měřítko, když se případu ujaly i zahraniční média a postupně se začalo přicházet na to, že doping v cyklistice je více než běžný. Doktorů profesionálních týmů si byli velmi dobře vědomi faktu, že chce-li sportovec rychle zvýšit svůj výkon, jen fyzické tréninky nestačí a sami jim ordinovali druhy a množství látek. Ve zповědi některých cyklistů dokonce stálo:

*„Můj doktor mi řekl: Na konci měsíce je tu závod Paris – Nice. Uděláme to jako obvykle, s tou výjimkou, že snížíme dávky EPO a možná GH (růstový hormon), pokud to chceš zajet opravdu dobře. Skončíš přibližně tři nebo čtyři dny před, abys toho v sobě neměl tolik.“*

Taktéž prý sportovci zažívali úžasné pocity štěstí, pod vlivem se cítili více sebevědomí a silnější i po duchovní stránce.

*„S erythropoetinem.. když přestanete šlapat na 10 sekund při tepu 185, během 15 sekund se váš puls sníží z ničeho nic na 177–178 a získáte najednou spoustu kyslíku. Není potřeba abych Vám to tu doslova kreslil. Erythropoetin... umožní Vám prožít úžasný pocit vnitřní plnosti a možnosti dýchat, protože nikdy nezažijete bolest.“ (volně přeloženo)*

Nicolas, cyklista v 90. letech 20. století

Tento skandál mohl být klasickým titulkem na předních stránkách několika novin, a do pár měsíců mohlo být po všem, tak jako tomu bylo doposud v té době. Tato událost změnila však mnoho věcí jak v cyklistice, tak ve státních zdravotních opatřeních, ale i v politice. Byla zavedena oddělení sportovní medicíny na univerzitách, ale i v nemocnicích, taktéž se více investovalo do dopingového výzkumu. V roce 1999 byl stanoven i nový antidopingový zákon. Jediný opravdu negativní dopad to mělo na kolektivnost týmů. Kdo dopingové látky měl, ačkoliv to vyzní zvláště, nedělil se, trénoval sám, závodníci si od sebe obecně drželi odstup. [39]

## 4.2. Lance Armstrong

Lance Armstrong je známý americký, nyní již bývalý, profesionální cyklista. Svou kariéru nastartoval již v 16 letech jako profesionální triatlonista, ale poté přešel k cyklistice a v roce 1991 zvítězil v amatérském mistrovství Spojených států. Na Olympijských hrách v roce 1992 se mu podařilo v silniční cyklistice umístit na skvělém 14. místě. V roce 1995 se mu taktéž poprvé podařilo dokončit závod Tour de France. Bohužel, v roce 1996 mu byla diagnostikována pokročilá rakovina varlat. Armstrong se však vyléčil a nastoupil na start závodů o dva roky později. Nemoc jej na pohled zničila, ale dle výpovědí se on sám cítil silnější než kdy dříve, a ačkoliv byla fyzická bolest po pauze opravdu velká, psychické potěšení z návalu endorfinů po tréninku či závodu bylo vždy silnější. [40]

Po nemoci a úspěšném návratu se během let stal sedminásobným vítězem Tour de France v řadě, v letech 1999–2005. Už v té době se ale objevily spekulace o možném dopingu, ale on je vždy popíral, dokonce úspěšně žaloval žurnalisty, pojišťovny, jen aby jeho pravda zvítězila. V roce 2012 byl americkou antidopingovou společností USADA<sup>16</sup> obviněn z četných dopingových přestupků, které nezapíral, ale ani se k nim nevyjadřoval. Ihned mu byla odebrána všechna od roku 1998 získaná vítězství a bylo mu doživotně zakázáno účastnit se profesionální cyklistiky a dalších olympijských disciplín, včetně triatlonu, či běhu. V roce 2013 se veřejně v show Oprah Winfrey přiznal k užívání dopingových látek, i erythropoetinu. Všechna vítězství na Tour de France mu byla odebrána. [40]

Ačkoliv byl Tyler Hamilton Lancův přítel, taktéž obviněný z dopingu erythropoetinu, ve své knize *The Secret Race*, ale i ve filmových dokumentech, popisoval, že Lance byl přímo fanatik. Určoval pravidla, měl vše podchycené, byl miláček všech, a i když hodně lidí vědělo

---

<sup>16</sup> United States Anti-Doping Association.

krutou pravdu, nikdo neměl odvahu ji říct nahlas. Dokonce byl schopen pár dní před závodem obvinít prostřednictvím dopisu WADA své protivníky z užívání dopingových látek, jen aby měl méně konkurence. [41]

Existuje nespočet dalších sportovců, kteří erythropoetin užívali, a to nejen cyklistů. Ze všech bych, bohužel ne s hrdostí, chtěla zmínit Ondřeje Rybína, českého nadějného cyklistu, který svou kariéru ukončil v roce 2015, po pozitivním testu na erythropoetin. Ačkoliv dostal pouze čtyřletý zákaz účasti se závody, ke závodění se nikdy nevrátil. [46]

Tabulka č. 2: Krevní doping ve sportu; chronologicky. Převzato a volně přeloženo z [37].

<b>rok</b>	<b>událost</b>	<b>typ závodu</b>	<b>místo</b>
1968	spekulace o dopování krví	olympijské hry	Mexico City
1976	spekulace o dopování transfuzemi	olympijské hry	Montreal
1980	vítěz závodu v běhu na 5 km přiznává doping	olympijské hry	Moskva
1980	autologní transfuze zvyšují výkon	klíčový objev	
1984	homologní a autologní transfuze	olympijské hry	Los Angeles
1987	epoetin schválen US FDA		
1988	spekulace o zneužívání rhEpo	olympijské hry	Calgary
1989	nevysvětlená úmrtí cyklistů		Nizozemí
1998	zabavení rhEpo	Tour de France	Francie
2000	objeven test na přítomnost rhEpo	klíčový objev	
2000	test na rhEpo oficiálně	olympijské hry	Sydney
2002	IEF <sup>17</sup> testy na rhEpo, pozitivní výsledky	cyklistický závod	
2002	darbepoetin v moči	olympijské hry	Salt Lake City

<sup>17</sup> Analytické testy založené na izoelektrické fokusaci.

## 5. Analýza tělních tekutin na přítomnost rhEpo

U sportovců, ale i u pacientů v klinické praxi, probíhá analýza na přítomnost rhEpo z tělních tekutin, a to z krve a moči. Analýza může být rozlišena na přímé a nepřímé metody. Přímé testy identifikují substanci metodami, které nám prokážou přítomnost látky v těle, jedná se například o plynovou chromatografii s hmotnostní spektroskopií. Nepřímé metody měří například koncentraci určitých markerů v séru, která pak koreluje s koncentrací substance v těle, nepřímo tak stanovuje její hodnotu. Nepřímé testy se v dopingů příliš neutilizovaly, ale s příchodem endogenních steroidů a glykoproteinů, které byly zneužívány, bylo nutné vytvořit nové metody analýzy.

### 5.1. Nepřímé metody

#### 5.1.1. Hematokritový a hemoglobinový test

Mezinárodní cyklistická unie se obávala, že by rhEpo narušilo vysokou úroveň elitních závodů a stupně vítězů by se staly lehce dosažitelné, a tak zavedla pravidlo, že sportovci s hematokritem vyšším než 50 % u mužů a 47 % u žen do závodu nesmí odstartovat. Mezinárodní lyžařská federace aplikovala podobné pravidlo, a to s hemoglobinem. Hraniční hodnoty pro start byly 185 g/l pro muže a 165 g/l u žen. Těmto testům se říkalo „*health test*“, protože závodník nebyl obviněn z dopingů, ale pouze pro něj bylo nebezpečné startovat s vyššími hodnotami. Zákaz závodění byl pouze na 15 dní, pokud tedy hodnota hematokritu klesla. [37]

Hematokrit (HCT) se stanovuje z plné žilní krve odebrané do zkumavky, která obsahuje K<sub>3</sub>EDTA, což je antikoagulační činidlo. Zkumavka je 5 minut při 10 000 otáčkách/min odstředována. Působením odstředivé síly dochází k oddělení plazmy, leukocytů, červených krvinek a krevních destiček dle hustoty. Poté se hodnotí podíl jednotlivých elementů. Dnes je již možné změřit hematokrit i metodou průtokové cytometrie, na základě počtu a objemu buněk v jednotce krve.

Referenční hodnoty HCT: ♂ 44±5 %; ♀ 39±4 % (0,44±0,05 ; 0,39±0,04) [33]

Hemoglobin se také stanovuje z plné žilní krve. Existuje řada přístrojů, která jeho hodnotu vyhodnocuje spolu s krevním obrazem, analýza samotného hemoglobinu se neprovádí.

Měření je spektrofotometrické. Hemoglobin je lyzujícím činidlem přeměněn na stabilní oxyhemoglobin. Absorbance roztoku je přímo úměrná koncentraci hemoglobinu ve vzorku. Analýza probíhá pomocí LED diody při 545 nm.<sup>18</sup> [37]

Referenční hodnoty HGB: ♂ 135–170 g/l; ♀ 120–160 g/l [33]

### 5.1.2. Hypochromní makrocyty

Vědecký tým pod vedením Casoniho navrhl testování podle své studie z roku 1993, ve které se zabýval změnami červených krvinek pod vlivem erythropoetinu. Ukázalo se, že rhEpo užívatelům se nejvíce změnil střední objem erytrocytů (MCH) a objem hemoglobinu v erytrocytu (MCV). Autor označil erytrocyty s MCV >128 fl a MCH <28 pg jako hypochromní makrocyty a stanovil hranice  $\pm 0,6$  %, jako hraniční. Bohužel v praxi toto testování neprobíhá a žádné další studie nebyly dále provedeny. [37]

### 5.1.3. Počet retikulocytů

Vzhledem ke zvýšené produkci erytrocytů dochází ke zvýšení počtu retikulocytů v periferní krvi. Retikulocyty jsou lehce rozpoznatelné pod mikroskopem, ale v dnešní pokročilé době je umožněno počet krevních elementů zjistit přes jeden laboratorní přístroj při analýze celého krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu. Nárůst počtu retikulocytů je možné pozorovat po 2–3 dávkách podaných subkutánně, přibližně po 4 dnech. Bohužel tato metoda se využívá spíše v klinické praxi, jak při podezření na doping. [23]

## 5.2. Přímé metody

### 5.2.1. Elektroforetické metody

Analýzy založené na elektroforetické separaci erythropoetinu a následná imunologická detekce (Western blot) jsou jedny z nejvíce využívaných metod k analýze této látky. Patří mezi přímé detekční metody podobné imunoanalytickým (RIA, ELISA), ale s tou obdobou, že navíc umožňují vizualizaci molekuly vázané na protilátky, zajímá-li nás heterogenita náboje (metoda IEF-PAGE) nebo podávají informaci o molekulární hmotnosti (SDS-PAGE,

---

<sup>18</sup> Tento postup platí pro zařízení DhX 500 Beckmann Coulter, ale většina analyzátorů funguje na stejném principu.

SAR-PAGE). Na základě těchto možností je rozlišení endogenního erythropoetinu a sportovci užívaného rekombinantního erythropoetinu snadno proveditelné. [42]

#### 5.2.1.1. IEF-PAGE (isoelectric focusing-polyacrylamide gel electrophoresis)

Izoelektrická fokusace erythropoetinu v polyakrylamidovém gelu byla první metodou, kterou povolila WADA k běžnému používání, a také první metodou, která umožnila detekci užívání rhEpo v dopingové sféře. Erythropoetin může být díky svojí nábojové heterogenitě rozdělen na izoformy, které dohromady tvoří tzv. *Epo isoform profile*. Jednotlivé „profily“ se od sebe liší, lze najít značné rozdíly mezi rekombinantním erythropoetinem rhEpo, lidským urinálním erythropoetinem uhEpo a erythropoetinem z lidského séra shEpo.

Na princip testu přišel výzkumný tým Lasneho (2000), který se inspiroval pracemi vědců Wide a Bengtsoon (1990), Tam a kol. (1991) a Wide a kol. (1995), kteří zónovou elektroforézou a IEF přišli na fakt, že uhEpo obsahuje větší množství kyselých isoform než rhEpo a shEpo, a že tento rozdíl lze použít k detekci přítomnosti rhEpo v moči i v séru. Na základě odlišné stavby molekul lze tedy rozeznat endogenní erythropoetin od urinálního.

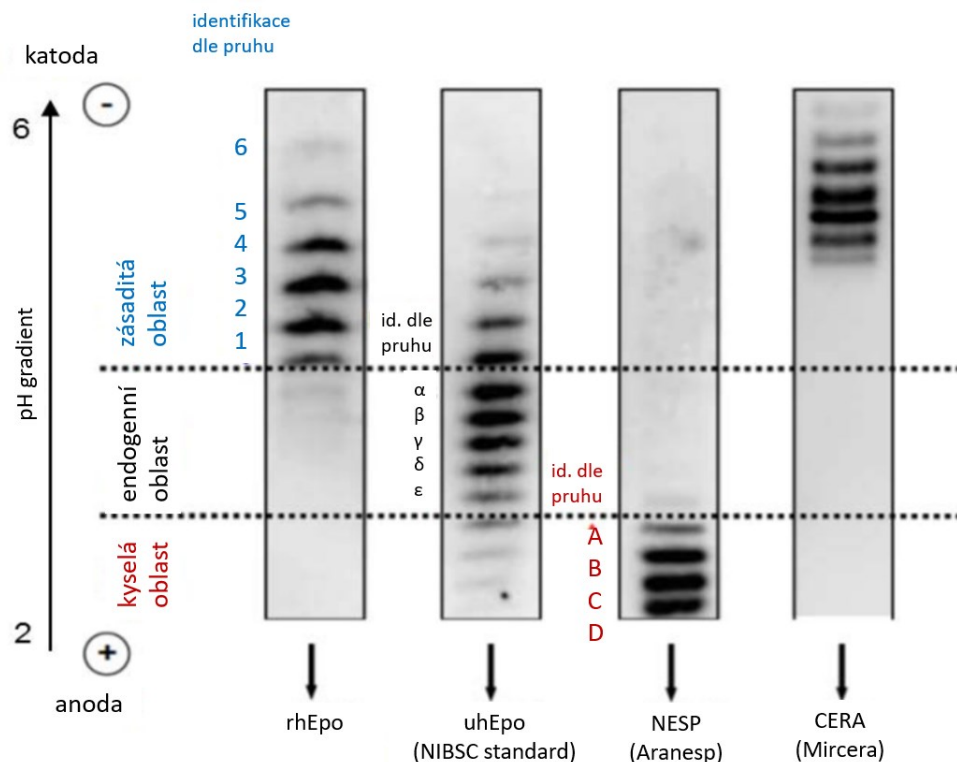
Izoelektrická fokusace je metoda, která je schopna rozdělit amfoterní molekuly jako jsou proteiny a peptidy v závislosti na jejich náboji, který je definován pKa. U erythropoetinu hovoříme o N- a O- glykosylačních místech, na kterých jsou navázány oligosacharidy, které obsahují kyselinu sialovou, na jejichž přítomnosti je následně založen počet isoelektrických bodů. Izoelektrický bod je specifický fyzikálně – chemický parametr amfoterní molekuly, definovaný jako pH, ve kterém má molekula neutrální náboj. Princip metody spočívá v migraci proteinů za proměnlivého pH. V kyselém prostředí mají proteiny celkový náboj kladný, putují tedy ke katodě, v zásaditém prostředí tomu je naopak, proteiny migrují k anodě. Je-li pH rovné isoelektrickému bodu, je molekula neutrální a nehne se. Izoelektrická fokusace probíhá na polyakrylamidovém gelu, kde díky napětí migrují molekuly na místo svého isoelektrického bodu, kde se následně zastaví (fokusují), neboť jejich celkový náboj je roven nule.

Analýza vzorků může probíhat z moči i séra, v praxi se ale provádí pouze z moči. Následující postup je pro analýzu moči. Moč je nejprve stočena, poté proběhne ultrafiltrace přes molekulární síto, které propustí látky s molekulární hmotností do 30 kDa. Aby se zabránilo ucpání síta, probíhá filtrace vakuově. Pomocí pufru 3,75 Tris – HCl je zajištěno pH 7,4. Dále je přidána směs proteázových inhibitorů, které zabraňují degeneraci rhEpo močovými proteázami. Přibližně 20 ml moči je zkoncentrováno na objem 20–50 µl. Vzorky jsou

aplikovány na polyakrylamidový gel a ponořeny do roztoku katolytů a anolytů. Fokusace probíhá za stálého výkonu 1 Watt na 1 cm délky gelu.

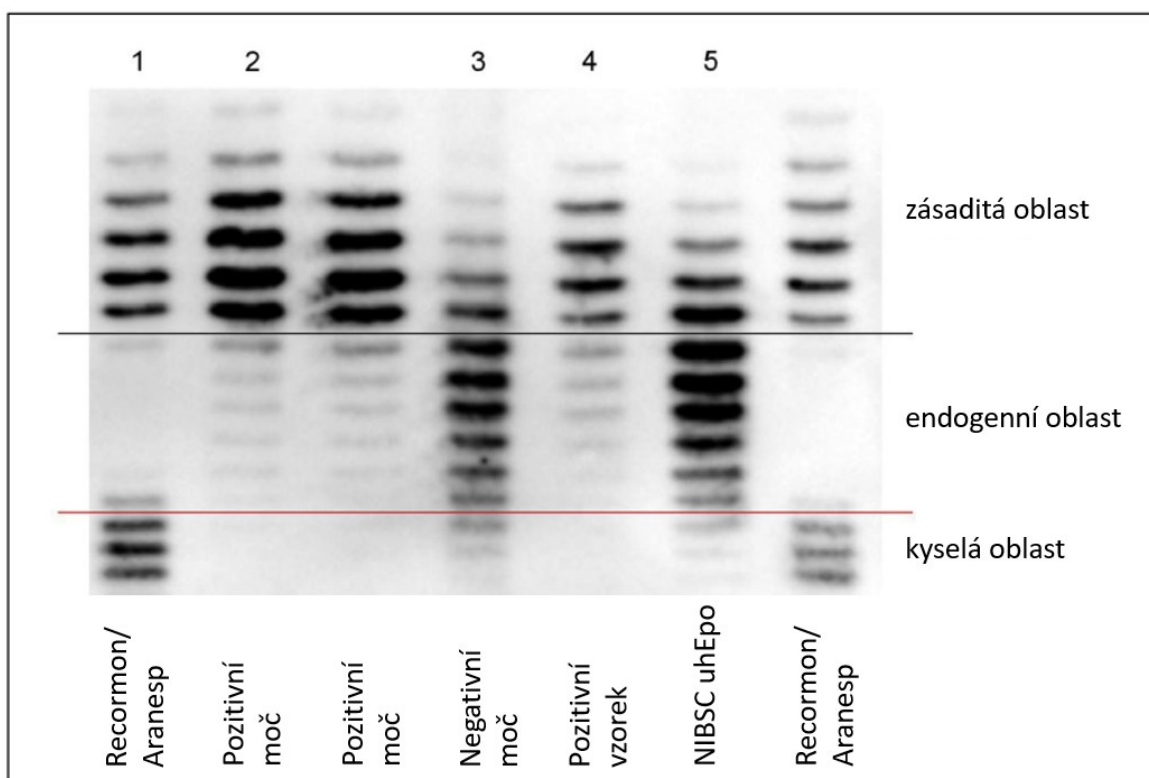
Po izoelektrické fokusaci je provedena imunochemická metoda Western blotting. Plastová podložka, na které byl gel pro ochranu umístěn, se oddělá a proteiny jsou transferovány na membránu polosuchým blottingem. Přidá se 5% odtučněné mléko a proběhne inkubace v roztoku s monoklonálními protilátkami anti-Epo. Poté je proveden druhý blotting a komplexy rhEpo + anti-Epo jsou převedeny na membránu. Membrána je opět zafixována v 5% odtučněném mléku, inkubována se sekundárními protilátkami a po promytí je přidán roztok se streptavididem, který je značen křenovou peroxidázou a konjuguje se se sekundárními protilátkami. Samotná analýza přítomnosti rhEpo je provedena chemiluminiscenčně, díky křenové peroxidáze. Kvantitativní vyhodnocení imunochemické i IEF probíhá přes speciální software. Rozpoznání jednotlivých erythropoetinů je podmíněno shodou v pruzích, jak lze vidět na Obrázku 13. [2]

Test je poměrně časově náročný, může trvat i 3 dny. I přesto je ale hojně využíván, protože je přesný a na výsledky se dá spoléhat.



Obrázek 13: Rozdělení jednotlivých erythropoetinů při pH 2–6. Převzato a volně přeloženo z [47].





Obrázek 14: Ukázka pozitivního nálezu pomocí IEF metody zakončené imunoblottingem. Řada 1: Referenční marker odpovídající mixu epoetinu beta a darbepoetinu; řada 2: Lidská moč pozitivní na epoetin beta; řada 3: endogenní urinární erythropoetin; řada 4: vzorek pozitivní na epoetin alfa/beta; řada 5: urinární erythropoetin – standard (určeno NIBSC). Převzato a volně přeloženo z [38].

#### 5.2.1.2. SDS-PAGE/ SAR-PAGE (sodium dodecyl sulphate/ sarcosyl-polyacrylamide gel electrophoresis)

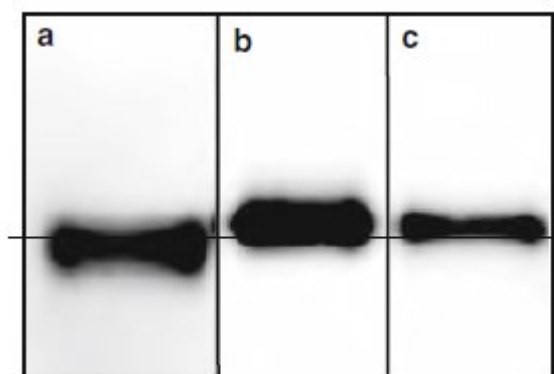
Jedná se o elektroforetické metody separující molekuly na gelu podle velikosti/hmotnosti, za přítomnosti dodecylsírany sodného ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ) nebo sarkosylu. Opět tak lze velmi dobře rozlišit uhEpo shEpo od rhEpo, protože uhEpo a shEpo má molekulární hmotnost 34 kDa, kdežto rhEpo má větší, záleží na druhu, viz Tabulka č. 3. Dodecyl síran sodný zde slouží jako aniontový detergent, který reaguje s proteiny a předává jim negativní náboj. Spolu s gelem tak napomáhá roztřídit molekuly jako kdyby procházely sítím, malé proteiny migrují gelem rychleji směrem k anodě, velké až takový pohyb nevykazují a zůstávají u anody. SAR-PAGE se užívá zejména pro identifikaci CERA rhEpo, SDS-PAGE nejlépe identifikuje Dynepo.

Tabulka č. 3: Přehled rekombinantních erythropoetinů a jejich molekulárních hmotností.

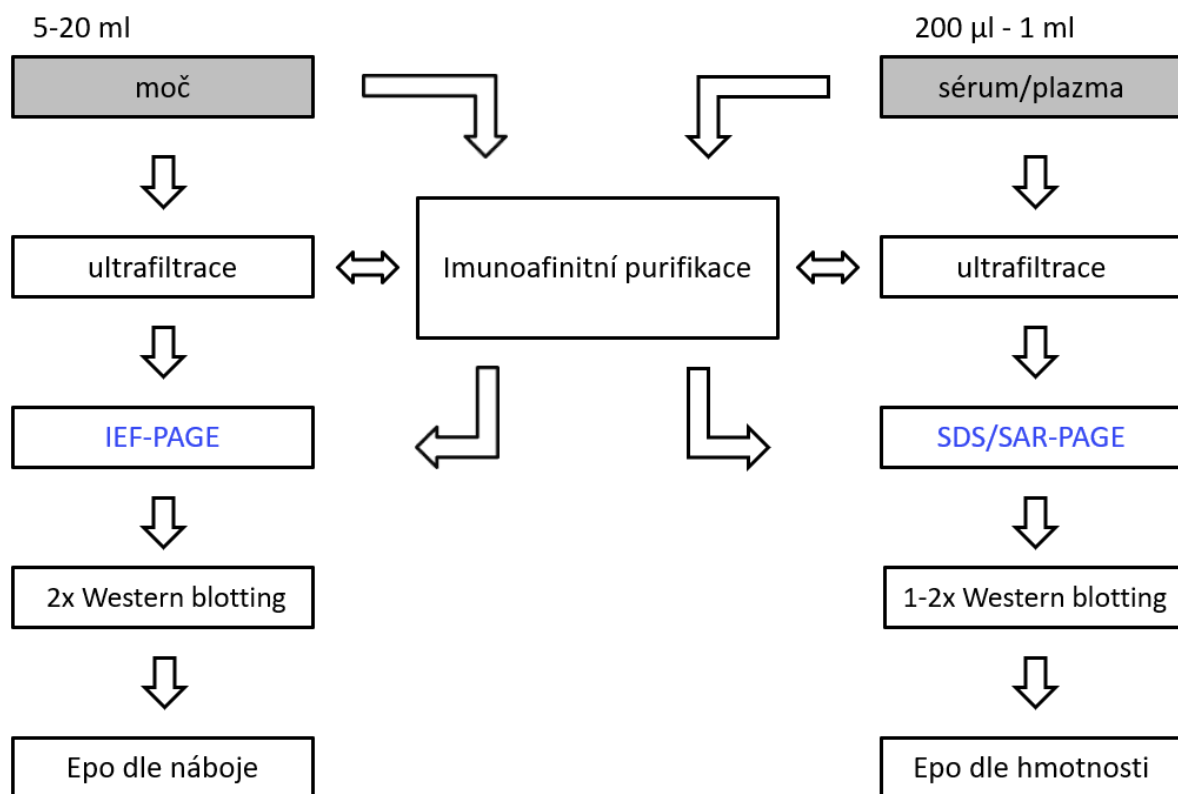
<b>druh rhEpo</b>	<b>komerční název</b>	<b>molekulární hmotnost</b>
epoetin alfa	Eprex, Erypo	36–38 kDa
epoetin beta	Neo Recormon	36–38 kDa
epoetin omega	Repotin	34 kDa
darbepoetin alfa	NESP, Aranesp	44–45 kDa
epoetin delta	Dynepo	36 kDa
CERA	Mircera	69–78 kDa

Analýza může probíhat jak z moči, tak séra. Před samotnou analýzou je nutné, aby proběhla imunoafinitní purifikace vzorku pomocí metody ELISA nebo na monolitickém disku. Tak je zabráněno tomu, aby vyšly nehodnotitelné výsledky, kvůli velkému množství proteinů. [2, 42]

Obě metody jsou schváleny WADA a jejich postup a kritéria jsou popsány v technickém dokumentu z května 2021, dostupného na webu [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org) pod názvem TD2021EPO.



Obrázek 15: Zobrazení (a) negativní kontroly, (b) pozitivní kontroly (Epoetin delta, Dynepo), (c) odebraný vzorek, který se jeví jako pozitivní na Dynepo. Převzato z [2].



Obrázek 16: Porovnání pracovních postupů metod IEF-PAGE a SDS/SAR-PAGE. Analýza u IEF-PAGE může probíhat i ze séra. Imunoafinitní purifikace není nezbytně nutná, ale doporučuje se. Převzato a volně přeloženo z [42].

### 5.2.1.3. 2D – elektroforéza

Dvoudimenzionální elektroforéza kombinuje izoelektrickou fokusaci a SDS-PAGE. Proteiny jsou nejprve separovány podle náboje pomocí IEF a poté přeneseny na SDS-PAGE gel a rozděleny dle molekulární hmotnosti. IEF neprobíhá v roztoku amfolytů, ale na imobilizovaných pH gradientních gelech (IPG), které zjednodušují další přesun do „druhé dimenze“. Výhoda této metody spočívá v tom, že se zvýší přesnost a možnost rozlišení molekul, právě díky dvojité separaci. Spolu s nástupem této metody byl doporučen i jiný postup úpravy moči. Místo zakoncentrování a ultrafiltrace probíhá precipitace s acetonitrilovým proteinem.

Vzorek moči je tedy precipitován acetonitrilovým proteinem, redukován a alkylován. Diafiltrací je vzorek zbaven soli a následně fokusován na IPG strip, při pH 3–5. Poté proběhne přenos na SDS-PAGE gely a rozdělení do druhé dimenze.

Tato metoda byla představena v roce 2005, ale vzbudila ve vědecké sféře mnoho diskusí a přišlo se na nevýhody jako jsou například možnost testování pouze jednoho vzorku v jednom testu. [2, 42]

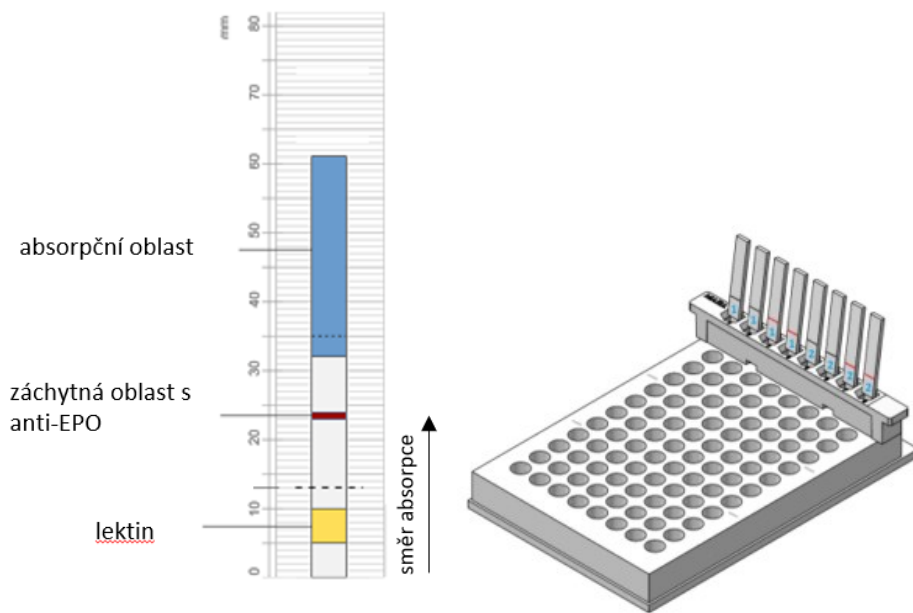
## 5.2.2. Imunochemické metody

### 5.2.2.1. EPO WGA MAIIA (Membrane-asisted isoform immunoassay)

Tento test byl objeven ve Švédsku v roce 2008. Test je kombinací chromatografické separace glykosylovaných izoform erythropoetinu pomocí aglutininu z pšeničných klíčků (WGA-wheat germ agglutinin) a citlivé lateral flow analýzy pomocí černých anti-Epo nanovláken. Analýza probíhá na měrné tyčince. Rozlišení rhEpo a endogenního erythropoetinu je na základě rozdílné afinity izoform k lektinu WGA. Afinita je odlišná kvůli rozdílům v počtu terminálních zbytků sialových kyselin a poly-N-acetyl laktosaminu (LacNAc). Rekombinantní erythropoetin reaguje s WGA více než endogenní. Největší afinitu k WGA má Darbepoetin, zatímco afinita CERA je ještě nižší jak u endogenního erythropoetinu.

Vazebné komplexy izoform erythropoetinu s WGA jsou promyty sacharidem N-acetylglukosaminem (GlcNAc). GlcNAc je použit ve dvou různých koncentracích (vysoká/nízká). Při nízké koncentraci GlcNAc se vyloučí izoformy erythropoetinu s nízkou afinitou k WGA, zatímco při vysoké koncentraci se vymyjí všechny izoformy. Eluované izoformy reagují s imobilizovanými anti-Epo protilátkami značenými černými nanovláčky. Obraz, který je vyhodnocen skenerem nám udává kvantifikační hodnotu, intenzita signálu nám udává koncentraci navázaného erythropoetinu.

K analýze je možné použít sérum, plazmu nebo moč, ale je nutná imunoafinitní purifikace pomocí anti-Epo monolotických kolon. V porovnání s metodami, které jsou akreditované WADA (SAR/SDS – PAGE a IEF) je možné pomocí MAIIA analyzovat až 15 vzorků za 1 hodinu. Bohužel se ale zdá být těžší výsledky MAIIA testu interpretovat, gely jsou již na pohled průkaznější a více důvěryhodné. [38]



Obrázek 17: Kit pro MAIA analýzu. Převzato a volně přeloženo z [48].

## Závěr

Práce byla zaměřena na popis léčivé, ale bohužel i často zneužívané látky erythropoetin. V úvodu práce je kladen důraz na historii objevování příčiny zvýšeného počtu erytrocytů ve vysokých nadmořských výškách, který byl doprovázen nespočtem studií, za účelem extrakce neznámé látky. Samotná purifikace erythropoetinu a jeho syntéza znamenalo pro lidstvo velký průlom, nejen ve zdravotnictví.

Právě protože našel erythropoetin své využití i ve zdravotnictví, je další část práce věnována struktuře erythropoetinu a jeho na lidský organismus. Erythropoetin obecně navyšuje počet červených krvinek a samotná erythropoéza od navázání erythropoetinu na receptor, až po vývojovou linii erytrocytů, je složitý proces.

K léčebným účelům se užívá uměle vytvořený rekombinantní erythropoetin, kterého je více druhů, záleží na metodě získávání, molekulární hmotnosti nebo i jeho farmakokinetickém profilu. Používá se nejčastěji k léčbě anémií, které jsou způsobené různými imunitními onemocněními.

Mimo jiné našel erythropoetin své využití i ve sportu, jako dopingová látka. Díky navyšování počtu červených krvinek mohli sportovci lépe dýchat a podávat lepší výkony. Tato látka byla užívána zejména v cyklistice.

V neposlední řadě je důležitá analýza erythropoetinu. Závěr práce je zaměřen na analýzu erythropoetinu z tělních tekutin, zejména ve sportovní sféře. Analýza probíhá nejčastěji z krve a moči a využívá se elektroforetických metod k přímému průkazu rekombinantního erythropoetinu.

## SEZNAM LITERATURY

- [1] KRANTZ, SB. Erythropoietin. *Blood*. 1991, **77**(3), 419-434. doi:10.1182/blood.V77.3.419.419
- [2] THIEME, Detlef a Peter HEMMERSBACH, ed. *Doping in Sports: Handbook of Experimental Pharmacology*. 195. Berlin: Springer Science & Business Media, 2009, 540 s. ISBN 3540790888, 9783540790884.
- [3] ROBINSON, N. Erythropoietin and blood doping. *British Journal of Sports Medicine*. 2006, **40** (Supplement 1), i30-i34. doi:10.1136/bjism.2006.027532
- [4] ADAMSON, John W. *The Story of Erythropoietin* [online]. 2008 [cit. 2021-4-7]. Dostupné z: <https://www.hematology.org/about/history/50-years>
- [5] WEST, John B. a Jean-Paul RICHALET. Denis Jourdanet (1815–1892) and the early recognition of the role of hypoxia at high altitude. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013, **305**(5), L333-L340. doi:10.1152/ajplung.00128.2013
- [6] BUNN, H. F. Erythropoietin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013, **3**(3), a011619-a011619. doi:10.1101/cshperspect.a011619
- [7] STÁRKA, Luboslav a Michaela DUŠKOVÁ. Non-hematogenic activity of erythropoietin. *Vnitřní lékařství*. 2019, **65**(7-8), 515-519. doi:10.36290/vnl.2019.089
- [8] SACKS, MILTON S. ERYTHROPOIETIN. *Annals of Internal Medicine*. 1958, **48**(1). doi:10.7326/0003-4819-48-1-207
- [9] TEI, Yu-Tin. *Studies on the hematopoietic substance in blood under various conditions. III. Production of hematopoietic substance in the serum of venesected anaemic rabbit*. *J. Chosen Med. Ass*, 1938, 228: 173-174.
- [10] KRUMDIECK, N. Erythropoietic Substance in the Serum of Anemic Animals. *Experimental Biology and Medicine*. 1943, **54**(1), 14-17. doi:10.3181/00379727-54-14283
- [11] FISHER, James W. Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Experimental Biology and Medicine*. 2003, **228**(1), 1-14. doi:10.1177/153537020322800101

- [12] ERSLEV, ALLAN. Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood*. 1953, **8**(4), 349-357. doi:10.1182/blood.V8.4.349.349
- [13] JELKMANN, W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological Reviews*. 1992, **72**(2), 449-489. doi:10.1152/physrev.1992.72.2.449
- [14] BONSDORFF, EVA a EEVA JALAVISTO. A Humoral Mechanism in Anoxic Erythrocytosis. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1948, **16**(2-3), 150-170. doi:10.1111/j.1748-1716.1948.tb00535.x
- [15] JACOBSON, L. O., E. GOLDWASSER, W. FRIED a L. PLZAK. Role of the Kidney in Erythropoiesis. *Nature*. 1957, **179**(4560), 633-634. doi:10.1038/179633a0
- [16] SYTKOWSKI, Arthur J. *Erythropoietin: blood, brain and beyond*. John Wiley & Sons, 2006, 237 s. ISBN: 978-3-527-60543-9
- [17] NATHAN, David G., Eugene SCHUPAK, Frederick STOHLMAN a John P. MERRILL. Erythropoiesis in Anephric Man \*. *Journal of Clinical Investigation*. 1964, **43**(11), 2158-2165. doi:10.1172/JCI105089
- [18] MIYAKE, T., C. K. KUNG a E. GOLDWASSER. Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*. 1977, **252**(15), 5558-5564. doi:10.1016/S0021-9258(19)63387-9
- [19] JACOBS, Kenneth, Charles SHOEMAKER, Richard RUDERSDORF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985, **313**(6005), doi:10.1038/313806a0
- [20] LIN, F. K., S. SUGGS, C. H. LIN, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985, **82**(22), 7580-7584. doi:10.1073/pnas.82.22.7580
- [21] JELKMANN, Wolfgang. Molecular Biology of Erythropoietin. *Internal Medicine*. 2004, **43**(8), 649-659. doi:10.2169/internalmedicine.43.649
- [22] WENGER, Roland H.; KURTZ, Armin. Erythropoietin. *Comprehensive Physiology*, 2011, 1.4: 1759-1794. doi:10.1002/cphy.c100075



- [23] CHOI, Dongmi, Myungsoo KIM a Jongsei PARK. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1996, **687**(1), 189-199. doi:10.1016/S0378-4347(96)00308-8
- [24] JELKMANN, Wolfgang. Erythropoietin. *Sports Endocrinology*. S. Karger, 2016, 2016-6-27, 115-127. *Frontiers of Hormone Research*. doi:10.1159/000445174
- [25] MULCAHY, L. The erythropoietin receptor. *Seminars in Oncology*. 2001, **28**, 19-23. doi:10.1016/S0093-7754(01)90208-8
- [26] FOLEY, Robert N. Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. *Heart Failure Reviews*. 2008, **13**(4), 405-414. doi:10.1007/s10741-008-9083-0
- [27] KLINGMULLER, U., H. WU, J. G. HSIAO, A. TOKER, B. C. DUCKWORTH, L. C. CANTLEY a H. F. LODISH. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997, **94**(7), 3016-3021. doi:10.1073/pnas.94.7.3016
- [28] STURKIE, Paul D., ed. *Avian Physiology*. 4. New York, NY: Springer, 1986. doi:10.1007/978-1-4612-4862-0
- [29] JACOB, Jubbin J., M. Joseph JOHN, Vineeth JAISON, Kunal JAIN a Naveen KAKKAR. Erythropoietin use and abuse. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2012, **16**(2). doi:10.4103/2230-8210.93739
- [30] MOCINI, D., T. LEONE, M. TUBARO, M. SANTINI a M. PENCO. Structure, Production and Function of Erythropoietin: Implications for Therapeutical Use in Cardiovascular Disease. *Current Medicinal Chemistry*. 2007, **14**(21), 2278-2287. doi:10.2174/092986707781696627
- [31] SEMENZA, Gregg L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology*. 2001, **13**(2), 167-171. doi:10.1016/S0955-0674(00)00194-0
- [32] IVAN, M., T. HABERBERGER, D. C. GERVASI, et al. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, **99**(21), 13459-13464. doi:10.1073/pnas.192342099
- [33] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

- [34] *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie*. 2014. Praha: Česká lékařská společnost J.E.Purkyně, 1993. ISSN 1210-7921.
- [35] ŠTĚPÁNKOVÁ, S., et al. Anémie u chronického selhání ledvin. *Vnitřní lékařství*, 2011, 57.7-8: 631-634.
- [36] DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Panagiotis A. KONSTANTINOPOULOS, Joanna PAPAILIOU, Stylianos A. KANDARAKIS, Anastasios ANDREOPOULOS a Gerasimos P. SYKIOTIS. Erythropoietin Abuse and Erythropoietin Gene Doping. *Sports Medicine*, 2005, **35**(10), 831-840. doi:10.2165/00007256-200535100-00001
- [37] CATLIN, Don H., Caroline K. HATTON a Françoise LASNE. Abuse of recombinant erythropoietins by athletes. *Erythropoietins and Erythropoiesis*. Basel: Birkhäuser-Verlag, 2006, 205-227. Milestones in Drug Therapy MDT. doi:10.1007/3-7643-7543-4\_13
- [38] SALAMIN, Olivier, Tiia KUURANNE, Martial SAUGY a Nicolas LEUENBERGER. Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018, **464**, 75-87. doi:10.1016/j.mce.2017.01.033
- [39] BRISSONNEAU, Christophe. The 1998 Tour De France: Festina, from scandal to an affair in cycling. In: *Routledge handbook of drugs and sport*. Routledge, 2015. p. 181-192. doi: 10.4324/9780203795347.ch15
- [40] MOORE, Eric. Did Armstrong Cheat? *Sport, Ethics and Philosophy*. 2017, **11**(4), 413-427. doi:10.1080/17511321.2017.1292306
- [41] HAMILTON, Tyler a Daniel COYLE. *The Secret Race: Inside the Hidden World of the Tour de France: Doping Cover-ups, and Winning at All Costs*. New York: Bantam Books, 2012. ISBN 0345530411.
- [42] REICHEL, Christian. Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, **401**(2), 463-481. doi:10.1007/s00216-011-5116-y

- [43] ŠTAUD, František. Molekulární farmakologie látek stimulujících erytropoézu. *Remedia* [online]. Hradec Králové, 2007, 2007, **2007**(5), 485-494 [cit. 2021-7-3]. ISSN 2336-3541. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Molekularni-farmakologie-latek-stimulujicich-erytropoezu/6-F-iw.magarticle.aspx>
- [44] Bioinformatic tools. *GenScript* [online]. [cit. 2021-7-3]. Dostupné z: <https://www.genscript.com/molecular-biology-glossary/2923/tetra-antennary>
- [45] Co je HIV/AIDS? *HIV prevence* [online]. 2014 [cit. 2021-7-3]. Dostupné z: <https://www.hiv-prevence.cz/co-je-hiv-aids.html>
- [46] Dráhový cyklista Rybín dopoval, po trestu za EPO ukončil kariéru. *Idnes.cz* [online]. 2015 [cit. 2021-7-3]. Dostupné z: [https://www.idnes.cz/sport/cyklistika/cyklista-rybin-dopoval-po-trestu-za-epo-ukoncil-karieru.A150918\\_140139\\_cyklistika\\_tof](https://www.idnes.cz/sport/cyklistika/cyklista-rybin-dopoval-po-trestu-za-epo-ukoncil-karieru.A150918_140139_cyklistika_tof)
- [47] WADA Technical Document – TD2021EPO. *World Anti-doping Agency* [online]. 2021 [cit. 2021-7-3]. Dostupné z: [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2021epo\\_final\\_eng\\_v\\_2.0.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2021epo_final_eng_v_2.0.pdf)
- [48] EPO Analysis. *MAIIA* [online]. [cit. 2021-7-3]. Dostupné z: [http://maiiadiagnostics.com/?page\\_id=71](http://maiiadiagnostics.com/?page_id=71)