

## Peptidové hormóny, rastové faktory, príbuzné látky a mimetiká

Trvalo zakázané látky tejto skupiny majú variabilnú chemickú štruktúru a široké spektrum účinkov. Vo všeobecnosti ide najmä o krátke peptidy a proteíny, ktoré sa v ľudskom organizme prirodzene produkujú. Plnia úlohu chemických poslov, ktoré modulujú syntézu ďalších látok s potenciálne stimulačným účinkom. Podľa štatistiky WADA boli látky tejto skupiny v priebehu roka 2017 zistené v 130 prípadoch dopingov, čo tvorí približne 3 % všetkých pozitívnych dopingových nálezov.

Základnú charakteristiku erythropoetínu (EPO) a rastového hormónu, ktoré sú najznámejšími zástupcami tejto skupiny si môžete prečítať tu:

[https://www.antidoping.sk/data/files/379\\_s2-erythropoetin.pdf](https://www.antidoping.sk/data/files/379_s2-erythropoetin.pdf)

[https://www.antidoping.sk/data/files/433\\_s2-rastovy-hormon.pdf](https://www.antidoping.sk/data/files/433_s2-rastovy-hormon.pdf)

Bližšie sa budeme venovať:

- EPO a vývoju jeho rekombinantných foriem
- modifikovanému erythropoetínu (CERA)
- EPO mimetikám
- rastovému hormónu (GH) a jeho fragmentom
- hormónu uvoľňujúcemu rastový hormón (GHRH) a jeho analógom
- peptidom uvoľňujúcim rastový hormón (GHRPs)
- sekretagómom rastového hormónu (GHS), ghrelínu a jeho mimetikám

S.2 Peptide Hormones, Growth Factors and Related Substances	Occurrences	% within drug class
erythropoietin (EPO)	62	48%
methoxy polyethylene glycol-epoetin beta (CERA)	21	16%
human Chorionic Gonadotrophin (hCG)	15	12%
ibutamoren	11	8%
luteinizing hormone (LH)	8	6%
GHRP-2 (Pralmorelin)	5	4%
molidustat	2	2%
GHRP-6	2	2%
darbepoetin (dEPO)	2	2%
ipamorelin	2	2%
<b>TOTAL*</b>	<b>130</b>	

Nepriaznivé analytické nálezy skupiny S.2 (peptidové hormóny, rastové faktory, príbuzné látky a mimetiká) za rok 2017

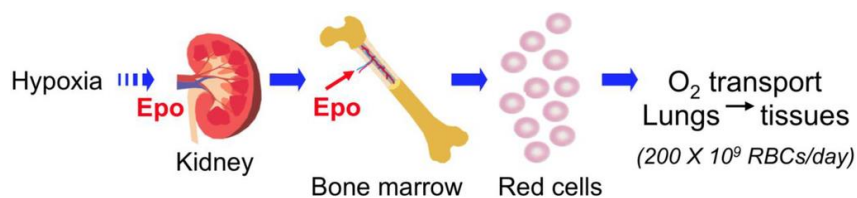
## Erytropoetín

Erytropoetín je glykoproteínový hormón zodpovedný za reguláciu erytropoézy. Väzbou na svoj receptor lokalizovaný na membráne prekursorových buniek spustí kaskádu reakcií, ktorých výsledkom je stimulácia proliferácie a diferenciácie erytroidných prekursorov v kostnej dreni. Primárnym stimulom pre syntézu EPO je zníženie parciálneho tlaku kyslíka v krvi. Počas embryonálneho vývoja je EPO syntetizovaný prevažne v pečeni, a po narodení v peritubulárnych bunkách kortexu obličiek. Pre zachovanie fyziologického počtu erytrocytov je erytropoetín v malých množstvách vylučovaný neustále. Denne sa tak vyprodukuje zhruba 200 miliárd červených krviniek.

Nedostatok erytropoetínu je primárnou príčinou anémie spojenej s chronickým zlyhávaním obličiek. V takom prípade je nutná substitučná terapia rekombinantným erytropoetínom alebo inou látkou stimulujúcou erytropoézu.

V roku 1984 sa podarilo izolovaný EPO gén exprimovať v ovariálnych bunkách čínskeho škrečka, čo umožnilo vývoj prvého rekombinantného erytropoetínu ako liečiva. Prvý rekombinantný EPO (rHuEPO), epoetín alfa bol vyrobený spoločnosťou Amgen a predávaný ako Epogen od roku 1989 (prvá generácia rHuEPO). Vzhľadom na biologický polčas (cca 8 hodín) bolo na udržanie primeraných hladín hemoglobínu nevyhnutné jeho časté dávkovanie. Novodobé rekombinantné EPO sú vyvinuté so zmenenými štruktúrami, predlžujúcimi eliminačný polčas, čo umožňuje znížiť dávkovanie na 1x týždenne až 1x mesačne.

Cieľom farmakoterapie je dosiahnutie hladiny hemoglobínu 110 až 120 g/l (hematokrit 0,33–0,36). Okrem zlyhania obličiek sa dnes erytropoetín klinicky používa i v ďalších indikáciách, ako napr. prevencia anémie u pacientov s nádorovým ochorením, ktorí podstupujú chemoterapiu, u pacientov s AIDS liečených zidovudinom, u pacientov s hepatitídou C alebo pred závažnými chirurgickými zákrokmi.

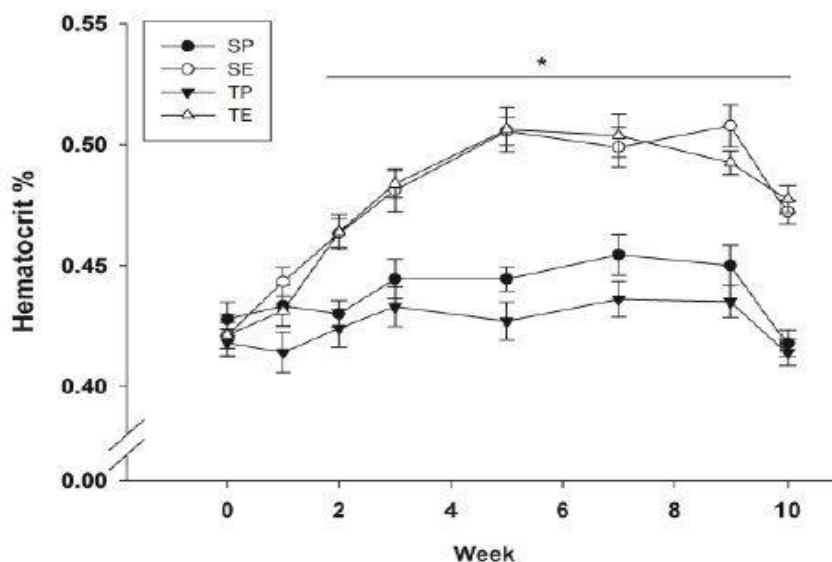


Mechanizmus tvorby a účinku erytropoetínu

Humánny rekombinantný erytropoetín i ďalšie látky stimulujúce erytropoézu sú obvykle dobre znášané, s minimom nežiaducich účinkov. Závažným, ale vzácnym vedľajším účinkom je produkcia protilátok erytropoetínu spôsobujúcich úplnú apláziu červených krviniek.

Cieľom zneužívania EPO športovcami je zlepšenie vytrvalosti a zníženie času potrebného na regeneráciu. Nárast počtu červených krviniek zvýši transport kyslíka z pľúc do tkanív (svalov), a taktiež zvýši export oxidu uhličitého. Štúdiá na zdravých dobrovoľníkoch potvrdila zvýšenie  $VO_{2max}$  (maximálna rýchlosť spotreby kyslíka) o 6-12%. Vysoké množstvo erytrocytov (vysoké hodnoty hematokritu) spôsobí zvýšenie viskozity krvi, čím sa zníži prietok krvi v cievach, a v dôsledku toho môže dôjsť k trombóze, či mozgovej príhode.

S príchodom rekombinantného erytropoetínu v 90. rokoch 20. storočia sa doping autológnou a homológnou transfúziou krvi čiastočne nahradil injekčným podávaním rHuEPO. V tom čase neexistoval žiadny spôsob ako ho vo vzorkách priamo detegovať. Až v roku 2000 bol vedcami vo francúzskom národnom antidopingovom laboratóriu vypracovaný test na detekciu rHuEPO, ktorý následne schválila aj WADA.



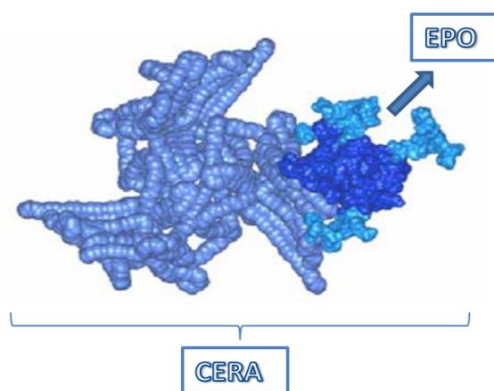
Hodnoty hematokritu počas 10 týždňov za daných okolností: (SP = bez tréningu + placebo, SE = bez tréningu + EPO, TP = tréning + placebo, TE = tréning + EPO)

Rekombinantný EPO je dnes možné detegovať v krvi aj v moči, a jeho zneužívanie možno odhaliť aj na základe odchýlok krvného modulu v biologickom pase športovca.

O mechanizme účinku erytropoetínu, jeho chemickej štruktúre, vedľajších účinkoch a športoch v ktorých sa najviac zneužíva si môžete prečítať tu: [https://www.antidoping.sk/data/files/379\\_s2-erythropoetin.pdf](https://www.antidoping.sk/data/files/379_s2-erythropoetin.pdf)

### CERA – 3. generácia rHuEPO

CERA (Continuous erythropoietin receptor activator), kontinuálny aktivátor EPO receptorov je 3. generáciou ľudského rekombinantného erytropetínu. Z hľadiska chemickej štruktúry je CERA rekombinantný EPO viazaný na polyetylén glykol (metoxyetylén glykol-epoetín beta), ktorý priniesla na trh švajčiarska firma Roche pod názvom lieku MICERA s indikáciou na liečbu symptomatickej anémie spojenej s chronickým ochorením obličiek. Tento liek sa podáva vo forme injekcie subkutánne alebo intravenózne, a na Slovensku je dostupný od roku 2008.



Štruktúra metoxypolyetylén glykol-epoetín beta (CERA)

V porovnaní s predošlými generáciami má CERA predĺžený biologický polčas (cca 6 dní) i samotný mechanizmus účinku, čím sa zabezpečí nepretržitá stimulácia receptorov pre EPO. Pre pacientov to znamená zníženie počtu aplikovaných injekcií (cca raz mesačne) a nižšie náklady na zdravotnú starostlivosť.

Aj keď si športovci mysleli, že pri menej frekventovanom podávaní CERA je nižšia šanca na odhalenie dopingu touto látkou, opak je však pravdou. Predĺžený biologický polčas predĺžil aj detekčné okno, a navyše prostredníctvom spolupráce WADA s firmou Roche bola už počas vývoja lieku úspešne vyvinutá metóda detekcie CERA v moči aj krvi. V súčasnosti možno na odhalenie dopingu touto látkou využiť metódy izoelektrickej fokusácie, imunochemickú metódou ELISA, kvapalinovú chromatografiu s hmotnostnou spektrometriou alebo elektroforetické techniky. Podľa štatistiky WADA bolo v priebehu roka 2017 zistených 62 prípadov dopingu EPO, 21 prípadov dopingu CERA a 2 prípady dopingu darbepoetínom (2. generácia rHuEPO).

Nežiaduce účinky CERA a iných rekombinantných erytropoetínov sú: príznaky podobné chrípke, alergické a anafylaktické reakcie, hyperviskozita krvi, zvýšené riziko trombózy, hypertenzia, či aplázia červených krviniek po vytvorení autoprotílátok.

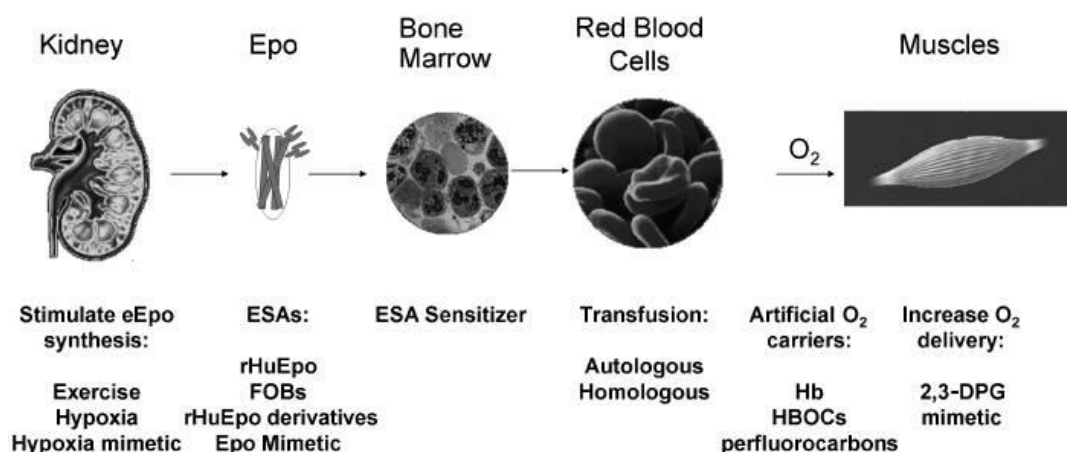
Pozitívny test na CERA mali v minulosti najmä atléti a cyklisti (napr. Rashid Ramzi, Riccardo Ricco, Bernhard Kohl, Erik Tysse, Davide Rebellin).

## EPO mimetiká

EPO mimetické peptidy (EPO mimetiká) sú syntetické cyklické peptidy, ktoré nevykazujú žiadnu sekvenčnú homológiu s EPO, ale dokážu sa viazať na EPO receptor, aktivovať ho a stimulovať tak syntézu EPO. Spolu s hypoxiou indukovateľnými faktormi (HIFs) patria k látkam stimulujúcim erytropoézu.

Najznámejšou a klinicky najvyspelejšou látkou tejto skupiny je peginesatid, známy aj pod názvami Omontys alebo Hematide. Štruktúrne ide o syntetický homodimér dvoch EPO mimetických peptidov viazaných s polyetylénglykolom, ktoré sa podobajú ľudskému EPO. Peginesatid bol vyvinutý na liečbu anémie spojenej s chronickým ochorením obličiek pre dospelých pacientov podstupujúcich dialýzu. Dve randomizované kontrolované štúdie uverejnené v roku 2013 zistili, že účinnosť peginesatidu je porovnateľná s darbepoetínom (2. generácia rHuEPO), avšak oproti darbepoetínu prináša liečba peginesatidom zvýšené riziko kardiovaskulárnych príhod i úmrtia. Vzhľadom na predĺžený biologický polčas sa peginesatid podáva intravenózne alebo subkutánne v dávke 0,03 - 0,1 mg/kg telesnej hmotnosti cca raz mesačne.

Nakoľko peginesatid nemá homologickú sekvenciu aminokyselín s EPO, bolo nutné vyvinúť nové analytické postupy a metódy na jeho detekciu vo vzorkách. Za posledné roky boli úspešne validované a aplikované metódy na jeho detekciu v krvi, moči i sére (napr. ELISA, LC-MS/MS).



Metódy používané na zvýšenie transportu kyslíka.

## Rastový hormón a jeho fragmenty

Ľudský rastový hormón (hGH) je peptidový hormón, ktorý sa v organizme prirodzene syntetizuje v prednej časti hypofýzy. Kolísajúce hladiny hGH v krvi sú spôsobené jeho nepravidelnou sekréciou do krvného obehu, ktorá závisí od veku, pohlavia, spánku, fyzickej aktivity, stravy, stresu či životného prostredia.

hGH je komplexnou kombináciou rôznych molekulárnych foriem (izoforiem), vrátane hlavnej 22-kDa formy, minoritných izoforiem (napr. 20-kDa forma) alebo môže existovať aj v podobe agregátov izoforiem (napr. diméry a oligoméry). Po sekrécii do krvného obehu má 22-kDa hGH biologický polčas 10-20 minút a ovplyvňuje metabolizmus bielkovín, tukov, uhl'ohydrátov a minerálov. Hlavnou úlohou hGH je stimulácia pečene k vylučovaniu inzulínu podobnému rastovému faktoru-I (IGF-I), ktorý sa viaže na IGF-1 receptory, prítomné takmer vo všetkých tkanivách, čím stimuluje rast a delenie buniek.

Účinky hGH na tkanivá sa dajú všeobecne opísať ako anabolické. Okrem stimulácie syntézy proteínov a rastu svalovej hmoty zároveň zvyšuje mineralizáciu kostí, glukoneogézu v pečeni, ďalej podporuje lipolýzu a stimuluje imunitný systém.

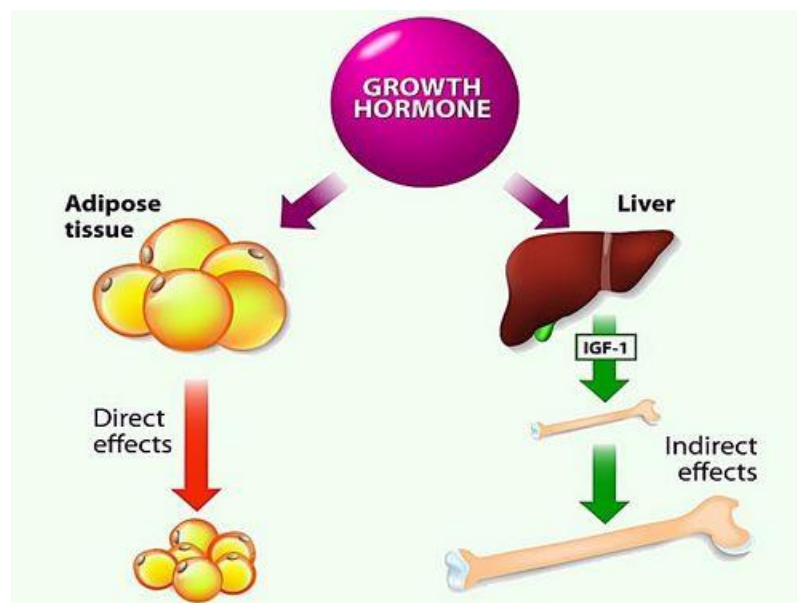


Schéma účinku rastového hormónu na kostné a tukové tkanivo.

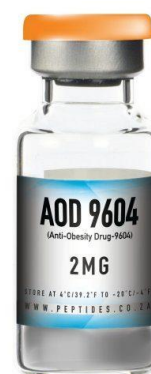
Pre vyššie uvedené účinky sa rekombinantný rastový hormónom (GH) používa v športe ako látka zvyšujúca výkon. Detekcia dopingu GH je náročná z niekoľkých dôvodov: podobnosť exogénneho GH s endogénnym hGH, krátky biologický polčas, veľmi nízka miera vylučovania močom.

Na odhalenie dopingu GH je v súčasnosti k dispozícii izoformový a biomarkerový test. Izoformový test využíva rozdiel medzi rekombinantným GH (čistý 22K-GH) a heterogénnou povahou endogénneho hGH (niekoľko izoforiem). Jeho hlavným obmedzením je krátka doba detekcie (~ 12-24 hodín po poslednej dávke GH). Biomarkerový test je založený na detekcii IGF-I a kolagénu III, ktorých hladiny sa po externom podaní GH zvýšia. GH je možné týmto testom detegovať cca 1 - 2 týždne od podania.

Zneužívania GH vedie k náležitým a častokrát k život ohrozujúcim nežiaducim účinkom. O najznámejších prípadoch dopingu GH, o najviac ovplyvnených športoch kde sa GH zneužíva, i o jeho nežiaducich účinkoch si môžete prečítať tu: [https://www.antidoping.sk/data/files/433\\_s2-rastovy-hormon.pdf](https://www.antidoping.sk/data/files/433_s2-rastovy-hormon.pdf)

Vedci zistili, že účinky hGH zodpovedné za metabolizmus tukov sú kontrolované malou oblasťou blízko jedného konca molekuly hGH. Táto oblasť pozostávajúca z aminokyselín 176-191 tvorí menej ako 10% celkovej veľkosti molekuly hGH. Peptidový fragment hGH 176-191 (známy aj ako AOD-9604) C-konca ľudského rastového hormónu, do ktorého sa na N-terminálnom konci pridá tyrozín funguje tak, že napodobňuje spôsob, akým prírodný hGH reguluje metabolizmus tukov, ale bez vedľajších účinkov na hladinu cukru v krvi alebo rast, ktorý sa prejavuje pri nemodifikovanom hGH. In vivo účinky syntetického peptidu GH 176-191 (AOD-9604) potvrdili stimuláciu lipolýzy, inhibíciu lipogenézy, a taktiež boli pozorované priaznivé regeneračné vlastnosti chrupaviek.

AOD-9604 bol pôvodne vyrobený v Melbourne profesorom Frankom Ng ako potenciálny liek proti obezite. Zakázaná látka AOD-9604 je stále klinickom vývoji, a zatiaľ nebola schválená na terapeutické použitie. Na čiernom trhu je však voľne dostupná spolu inými zakázanými látkami tejto skupiny. AOD-9604 sa podáva intramuskulárnou alebo subkutánnou injekciou 2 až 6 IU (500 až 1 000 µg) rozdelená na 2 až 3 dávky - jedna ráno pred raňajkami, druhá dávka po tréningu a tretia pred spaním. K vedľajším účinkom patrí napr. nadmerná potreba spánku alebo nespavosť.



Vo výskume existuje nespočetné množstvo týchto peptidov. S pokrokom technológií, biochémie a priemyselnej výroby peptidov sa vyhľadávajú špecifické faktory na ovplyvnenie metabolizmu a funkcie najmä svalových a nervových buniek.



## Hormón uvoľňujúci rastový hormón (GHRH) a jeho analógy

V doslovnom preklade z anglického growth hormone-releasing hormone je to rastový hormón uvoľňujúci hormón (GHRH), tiež známy pod INN názvom ako somatorelín. GHRH pozostávajúci zo sekvencie 29 aminokyselín je produkovaný hypotalamom a väzbou na svoje receptory v hypofýze stimuluje uvoľňovanie endogénneho rastového hormónu hGH. GHRH má množstvo štrukturálnych a funkčných analógov, ako napr. Pro-Pro-hGHRH (1-44) -Gly-Gly-Cys, CJC-1293, a CJC-1295.

Pre dosiahnutie účinkov dopingu sa rekombinantný GHRH a jeho analógy často používajú namiesto rekombinantného rastového hormónu (rGH). Podávanie GHRH a ďalších faktorov uvoľňujúcich ľudský rastový hormón, zároveň maskuje detekciu zneužívania rekombinantného rastového hormónu pri analýze izoformovým testom. Okrem odhalenia dopingu či už GHRH alebo iných faktorov uvoľňujúcich ľudský rastový hormón pomocou nepriameho testu biomarkerov hGH, vyvinuli antidopingové laboratória aj metódu detekcie na základe hmotnostnej spektrometrie. Práve pomocou tejto metódy bolo odhalených a hlásených niekoľko nepriaznivých analytických nálezov.

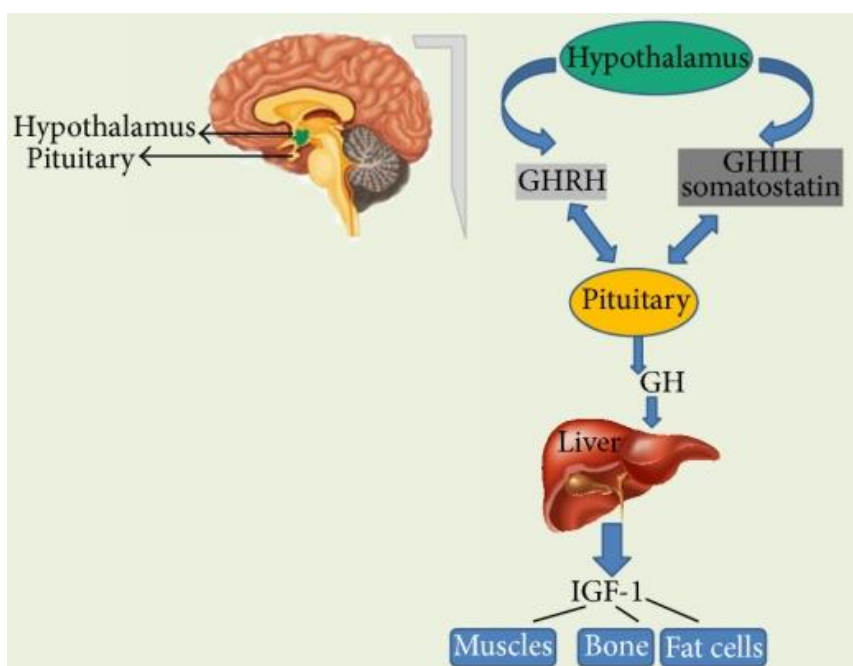


Schéma pôsobenia hormónu uvoľňujúceho rastový hormón (GHRH).

Mnohé analógy GHRH sú stále predmetom výskumu, aj keď niektoré už majú špecifické terapeutické alebo diagnostické použitie, napr. sermorelín - funkčný peptidový fragment GHRH sa používa pri diagnostike sekrécie rastového hormónu. Tesamorelín bol pod obchodným názvom Egrifta v roku 2010 schválený na liečbu lipodystrofie spojenej s HIV. Nežiaduce účinky užívania GHRH a jeho analógov sú podobné ako pri podávaní samotného rGH.

## Peptidy uvoľňujúce rastový hormón (GHRPs)



Peptidy uvoľňujúce rastový hormón (GHRPs) sú krátke syntetické peptidy (pod 1 kDa), ktoré majú schopnosť stimulovať sekréciu ľudského rastového hormónu (hGH) väzbou na receptor ghrelínu. V dôsledku toho je možné pozorovať rôzne účinky, vrátane zvyšovania výkonnosti, čo je pri zneužívaní týchto látok športovcami najžiadanejšie.

S úmyslom terapeutického použitia bolo vyvinutých niekoľko GHRPs. Prvý hexapeptid objavený vďaka empirickým a teoretickým štúdiám s in vitro a in vivo aktivitou bol GHRP-6. Charakteristickým znakom GHRPs je prítomnosť skupín D-aminokyselín, ktoré stabilizujú štruktúru peptidov pred degradáciou v plazme. Od začiatku 80. rokov 20. storočia sa zaznamenávali dôkazy ktoré naznačovali neočakávané farmakologické kardioprotektívne a cytoprotektívne vlastnosti GHRPs. Najznámejšie peptidy uvoľňujúce rastový hormón (GHRPs) sú: GHRP-1, -2, -4, -5, -6, hexarelin, alexamorelin a ipamorelin.

Na terapeutické použitie je schválený jediný GHRPs - pralmorelin (GHRP-2), ktorý sa v Japonsku používa pri diagnostike nedostatku hGH. Napriek tomu sa GHRPs predávajú prostredníctvom internetu, čo využívajú najmä športovci silových a rýchlostných športov. Po intravenóznom, subkutánnom, intranazálnom aj perorálnom podaní sú GHRPs biologicky dobre dostupné. Na čiernom trhu sa môžu objaviť aj nové analógy už známych GHRPs. Aj malá modifikácia štruktúr GHRPs ich robí v podstate nezistiteľnými, pretože súčasné analytické stratégie antidopingových laboratórií sú založené hlavne na cielej analýze. Analytické metódy na detekciu a jednoznačnú identifikáciu peptidov uvoľňujúcich rastový hormón využívajú najmä kvapalinovú chromatografiu v spojení s hmotnostnou spektrometriou. Na rozdiel od detekcie rGH sa GHRP detegujú vo vzorkách moču.

V roku 2019 mal pozitívny test na anastrozol, GHRP-2 a GHRP-6 americký bojovník zmiešaných umení Clarence Byron Dollaway, za čo dostal 2 roky zákazu činnosti.



Clarence Byron Dollaway

## Sekretagógy rastového hormónu (GHS), ghrelín a jeho mimetiká

Sekretagógy rastového hormónu (GHS) sú skupinou štruktúrne rozmanitých chemických zlúčenín, ktoré sa viažu na špecifické GHS receptory v hypotalame a hypofýze so stimulačným účinkom na sekréciu rastového hormónu (GH). Endogénnym ligandom (prirodzene produkovaný organizmom) GHS receptorov je 28-aminokyselinový peptid ghrelín, ktorý bol v roku 1999 izolovaný z gastrointestinálneho traktu. Jeho pomenovanie tiež predstavuje skratku **g**rowth **h**ormone-**r**eleasing peptid, pre schopnosť uvoľňovať rastový hormón (GH) z adenohipofýzy. Okrem toho stimuluje aj sekréciu adrenokortikotropného hormónu (ACTH) a prolaktínu (PRL). Terapeuticky sa používa pri diagnostike deficitu GH alebo aj ako anabolická liečba kachexie.

Ghrelín vykazuje aj niekoľko neendokrinných účinkov, napr. modulácia metabolizmu glukózy a lipidov, regulácia gastrointestinálnej motility, chuti do jedla, imunitnej funkcie, ochrana neuronálnych a kardiovaskulárnych buniek.

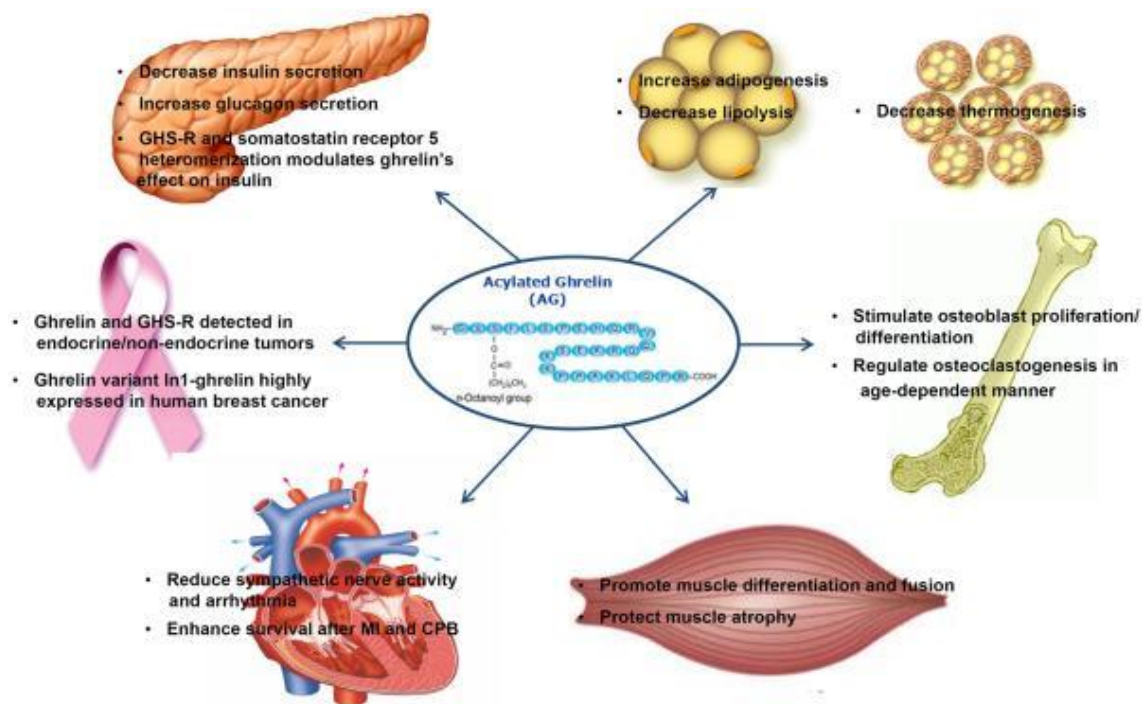


Schéma účinkov ghrelínu.

Postupne boli vyvinuté mimetiká ghrelínu (napr. anamorelín, ipamorelín, tabimorelín), pôsobiace ako agonisty ghrelínových receptorov so schopnosťou vyvolať sekréciu GH. Podobne ako u GHRPs aj detekcia GHS sa vykonáva zo vzoriek moču separačnými metódami v spojení s hmotnostnou spektrometriou.

Sekretagógy GH, hormón uvoľňujúci rastový hormón a jeho analógy spolu s peptidmi uvoľňujúcimi GH patria k faktorom uvoľňujúcim ľudský rastový hormón (GHRF).

Všetky tieto látky indukujú sekréciu endogénneho hGH adenohipofýzou a podobne ako rastový hormón aj GHRF môžu znižovať množstvo telesného tuku a zvyšovať svalovú hmotu a silu. Pri ich zneužívaní športovcami ide o tzv. nepriamu formu dopingu rastovým hormónom. GHRF je možné podávať intravenózne, subkutánne, intranazálne, bukkálne alebo perorálne, v závislosti od liekovej formy jednotlivých látok. Výrobky s obsahom GHRF sú ľahko dostupné na čiernom trhu aj napriek tomu, že väčšina z nich nie je schválená na humánne použitie.

Podľa štatistiky WADA bolo v roku 2017 zistených 19 prípadov dopingu faktormi uvoľňujúcimi hGH.

### **Growth Hormone Releasing Factors (GHRFs)**

	<b>Samples</b>	<b># of Sports</b>	<b># of TAs</b>	<b>AAFs</b>
<b>2017</b>	57,869	119	218	19
<b>2016</b>	49,358	111	207	15
<b>2015</b>	21,727	88	154	14
<b>2014</b>	1,804	41	18	6

Štatistika množstva testovaných vzoriek a pozitívnych prípadov dopingu faktormi uvoľňujúcimi ľudský rastový hormón v rokoch 2014 – 2017.