

Sporda Gen Dopingi

Şengül TURAL¹, Ercan TURAL², Nurten KARA¹, Seydi Ahmet AĞAOĞLU²

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Tıbbi Genetik BD, Samsun.

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yaşar Doğu Beden Eğitimi ve Spor Yüksek Okulu, Samsun.

ÖZET

Genetik teknolojiler ve bu alandaki gelişmeler hızla ilerlemeye devam ederken olası suiistimalleri de beraberinde getiriyor. Yapılan hayvan deneyleriyle oluşturulan “süper fare” modellerinin ardından artık genetiği değiştirilmiş sporcular (GDS) terimi gündemdedir. 2001’den bu yana gen dopingi konusu tartışılmaktadır. 2003 yılında Uluslararası Olimpiyat Komitesi (IOC) tarafından yasaklı maddeler ve metotlar listesine eklenmiş, 2004 yılından itibaren de Dünya Anti Doping Ajansı (WADA) tarafından uluslararası yasaklı maddeler ve metotlar listesine eklenmiştir. Bu çalışmada, gen dopingi terimi tanımlanmış ve bu yöntemde kullanılabilecek aday genler [eritropoetin (EPO), Peroksizom proliferator-aktivasyonlu reseptör gama (PPAR- γ), fosfoenolpirüvat karboksikinaz (PEPCK), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), myostatin, follistatin kemik morfogenezik protein (BMP), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyotensin I–dönüştürücü enzim (ACE), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), aktinin bağlayıcı protein 3 (ACTN3) ve endorfinler] hakkında bilgi verildikten sonra hücre içi (in vivo) ve hücre dışı (in vitro) gen dopingi metotları açıklanmıştır. Daha sonra gen dopingi tespit yöntemlerinin ifade profileme, bağışıklık değerlendirilmesi, aktarılan vektör ve gene yanıt, transgen ve endojen gen arasındaki yapısal farklılıklar, DNA barkodları, doku spesifik testler ve promotor/ligand uyandırılabilir promotorlar uygulanabilirliği açısından birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Son olarak da gen dopinginin tespiti bu uygulamayı önleyici tedbirler ve gen dopinginin etik yönleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gen tedavisi, gen dopingi, spor

Gene Doping in Sport

ABSTRACT

As genetic technologies continue to progress at a rapidly, these developments bring on some potential misuses together. After created “super mouse” models by animal experimental studies the term of genetically modified athletes (GMA) was popular. The discussion on gene doping was initiated in June 2001. The International Olympic Committee (IOC) has included the method of gene doping in their list of prohibited classes of substances and prohibited methods in 2003. In 2004, World Anti Doping Agency (WADA) prohibited the method of gene doping also. In this review, firstly gene doping and related genes [eg. erythropoietin (EPO), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), insulinlike growth factor 1 (IGF-1), myostatin, follistatin, bone morphogenic protein (BMP), vascular endothelial growth factor (VEGF), angiotensin I–converting enzyme (ACE), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), Actinin binding protein 3 (ACTN3) and endorphins] were described, and following in vitro and in vivo gene doping methods were introduced. Then the possible health risks of using gene doping methods were defined. The detection methods of gene dopings (expression profiling, assessment of the immune response to the gene delivery vector, determination of structural differences between the transgene and the endogenous one, DNA Barcodes and assay for tissue-specific promoters/ligand inducible promoters) were compared. Finally, preventive measures and ethical aspects of gene doping were discussed.

Key Words: Gene therapy, gene doping, sport

GİRİŞ

Gen dopingi; hücrelerin, genlerin ve genetik elementlerin tedavi edici olmayan kullanımı ve gen ifadesinin ayarlanması ile sporcu performans kapasitesinin artırılmasıdır (31). Gen dopingi, sporcuya yarışmada avantaj sağlaması amacıyla gen tedavisi prensiplerinin uyarlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Gen tedavisi, ciddi hastalıkların tedavisinde kullanılan bir tekniktir. Teorikte vücutta var olan tüm proteinlerin düzeyi gen tedavisi kullanımıyla değişebilir (11). Bu yöntemlerin farklı yönde kullanımı dopingin farklı bir formunu “gen dopingi”ni oluşturmuştur.

Gen dopingi tartışmaları Haziran 2001’de başlamıştır. IOC (International Olympic Commity) Tıp komitesi tarafından başlatılan çalışmalar gen tedavisi ve onun spor üzerine etkilerini incelemektedir. Bu komite etik olarak kabul edilebilir metotları kullanmak için gerekli prosedürleri oluşturabileceklerini ve kötüye kullanımı takip edebileceklerini ifade etmiştir (8). IOC, 1 Ocakta 2003’te yasaklı metotlar ve modeller sınıfına gen dopingini de ekledi. 2004 başında, Dünya Anti Doping Ajansı (WADA) her yıl güncellenen uluslararası doping listesini yayınlama sorumluluğunu almıştır. Bu listede gen dopingini kapsayan metot “hücrelerin, genlerin ve genetik elementlerin tedavi edici olmayan kullanımı ve gen ifadesinin ayarlanması

ile sporcu performans kapasitesinin artırılması yasaktır” şeklinde ifade edilir (27).

Bu çalışmanın amacı, gen dopingi metodolojisiyle birlikte, ilgili genler ve uygulanması hakkında bilgi vermek ve ayrıca gen dopinginin; riskleri, tespit yöntemleri ve etik yönlerini tartışmaktır.

Genler ve Sporcular

İnsan genomu bireyin tüm genetik bilgilerini içerir. Bu bilgi her bir hücrenin çekirdeğinde var olan 23 çift kromozom tarafından taşınır. Kromozomlar, DNA ve proteinlerin paketlenmiş formudur. DNA, adenin, guanin, sitozin ve timin adı verilen dört baz içeren çift sarmal yapıdadır. Genetik bilgi nükleotid zincirlerindeki bazların dizilimi ile belirlenir. Bu dizi, özel bir proteini, enzimleri ya da yapısal proteini oluşturan aminoasit sırasını verir. Özel bir proteini elde etmek için gerekli bilgi dizini “gen” olarak adlandırılır. Yaklaşık 30.000 farklı genden oluşan insan genomu, çeşitli hastalıkların önlenmesine ve teşhisine imkân sağlar.

Bir mili 4dk.’nın altında koşan ilk kişi Sir Roger Bannister’a ait olan “sporcular eşit doğmazlar” sözü tartışmalı olmakla birlikte, insanların etnik kökenleri bazen diğerine göre avantaj gibi görülebilmektedir. Örneğin, Batı Afrikalı koşucular kısa mesafelerde başarılı iken Doğu Afrikalılar maratonda başarılıdır. Diğer yandan Asyalılar ise yüzmede başarılıdır. Bu genomik çağda kişilerin belirli sporlara yatkınlığında rol alan genlerin açıklanması ve bu yöndeki genetik çalışmalar aydınlatıcı olacaktır (27). Erken yaşta yapılacak genetik tarama bir çocuğa özel bir sporda gelişme ve özel antrenman programlarının düzenlenmesinde büyük bir potansiyel sağlayacaktır. Diğer yandan sporculara uygulanacak genetik tarama testleri, genetik yatkınlıklarının artırılması ya da geliştirilmesi için özel antrenman metodlarının seçimini sağlayacaktır.

Gen Dopingi Metodu

Gen tedavisi; hastalıkların ya da bozuklukların engellenmesinde kullanılan insan hücrelerine genetik materyal transfer etmek olarak tanımlanabilir. Gen tedavisinin prensibi; anormal gen ya da eksik geni telafi edecek tedavi edici geni hücreye gönderme temeline dayanır (2,11,25). Gen tedavisinde amaç, hasta kişide genetik mutasyonun neden olduğu hastalığı iyileştirmek amacıyla fonksiyonel bir genin ifadesini yönetmektir. İdeal bir gen tedavisi DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) gibi tek gen hastalıklarında fonksiyonel olmayan ya da bozuk gen ürünü oluşumu görülen hastalıklarda uygulanır. DMD’de distrofin geninde

oluşan mutasyon, distrofin proteininin az miktarda üretilmesi, hiç üretilmemesi ya da bozuk fonksiyonlu üretimine neden olur. Klasik gen tedavisinde, bu kişide fonksiyonel olarak normal distrofin proteinini üreten distrofin geni, hastaya aktarılır. Tek gen hastalıklarında temel yaklaşım budur. Günümüzdeki tedavisinde ise kanserde olduğu gibi genin ifadesi kontrol edilir (10,28). Genin alıcı hücreye tanıtılmasında biyolojik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere üç yol kullanılır (3).

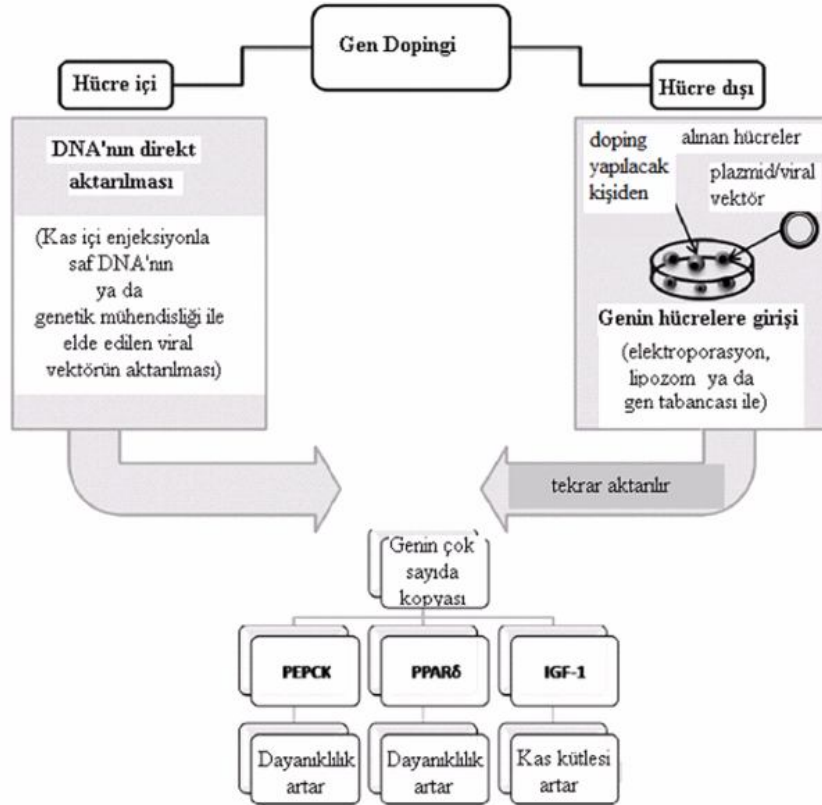
Gen dopingi de gen tedavisinde olduğu gibi hedef genin konak hücreye aktarılması şeklinde gerçekleştirilir ve genin ifadesinin ayarlanması sağlanır. Gen tedavisi hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş bir yöntem olmasına karşın, bu yöntem gen dopingi adı altında sağlıklı sporcularda performansın artırılması yönünde de kullanılmaktadır (25). Sporcuya hedef genin tanıtılması in vivo (hücre içi) ya da in vitro (hücre dışı) metotla uygulanabilir (1,28).

Hücre içi gen dopingi metodunda hedef gen, sporcu vücuduna direkt olarak biyolojik (viral vektör), kimyasal (lipozomlar) ya da fiziksel metotlarla (enjektör ya da gen tabancasıyla direkt enjeksiyon) tanıtılabilir. Şekil 1’de gen dopinginde uygulanan hücre içi ve hücre dışı yöntemler görülmektedir. Hücre dışı (in vitro) yöntemde, gen dopingi yapılacak kişiden alınan hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılır ve vektör aracılığıyla aktarılmak istenen genler bu hücrelere nakledilir. Daha sonra, başarılı bir şekilde genleri içine almış hücreler seçilir ve çoğaltılır. Son aşamadaysa, çoğaltılan bu hücreler tekrar kişiye verilir. Hücre içi (in vivo) yöntemde ise, genleri taşıyan virüsler doğrudan doğruya kana ya da dokulara verilir (16). Doğrudan DNA enjeksiyonunda ilgili gen DNA’sını taşıyan plazmid, doğrudan doğruya, örneğin kas içine, enjekte edilir. Diğer yandan hücre dışı yöntemde, hücreye gen transferi elektroporasyon, ya da gen tabancası gibi metotları da içeren kültür yöntemiyle gerçekleştirilir ve genetik olarak modifiye edilmiş olan hücreler ilgili hücreye tanıtılır (11,2,17). Parça bombardmanı ya da gen tabancası olarak da adlandırılan balistik DNA enjeksiyonu yönteminde genellikle altın ya da tungstenden oluşan 1-3 mikron boyutunda mikro parçacıklar, aktarılmak istenen geni taşıyan plazmit DNA’sı ile kaplanır, sonra da bu parçacıklara hız kazandırılarak, hücre zarını delip, içeri girmeleri sağlanır. Basit olmalarına karşın fiziksel yöntemler verimsizdir; ayrıca, yabancı genler, sadece belirli bir süre fonksiyonel kalabilmektedirler. Bu nedenle araştırmacıların çoğu, genellikle virüs kökenli vektörlere yönelmişlerdir. "Vektör" kelimesinin bir anlamı da "taşıyıcıdır". Benzer şekilde, gen tedavisinde genleri hücrelere taşıma amacıyla kullanılan ve genetik olarak zararsız hale getirilmiş virüslere de vektör denir (16). Gen dopingi/gen tedavisinde en etkili yöntem, retrovirüs, adenovirüs ya da lentivirüslerden sağlanan viral vektörlerle sağlanmıştır. Bu yöntem daha az immunogeniktir ve replikasyonu daha iyidir (2).

Adenovirüs gibi bazı viral vektörlerin hücrel genomu uyumu daha zayıftır ve bir miktar kodlanmış genetik bilgi kaybına neden olur ve tekrar uygulama gerektirebilir. Genin tanımlanmasından sonraki aşamada, genin hedeflenen hücrelere nakledilmesi ve orada ekspresyonu (ifadesi), yani kodladığı proteinin üretimi gelir. Gen dopingi sadece gen manipülasyonu gerektirmez ayrıca, biyosentetik ilaçlar (oksijeni arttıran ilaçlar) gibi dolaylı genetik teknolojiler de gerektirir. Kan oksijeni, kas aktivitesini en elverişli düzeye getirmede en temel faktördür. Bunun için özellikle kırmızı kan hücrelerinin arttırılmasında Eritropoietin (EPO) geni kullanılmaktadır. Farklı gen dopingi metodlarının avantaj ve dezavantajları Tablo1' de görülmektedir. DNA, tamamen insan genomu formunda ticari kaynaklardan elde edilebilir ya da rutin moleküler biyoloji teknikleri ile izole edilebilir. Viral vektör gen aktarımında daha etkilidir, ama zor bir üretim metodudur. Plazmid

DNA (pDNA) viral vektörlerden farklı alternatif bir biyolojik vektördür. Plazmid formunda DNA bakteriler tarafından çok miktarda üretilebilir, bakteriler düşük maliyetli kolay üretim yerleridir. Bunlar sentetiktir, bakterilerde üretildikten sonra saflaştırılır (11). Viral vektörlerden daha etkili olmamakla birlikte pDNA'lar immün cevap sağlayabilme açısından daha avantajlıdır (28,10). Lipozomlar hücre membranından hücre içine girmesine (penetrans) yardımcı olur. RNAi (interferans) RNA engellenmesi bir diğer metottur.

Önemli bir husus, somatik (vücut hücresi) ve germ (eşey hücresi) gen tedavi ayrıdır. Somatik gen tedavisi yetişkin hücreleriyle sınırlıdır ve kişinin DNA'sında devamlı (sonraki nesillere geçen) bir değişime neden olmaz. Vücut hücresi gen tedavisi eşey hücrelerini etkilemez; sadece ilgili kişiyi etkiler. Birçok hayvan çalışmasında uygulanan germline gen tedavisinde, gamet hücrelerini de içeren tüm vücutta bir genetik değişim söz konusudur ve bu değişim yeni nesillere de aktarılır.



Şekil 1. Gen Dopingi Metodolojisi (7)

Tablo 1. Gen Dopingi Metodlarının Avantaj ve Dezavantajları

Metot	Avantajları	Dezavantajları
Hücre dışı (in vitro)	*Gen ürünü kişiye aktarılmadan önce sınıflandırılabilir ve ayrılabilir.	*Daha az etkin *Kişiyi özgü *Daha pahalı *Daha özellikli laboratuvar şartları gerektirir
Hücre içi (in vivo)	* Gen ürününün daha fazla miktarda üretimi sağlanır *Daha ucuz	*Sınıflandırmak ve ayırmak mümkün değil *İmmün yanıtı neden olabilir *Germline bütünleşmelere neden olabilir

Gen tedavisi ve gen dopingi arasındaki fiziksel, kimyasal ve etik olarak temel fark, gen tedavisinin hasta bireylerde, gen dopinginin ise sağlıklı bireylerde uygulanmasıdır.

Dayanıklılık genleri

Eritropoietin (EPO) Geni; EPO, kandaki düşmüş oksijen seviyesine cevap olarak üretilen bir hormondur ve kandaki hemogloblin miktarını artırır(20). EPO uyarıcı ajanlar, performans arttırıcı olarak kullanılırlar. Gen dopingi ile EPO geninin ifadesinin arttırılması vücut içi hemogloblin üretimini ve kaslara giden oksijen dağılımını arttıracaktır (26).

Peroksizom Proliferatör-Aktive Edici Reseptör Gama (PPAR- γ): PPAR- γ enerji metabolizmasını değiştiren bir transkripsiyon faktörüdür. Bu genin upregulasyonu dayanıklılık sporunun gerektirdiği tip II kas lifleri artışına neden olacaktır. Yavaş kas lifleri oksidatif fosforilasyonla uzun süreli ATP üretimi sağlar. Hızlı kas lifleri glikolizis ile ATP üretir ve hızlı kasılmalarda ihtiyaç duyulan enerjiyi üretir (2).WADA 2010 yılında yasaklar listesine PPAR- γ agonisti (GW1516) ve PPAR- adozin monofosfat aktive edici protein kinaz aksis agonistini (AICAR)(Mc2) ilave etmiştir (22).

Fosfoenilpürivat karboksikiaz (PEPCK): PEPCK'in iskelet kasındaki rolü tam olarak bilinmemesine karşın farelerle yapılan deneylerde, PEPCK geni ifadesinin artışı dayanıklılık ve yaşam süresinin artışıyla vücut yağ oranının azalışına neden olmaktadır (3).

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF): VEGF büyüme faktörü yeni kan

damarlarının gelişimini sağlar ve yara iyileşmesinin moleküler yolağında önemli rol alır. Yeni kan damarlarının gelişimi dokulara daha fazla oksijen ve besin maddesi taşınmasını sağlar (3).

Hız ve Güç Genleri; Aktinin bağlayıcı protein (ACTN3): ACTN3 geni ve bu genin sportif performans özellikleri üzerindeki etkisi güncel araştırma konuları içerisinde. Alfa-aktininler distrofin ile ilişkili aktin-bağlayıcı proteinlerin bir ailesidir. Hücre iskeleti organizasyonunda ve kas kasılmasında yapısal ve düzenleyici rolleri bulunur. Actinin-3 ise spesifik olarak kasta hızlı güç temin etmekten sorumlu olan myofibrillerde eksprese olur (23).

Anjiyotensin-Dönüştürücü Enzim (ACE): ACE gen ekspresyonundaki değişimlerin Ang II üretimini ve Bradikinin yıkımını etkilemesi beklenir. ACE gen ekspresyonu değişkendir ve seviyesi ACE-mRNA transkriptlerinin sayısı ile belirlenir. ACE gen ekspresyonu seviyesi de kas fibril alanı ile damarsal düz kasta ve kapiller yoğunluk ile ters ilişki gösterir (6).

Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS): Egzersize uyum gösterebilme kan damarlarının sorumluluğu içerisinde. Birkaç ay düzenli antrenman yapıldığında, kan damarları egzersiz esnasında daha rahat gevşer ve kaslara daha fazla kan akışı sağlar. Hızlı kan akışı kas liflerine daha fazla oksijen taşır. Bu damar genişlemesi damar endotelinden salgılanan nitrik oksit (NO) tarafından koordine edilir. NO vazodilatasyonu başlatır ve egzersizde kas hücrelerine yeterli kan akışı sağlar. Nitrik oksidin (NO) sentezlenmesinden sorumlu madde olan nitrik oksit sentaz enzimi (eNOS) nitrik oksit sentaz geni tarafından kontrol edilir (32).

Tablo 2. Aday Genler

Beklenen performans artışı	Hedef gen(ler)
Dayanıklılık	*Eritropoietin (EPO) *Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) *Hipoksi uyarılabilir Faktör (HIFs) *Fosfoenilpürivat karboksikiaz (PEPCK)
Ağrı toleransı	*Endorfinler *Aşağı düzenleyici element antagonistik düzenleyici (DREAM) inhibitör genleri
Hız ve dayanıklılık	*Anjiyotensin- dönüştürücü enzim (ACE) * Endotelial Nitrik Oksit Sentaz (eNOS) *Peroksizom Proliferatör-Aktivasyonlu Reseptör Gama (PPAR- γ)
Hız Güç	*Aktinin bağlayıcı protein (ACTN3) *Myostatin (inhibisyon) *Follistatin *İnsan Büyüme Faktörü (hGF) *İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)

İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü (IGF-1): Büyüme hormonu görevindedir bir diğer adı da kas büyüme faktörüdür. Farelerde artmış gen ifadesi kas kütlesi ve gücünün artışı sağlar (15,29). Ayrıca kas hipertofisini yönetir ve kas tamirinde rol alır (15). 1998 yılında arka bacağın anterior kasının hücreler arası boşluğuna IGF geni içeren AAV vektörü enjekte edilmiş enjeksiyondan 4-9 hafta sonra “süper fare” olarak tanımlanan kas kütlesi ve gücü artmış fareler elde edilmiştir (3).

Myostatin Geni: Gen dopinginde diğer aday genlerden farklı olarak, bu genin azalmış ifadesi sağlanır. Myostatin kas gelişiminde negatif düzenleyicidir ve azalmasıyla kas kütlesinin artışı beklenir (16).

Tamir Genleri ve diğerleri: Gen tedavisi sadece ciddi hastalıkların tedavisinde değil aynı zamanda yaralanma ve yaşamı daha az tehdit edici durumlarda da kullanılabilir. Kas, tendon, ligament, menisküs yırtılması ve kemik faktörlerini de kapsayan çeşitli yaralanmalar iş yorgunluğu ve zaman kaybı yaratır. Yaralanmış dokuya transfer edilen uygun gelişim faktörünü üreten gen tedavisi bir sonraki travma ile oluşabilecek doku defektlerinin rejenerasyonunu da sağlayabilir (11).

Kemik Morfogenetik protein (BMP): BMP ailesi kemik tamirini artırıcı büyüme faktörleridir ve yaralanmadan sonra iyileşme sürecini kısaltır. Yaralanma yokluğunda bu büyüme faktörleri kemik, kırık ve tendon gücünü artırır ve yaralanmalar karşı potansiyel koruyucu etki sağlar (24).

Endorfinler: Endorfinler, ağrı yönetimi, yorgunluğun geciktirilmesinde ve dayanıklılıkta önemli bir bileşendir. Yarışma sırasında akut ağrı eşliğinin artması, laktik asit azalmasını sağlar. İlk yaralanma anındaki olumsuz etkileri azaltır. Bu etkiler endorfin üretimi, ifadesi ve salınımı ile ilişkili genleri hedef haline getirmiştir.

Hayvan Modelleri

Hayvan modelleri, gen dopingi metodunun olumlu ve olumsuz yönleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Hayvanlarda gen transferi yöntemleri uygulanmış ve başarılı sonuçlar bildirilmiştir (18). IGF1 gen dopingi fare modellerinde başarılı sonuçlar göstermiş ve kas kütlesi ve gücünde artış olmuştur. Farklı genlerle yapılan benzer çalışmalar sportif performansta artış göstermiştir (18). PPAR- γ transgenik fareler koşu süresinde ve dayanıklılıkta artış gösterirken, obezitede azalış göstermiştir (3). Makaklarda EPO gen dopingi aerobik kapasitede artış, performans artışı ve hematokrit seviyelerinde artış göstermiştir (25). Myostatinin inhibitörü olan follistatin gen dopingi kas hacminde artış meydana getirmiştir (21). Bazı çalışmalar, genlerin fazla ifade edilmesinin hiperaktivite ve saldırganlık artışı gibi

istenmeyen bazı sorunlara da neden olabildiğini göstermiştir. Makaklarda Epo'nun fazla ifadesi kan viskozitesinde artışa neden olmuş ve de kardiyak fonksiyonu uyarıcı ajanları etkilediği rapor edilmiştir (3).

Teorik İnsan Modelleri

Hayvan modellerinin gen dopingi etkisini başarılı bir şekilde göstermesine karşın, bu teknolojinin insanla buluşturulmasının lojistik ve pratik sınırlamaları vardır. Fare modellerinde, yüksek vektör dozları kullanılmaktadır fakat insanda bunun dozunun tam olarak ne olması gerektiği ve kişinin bu dozu tolere edip edemeyeceği net değildir. Uygulama sonrası gen ifadesinin kontrol edilememesi olasılığı da vardır bu da performansı olumsuz yönde etkileyebilir (29). Ayrıca bu yöntemleri uygulama kapasitesine sahip mevcut laboratuvar teknikleri ve kaynaklarını oluşturmak da kolay değildir.

Performansla ilişkili mutasyonlar ve Polimorfizmler

İlk insan modelleri göstermektedir ki spontan mutasyonlar gen ifadesinin değişimine neden olmuştur. Örneğin, 1964'te Avusturya'nın Innsbruck kentinde yapılan Olimpiyat Oyunlarında Finlandiyalı kayak sporcusu Eero Mäntyranta iki altın madalya kazanmıştır. Sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda, Mäntyranta'nın doğal bir şekilde oluşan genetik mutasyon sebebiyle diğer elit olmayan ortalama kişilere göre daha fazla miktarda kırmızı kan hücresine sahip olduğu bulunmuştur (3). Fazla miktarda kırmızı kan hücresi akciğerlerden dokulara daha fazla oksijen taşınması anlamına gelmektedir, bu da dayanıklılığın artışına yol açmaktadır. Epo geninin Mäntyranta'ya sağladığı bu özellik, her dayanıklılık sporcusunun sahip olmak istediği bir özelliktir. Performansı arttıran bir diğer doğal mutasyon, çok güçlü kaslara sahip olan bir çocukta myostatin geninin her iki kopyasında da fonksiyon kaybına neden olan mutasyona sahip olmasıdır. Bu genin erken yaşta inaktivasyonu erken yaşlarda çok güçlü kaslara sahip olmayı sağlamaktadır (22). Geleceğin sporcularında Mäntyranta'nın genlerinde sahip olduğu doğal mutasyon gibi gen değişimleri olabilecektir.

Kas gücü dayanıklılık, güç vücut kompozisyonu ve sporla ilişkili özelliklerle ilişkili birçok gen tanımlanmıştır (30,1). ACE geninde spesifik bir genotip, serumda düşüş ve dokuda aktivasyon artışına neden olur. Gen dopinginin dışında yapılan genetik çalışmalarla (polimorfizm çalışmaları gibi) elit sporcularla sedanter normal bireylerin karşılaştırıldığı ve bu elit kişilere özgü genetik farklılığın belirlenmesi erken yaşta genotip belirlenmesiyle yatkınlığı olan kişileri bu sporlara yönlendirilmesi çalışmaları yararlı olacaktır (24).

Riskleri

Gen dopingi yöntemine sağlık riskleri açısından da bakmak gerekir. Gen dopinginin çeşitli riskleri bildirilmiştir. Bunlar, gen aktarımında kullanılan viral vektöre karşı şiddetli immün cevabın oluşması, rekombinant proteine otoimmün cevap ve insersiyonal (araya giren mutagenesis) mutogenezisdir (11,2). Gen ürünleriyle ilişkili diğer riskler hayvan modellerinde gösterilmiştir. Süper fare modelinde yüksek derecede hiperaktivite ve agresif davranışların arttığı gözlenmiştir. PEPCK'nin fazla ifadesi tüm iskelet kaslarında eşey hücre modifikasyonu gerektirir. Yoksa doğacak olan diğer nesillerde son derece agresif ve hiperaktif bireyler meydana gelebilir (12,13). Yine hayvan modellerinde EPO geninin ifade artışı kan viskozitesinin artışına neden olarak kalp fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Bu durumda kalp krizi ve felç bile meydana gelebilir (27). IGF1'in kullanımı ya da myostatinin azalması kasta değişimlere neden olur (25). Kaslar orantısız olarak güçlenir, tendonları çevreler ve kemiklerde kırılma ve kaslarda yırtılmaya neden olabilir (5).

Viral vektörün konak genoma integrasyonu insersiyonel mutogenezis açısından bir risktir. Hücre büyümesinin anormal regülasyonu büyüme faktörü ve sitokinlerin kronik fazla ifadesinden dolayı toksisite ve malignansi (kansereleşme) teorik olarak mümkün olabilecek tehlikelerdir (19).

Tespiti

Gen dopinginin tespiti için kesin bir metod henüz gelişmemiştir, fakat bu konuda geniş çaplı çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar proteinlerdeki yapısal değişimlerin tespiti, vektörlere karşı immün cevabın değerlendirilmesi, DNA mikroyarrayleri, ifade profilleri ve DNA barkodlarının kullanımı yönündedir. Tespit yöntemleri başarılı, hızlı ve güvenilir olmalıdır. Kandan tespiti zor olmakla birlikte kas biyopsisi dopingin tespitinde daha hassastır ancak pratik değildir. Direkt ve indirekt olmak üzere iki çeşit tespit yöntemi vardır. Direkt yöntem; Vektör ya da rekombinant proteinin tespitine yöneliktir. Vektörler gen terapısından sonra kanda tanımlanabilir fakat tespit sistemlerinin uygulanabilirliği önemlidir (29). İndirekt yöntem kişinin biyolojik örneklerinin incelenmesiyle olur. Sporcuların gen ifadelerinin ölçümü yapılabilir ya da mRNA konsantrasyonu ölçülebilir (4).

Etik Tartışmalar ve Sonuç

Gen transferinin doping olarak kullanılabilir olması, spor felsefesini derinden sarsmaktadır. Hayvan deneyleriyle oluşturulan "süper fare modelleri" "süper sporcu" oluşturma fikirlerini cazip hale getirmektedir. Fakat gen dopingi metodunda geleneksel ilaçla yapılan dopingin çok ötesinde performans artışları elde edildiği, tetkik ve tespitinin son derece zor olduğu fark edilince gecikmeden 2003 yılında Uluslararası Olimpiyat Komitesi'nin (IOC) ve WADA'nın yasaklı uygulamalar listesine eklenmiştir.

Tablo 3. Gen Dopingi Tespit Yöntemleri

Tespit yöntemi	Metodlar	Başlıca zorlukları
İfade profileme	*DNA mikroyarrayleri, katı bir destek üzerine oligonükleotidlerin sabitlemesine dayalı bir yöntem. *Bu oligonükleotidler ifade edilmiş dopingli gen tarafından oluşturulmuş mRNA dizilerine komplementer cDNA dizilerini içerir.	*Mikroyarray sonuç analizi uygulaması zor bir yöntemdir. *DNA mikrodizilerinin yöntemi standardizasyon gerektirir. *İfade profilleri için referans veri tabanları gerektirir.
Bağışıklık Değerlendirilmesi aktarılan vektör ve gene yanıt	*Aktarılan vektöre karşı oluşturulan antikorlar immunoassay test ile belirlenebilir	*Eğer sporcunun doping dışı bir virüs enfeksiyonu varsa yanlış pozitif sonuçlar oluşabilir. *Uyumlu viral vektörlerin kullanımı immün cevap oluşturmayabilir
Transgen ve endojen gen arasındaki yapısal farklılıklar	*İfade edilmiş rekombinant proteinin tespiti için immunoassay test kullanılabilir *Endojen ve rekombinant proteinin elektroforez ile yürüme hızı farkına dayanarak ayrılabilir.	*Tüm doping proteinler için geçerli değildir. *Rekombinant proteinin ifade edildiği hücrelerdeki transkripsiyon sonrası değişimlere bağlıdır.
DNA barkodları	*Genin barkodlu bölgesine özgü primerler kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) yöntemi ile yapılır.	*Mali yükü fazladır *Kapsamlı bir veri tabanı oluşturulması ve bunun devamını gerektirir
Doku spesifik testler Promotor/ligand uyarılabilir promotörler	*Promotor dizilere özgü primerler kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile yapılır.	*Endojen promotörler yada homoloji gösteren diziler nedeniyle olası yanıltıcı sonuçlar oluşabilir *Gen dopinginde bilinenin dışında promotörler kullanılmış olabilir.

Gen dopingi birey için sağlık riskleri taşımasının yanında ciddi bir etik ihlal oluşturmaktadır. Bu durum gen dopinginin tespit edilme yöntemlerinin geliştirilmesini daha fazla gerekli kılmaktadır. Çoğu sporcu gen dopinginin potansiyel sağlığa verdiği zararlar konusunda bilgi sahibi değildir. Sporcular ve onları destekleyen personelin gen dopinginin engellenmesi konusunda bilgilendirilmesi son derece önemlidir. Gen dopinginin engellenmesi konusunda etkili bir strateji geliştirmek için uluslararası ve ulusal eşgüdüm gereklidir. Özellikle bu hususta farmakoloji endüstrisinden genetik ürünlerin satılmaması ya da üretilmemesi konusunda söz alınmalıdır. Aslında bu uygulama gen dopingini yasaklamaktan daha anlamlı olacaktır. Sporun temelinde değerli olan şey “spor ruhu”dur ve sporcuların adil ve eşit şartlarda yarışmalarını gerektirir. Oysa doping, haksız avantaj sağlayacağından hem spor ruhuna ve hem de spor etiğine aykırıdır. Ayrıca dopingin insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere yol açması (9) kaçınılmazdır. Bu nedenle performansı yükseltme çabaları doğal yöntemlerden yararlanılarak yapılmalı ve konuyla ilgili sporcu ve spor çevresi hassasiyeti giderek artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Ahmetov II, Rogozkin VA. Genes, athlete status and training- an overview. *Med Sport Sci.* 2009; 54: 43–71.
- Azzazy HM, Mansour MM, Christenson RH. Doping in the recombinant era: strategies and counterstrategies. *Clin Biochem.* 2005; 38: 959-65.
- Azzazy HME, Mansour MMH, Christenson RH. Gene doping: of mice and men. *Clin Biochem.* 2009; 42: 435–41.
- Baoutina A, Alexander IE, Rasko JE, Emslie KR. Developing strategies for detection of gene doping. *J Gene Med.* 2008; 10: 3-20.
- Barton-Davis ER, Shoturma DI, Musaro A, et al. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (26): 15603-7.
- Cerit M. Ace Genotipi ve Kısa Süreli Aerobik Performans Gelişimi İlişkisi. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 2006. İzmir.
- Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Chery Y, Casadevall N, et al. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood* 2004;103:3303–4.
- Cummiskey J. Report on the IOC MC gene therapy medicine and sport. 1-1-2002. Lausanne: IOC, 2002
- Dost T. Doping. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006;2(46):145-51.
- Gatzidou E, Gatzidou G, Theocharis S. Genetically transformed world records: a reality or in the sphere of fantasy? *Med Sci Monit.* 2009; 15(2): RA41–7.
- Haisma HJ, Hon O.de. Gene Doping. *Int. J. Sports Med.* 2006; 27: 257-266.
- Hakimi P, Yang J, Casadesus G, Massillon D, Tolentino-Silva F, Nye CK, et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *J Biol Chem* 2007;282:32844–55.
- Hanson RW, Hakimi P. Born to run; the story of the PEPCK-Cmus mouse. *Biochimie* 2008; 90: 838–42.
- Harridge SDR, Velloso CP. Gene doping. *Essays Biochem* 2008; 44:125–38.
- Harridge SDR, Velloso CP. IGF-1 and GH: potential use in gene doping. *Growth Horm IGF Res* 2009; 19: 378–82.
- http://tr.wikipedia.org/wiki/Gen_tedavisi
- John SMG, Noble MA, Lewis DL, Herweijer H, Wolff JA. Progress toward a nonviral gene therapy protocol for the treatment of anemia. *Hum Gene Ther.* 2007; 18: 269-85.
- Lunde IG, Ekmark M, Zaheer AR, et al. PPAR-delta expression is influenced by muscle activity and induces slow muscle properties in adult rat muscles after somatic gene transfer. *J Physiol.* 2007; 582: 1277–87.
- Martinek V, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in sports medicine. *Phys Sportsmed* 2000; 28 (2): 1-12.
- Minunni M, Scarano S, Mascini M. Affinity-based biosensors as promising tools for gene doping detection. *Trends Biotechnol.* 2008; 26(5): 236–43.
- Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, et al. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve.* 2009; 39(3): 283–96.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2682–8.
- Şanlısoy F, Altıntaş N, Büyükyazı G, Candan N. Ege Bölgesi Elit Sporcularının ACTN3 R577X Genotip Dağılımının Araştırılması. *Cumhuriyet Tıp Dergisi.* 2011; 33: 153-159.
- Trudy A. McKanna, Helga V. Toriello. Gene Doping: The Hype and the Harm. *Pediatr Clin N. Am.* 2010; 57: 719-727.
- Ünal M, Özer Ünal.D. Gene Doping in Sports. *Sports Med.* 2004; 34: 357-62.
- Varlet-Marie E, Audran M, Ashenden M, et al. Modification of gene expression: help to detect doping with erythropoiesis-stimulating agents. *Am J Hematol.* 2009; 84(11): 755–9.
- WADA. The world anti doping code. The 2006 prohibited list. International standart. Keynote

- address WADA health medical and research committee. 1-1-2005. Montreal; WASA, 2005.
29. Wells DJ. Gene doping: the hype and the reality. *Br J Pharmacol* 2008;154: 623–31.
 30. Wells DJ. Gene doping: possibilities and practicalities. *Med Sport Sci.* 2009; 54: 166–75.
 31. 166–75.
 32. Wolfarth B, Bray MS, Hadberg JM, et al. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update. *Med Sci Sports Exerc.*2005; 37: 881–903.
 33. World Anti-Doping Agency (WADA). www.wada.ama.org (Accessed 19 September 2008).
 34. Zümürüt Kavuncuoğlu. Güreşçilerde ve Sedanter Populasyonda eNOS Gen Polimorfizminin Karşılaştırılması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 2006. İstanbul.