



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00431

(22) Data de depozit: 05.05.2011

(41) Data publicării cererii:
30.11.2011 BOPI nr. 11/2011

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU ȘTIINȚE
BIOLOGICE, FILIALA BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• BRATOSIN DANIELA, STR. TRESTIANA
NR. 5, BL. 9, SC. 1, ET. 6, AP. 24,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;

• GHEORGHE ANA-MARIA, STR. LUICA
NR. 31, BL. M4BIS, SC. A, ET. 10, AP. 63,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• RUGINA ALEXANDRINA, STR. LUICA
NR. 21, BL. 7, SC. 2, AP. 67, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• SIDOROFF MANUELA,
STR. DRUMUL TABEREI NR. 138, BL. 715,
SC. A, ET. 1, AP. 1, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ARDELEAN AUREL,
SPLAIUL TOTH SANDOR NR. 6/B, ARAD,
AR, RO

(54) TEST DE DEPISTARE A AUTOTRANSFUZIEI LA SPORTIVII DE PERFORMANȚĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la realizarea unui test pentru depistarea autotransfuziei la sportivii de performanță, fiind util în depistarea practicii de dopaj prin transfuzie autologă. Testul se bazează pe determinarea viabilității eritrocitelor prelevate de la sportivii de performanță, care sunt supuse unui stres exterior care va amplifica "leziunile de stocare" apărutele hematiile conservate înainte de autotransfuzie, conform principiului "stress on stress", și au, în consecință, o viabilitate mult diminuată, conducând la apariția a două subpopulații pe histograma de viabilitate.

Revendicări: 1

Figuri: 2

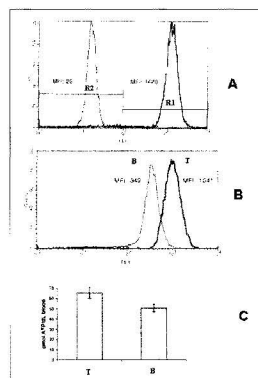


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 204 @ 48
Data depozit 05-05-2011

9

DESCRIEREA INVENȚIEI

Test de depistare a autotransfuziei la sportivii de performanță

Invenția se referă la realizarea unui test de depistare a autotransfuziei la sportivii de performanță, formă de „dopaj curat” dificil de depistat. Invenția va putea fi utilizată pentru a depista sportivii ce recurg la transfuzia de sânge autologă (folosind propriul sânge) pentru a-și spori performanțele.

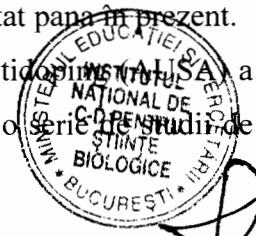
Este bine cunoscut faptul că la ora actuală anumiți sportivi de elită recurg la folosirea transfuziei sanguine pentru îmbunătățirea performanțelor lor sportive în timpul unor mari competiții (Leigh-Smith S., Blood boosting, Br. J. Med., 38, 99-101, 2004; Ashenden M., Contemporary issues in the fight against blood insport, Haematologica, 89, 901-903, 2004).

Numit și „Blood boosting”, această formă de dopaj folosește transfuzia intravenoasă de sânge pentru a produce o creștere a capacității organismului de a transporta oxigenul, prin creșterea masei eritrocitare de până la 10% (Berglund B., Birgegård G., Wide L., Pihlstedt P., Effects of blood transfusions on some haematological variables in endurance athletes, Med. Sci. Sports Exerc., 21, 637-642, 1989).

Transfuzia poate fi realizată fie cu sânge de la un donator potrivit (*transfuzie omologă*) fie prin reinfuzarea propriului sânge (*transfuzie autologă*).

Transfuzia autologă se realizează prin reinfuzarea a 1 până la 4 unități (450-1800 ml) de sânge propriu, prelevate de la sportiv prin afereză (eliminarea componentelor plasmatică care sunt imediat reinfuzate) iar eritrocitele sunt stocate la 4°C (McArdle W., Exercise physiology: energy, nutrition, and human performance, 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1986). Prelevarea de sânge are loc cu 3 până la 6 săptămâni înainte de transfuzie, fiind necesar un timp pentru ca organismul uman să refacă masa eritocitară la nivelurile existente înainte de prelevare (Wilmore J., Costill D., The physiological basis of the conditioning process, Training for sport and activity, 3rd ed. Dubuque, IA: Human Kinetics, 255-257, 1988). Transfuzia are loc cu una până la patru zile înainte de competiție (Burke E., Performance enhancement: blood boosting, erythropoietin, and steroids. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1994; Cowart V., Erythropoietin: a dangerous new form of drug doping, Physician and Sports Medicine, 17, 115-118, 1989) și este practic imposibil de depistat până în prezent.

În cazul practicării transfuziei sanguine omologe, Agenția US Antidoping (USA) a finanțat cercetări pentru elaborarea unui test de depistare. În anul 2003, o serie de studii de



validare au fost realizate (Nelson M., Popp H., Sharpe K., Ashenden M., Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens, Haematologica, 88, 1284-1295, 2003) și a fost deja elaborat un test introdus în câteva laboratoare acreditate de către World Anti-Doping Agency (WADA), inclusiv laboratorul de control antidoping olimpic de la Atena și Lausanne unde au fost realizate mai mult de 250 teste individuale, fără rezultate fals pozitive. Pe baza lui, doi cicliști au fost eliminați din competiție pe o perioadă de doi ani. Acest test de determinare a transfuziei sanguine omologe este bazat pe diferențele dintre grupele minore de sânge ***dar nu este însă capabil să detecteze o transfuzie recentă în sistem autolog, transfuzie la care sângele transfuzat aparține aceluiași individ după o stocare prealabilă.*** Prin urmare, această deficiență în procedurile de testare existente, impune de urgență elaborarea unui test suplimentar care să poată detecta o transfuzie recentă autologă.

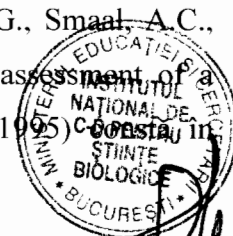
Este important de menționat faptul că punerea la punct a unui test pentru determinarea autotransfuziei (transfuzie autologă) a fost și rămâne și în prezent mai dificilă decât elaborarea unui test de detectare a transfuziei omologe. Pentru autotransfuzie nu s-a stabilit încă nici un marker sau metodă de testare care să poată fi folosite. Abordări actuale se referă la detectarea unor schimbări în parametrii hematologici, o „semnătură” în expresia ARN-ului, schimbări de proteomică sau schimbări în masa celulară. Toate aceste metode implică o abordare indirectă, puțin sensibilă și necesită investigații laborioase și greoaie.

În concluzie, nici un grup de cercetare nu a ajuns încă la elaborarea unui test în stadiu final.

Problema pe care o rezolva prezenta invenție este reprezentată de depistarea practicii de dopaj prin autotransfuzie (transfuzie autologă) practică de sportivi.

Prezentul test de depistare a dopajului prin autotransfuzie se bazează pe determinarea prin citometrie în flux cu Calcein-AM a viabilității eritrocitelor prelevate de la sportivii de performanță, care supuse unui stres exterior va amplifica „leziunile de stocare” apărute la hematiile conservate înainte de autotransfuzie, conform principiului „stress on stress” și vor avea în consecință o viabilitate mult diminuată sau poate vor deveni chiar moarte, conducând la apariția a două subpopulații pe histograma de viabilitate.

Metoda „stress on stress” aplicată în ecotoxicologie de către Viarengo *et al.*, în anul 1995 (Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, G., Smaal, A.C., Orunesu, M., Stress on stress response: a simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels, Mar. Environ. Res., 39, 245-248, 1995)



suprapunerea a două tipuri de stres asupra unor organisme (moluște) prelevate din mare. La stresul pe care îl suferă deja animalele în mediul lor natural dacă acesta este poluat, se adaugă un al doilea stres perturbant, plasând moluștele într-o situație de anoxie, prin ținerea lor în laborator direct în aer, de unde denumirea de stres peste stres („*stress on stress*”). Dacă moluștele sunt capabile în mod normal să reziste câteva ore, rezistența la expunerea directă în aer este diminuată dacă ele au fost înainte contaminate chimic în mare. Acești indivizi deci, dublu perturbați, vor muri primii, în timp ce cei sănătoși vor fi în măsură să îndure tratamentul pe o perioadă de timp mai lungă. Compararea nivelului de mortalitate, în același timp, pentru diferite situri de proveniență a animalelor, dă în final o indicație relativă asupra poluării sau a „stării de sănătate” a zonelor studiate.

În cazul nostru, organismele sunt reprezentate de hematiile din sângele supus analizei, stresul poluant fiind constituit de conservarea acestora la 4°C pentru mai multe săptămâni (conform practicii sportivilor), stresul perturbant putând fi incubarea la 37°C, iar aprecierea viabilității celulare cu Calcein-AM înlocuind compararea nivelului de mortalitate.

Dacă sportivul în cauză a practicat autotransfuzia, sângele prelevat va conține două tipuri de sânge: o cantitate de sânge (aprox. 10% conform practicilor) care a fost conservată la 4°C și transfuzată înaintea competiției, și o cantitate mai mare (aprox. 90%) reprezentată de sângele circulant al sportivului.

Sângele prelevat este apoi supus stresului de incubare la 37°C timp de 24h sau mai mult, unde fracția de 10% conservată și reinjectată în organism va muri înaintea fracției de 90% constituită din sângele circulant care a fost supus doar celui de-al doilea stres perturbant (conservarea la 37°C timp de 24h sau mai mult) sau altor stresuri de natură fizică sau chimică. După aplicarea acestui stres se determina viabilitatea eritrocitelor prin citometrie în flux cu Calcein-AM, conform metodei descrise de Bratosin et al., în anul 2005 (Bratosin D., Mitrofan L., Paliu C., Estaquier J., Montreuil J., A novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing, *Cytometry A*, 66A, 78-84, 2005), și se constată apariția a două subpopulații celulare, respectiv o populație mai numeroasă de hematii viabile (cele aprox. 90% hematii care au fost supuse doar stresului de incubare la 37°C) și o populație mai mică de celule cu o viabilitate scăzută sau moarte (cele aprox. 10% hematii supuse dublului stres (primul stres datorat conservării la 4°C, timp în care apar „leziuni de stocare”, urmat de stresul de temperatură ce va amplifica aceste leziuni și va conduce la scăderea viabilității acestor hematii sau chiar la moartea lor).

Calcein-AM este un substrat ne fluorescent permeabil prin membranele celulare care odată pătruns în celulă este scindat de către esterazele intracelulare la produsul fluorescent.



Stănilă

numit calceină. În celulele viabile, cu membrana intactă, calceina este reținută în interior, în timp ce din celulele care și-au pierdut integritatea membranelor este eliminată. În acest fel, prin citometria în flux se pot diferenția populațiile viabile (care prezintă fluorescență datorată prezenței calceinei) de cele neviabile, care nu au fluorescență. De asemenea, cu acest test se poate discrimina între hematiile tinere și bătrâne (sau îmbătrânite) pe baza intensității de fluorescență a produsului rezultat prin clivarea Calcein-AM, respectiv calceina, intensitatea de fluorescență dovedindu-se a fi direct proporțional cu cantitatea de ATP intracelular, conform figurii 1.

Testul de determinare a autotransfuziei presupune parcurgerea a mai multor etape de lucru:

1. Prelevarea unui mic volum de sânge de la sportivi.
2. Supunerea sângelui unui stres prin incubarea hematiilor la 37°C timp de 24 ore sau mai mult când hematiile transfuzate sunt practic supuse unui al 2-lea stres ce va amplifica leziunile de stocare și vor diminua mult mai mult viabilitatea acestora.
3. Analiza viabilității celulare cu Calcein-AM prin citometrie în flux conform metodei descrise de Bratosin *et al.*, 2005 (Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J., Montreuil J., A novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing, *Cytometry A*, 66A, 78-84, 2005).

Invenția prezintă avantajul că permite depistarea autotransfuziei la sportivi putând fi utilizată înaintea competițiilor ca test de verificare, ea fiind o metodă rapidă și sensibilă.

EXEMPLU

În vederea determinării unei eventuale autotransfuzii la sportivii de performanță, înaintea unei competiții se parcurg următoarele etape:

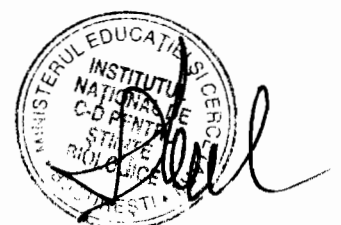
- Se prelevează o mică cantitate de sânge într-un tub cu anticoagulant de tip heparină pentru împiedicarea coagularii sângelui.
- Se centrifughează sângele la 1000 g, 4°C, 5 minute pentru eliminarea plasmei, leucocitelor și plachetelor sanguine prin aspirare împreună cu o mică cantitate de hematii de la suprafața sedimentului eritrocitar.
- Se prepară o suspensie eritocitară de aprox. 10^7 celule/ml în PBS, din 1 microlitru (1μl) sediment hematii în 1ml PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4 (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ și 1.5 mM KH₂PO₄).
- Se incubează suspensia celulară obținută în godeul unei plăcuțe pentru cultură celulară cu 12 godeuri la 37°C pentru 24 ore sau mai mult, într-o etuvă cu CO₂.



- Se prepară o soluție stock 10 mM de Calcein-AM în DMSO (dimetilsulfoxid), adică 1mg în 100 μ l DMSO, soluție ce se conservă la -20°C .
- Se prepară extemporaneu o soluție de lucru 100 μM (1 μ l soluție stock în 500 μ l PBS).
- 100 μ l din suspensia celulară cu densitatea de 10^7 celule/ml se diluează cu 900 μ l PBS și se incubează cu 50 μ l soluție de calcein-AM 100 μM , rezultând o concentrație finală de 1 μM Calcein-AM.
- Se incubează pentru 45 minute la 37°C , în etuva cu CO_2 în condiții de obscuritate, cu tubul neacoperit.
- Se adaugă 4 ml de PBS și se analizează celulele direct prin citometrie în flux, în sistem linear FSC/SSC și logaritmic pentru FL1. Numărul minim de celule analizat trebuie să fie între 50 000 și 100 000.

Interpretarea testului

Conform figurii nr.1 se observă o populație viabilă (regiunea M1) și o populație neviabilă, populația supusă dublului stres (regiunea M2) corespunzând sângelui transfuzat. Prin apariția celui de-al doilea pic reprezentat de populația neviabilă M2 se dovedește prezenta în sângele circulant a unei subpopulații care în urma unui stres suplimentar (în cazul nostru temperatura) prezintă o viabilitate scăzută, care poate ajunge chiar în regiunea celulelor moarte, dovedind practicarea unei autotransfuzii la sportivul testat.



REVENICĂRI

1. Test de determinare a autotransfuziei (transfuzie autologă) la sportivi.



DESENE

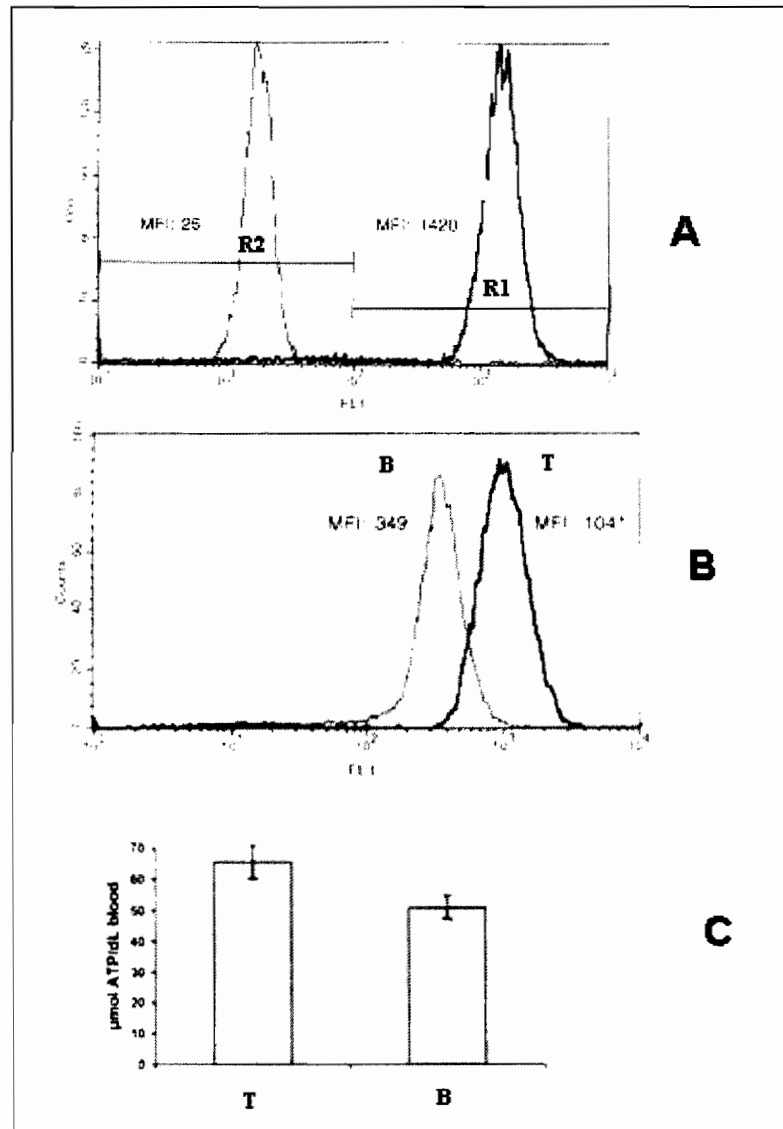
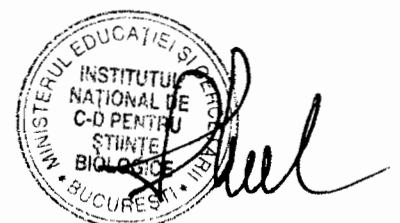


Fig. 1. Principiul determinării viabilității hematiilor prin citometrie în flux cu Calcein-AM cu cele 2 regiuni de dispunere a celulelor după fluorescență: R1-regiunea celulelor vii și R2-regiunea celulelor moarte (A); (B)-dispunerea histogramelor de viabilitate a populației tinere de hematii circulante (T) și bătrâne (B) corelată cu cantitatea de ATP intracelular (C), conform cu metoda descrisă de Bratosin *et al.*, 2005 (Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J., Montreuil J., A novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and ageing, *Cytometry A*, 66A, 78-84, 2005).



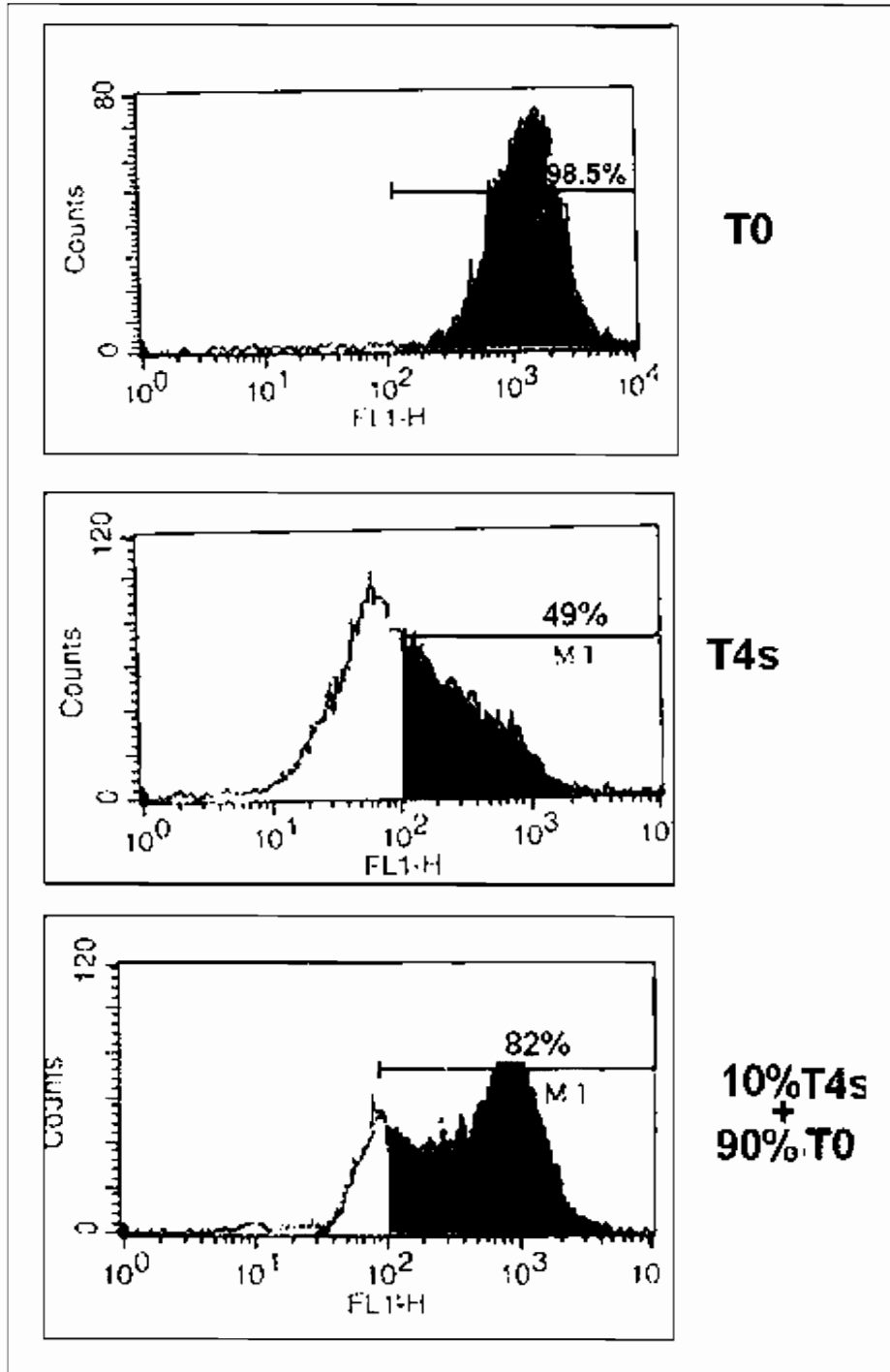


Fig. 2. Evidențierea viabilității celulare pe sângele proaspăt (T₀), conservat timp de 4 săptămâni (T_{4s}) și asupra amestecului de 10% T_{4s} + 90% T₀ (simulând un sange prelevat de la un sportiv care a practicat autotransfuzia) după aplicarea stresului de temperatură pentru amplificarea “leziunilor de stocare”. M1: regiunea de celule fluorescente cu membrana celulară intactă (celule vii). Abscisa: intensitatea fluorescenței verzi a calceinei (FL-1) în sistem logaritmic. Ordonată: numărul de celule. Număr de celule analizate 50.000. Rezultatele prezentate sunt reprezentative pentru cele trei experimente realizate.

