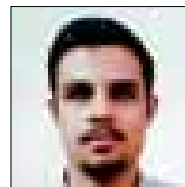


دوپینگ، انتقال خون اتولوگ؛ بیومارکرهای جدید



• دکتر فریبا نباتچیان

دکترای بیوشیمی پزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده
پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
fnabatchian@yahoo.com



• مهدی رامشینی

دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
ramshiny@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: تزریق خون اتولوگ از طریق افزایش ظرفیت حمل اکسیژن و تعداد گلبول‌های قرمز، عملکرد ورزشکاران را افزایش می‌دهد و پرجالش‌ترین روش دوپینگ در زمینه تشخیص در سال‌های اخیر است. هدف از این مطالعه، بررسی روش‌ها و بیومارک‌هایی است که تا کنون برای تشخیص آن ارائه شده است.

روش بررسی: در این مقاله مروری، مقالات با کلمات کلیدی تشخیص تزریق خون اتولوگ، دوپینگ خون اتولوگ در پایگاه داده PubMed، google scholar بررسی گردید. **یافته‌ها:** در تشخیص دوپینگ خون، روش‌ها و بیومارک‌های مختلفی معرفی شده است که می‌تواند تا حدودی تزریق خون اتولوگ را نشان دهند مانند: الکتروفورز موئینه، آهن، هپسیدین، دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP)، میکرو RNA ها، جرم تام هموگلوبین (tHb) و پاسپورت بیولوژیکی ورزشکار (ABP).

نتیجه گیری: بر خلاف روش‌های دوپینگ انتقال خون همولوگ و محرک‌های اریتروپویتیک، در حال حاضر هیچ روش مستقیمی برای تشخیص دوپینگ از طریق انتقال خون اتولوگ وجود ندارد. دریافت (تزریق) خون در حال حاضر با متغیرهای هماتولوژیک فردی از طریق فرآیند پاسپورت بیولوژیکی

ورزشی بررسی می‌گردد و این کار نیاز به اصلاح بیشتری دارد. بیومارک‌های غیر مستقیم اضافی می‌توانند حساسیت و ویژگی روش را افزایش دهند. **واژه‌های کلیدی:** تزریق خون اتولوگ، دوپینگ خون، پاسپورت بیولوژیکی ورزشکار، بیومارک‌ها

مقدمه

تزریق خون اتولوگ مستلزم برداشت خون، ذخیره سازی آن در ۴ درجه سانتی گراد برای هفته‌ها یا در دمای زیر صفر درجه سانتی گراد برای یک دوره نامحدود و پس از آن، تزریق دوباره به گردش خون فرد دهنده خون می‌باشد. با وجود این که روش نسبتاً سخت و وقت گیر است، گزارش‌های موردی نشان می‌دهد که از اوایل سال ۱۹۷۰ ورزشکاران از این روش‌های غیرقانونی برای افزایش سطح هموگلوبین خون و نتیجتاً بهبود عملکرد ورزشی استفاده نموده‌اند. اگر چه در این روش، از خون اتولوگ استفاده می‌شود، ولی آژانس ضد دوپینگ جهانی (World Anti-Doping Agency (WADA)) آن را ممنوع اعلام کرده است و هیچ روشی قادر به تشخیص دقیق آن نیست (۱). بعضی عملیات پلیسی، شبکه‌هایی از پزشکان یا پیراپزشکان را نشان می‌دهد که به ورزشکاران جهت

ذخیره سازی و تزریق مجدد خون ذخیره شده خودشان کمک می کنند (۲).

افزایش اکسیژن رسانی به عضله در حال ورزش، یکی از قدرتمندترین ابزارها برای بهبود عملکرد، به ویژه در ورزش های هوازی به شمار می رود. چندین راه برای نیل به این هدف وجود دارد که یا با موادی انجام می شود که می توانند منحنی اشباع اکسیژن- هموگلوبین را تغییر دهند مانند: **efaproxiral** یا به وسیله استفاده از حاملین جدید اکسیژن با پایه هموگلوبین (**HBOC (Hemoglobin-based oxygen carriers)**) یا مواد شیمیایی دیگر مانند: **Perfluorocarbons** عمل می کنند. افزایش مداوم گلبول های قرمز خون می تواند توسط عوامل محرک اریتروپویتیک مانند: اریتروپویتین یا داروهای مرتبط به دست آید. اغلب، ورزشکاران به دنبال افزایش حاد گلبول های قرمز خون با کمک تزریق های خونی هستند (۳).

کشف اریتروپویتین، دوپینگ خون در ورزش را تسهیل بخشیده ولی روش های تشخیص اریتروپویتین، ورزشکاران متقلب را مجبور به بازگشت به روش انتقال خون کرده است (۴). انتقال خون اتولوگ با گلبول های قرمز خون منجمد، یک روش انتخابی به شمار می رود، زیرا هیچ روش معتبری برای تشخیص چنین رخدادی وجود ندارد. در ورزش های استقامتی، می توان تخمین زد که عملکرد ورزشکاران نخبه تا ۳٪ با دوپینگ خون بهبود می یابد.

در ورزش های استقامتی، جذب حداکثر اکسیژن یک فاکتور مهم برای بهبود عملکرد به شمار می رود. استخراج اکسیژن در دسترس برای کار عضله یک فاکتور در ورزشکاران نخبه می باشد. روش های متفاوتی برای افزایش اکسیژن رسانی می تواند توسط ورزشکاران به کار گرفته شود که اثرات آن روی عملکرد فیزیکی می تواند مورد توجه باشد (۳).

آژانس جهانی مبارزه با دوپینگ، استفاده از تکنیک های افزایش ظرفیت اکسیژن رسانی خون که عبارتند از: انتقال خون، تزریق هورمون، حاملین مصنوعی اکسیژن و دست کاری های ژنتیکی را ممنوع اعلام کرده است (۵). در حالی که روش هایی برای مشخص کردن اریتروپویتین انسانی نو ترکیب **rhEPO (Recombinant human erythropoietin)** (۶) و انتقال خون همولوگ (۷) به طور موقت گسترش یافته اند، هیچ روش مستقیمی برای تشخیص انتقال خون اتولوگ در

دسترس نیست (۸). روند بررسی طولانی مدت نشان می دهد که تعدادی از بیومارکرها در نمونه خون ورزشکار و تغییرات غیر طبیعی آن ها می تواند به این تشخیص ها کمک نماید (۹).

بررسی

با کلید واژه های **detection autologous blood transfusion** و **autologous blood doping** در پایگاه های اطلاعاتی **google scholar, pubmed** بررسی انجام شد. مقالاتی که به ارائه یک روش یا بیومارکری در رابطه با تشخیص دوپینگ تزریق خون اتولوگ پرداخته بودند، برگزیده شدند. محدوده زمانی انتشار متون مورد بررسی، از سال ۱۹۹۵ تا اول مه ۲۰۱۷ میلادی است.

یافته ها

الکتروفورز موئینه

یکی از این روش ها، استفاده از الکتروفورز موئینه (**capillary electrophoresis**) به عنوان ابزاری برای شناسایی است. این کار در مواقعی که گلبول های قرمز تازه و ذخیره شده در نمونه مشکوک وجود دارند، برای آنالیز گلبول ها پیشنهاد می شود. محققین نشان داده اند که الکتروفورز موئینه می تواند برای تعیین تعداد گلبول های قرمز و شناسایی گروه های خونی متفاوت به دلیل حرکت های مختلف گلبول های قرمز مورد استفاده قرار گیرد (۱۰).

ذخیره سازی گلبول های قرمز با تغییراتی در داخل سلول، از جمله تغییرات در سطح غشاء گلبول همراه است. صریح ترین تغییر که دلیل بر سن گلبول قرمز است، افزایش تراکم و کاهش اندازه آن می باشد که در اصل نتیجه ایجاد وزیکول می باشد. در جدا سازی الکتروفورتیک، این تغییر در اندازه گلبول، بزرگ ترین شاخص است، به این ترتیب که اندازه یک ترکیب، تحرک آن را تحت تأثیر قرار می دهد. اگر چه توانایی این روش تشخیصی به دو عامل بستگی دارد. ورزشکاران به خصوص ورزشکاران استقامتی، گلبول های قرمز بزرگتری در گردش خون دارند. دوم اینکه، ذخیره گلبول های قرمز در کاهش اندازه متوسط گلبول تأثیر دارد. به نظر می رسد که کاربرد این نوع الکتروفورز، همراه با آماده سازی مناسب گلبول های قرمز، می تواند بین انتقال های خون اتولوگ و نمونه های خون تازه خود ورزشکار تمایز ایجاد نماید. اگر چه سنجش های فردی



می‌توانند بین دو نوع نمونه، تشخیص ایجاد کنند ولی این تشخیص از صحت کاملی برخوردار نیست و گاهی اوقات نتایج به غلط منفی ایجاد می‌کند (۱۱).

آهن و هپسیدین

افزایش سطح آهن سرم بعد از انتقال خون اتولوگ توسط Hod و همکاران نشان داده شد (۱۲). اندازه گیری غلظت آهن می‌تواند یک مارکر مقرون به صرفه از انتقال خون باشد. علاوه بر این، همبستگی بالایی بین غلظت آهن سرم و پلاسمای آماده شده با EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) وجود دارد (۱۳).

هپسیدین، نقش مهمی در متابولیسم آهن ایفا می‌کند (۱۴). این هورمون پپتیدی به تازگی کشف شده است و توسط سلول‌های کبدی تولید و موجب تخریب و ورود فروپورتین به سلول می‌شود (۱۵). از آنجا که هپسیدین مستقیماً به وسیله مقادیر آهن آزاد در خون تنظیم می‌شود و انتقال خون اتولوگ، مقادیر آهن را افزایش می‌دهد، می‌تواند یک مارکر جدید برای انتقال خون به حساب آید. برای اندازه گیری هپسیدین از روشی بر اساس LC-HRMS (LC-high resolution mass spectrometry) استفاده می‌شود (۱۶). غلظت میانگین هپسیدین ۱۲ ساعت بعد از انتقال خون به ۷ برابر می‌رسد که ارتباطی معنی دار با انتقال خون را نشان می‌دهد. پیشنهاد می‌شود که اندازه گیری هپسیدین در خلال یک استراتژی ironomics قرار گیرد تا به نتایج دقیق‌تری نائل گردد. این استراتژی شامل بررسی فریتین، اریتروفرون و آهن می‌باشد (۱۷).

DEHP

روش‌هایی که برای تشخیص سوء استفاده از انتقال خون اتولوگ مطرح هستند، همگی بر اساس متغیرهای خونی استوارند. اما خون، ماده همیشه مناسبی برای کنترل دوپینگ نیست. در مقابل، استفاده از یک روش مبتنی بر تجزیه و تحلیل ادراری، شرایط جدیدی را برای این وضعیت فراهم می‌نماید زیرا این روش می‌تواند به تمام آزمایش‌های کنترل دوپینگ اشاعه پیدا کند. اکثر کیسه‌های ذخیره خون یا گلول‌های قرمز از پلی وینیل کلرید (PVC) که حاوی پلاستیزرها برای انعطاف‌پذیری مناسب می‌باشند ساخته شده‌اند (۱۸). دی (۲-اتیل هگزیل) فتالات (DEHP) بیشتر از بقیه

پلاستیزرها استفاده می‌گردد. یکی از حادترین مشکلات DEHP بعد از روند انتقال خون است. زیرا DEHP بخشی از مواد پلاستیک کیسه را تشکیل می‌دهد که در محیط و افراد در معرض آن پخش می‌شود. بنابراین، غلظت‌های پایه متابولیت‌های DEHP می‌تواند در ادرار افراد معمولی دیده شود. در سیستم عروقی، DEHP به سرعت به منو (۲-اتیل هگزیل) فتالات (MEHP) و دو ترکیب منو (۲-اتیل ۵-هیدروکسی هگزیل) فتالات (MEHHP) و منو (۲-اتیل ۵-اکسوهگزیل) فتالات (MEOHP) اکسید می‌شود که به اسید گلوکوکرونیک متصل شده و در ادرار دفع می‌شوند (۲۰ و ۱۹).

این که DEHP دارای خواص تخریبی اندوکراین است، سبب مطالعه این ترکیب برای بعضی پدیده‌ها شده است. DEHP معمولاً به عنوان مارکر استفاده نمی‌شود. زیرا، به فراوانی وجود دارد و به سرعت در بدن متابولیزه می‌شود (۲۱). متابولیت‌های DEHP به طور معمول برای اندازه گیری وجود DEHP برای اهداف اپیدمیولوژیک به کار گرفته می‌شود. ترشح ادراری زیاد متابولیت‌ها چنین شرایطی را نشان می‌دهد. DEHP و متابولیت‌های آن در ادرار می‌توانند به وسیله کروماتوگرافی مایع که به اسپکترومتری جرمی وصل شده است با حساسیت قابل قبولی تعیین مقدار گردند (۲۲ و ۲۱).

در حال حاضر، بیش از ۱۵ متابولیت DEHP در ادرار انسانی شناخته شده است. متابولیت‌های ثانویه شامل: منو (۲-اتیل ۵-هیدروکسی هگزیل) فتالات، منو (۲-اتیل ۵-اکسوهگزیل) فتالات، منو (۲-اتیل ۵-کربوکسی پتیل) فتالات و منو (۲-کربوکسی متیل هگزیل) فتالات است که همگی مارکرهای وجود DEHP هستند. تحقیقات جدید نشان داده‌اند که DEHP، سیستم آندوکراین را مختل می‌نماید (۲۳). به طور مثال، در افراد، وجود DEHP، با مقادیر هورمون تیروئیدی و تستوسترون ارتباط عکس دارد. در نتیجه، کمپانی‌ها، کیسه‌های حاوی خونی تهیه کرده‌اند که حاوی n-بوتریل-تری (n-هگزیل)-سیترات (BTHC) به جای DEHP است. بنابراین ممکن است که ورزشکاران از این کیسه‌ها، به منظور جلوگیری از تشخیص متابولیت‌های DEHP ادراری بعد از این انتقال خون استفاده

نمایند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که در کیسه‌های خونی بدون DEHP، مقادیر پایین‌تر این متابولیت قابل اندازه‌گیری است. علی‌رغم برجستگی (DEHP-FREE)، کیسه‌های BTHC(n-buteryl-tri-(n-hexyl)-citrate) دارای DEHP هستند. مطالعات نشان می‌دهد که سنجش کمی این متابولیت، اطلاعات با ارزشی را فراهم می‌سازد. این سنجش در ۱ الی ۲ روز بعد از انتقال خون معنی‌دار است. (۲۴).

میکرو RNA ها

میکرو RNA ها (miRNA)، RNA های غیرکد شونده کوچکی هستند که فرایندهای مختلف بیولوژیکی را تنظیم می‌کنند. miRNA های آزاد اندازه‌گیری شده در پلاسماهای خون، مارکرهای ویژه و حساس فرایندهای بیولوژیک و بیماری‌ها به شمار می‌آیند. نمونه‌هایی از این موارد عبارتند از: miR-122 پلاسمایی که در عارضه کبدی ناشی از مواد دارویی افزایش می‌یابد (۲۵) و شناسایی miR-144 به عنوان یک بیومارکر مناسب برای تشخیص عوامل تحریک کننده خونساز در تشخیص دوپینگ مطرح است. (۲۶).

در مقایسه با بیومارکرهای پروتئینی، miRNA چندین مزیت دارد. miRNA ها در مایعات مختلف بدن بسیار پایدار هستند. بیان بعضی از miRNA ها به بافت‌های خاص محدود می‌شود و مقادیر miRNA می‌تواند به آسانی توسط روش‌های آزمایشگاهی معمول اندازه‌گیری شود (۲۷). مطالعات تاکید بر آن دارند که از بیومارکرهای متفاوت برای تشخیص دوپینگ در ورزش استفاده گردد. تحقیقات نشان می‌دهد که تلفیقی از اندازه‌گیری miRNA در گردش و اریتروپویتین، قدرت بالایی برای تعیین و تشخیص ABP (Autologous Blood Passport) نسبت به اندازه‌گیری به تنهایی miRNA دارا می‌باشند (۲۸).

جرم تام هموگلوبین

آژانس جهانی ضد دوپینگ مدل خونی را بر اساس غلظت هموگلوبین، درصد رتیکولوسیت (۲۹) و شاخص‌های گوناگون گلبول قرمز (۳۰) بیان می‌دارد.

موارد غیرطبیعی یا مشکوک، افرادی هستند که به لحاظ آماری بیش از حد آستانه هموگلوبین و با درصدی حدود ۹۹٪ یا ۹۹.۹٪ ویژگی دارند و سپس متخصصین تشخیص می‌دهند

که آیا این یافته‌ها نشان دهنده دوپینگ است یا به وسیله عوامل دیگری ایجاد شده‌اند. جرم تام هموگلوبین (tHb) به عنوان پارامتر جدید برای تعیین دوپینگ خون اتولوگ از سال ۲۰۰۷ مورد بحث قرار گرفته است (۳۱). منطق موضوع در این است که جرم تام هموگلوبین، هدف نهایی انتقال خون را نشان می‌دهد و در مقایسه با متغیرهای وابسته به غلظت مانند: هموگلوبین و هماتوکریت به نوسانات حجم پلاسما وابسته نیست. جرم تام هموگلوبین با درصد تغییر حدود ۲ الی ۳ درصد، پارامتر نسبتاً پایداری است. از سوی دیگر، چندین وضعیت فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی شناخته شده‌اند که روی آن اثر دارند مانند: بودن در ارتفاع، مسابقات دوچرخه سواری، اهدای خون. تعیین میزان جرم تام هموگلوبین با نتایجی با خطای پایین آنالیتیک بین ۱.۴٪ و ۲.۲٪ قابل انجام است (۳۳ و ۳۲).

کاربرد روش تنفس مجدد (co rebreathing method) برای تعیین tHb وقت گیر و نسبتاً طاقت فرسا می‌باشد و بنابراین می‌تواند مشکل‌ساز باشد. ضمناً در مورد این روش، هیچ سیستم کنترل کیفی در دسترس نمی‌باشد. در عین حال، CO یک ماده سمی با انواع علائم مسمومیت می‌باشد و این به نوبه خود می‌تواند ایجاد اختلال نماید. مجبور کردن یک ورزشکار سالم برای قبول این آزمایش با ماده‌ای مضر بعید به نظر می‌رسد (۳۴).

نتیجه گیری

به دلایل ایمنی و رفاهی تزریق خون اتولوگ نسبت به تزریق خون همولوگ و اریتروپویتین و عدم وجود روش دقیقی برای تشخیص، در بین ورزشکاران بسیار شایع است. انتقال خون، موجب تغییراتی در خون می‌شود. این تغییرات می‌تواند در زمان ذخیره سازی یا تزریق به فرد باشند. لذا این تغییرات در بیومارکرهای غیرمستقیم می‌تواند در تشخیص مفید واقع گردند. سه روش کلی برای تشخیص این تغییرات ارائه می‌شود که عبارتند از:

۱. روش ترانسکریپتومیکس بر اساس بیان micro RNA یا RNA پیامبر، روش مناسبی به نظر می‌رسد. چون تبادلات خونی، متابولیسم آهن را تغییر می‌دهند، بررسی کمی پروتئین‌های دخیل در متابولیسم فلزات مانند: همسیدین می‌تواند در استراتژی ironomics برای بهبود وضع تشخیص

مانند: اندازه گیری کل جرم هموگلوبین یا آزمایش ترشح متابولیت‌های کیسه پلاستیکی (plasticizer) در ادرار، طرح‌های جدیدی برای تشخیص این شیوه‌های ممنوع شده هستند (۳).

این روش‌ها می‌تواند به تشخیص دوپینگ خون اتولوگ کمک کند اما روش رسمی برای این کار به حساب نمی‌آید. با توجه به بررسی‌ها، پیشنهاد می‌دهیم که بهترین روش استفاده از پاسپورت بیولوژیکی در کنار اندازه گیری بیومارکرهای غیر مستقیم از جمله: آهن و هپسیدین، الکتروفورز موئینه، EDTH، میکرو RNA ها و جرم تام هموگلوبین است که می‌تواند در تشخیص ABT بسیار کمک کند.

انتقال خون اتولوگ استفاده گردد (۳۵).

۲. روش‌های پروتئومیک، از آنجایی که ذخیره گلبول‌های قرمز خون، سبب تغییراتی در پروتئین‌های غشایی می‌شود، توان تعیین حضور گلبول‌های قرمز ذخیره شده در خون را دارند (۳۵).

۳. روش‌های فلوسیتومتری برای آنتی ژن‌های مضاعف سطح غشاءها می‌تواند روش انتقال خون همولوگ (آلورژیک) را آشکار نمایند. این موضوع حائز اهمیت است که افزایش کنسانتره گلبول قرمز خود ورزشکار قابل تشخیص باشد، زیرا گلبول‌های قرمز انتقال یافته همان آنتی ژن‌های سطحی گلبول‌های قرمز موجود در بدن ورزشکار را دارند. بنابراین، روش‌های مبتکرانه برای مارکرهای خونی غیرمستقیم

References

- 1- Nikolovski Z, De La Torre C, Chiva C, Borrás E, Andreu D, Ventura R, et al. Alterations of the erythrocyte membrane proteome and cytoskeleton network during storage—a possible tool to identify autologous blood transfusion. *Drug Test Anal* 2012; 4:882–90.
- 2- Mallorqui J, Segura J, de Bolos C, Gutierrez-Gallego R, Pascual JA. Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica* 2008; 93:313–14.
- 3- Segura J, Monfort N, Ventura R. Detection methods for autologous blood doping. *Drug Test Anal* 2012; 4:876–81.
- 4- Christer B. Malm, Nelson S. Khoo, Irene Granlund, Emilia Lindstedt, Andreas Hult. Autologous Doping with Cryopreserved Red Blood Cells – Effects on Physical Performance and Detection by Multivariate Statistics” *plos one*: 2016: 1–25.
- 5- WADA. Prohibited List 2015. September 29. Available: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list>.
- 6- Wide L, Bengtsson C, Berglund B, Ekblom B. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc*. 1995; 27(11):1569–76.
- 7- Nelson M, Popp H, Sharpe K, Ashenden M. Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica*. 2003; 88(11):1284–95.
- 8- Pialoux V, Mounier R, Brugniaux JV. Hemoglobin and hematocrit are not such good candidates to detect autologous blood doping. *Int J Hematol*. 2009; 89(5):714–5.
- 9- Pottgiesser T, Sottas PE, Ehteler T, Robinson N, Umhau M, Schumacher YO. Detection of autologous blood doping with adaptively evaluated biomarkers of doping: a longitudinal blinded study. *Transfusion* 2011; 51:1707–15.
- 10- Lu WH, Deng WH, Liu ST et al (2003) Capillary electrophoresis of erythrocytes. *Anal Biochem* 314:194–198.
- 11- Harrison CR, Fang JC, Walthall KJ, et al. Towards the identification of autologous blood transfusions through capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406:679–86.
- 12- Hod EA, Brittenham GM, Billote GB, Francis RO, Ginzburg YZ, Hendrickson JE, et al. Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound iron. *Blood* 2011; 118: 6675–82.
- 13- Leuenberger N, Barras L, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Lion N, et al. Hcpidin as a new biomarker for detecting autologous blood transfusion. *Am J Hematol* 2016; 91:467–72.
- 14- Ganz T. Hcpidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011;117:4425–4433.

- 15- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090–2093.
- 16- Rochat B, Peduzzi D, McMullen J, Favre A, Kottelat E, Favrat B, et al. Validation of hepcidin quantification in plasma using LC-HRMS and discovery of a new hepcidin isoform. *Bioanalysis* 2013;5:2509–20.
- 17- Leuenberger N, Barras L, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Lion N, et al. Urinary di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites for detecting transfusion of autologous blood stored in plasticizer-free bags. *Transfusion* 2015;56:571–8.
- 18- FDA. FDA Public Health Notification (monograph on the Internet) Rockville, MD. Safety assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from polyvinyl chloride (PVC) medical devices. US Food and Drug Administration, Center of Devices and Radiological Health. Updated 2001. [cited 2011 August]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM080457.pdf>
- 19- Frederiksen H, Skakkebaek N, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:899-911.
- 20- Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, et al. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology* 2006;219:22-32.
- 21- Monfort N, Ventura R, Platen P, Hinrichs T, Brixius K, Schanzer W, et al. Plasticizers excreted in urine: indication of autologous blood transfusion in sports. *Transfusion* 2012;52:647–57.
- 22- Monfort N, Ventura R, Balcells G, Segura J. Determination of five di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in urine by UPLC-MS/MS, markers of blood transfusion misuse in sports. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012;908:113–21.
- 23- Mendiola J, Meeker JD, Jorgensen N, et al. Urinary concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites and serum reproductive hormones: pooled analysis of fertile and infertile men. *J Androl* 2012;33:488-98.
- 24- Leuenberger N, Barras L, Nicoli R, Robinson N, Baume N, Lion N, et al. Urinary di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites for detecting transfusion of autologous blood stored in plasticizer-free bags. *Transfusion* 2015;56:571–8.
- 25- Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DG, et al. (2011) Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology* 54: 1767–1776.
- 26- Leuenberger N, Jan N, Pradervand S, Robinson N, Saugy M (2011) Circulating microRNAs as long-term biomarkers for the detection of erythropoiesisstimulating agent abuse. *Drug Test Anal* 3: 771–776.
- 27- Andreasen D, Fog JU, Biggs W, Salomon J, Dahlsveen IK, et al. (2010) Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods* 50: S6–9.
- 28- Leuenberger N, Schumacher YO, Pradervand S, Sander T, Saugy M, Pottgiesser T. Circulating microRNAs as biomarkers for detection of autologous blood transfusion. *PLoS One* 2013;8:e66309.
- 29- Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, et al. Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*. 2003;88(3):333–44.
- 30- World Anti-Doping Code. Athlete Biological Passport Operating Guidelines and Compilation of Required Elements Version 2.1 [Internet]. World Anti-Doping Agency; 2010 [cited 2011 Aug 8]. Available from: <http://www.wada-ama.org>.
- 31- Prommer N, Sottas PE, Schoch C, Schumacher YO, Schmidt W. Total hemoglobin mass—a new parameter to detect blood doping? *Med Sci Sports Exerc* 2008;40:2112–8.
- 32- Garvican LA, Martin DT, McDonald W, Gore CJ. Seasonal variation of haemoglobin mass in internationally competitive female road cyclists. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109(2):221–31.
- 33- Gore CJ, Hopkins WG, Burge CM. Errors of measurement for blood volume parameters: a meta-analysis. *J Appl Physiol*. 2005;99(5):1745–58.
- 34- Pottgiesser T, Ehteler T, Sottas PE, Umhau M, Schumacher YO. Hemoglobin mass and biological passport for the detection of autologous blood doping. *Med Sci Sports Exerc* 2012;44:835–43.
- 35- Salamin O, De Angelis S, Tissot JD, Saugy M, Leuenberger N. “Autologous Blood Transfusion in Sports: Emerging Biomarkers” *Transfusion Medicine Reviews*. 30(2016):109-115