

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Mitja Ferlež

ANALIZA UPORABE BIOLOŠKEGA POTNEGA LISTA V ŠPORTU
ANALYSIS OF THE ATHLET'S BIOLOGICAL PASSPORT IN SPORT

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravil na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec.med.biokem.

Na tem mestu bi se rad zahvalil mentorju prof. dr. Osredkarju za mentorstvo, zaupanje in spodbudo ves čas priprave diplomske naloge, ter omogočen dostop do uradne verzije programa biološkega potnega lista. Prav tako se iskreno zahvaljujem doc. dr. Maji Pohar Perme za zaupanje, številne nasvete in pomoč pri izračunih brez katerih ključna vprašanja naloge ne bi bila rešena. Zahvaljujem se tudi mag. Juretu Ferležu za pomoč pri računskih delih naloge in izdelavi nekaterih grafov v nalogi. Prav tako se zahvaljujem vsem, ki so mi za potrebe diplomskega dela omogočili dostop do krvnih podatkov vrhunskih športnikov.

Nenazadnje bi se rad na tem mestu zahvalil še staršem, bratu in dr. Alenki Žabjek za zaupanje, pomoč, vero vame in moje delo ves čas študija ter še posebno v trenutkih ko sem to najbolj potreboval. Brez Vas mi ne bi uspelo. Hvala.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec.med.biokem.

Ljubljana, november 2010.

Vsebina

Povzetek	7
Uporabljene kratice	9
UVOD	12
1. Namen dela.....	14
2. Kaj je doping?	15
3. Boj proti doping v Republiki Sloveniji	15
4. Zakaj je doping prepovedan?	16
5. Problemi boja proti doping	18
5.1. Problem bioloških zdravil s stališča boja proti doping.....	22
5.1.1. Primer eritropoetina	23
5.2. Nov mejnik v boju proti doping - uvedba biološkega lista	27
6. Indirektno dokazovanje zlorabe rHuEPO	29
6.1. ON/OFF model	29
6.2. Druga generacija ON/OFF modela	31
6.3. Kako naprej?	32
6.4. Tretja generacija ON/OFF modela.....	35
6.5. Od tretje generacije ON/OFF modela do modela biološkega potnega lista.....	43
6.6. Matematična osnova modela biološkega lista.....	51
6.6.1. Detekcija abnormalne vrednosti.....	53
6.6.2. Detekcija abnormalnega zaporedja	55
6.6.3. Sekvenčna analiza: dve paradigmi	56
6.6.4. (Še) nerešeni problemi biološkega potnega lista?	57
7. Primer 1: izračun dovoljenih mej [Hb] s pomočjo programa biološkega potnega lista za rekreativnega kolesarja.....	60
8. Primer 2: izračun dovoljenih mej [Hb] s pomočjo programa biološkega potnega lista za poklicnega kolesarja.....	63
9. Primer 3: Dokazovanje doping prekrška poklicnega kolesarja na podlagi podatkov biološkega potnega lista	66
9.1. Rezultati biološkega potnega lista.....	67
9.2. Hemoglobin.....	69
9.3. OFF –hr vrednost	69
9.4. ABPS.....	70

9.5. RET%	70
9.6. Izračun mej in ustreznosti zaporedja [Hb] po metodologiji tehničnega dokumenta BPL	71
9.7. Upoštevanje bivanja na višini v okviru biološkega potnega lista	77
9.8. Predstavitev argumentov razlage ugotovljenih abnormalnih vrednosti pri športniku	82
9.8.1. Alternativne hipoteze - zakaj ja, zakaj ne?	84
9.8.2. Zakaj uporaba krvne transfuzije?	85
9.8.3. Učinek krvne transfuzije na športni vzdržljivostni nastop	91
9.8.4. Primerjava krvnih vrednosti v letu 0001 in 0002	94
9.8.5. Argumentacija hipoteze 3b (uporaba avtologne krvne transfuzije)	95
9.8.5.1. Dokazi o odvzemu krvi	95
9.8.5.2. Dokazi o reinfuziji krvi	102
9.8.5.3. Nenavadno hitra obnova krvi	107
9.8.5.4. Vrednosti retikulocitov	109
9.8.6. Argumentacija hipoteze 2 (uporaba rHuEPO)	112
9.8.7. Argumentacija hipoteze 4 (uporaba višinskega treninga in hipoksičnih naprav)	115
9.8.8. Argumentacija hipoteze 8 (Statistična napaka/napaka programa ABP)	124
10. Zaključek	153
11. Viri:	155
12. Priloge	165

Povzetek

Dokazovanje zlorabe snovi in metod prepovedanih v vrhunskem športu, kar imenujemo boj proti doping u v športu, poteka neprekinjeno že več kot 40 let. V tem času so se oblikovali pristopi dokazovanja zlorabe, ki temeljijo na detekciji in karakterizaciji telesu tuje snovi v bioloških vzorcih športnika (urin, kri, lasje). Razvoj (številnih) novih zdravil - še posebej bioloških, usmerjenih v čim natančnejše posnemanje telesu lastnih hormonov - grozi, da bo izničil napore boja proti doping u, utemeljenem le na razlikovanju telesu tuje snovi od telesu lastne. Zato se iščejo novi načini dokazovanja zlorabe prepovedanih snovi in metod. Eden od teh je utemeljitev spremljanja indirektnih krvnih biokazalcev za identificiranje in sankcioniranje krvnega dopinga pri športnikih. Najnovejši model ocenjevanja sprememb indirektnih krvnih biokazalcev je biološki potni list, na podlagi katerega je z visoko verjetnostjo mogoče, ne le identificirati abnormalne spremembe krvnih biokazalcev pri športniku, temveč je, od leta 2010 mogoče na osnovi informacij, ki jih ta model zagotavlja, uvesti sankcije proti športniku. Uvedba biološkega potnega lista tako predstavlja pomemben mejnik v dokazovanju zlorabe zdravil, saj utemeljuje nenormalna odstopanja bioloških kazalcev od pričakovanih vrednosti v osnovnem profilu posameznega športnika, čeprav vzrok zanje ostaja neznan. Namen našega dela je predstaviti namen, razvoj in utemeljitev indirektnih krvnih biokazalcev za identificiranje in sankcioniranje krvnega dopinga pri športnikih. Obenem želimo, na podlagi podatkov meritev krvi in podane oprostilne sodbe domnevnega doping primera poklicnega športnika, prikazati prednosti in slabosti modela biološkega potnega lista ter dokazovanja doping prekrška le na osnovi informacij, ki jih le ta zagotavlja. V nalogi smo predstavili nekatere naše argumente o večji ali manjši možnosti alternativnih hipotez abnormalnega krvnega profila poklicnega športnika. Zavrnili smo vse alternativne hipoteze razen možnosti uporabe avtologne krvne transfuzije, uporabe rHuEPO, bivanja na višini ali napake modela biološkega potnega lista. Ker je ocenjevanje krvnih biokazalcev z modelom biološkega lista upravičeno le na veljavnih predpostavkah modela, smo preverili ustreznost določenih predpostavk modela. Na osnovi naših podatkov smo ugotovili razhajanja v primeru občasnega bivanja na višini, izračunu dovoljenih mej odstopanja, ter po našem mnenju še neobhodno nujno korekcijo vpliva multiplega testiranja ter izračuna ustrezne ocene verjetnosti lažno pozitivnega rezultata. Nenazadnje menimo, da bi morali biti parametri porazdelitev zaporedij krvnih vrednosti določeni izključno na osnovi pogostih meritev športnikov tiste tekmovalne discipline, v kateri aktivno sodeluje športnik sam. Prav tako način trenutnega ocenjevanja abnormalnih profilov športnikov s strani ekspertne skupine UCI, po mnenju nekaterih pravnikov, kaže na zmoto tožilca. Nenazadnje po našem mnenju obstaja velika nevarnost argumenta iz nevednosti pri obravnavi informacij pridobljenih z modelom biološkega potnega lista. Zato menimo, da uvedba sankcij proti športniku, utemeljenih izključno le na informacijah izhajajočih iz uporabe trenutnega modela biološkega potnega lista ni upravičena, lahko pa se skupaj z analizo ekspertov uporabi kot izjemno uspešna metoda odkrivanja sumljivih športnikov.

Ključne besede: biološki potni list, indirektni krvni kazalci, krvni doping.

Proof of abuse of prohibited substances and methods in elite sport, which is called the fight against doping in sport, is continuous for over 40 years. In the meantime, approaches aimed

to give a proof of abuse were developed. They are based on the detection and characterization of foreign substances in biological samples of athletes (urine, blood, hair). Development of new (biological) drugs, especially aimed at the most accurate imitation of the human body's own hormones, threatens to nullify efforts to combat doping, relying only on the difference of foreign substances from the body's own. Therefore, we are looking for new ways of proving abuse of prohibited substances and methods. One of these is the support of monitoring indirect blood markers for identifying and sanctioning of blood doping in athletes. The latest model for evaluating changes in indirect blood markers is biological passport. This model can, with high probability, not only identify abnormal changes in blood markers of sportsman, but since 2010 can, based on information it provides, impose sanctions against the athlete. The introduction of the biological passport is an important milestone in demonstrating drug abuse, because abnormal deviations of biological markers from the expected value of the basic profile from each athlete can be identified despite the fact that the cause remains unknown. The purpose of our work is to present the purpose, development and support of indirect blood markers to identify and punish the blood doping in athletes, and also show the strengths and weaknesses of the model on the basis of an analysis of a doping case of a professional athlete. We rejected all the alternative hypotheses other than the possibility of using autologous blood transfusion, use of rHuEPO, or an error in the model of the biological passport. The assessment of indirect blood markers by a model can only be justified on current assumptions of the model which we have partly examined. Based on our data, we found differences in the case of occasional residence at height altitude, in the calculation of allowable limits of tolerance. In our opinion it is absolutely necessary to correct the impact of multiple testing in the model, and calculate the likelihood of false-positive result. Finally, we believe that we should determine the parameters of the distribution of sequences of blood values solely on the basis of frequent measurements of those athletes sports discipline in which the athlete is actively involved himself. Also the means of the current evaluation of abnormal profiles of athletes by the expert UCI group, according to some lawyers, shows the prosecutor fallacy. Finally, we believe there is a high risk of an argument from ignorance in dealing with information obtained with the model of the biological passport. We therefore believe that the imposition of sanctions against the athlete based solely on the information resulting from the use of the current model of the biological passport is not justified, but can be, accompanied by an analysis of experts, used as an extremely effective method of detecting suspicious athletes.

Uporabljene kratice

3 G – tretja generacija matematičnega modela ocenjevanja indirektnih kazalcev (dolgoročno spremljanje)

AAS – androgeni anabolični steroidi

ABPS – (ang. abnormal blood profile score) – multiparametrični indirektni kazalec krvnega dopinga, imenovan abnormalna vrednost krvnega profila

BN – (ang. bayesian network) - Bayesova mreža

BPL – program biološkega potnega lista (Athlete's Biological Passport- ABP), verzija 2.2.1

CDF – (ang. cumulative distribution function) – kumulativna porazdelitvena funkcija

CERA – (ang. continuous erythropoietin receptor activator) - metoksi polietilen glikol epoetin beta

CV – (ang. coefficient of variation) – koeficient variacije

EPO – eritropoetin

Hct – (ang. hematocrit) – hematokrit, delež volumna krvi, ki ga zasedajo rdeče krvne celice

Ht – hematokrit, delež volumna krvi, ki ga zasedajo rdeče krvne celice

Hgb – (ang. haemoglobin) – koncentracija hemoglobina, masa hemoglobina na volumen krvi

Hb – koncentracija hemoglobina, masa hemoglobina na volumen krvi

IAAF – (ang. International Association of Athletics Federations) – mednarodno združenje atletskih zvez

LF – napovedna porazdelitev LF (likelihood function) je gama funkcija z parametrom oblike $n/2$ in parametrom merila $1/n$, za zaporedje n opazovanj [72].

MCH (ang. mean corpuscular haemoglobin) - masa hemoglobina na rdečo krvno celico

MCHC (ang. mean corpuscular haemoglobin concentration) – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitu

MCV (ang. mean corpuscular volume) – povprečni volumen posamezne rdeče krvne celice

OOB – (ang. out-of-competition) – izven tekmovanja

RET# - (ang. reticulocyte count) – število retikulocitov (retikulociti so mlade rdeče krvne celice)

RET% - (ang. reticulocyte percentage) – delež retikulocitov v %.

rHuEPO – (ang. recombinant human erythropoietin) - rekombinantni humani eritropoetin

TD – (Athlete's Passport Haematological Module Interpretation Technical Document) – tehnični dokument biološkega potnega lista [72]

UVOD

Ljudje so že zelo zgodaj ugotovili, da lahko določene snovi, ki so vnesene v naš organizem, pozitivno vplivajo na fiziološke in psihološke funkcije in posledično na izid športne tekme ali borbe. Prve zapise uporabe poživil v športu najdemo v grško rimskih časih [1]. V zgodnjem obdobju modernega športa, pa se je doping začel povezovati predvsem s tekmovalnim kolesarstvom [2]. Čeprav je nekaj kolesarjev umrlo zaradi vnosa močnih stimulansov že v poznem devetnajstem stoletju in v začetku dvajsetega stoletja, so športne oblasti ostale pasivne. Ti so doping v javnosti pojasnjevale kot nenavaden dogodek, ki v športu predstavlja prej izjemo kot pravilo in se bo zato razrešil sam od sebe [3]. Šele smrt danskega kolesarja Knuda Enemarja Jensena med olimpijsko kolesarsko dirko leta 1960 v Rimu je izzvala reakcijo mednarodne kolesarske zveze (UCI), ki je začela oblikovati prva pravila proti doping u v športu [2]. Leta 1966 tako UCI kot mednarodna nogometna zveza (FIFA) na svojih svetovnih prvenstvih prvič izvedejo doping testiranje [1]. Mednarodni olimpijski komite (MOK), ki predstavlja najvišjo avtoriteto v olimpijskih športih, se aktivno vključi v borbo proti doping u leta 1967, po tem, ko je televizija v svet prenesla vest o smrti britanskega kolesarja Tommyja Simpsona, ki je zaradi zlorabe poživil umrl na Dirki po Franciji, kljub takojšnjemu zdravniškemu posredovanju [3]. Leta 1967 je pri MOK ustanovljena medicinska komisija, ki je dobila nalogo da oblikuje strategijo proti zlorabi zdravil v olimpijskih športih, predstavila Listo prepovedanih snovi [1]. Kmalu je postalo jasno, da ima doping dolgo zgodovino in da je prisoten v številnih olimpijskih športih. Potrebno je bilo začeti zapirati velikansko vrzel zlorabe zdravil v športu, kar danes opredeljujemo kot boj proti doping u v športu, ki poteka že več kot 40 let [2]. Doping danes opredeljujemo kot pojav ene ali več kršitev predpisov proti doping u, ki jih določa besedilo Antidopinškega Kodeksa Svetovne protidopinške Agencije (WADA). Čeprav se je boj proti doping u od leta 1967 intenziviral, pa je do pred kratkim veljalo prepričanje, da so bili dopingerji vedno v prednosti pred tistimi, ki so želeli doping omejiti [2]. Predvsem zaradi dejstva, ker tradicionalno dokazovanje zlorabe nedovoljenih snovi in metod temelji na neposrednem odkritju telesu tuje snovi oz. njenih presnovkov v biološkem vzorcu športnika (običajno v urinu in krvi) [4]. To zahteva izvedbo študij metabolizma in izločanja nedovoljenih snovi za vsako novo zdravilo posebej, kar

zahteva svoj čas. Zaradi hitrega razvoja novih zdravil, izmed katerih se nekatera zlorabijo v športu, postaja boj proti dopingu, ki temelji na razlikovanju med telesu lastnimi in tujimi snovmi, vedno težji [5], v nekaterih primerih pa že nemogoč [4]. Prav tako se ni mogoče izogniti zaostanku v razvoju preizkušenih metod za dokazovanje zlorab prepovedanih snovi. Leta 2008 je UCI kot prva in do sedaj edina športna zveza uvedla biološki potni list, katerega glavna novost je izdelava t.i. osebnega hematološkega in v prihodnosti tudi hormonskega profila za vsakega kolesarja posebej [6]. Na daljši rok to omogoča identifikacijo morebitnih sprememb v osnovnem profilu športnika ne glede na uporabljena sredstva [4]. Uvedba biološkega potnega lista predstavlja pomemben mejnik v dokazovanju zlorabe zdravil, saj utemeljuje nenormalna odstopanja bioloških kazalcev od pričakovanih vrednosti v osnovnem profilu posameznega športnika, čeprav vzrok zanje ostaja neznan [4]. Na podlagi analize športnikovega biološkega profila lahko ugotovimo ali so odstopanja posledica bolezni ali pa izhajajo iz uporabe prepovedanih snovi oziroma metod. Decembra 2009 je WADA odobrila in vključila sistem biološkega potnega lista v Svetovni kodeks proti dopingu, zato se od leta 2010 naprej odstopanja v biološkem potnem listu obravnavajo kot dopinški prekrški [7]. Namen naloge je na primeru poklicnega športnika obtoženega domnevnega doping prekrška s strani UCI, prikazati prednosti in slabosti dokazovanja doping prekrška le na osnovi informacij, ki jih le-ta omogoča.

1. Namen dela

S pomočjo dostopne literature prikazati namen, razvoj in utemeljitev spremljanja indirektnih krvnih biokazalcev za identificiranje in sankcioniranje krvnega dopinga pri športnikih.

Z uporabo programske opreme biološkega potnega lista (Athlete's Biological Passport, verzija 2.2.1) in krvnih podatkov dveh športnikov, katerih doping status je popolnoma jasen, prikazati način delovanja biološkega lista, to je, najnovejšega modela za ocenjevanje sprememb indirektnih biokazalcev krvi.

Na osnovi podatkov meritev krvi in podane oprostilne sodbe domnevnega doping primera poklicnega športnika prikazati prednosti in slabosti dokazovanja doping prekrška le na osnovi informacij, ki jih zagotavlja model biološkega potnega lista, obenem pa kritično ovrednotiti predpostavke modela biološkega potnega lista. Slednje vključuje prikaz morebitnih pomanjkljivosti upoštevanja načina bivanja na višini pri interpretaciji krvnih vrednosti poklicnega kolesarja, ter na podlagi spremljanja meritev koncentracije hemoglobina skupine slovenskih moških domnevno nedopingiranih vrhunskih tekačev na smučeh v obdobju opazovanja 15. tednov, od tega tri tedne bivanja na višini 1600 m.n.v. po protokolu: spi visoko – treniraj nizko, opozoriti na morebitne nedorečenosti določenih predpostavk modela biološkega potnega lista pri upoštevanju krvnih meritev odvzetih na višini (opisani pod hipotezo 8).

Na osnovi podatkov meritev koncentracije hemoglobina devetih anonimnih vrhunskih poklicnih športnikov pogosto merjenih (enkrat na dva meseca ali več) v daljšem časovnem obdobju (12 mesecev ali več) pred obdobjem uvedbe biološkega potnega lista prikazati način odkrivanja abnormalnih profilov športnikov v modelu biološkega potnega lista ter opozoriti na prednosti in slabosti takšnega pristopa odkrivanja abnormalnih profilov (opisani pod hipotezo 8).

2. Kaj je doping?

Leta 1967 je Svet Evrope predlagal naslednjo definicijo dopinga: *“Doping je aplikacija telesu tujih substanc v organizem, ali pa telesu lastnih substanc v nefizioloških količinah ali z neobičajnimi postopki, z namenom izboljšati fizično sposobnost na tekmovanju [8].”*

MOK opredeljuje doping kot [3]:

1. Uporabo pripomočkov (snovi ali metod), ki potencialno ogrožajo športnikovo zdravje in/ali lahko spodbudijo (*enhance*) njegovo udejstvovanje (*performance*);
2. Prisotnost prepovedanih snovi ali metod v športnikovem telesu ali dokaz o uporabi le teh.

Doping danes opredeljujemo kot pojav ene ali več kršitev proti dopingu, ki jih določa besedilo Antidopinškega Kodeksa Svetovne protidopinške agencije [8].

3. Boj proti dopingu v Republiki Sloveniji

Pravno osnovo za oblikovanje politike proti dopingu v Sloveniji predstavlja Konvencija boja proti dopingu v športu Sveta Evrope (1989), ki jo je Slovenija ratificirala 2. Julija 1992, nadalje pa tudi Medicinski pravilnik Mednarodnega olimpijskega komiteja (MOK) [3].

V Sloveniji je bila v institucionalnem smislu politika proti dopingu vzpostavljena leta 1996, ko sta država oz. Ministrstvo za šolstvo in šport (MŠŠ) in Olimpijski komite Slovenije – Združenje športnih zvez (OKS-ZŠZ) soustanovila Nacionalno antidoping komisijo (NAK) kot osrednjo institucijo za boj proti dopingu ter jo pooblastila za nosilko in izvajalko vzpostavljene politike [3].

Nacionalna antidopinška komisija (NAK), kot krovna institucija za področje antidopinga v Republiki Sloveniji, je Svetovni kodeks proti dopingu sprejela 5. avgusta 2005 s ciljem, da bi delovala kot neodvisna organizacija proti dopingu v imenu Republike Slovenije [9].

Junija 2009 sta njena ustanovitelja na podlagi Mednarodne konvencije o boju proti dopingu in dopolnjenega Svetovnega kodeksa (1.1.2009) sprejela dopolnjen Protidopinški pravilnik Nacionalne antidopinške komisije, ki v Sloveniji celovito ureja namen, organizacijo in postopke kontrole dopinga na nacionalni ravni v Republiki Sloveniji v pristojnosti NAK [9].

Protidopinški pravilnik Nacionalne antidopinške komisije je priložen v prilogi 4.

Lista prepovedanih snovi in metod, ki je v veljavi od 1. Januarja 2010 je v prilogi 5 [10].

4. Zakaj je doping prepovedan?

Protidopinški Pravilnik nacionalne antidoping komisije v 6. Členu opredeljuje namen kontrole dopinga:

6. člen

Namen kontrole dopinga

6.1 *Kontrola dopinga* se opravi iz etičnih in medicinskih razlogov.

6.2 *Kontrola dopinga* omogoča enakopravnost tekmovalcev pri doseganju tekmovalnih izidov glede na njihove zmožnosti in motiviranost, onemogoča pa doseganje tekmovalnih izidov pod vplivom *prepovedanih snovi* ali z uporabo *prepovedanih postopkov*.

6.3 *S kontrolo dopinga* se zagotavlja varovanje življenja in zdravja tekmovalcev, preprečuje pa se nastanek bolezni, poškodb in invalidnosti.

Omejitev dopinga je torej pomembna iz etičnega in medicinskega vidika. Etični vidik: vsi tekmovalci, ki sodelujejo na tekmovanju, kjer se vrednotijo človeške sposobnosti, morajo tekrovati pod enakimi pogoji – načelo »fair play«. Medicinski vidik: uporaba prepovedanih snovi in metod lahko povzroča hude neželene učinke in v nekaterih primerih ireverzibilne poškodbe telesnih tkiv. Namen svetovnega boja proti dopingu je zato [11]:

- Varovati osnovno športnikovo pravico do tekmovanja v športu brez dopinga in tako promovirati zdravje, poštenost in enakost vseh športnikov.
- Zagotoviti harmoniziran, koordiniran in učinkovit antidoping program na mednarodnem in nacionalnem nivoju z poudarkom na detekciji, odvrčanju in preprečevanju dopinga.

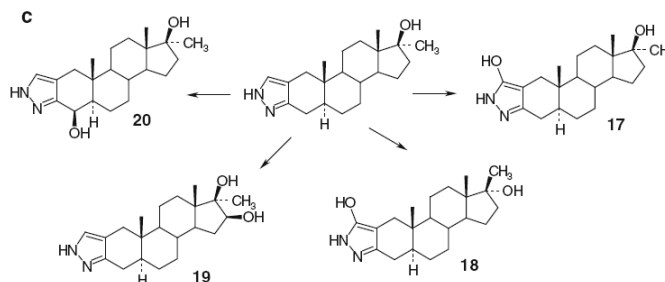
Z namenom omogočiti enake tekmovalne pogoje in zagotoviti zaščito zdravja športnikov Mednarodni olimpijski komite (MOK), WADA in posamezne panožne mednarodne športne organizacije vsako leto sprejmejo listo prepovedanih substanc in metod. Na listo se vključijo substance in tehnike, ki izpolnjujejo dva od treh kriterijev [11]:

- medicinski in/ali znanstveni dokazi, da substanca ali metoda lahko ali vpliva na izboljšanje športnega rezultata;
- medicinski in/ali znanstveni dokazi, farmakološki učinek ali izkušnje, da uporaba substanc ali tehnik predstavlja resnično ali potencialno grožnjo športnikovemu zdravju
- definicija WADE, da uporaba substance ali metode krši duh športa

»Športniki, ki do zmage pridejo po kemični poti ne le precenjujejo zmage, temveč ne razumejo zakaj je zmagovanje tako vrednoteno... « piše v poročilu iz leta 2007 avtorja Georga Mitchella, kjer opisuje »steroidno« dobo v ameriškem bejzbolu [12].

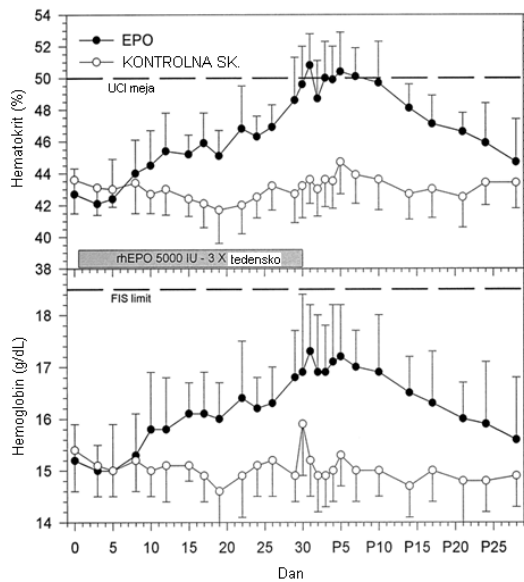
5. Problemi boja proti doping

Tradicionalno dokazovanje zlorabe nedovoljenih snovi in metod temelji na neposrednem odkritju snovi oziroma njenih presnovkov v biološkem vzorcu športnika (običajno v urinu in krvi) [4]. To dokazovanje je mogoče le na osnovi jasne identifikacije prej neznane snovi ter (objektivnega) dokaza, da se odkrita snov nedvoumno razlikuje od telesu lastne snovi, kar posledično pomeni, da je v telo vnešena. To zahteva ne le razvoj izjemno občutljivih analitičnih metod, ki so sposobne zaznati nizke koncentracije teh snovi v vzorcih športnika, temveč je zaradi dejstva, da se določene snovi v telesu kemično spremenijo (metabolizirajo), potrebno opraviti tudi študije njihovega izločanja in določiti njihove presnovke (metabolite). Dokazovanje teh presnovkov v vzorcih športnika tako nedvoumno (objektivno) potrdi ali ovrže prisotnost telesu tuje snovi v vzorcih športnika. Tako je npr. šele hiter razvoj masne spektrometrije v osemdesetih letih prejšnjega stoletja omogočil, na osnovi primerjav masnih spektrov ali izbranih ionskih profilov in primerjave retencijskih časov trimetil silil derivatov pri plinski kromatografiji, ustrezno detekcijo androgenih anaboličnih steroidov (AAS) v urinu [13], snovi ki so se v športu domnevno uporabljale že od leta 1954 [17] (Slika 1). Aparature, ki so jih uporabljali v ta namen so bili plinski kromatografi z masno detekcijo (GC-MS) [13]. Prav tako je znano, da so AAS najbolj pogosto podvrženi prvi fazi metabolizma in se redko izločajo v nespremenjeni obliki. Zato je bilo potrebno za njihovo detekcijo v urinu opraviti študije njihovega izločanja in določiti njihove metabolite (Slika 1) [14]. Vse to zahteva svoj čas.



Slika 1.: Količinsko najpomembnejši metaboliti prve faze metabolizma AAS stanozolola (izhodiščna molekula v sredini). Iz stanozolola v telesu nastanejo 3' – hidroksistanozolol (17), 3' – hidroksi – 17 – epistanozolol (18), 16b - hidroksistanozolol (19) in 4b – hidroksistanozolol (20) [15]. Metoda dokazovanja njegovih metabolitov v urinu je bila objavljena leta 1989 [16], čeprav je bila njegova sinteza objavljena že leta 1959 [13].

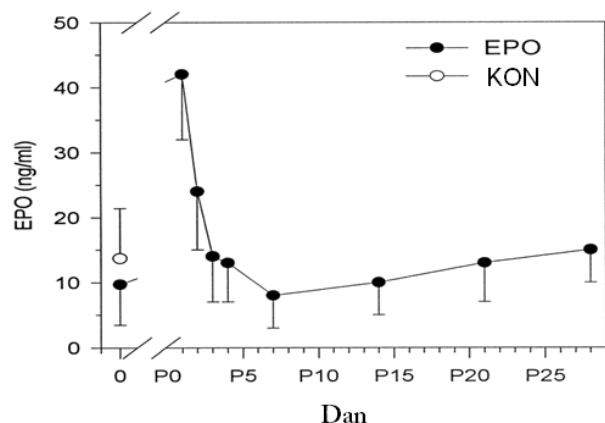
Dokazovanje zlorab pa je težavno tudi zato, ker se določene prepovedane snovi iz telesa športnika hitro izločijo, medtem ko je pozitiven učinek na telesne sposobnosti prisoten dalj časa [2]. Uporaba AAS predstavlja velik problem, saj imajo v nasprotju z stimulansi, ki delujejo takoj (in se zato morajo jemati na tekmovanju, kjer se tudi dokazuje njihova zloraba) AAS stopnjevan učinek, vključujoč lastnost, da omogočajo intenzivnejši in učinkovitejši trening [2]. Uporabniki AAS so se naučili, da uporabljajo AAS v obdobjih izven tekmovanj za povečanje telesne in mišične mase nato pa pred tekmovanjem (kjer izvajajo doping kontrolo) pravočasno prenehajo z njihovo uporabo [2]. Npr. čas učinkovite doze stanozolola (za moške: 50 – 100 mg/dan), AAS ki so ga dokazali v urinu sprinterja Bena Johnson na OI leta 1988, je 8 ur [17]. S trenutnimi analiznimi metodami se ga lahko detektira v urinu športnika še 3 tedne (peroralna aplikacija) ali do 9 tednov (subkutana aplikacija) po zadnji prejeti dozi [17]. Pozneje ne več. Zato je leta 1991 mednarodno združenje atletskih zvez (IAAF) prvič uvedel nenapovedano doping testiranje izven tekmovanj, odločitev, ki izzove burne reakcije športne publike, ki to odločitev razume kot nesprejemljiv vdor v zasebno življenje športnika [2]. Danes se ta



strategija razume kot nujni del učinkovitega boja proti dopingu v športu [2]. Dolgotrajen pozitiven učinek na vzdržljivostni nastop (nekaj tednov) ima tudi dvig oksiformne kapacitete krvi [18], ki se lahko doseže tudi preko zlorabe rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEPO) (Slika 2).

Slika 2.: Spremembe hematokrita (Ht) in koncentracije hemoglobina ([Hb]) pri rHuEPO tretirani skupini (3 x tedensko 5000 IU rHuEPO) v primerjavi s kontrolno skupino. Vsak posameznik je bil v obdobju opazovanja (60 dni) izmerjen 26 – krat (približno vsak drugi dan) [19]. Vrednosti Ht in [Hb] so višje od kontrolne skupine še več kot 30 dni po zaključku terapije.

Zlorabo kratko delujoče oblike tega glikoproteina (Slika 3) se z direktnim testom lahko dokazuje le tri do štiri dni po zadnji aplikaciji [5]. Intravenozna dostava teh zdravil pri športnikih, ki imajo trikrat hitrejšo kinetiko izplavljanja rHuEPO (6,5 ml/h/kg) v primerjavi z nešportniki [20], pa ni več dokazljiva že po 2-3 urah po aplikaciji [21]. Uporaba indirektnega dokazovanja zlorabe tega hormona še danes predstavlja edini način identificiranja posameznikov, ki so prenehali z uporabo kratko delujočih oblik tega hormona en teden ali več pred tekmovanjem [22]. Takšni športniki imajo značilno tekmovalno prednost pred drugimi, obenem pa niso izpostavljeni rizikom doping testov, ki temeljijo na direktnem dokazovanju rHuEPO [22].



Slika 3.: Sredine ($\pm$ SO) nivoja EPO v serumu pri z rHuEPO tretirani skupini (polni krogi) pred terapijo (dan 0) in po terapiji (dnevi P1-P28), kot tudi izhodiščna vrednost za kontrolno skupino (prazen krogec) [19].

Na doping testu se dokazujejo le odobrena zdravila in metode. Omejitev takega pristopa se je pokazala leta 2002, ko so v urinu športnice odkrili norbolethon, steroidno molekulo, ki jo je

farmacevtska industrija že davno opustila [2]. Razlog je bila njegova toksičnost [14]. Odkritje je bilo mogoče le zato, ker so pazljivi doping uradniki pri športnici opazili znižano produkcijo telesu lastnih steroidnih hormonov – očitni znak zlorabe steroidnih hormonov [2]. Koncept spremljanja sprememb telesu lastnih steroidnih hormonov bo osnova hormonskega (steroidnega) profila, ki se trenutno razvija v okviru biološkega potnega lista [23]. Že leto kasneje je bil na podlagi anonimne prijave identificiran tetrahidrogestrinon ali THG [2]. THG je sintezni steroid, ki ni bil nikoli odobren ali prodajan za katerokoli klinično indikacijo [14]. Tako je postal prvi steroid v zgodovini, ki je bil načrtovan, sintetiziran in razdeljevan le z enim namenom – da bi preslepil doping test [2]. Nenazadnje velik problem boja proti dopingu predstavljajo nova obetajoča zdravila, ki se včasih v športu uporabijo za izboljševanje fizičnih sposobnosti športnika. Glavni cilj modernega in preventivnega antidoping raziskovanja je zato tudi identifikacija novih prihajajočih zdravil, ki imajo potencial izboljševanja športnih dosežkov in razvoj načinov detekcije le teh [24]. V zadnjem desetletju so farmacevtske družbe predstavile številne nove molekule, ki imajo potencial za zlorabo v športu. Le te so [24]:

- Novi anabolični agensi: Selektivni modulatorji androgenih receptorjev (ang. SARM – selective androgen receptor modulators) kot so: LGD-2226, BMS-564929, S-40503.
- Nova zdravila proti anemiji: stabilizatorji hipoksično vzbujenega dejavnika – 1 (ang. hypoxia inducible factor (HIF) – 1 stabilizers) kot je FG-2216 ali eritropoetin posnemujoči peptidi (ang. EMPs – erythropoietin mimetic peptides) kot je Hematide®.
- Nova zdravila proti debelosti: agonisti PPAR γ (ang. Peroxisome-proliferator-activated receptor agonists) kot je GW501516.
- Nova zdravila proti srčni aritmiji: modulatorji kalcijevih kanalov na osnovi strukture benzodiazepinov kot sta JTV-519 in S-107.

Nove kemične značilnosti teh bodočih zdravil otežujejo pripravo ustreznih testov za dokazovanje njihove prisotnosti v vzorcih športnika, saj strukture nekaterih od teh v celoti niso znane ali pa ni dostopnega referenčnega materiala [24]. Poleg tega ustrezne metabolične študije *in vivo* za večino teh snovi še niso bile objavljene [24]. Nenazadnje bo po mnenju dr. Schmidta iz Univerze Bayreuth (Nemčija), izrečenem na WADA konferenci o krvnem

dopingu leta 2009, v nekaj letih število zdravil, ki jih bo mogoče zlorabiti z namenom krvnega dopinga, ter jih ne bo mogoče detektirati, presešlo številko 150 [25].

5.1. Problem bioloških zdravil s stališča boja proti dopingu

Biološka zdravila se v veliki meri razlikujejo od klasičnih zdravil, saj gre v večini primerov za proteinske molekule ali nukleinske kisline [26]. Ob tem je znano, da je sinteza majhnih kemijskih učinkovin običajno bistveno manj kompleksna kot proizvodnja rekombinantnih bioloških učinkovin [26]. Bistvena razlika je v uporabi živih organizmov oziroma mikroorganizmov v primeru priprave bioloških zdravil [26]. Od procesa je odvisno, kako se bodo proizvodne celice odzvale na okolje, kar lahko bistveno vpliva na zgradbo biološke učinkovine in posredno na njeno delovanje [26]. Poleg tega potrebujemo za popolno karakterizacijo majhne sintezne učinkovine relativno enostavne analitične metode. Poleg UV in IR – spektroskopskega zapisa še masno spektroskopijo, elementno analizo in NMR spekter. Z temi metodami pa ne moremo okarakterizirati kompleksnih bioloških učinkovin. Za to potrebujemo številne dodatne tehnike kot so: SDS-PAGE, izoelektrično fokusiranje, kapilarno consko elektroforezo, prenos western, peptidno kartiranje, analizo glikolizacije, Edmonovo določevanje peptidne zgradbe, masno spektrometrijo MALDI-TOF, rentgensko difrakcijo ali NMR visoke zmogljivosti ter druge [26]. V primerjavi s klasičnimi zdravili imajo torej biološka zdravila [26]:

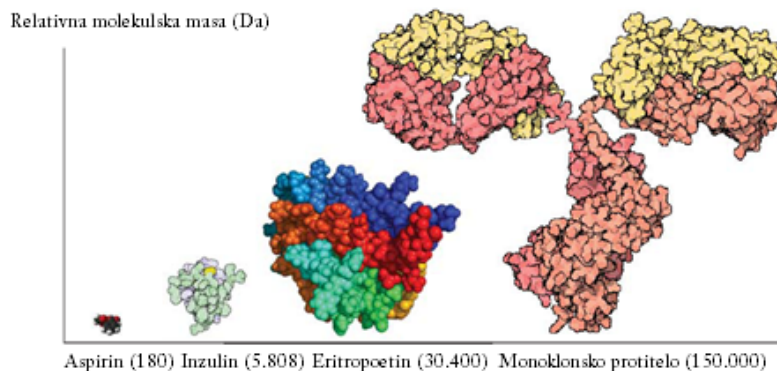
- veliko molekulsko maso (Slika 4)
- kompleksno tridimenzionalno zgradbo
- so proizvedena s pomočjo živih organizmov (ne pa kemijske sinteze)
- so pogosto heterogene molekule (npr. proteini in na njih vezani sladkorji)
- zelo težko jih v celoti ovrednotimo s trenutno dostopnimi fizikalno-kemijskimi analiznimi metodami in določimo njihovo biološko delovanje

- ponovljivost njihovega proizvodnega procesa je odvisna od obvladljivosti vseh stopenj proizvodnega procesa.

Slika 4.: Primerjava molekulске mase in kompleksnosti klasičnega zdravila (Aspirin® – acetilsalicilna kislina) z biološkimi zdravili (inzulin, eritropoetin, protitelo) [27].

5.1.1. Primer eritropoetina

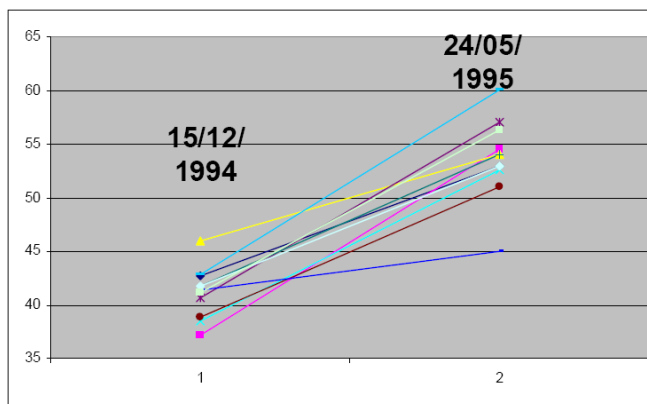
Humani rekombinantni eritropoetin (rHuEPO) se pridobiva tako, da cDNA za EPO vstavijo v genom ene izmed celičnih linij [28]. Največkrat je to linija kitajskega hrčka (ovarijske celice kitajskega hrčka – Chinese hamster ovary cells, CHO) ali pa linija hrčka (Baby Hamster Kidney, BHK) [28]. Ti dve liniji omogočata pravilno tvorbo disulfidnih vezi ter glikozilacijo proteina, ki je pomembna za njegovo biološko funkcijo [28]. Tako sintetiziran rHuEPO je v primerjavi z telesu lastnim EPO identičen na nivoju peptidnega zaporedja, vendar pa je heterogen na nivoju pripetih sladkorjev [28]. Čeprav se protein glikozilira v obeh celičnih linijah (CHO in BHK) in je glikozilacija zelo podobna kot pri endogenemu EPO, pa nekateri deli proteina ostanejo neglikozilirani zaradi odsotnosti specifičnih glukotransferaz. rHuEPO α je bil prvi komercialno dostopen



rekombinantni epoetin leta 1985 v ZDA [28]. Trenutno rHuEPO proizvajajo različni proizvajalci v različnih oblikah. Ker se rHuEPO proizvaja s strani različnih proizvajalcev, v različnih delih sveta po različnih postopkih, z različnimi reagenti in materiali, se ti epoetini med seboj razlikujejo po glikozilaciji, kljub temu, da se uporabljajo iste celične linije [28]. rHuEPO je glikoprotein, ki spodbuja rast rdečih krvničk ter na ta način povečuje oksigenacijo tkiv [22]. Le ta vodi v izboljšanje športnega nastopa [18], kar je bil vzrok prepovedi uporabe eritropoetina v tekmovalnem športu od leta 1990. Do zlorab je prišlo, še posebej v

vzdržljivostnih športih, ko je bilo razvito umetno pridobivanje tega hormona [22], to je, po letu 1985. Govorice o njegovi uporabi v tekmovalnem športu so se pojavile hkrati z začetkom prodaje rHuEPO v letu 1987, še celo pred zimskimi olimpijskimi igrami v Calgaryju [22]. Govorice, ki so se razširile, omenjajo uporabo tega zdravila v vzdržljivostnih športnih disciplinah kot so tek na smučeh, kolesarstvo, atletika in triatlon [22]. Leta 1990 je bil rHuEPO dodan na listo prepovedanih snovi pri MOK, čeprav zanj ni obstajala metoda detekcije. Leta kasneje, še posebej leta 1998, je zaradi odkritih rHuEPO zdravil pri kolesarskih moštvih in priznanj kolesarjev, uporaba rHuEPO v tekmovalnem športu postala očitna [22]. Detekcija zlorabe rHuEPO je bila težavna, saj analiza znanih hematoloških (npr. koncentracija hemoglobina) ali biokemijskih parametrov kaže le na to, da je bila eritropoeza stimulirana, ne more pa potrditi, da je za to odgovorna aplikacija rHuEPO (npr. lahko je vzrok bivanje na višini) [29]. Njegovo neposredno dokazovanje pa otežuje njegova kratka razpolovna doba (8.5 ur pri odmerku 100 U/kg telesne teže za rHuEPO α), velika individualna variabilnost v njegovi farmakokinetiki in dejstva, da v telesu nastaja tudi telesu lastni eritropoetin (EPO) [30]. Radioimunološke in encimimunološke metode ne uspejo ločevati endogenega in rekombinantnega EPO [31]. Šele leta 1995 je Widu s sodelavci uspelo uspešno ločiti endogeni EPO od rekombinantnega iz seruma in urina z uporabo metode elektroforeze [32]. Ločitev sloni na dejstvu, da ima endogeni (telesu lastni) EPO večji negativni naboj kot rekombinantni EPO [32]. Zaradi težavnosti neposrednega dokazovanja tega kompleksnega glikoproteina so že od leta 1996 različni raziskovalni inštituti iskali tudi indirektne krvne kazalce, ki bi bili sposobni dokazovati zlorabo rHuEPO pri športnikih [33].

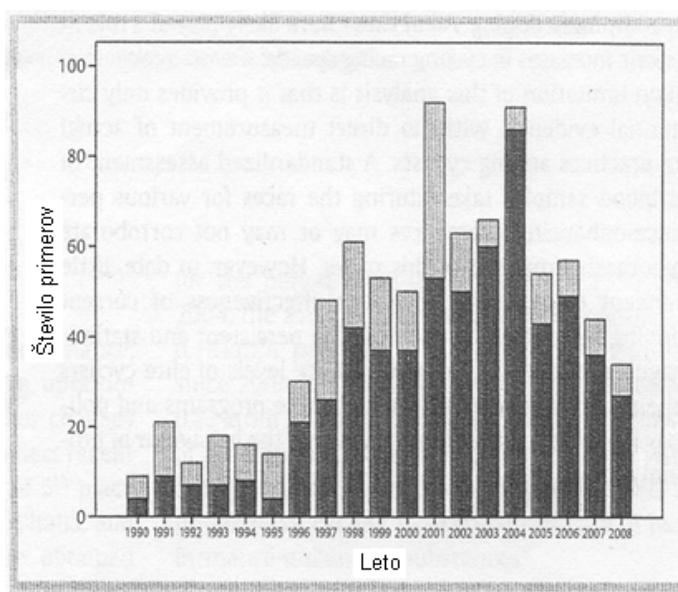
Slika 5.: Danes znane individualne spremembe hematokrita kolesarjev poklicnega kolesarskega moštva v letu 1994 – 1995. Sredina celotnega moštva se je v tem času premaknila z $41,4 \pm 2,4$ % na $53,7 \pm 3,8$ % (oz. + 12,5 %) [25].



Šele leta 2000, trinajst let po začetku njegove uporabe v terapiji, je bilo prvič demonstrirano, da je mogoče z ustrezno analitično tehniko ustrezno ločevati med telesu lastnim in umetnim (rekombinantnim) eritropoetinom v smislu doping kontrole (Slika 6, Tabela 1) [29]. Ponovna analiza shranjenih urinskih vzorcev kolesarjev iz Dirke po Franciji iz leta 1998 je potrdila visoko stopnjo uporabe rHuEPO pri kolesarjih na tej dirki (Slika 5) [22]. Sledilo je tudi povečano število kolesarjev pozitivnih na zlorabo

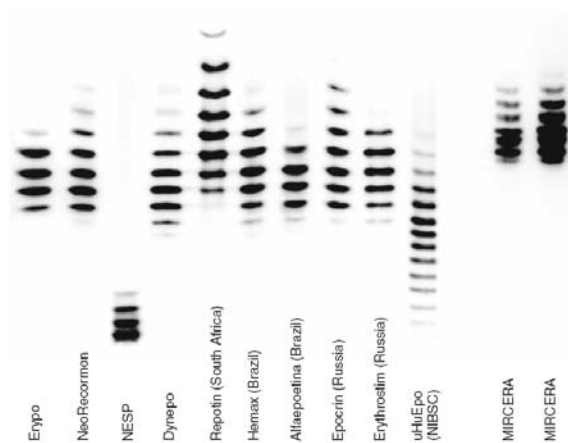
Št. pozitivnih primerov		Slika 6. in tabela 1.: Ocenjevanje EPO – IEF profilov glede na WADA tehnični dokument TD2007EPO (levo rEPO α oz. rEPO β , v sredini darbepoetin α oz. NESP v primerjavi z telesu lastnim eritropoetinom (desno). Pasovi so razdeljeni v bazično, endogeno in kislo območje. Intenziteta trakov je merjena z denzimetrijo [22]. Tabela 1: Število pozitivnih primerov na prisotnost rHuEPO vseh WADA akreditiranih laboratorijev v obdobju od 2003 do 2007 [22].
Leto	primerov	
2003	58	
2004	38	
2005	16	
2006	18	
2007	24	

Graf 1.: Število pozitivnih doping testov poklicnih kolesarjev od leta 1990 do 2008, ki so jim sledile sankcije (temno obarvanje), ter tistim za katere sankcije niso znane ali niso bile izvedene (svetlo obarvanje). Podatki so iz internetne strani (www.cyclisme-dopage.com) in niso potrjeni s strani uradnih organov [34].



Po približno treh desetletjih po identifikaciji, izolaciji, kloniranju in izražanju gena za eritropoetin in posledično uspešni proizvodnji rekombinantnega eritropoetina kot preboja v terapiji po skoraj 155 letih raziskovanja narave proizvodnje rdečih krvničk, se razvoj novih oblik in analogov tega visoko aktivnega proteina nadaljuje [22]. To se zdi upravičeno, saj terapija z EPO in njegovimi rekombinantnimi oblikami (rHuEPO), vodi v izboljšanje kvalitete in podaljševanja življenja pri več kot 90 % pacientov z izraženo močno anemijo [22]. EPO je ob tem z skokovitim naraščanjem prodaje postal eden najbolje prodajanih zdravil v farmacevtski industriji (samo v letu 2005 je prodaja eritropoetina alfa dosegla 6491 milijonov \$ [26]).

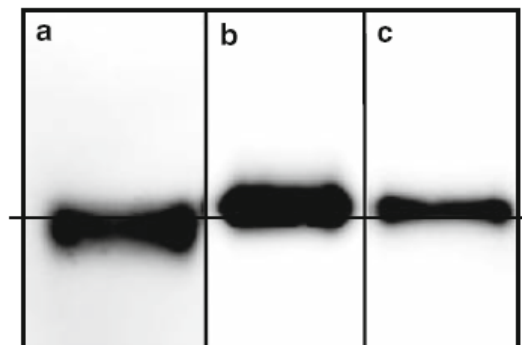
Slika 7.: IEF – profile različnih izvirnih in biološko podobnih epoetinov. Izoelektrično fokusiranje je bilo izvedeno v pH območju 2 – 6. Katoda je na zgornji strani slike [22].



Čeprav je bil leta 2000 razvit direkten test za rHuEPO, pa kmalu postane jasno, da je direktni urinski test drag in časovno zahteven, ob tem pa ima tudi kratko okno detekcije – le tri do štiri dni po zadnji aplikaciji rHuEPO [5], ob tem da je učinek tega hormona na vzdržljivostni nastop prisoten dalj časa. Obenem pa razvoj analogov (Slika 7), ki jih z omenjeno analizo tehniko ni mogoče več nedvoumno dokazovati, pogojuje nadaljnji razvoj analitičnih alternativ za dokazovanje dopingiranja z EPO (Slika 8) [22]. Razvoj novih bioloških zdravil, usmerjen v čim natančnejše posnemanje telesu lastnih humanih proteinov in hormonov grozi, da bo izničil napore boja proti dopingu utemeljen le na razlikovanju telesu tuje snovi od telesu lastne [5]. Prvi tak primer je rekombinantni epoetin δ (Dynepo[®]), ki se pridobiva v humani celični liniji, vendar pa ne v ledvičnih celicah [28]. Zato se glikozilacija EPO še vedno razlikuje od endogenega EPO [28], v vseh ostalih lastnostih pa je identičen humanemu EPO. Ravno zaradi še obstoječih razlik v pripetih sladkorjih (in zato različnega električnega naboja) ga je še mogoče razlikovati od telesu lastnega EPO z pomočjo tehnike izoelektričnega fokusiranja (ločitev na osnovi naboja) in nato še z uporabo dodatne metode

SDS-PAGE (ločitev na osnovi molekulske mase) (Slika 8). Kljub temu pa postane jasno, da v prihodnosti boja proti doping u ne bo več mogoče utemeljevati le na farmakološki osnovi [5].

Slika 8.: Slika pridobljena po IEF in nato še SDS-PAGE ločitvi, dvojnemu prenosu in detekciji s kemoluminiscenco; negativna kontrola (NIBSC uHuEPO)(a), epoetin delta standard (Dynepo®)(b), vzorec športnika (c) [22]. Vzorec športnika jasno izkazuje podobnost z epoetin delta standardom ne pa z negativno kontrolo [22].



A umetno izboljšanje vzdržljivostnega nastopa je mogoče doseči na več načinov. Krvni doping je prepovedana metoda namenjena povečevanju dostave kisika tkivom in s tem aerobnega nastopa, preko povečevanja skupne mase hemoglobina, večinoma v vzdržljivostnih športih. Raziskave kažejo, da je minimalna manipulacija skupne mase hemoglobina, ki izzove značilen napredek v maksimalni porabi kisika (povečanje VO_{2max} za 3-5 %, kar je velikost pričakovane napake meritev porabe kisika z večino trenutno uporabljenih spirometrov), 150 g funkcionalnega hemoglobina [35]. Skozi desetletja so se oblikovale različne strategije doseganja tega cilja, vključujoč uporabo homologne/avtologne krvne transfuzije, uporabo rekombinantnega humanega eritropoetina in drugih spodbujevalcev eritropoeze (v bližnji prihodnosti Hematid in HIF-1 stabilizatorji [24]), uporaba avtolognih transfuzij skupaj z rHuEPO, uporaba umetnih nosilcev kisika [36] in v bližnji prihodnosti genskega dopinga [37]. Dokazovanje teh, v športu nesprejemljivih metod, je izjemno težavno [36].

5.2. Nov mejnik v boju proti doping u - uvedba biološkega lista

Da bi rešili kar največ omenjenih problemov dokazovanja zlorabe zdravil v športu in tako še povečali učinkovitost boja proti doping u, je bilo potrebno narediti še en korak, to je, začeti z dolgoročnim spremljanjem indirektnih kazalcev dopinga. Problem tega pristopa je bila velika variabilnost bioloških kazalcev med posamezniki. Rešitev je bila prehod k sledenju krvnih

vrednosti vsakega posameznega športnika posebej. Tako so leta 1999 pri Mednarodni drsalni zvezi (ISU) začeli z programom spremljanja krvnih vrednosti njihovih hitrostnih drsalk in drsalcev v okviru programa SAFE (Safe and Fair Event Testing) [38]. Ta testni program naj bi prepoznal uporabo krvnega dopinga z visoko stopnjo verjetnosti, ob tem da je cenejši v primerjavi s standardnimi doping testiranjem ter omogoča hitro pridobivanje rezultatov vseh tekmovalcev. V naslednjih treh letih je ISU tako izvedla več kot 11.000 krvnih pregledov na približno 1650 hitrostnih drsalk in drsalcev in nato oblikovala hematološke potne liste, ki beležijo hematološke vrednosti v času, za vsako tekmovalko in tekmovalca posebej. Dolgoročno spremljanje krvnih vrednosti tako omogoča medicinski komisiji ISU, da lažje odkriva anomalije ali specifične spremembe v času. V primeru anomalij je sledilo nadaljnje (tarčno) testiranje z urinskim rHuEPO testom [39]. Ugotovljeno je bilo, da je incidenca visoko abnormalnih vrednosti krvnih parametrov padla s 13 % v prvi sezoni uvedbe programa, na 3 – 5 % v poznejših sezonah in tako potrdila učinkovitost tega programa [38]. Leta 2008, le dve leti po tajni operaciji španske policije imenovane operacija Puerto [40], ki je razkrila veliko razširjenost dopinga v kolesarstvu in drugih športnih disciplinah, kljub nenehnemu boju proti doping, je UCI kot prva in do sedaj edina športna zveza uvedla biološki potni list. Uvedba biološkega potnega lista predstavlja pomemben mejnik v dokazovanju zlorabe zdravil, saj utemeljuje nenormalna odstopanja bioloških kazalcev od pričakovanih vrednosti v osnovnem profilu posameznega športnika, čeprav vzrok zanje ostaja neznan [4]. Na podlagi analize športnikovega biološkega profila lahko ugotovimo ali so odstopanja posledica bolezni ali pa izhajajo iz uporabe prepovedanih snovi oziroma metod. Tako biološki potni list predstavlja formalni način potrjevanja normalnih fizioloških variacij biokazalcev pri športnikih. Uvedba biološkega lista s strani UCI je indirektno teste osnovala za uvedbo ukrepov in sankcij proti športniku [22]. To prinaša številne prednosti, pa tudi pomanjkljivosti (Tabela 2).

Tabela 2.:

	Neposredno dokazovanje	Posredno dokazovanje
	(testiranje prisotnosti eksogene substance)	(Testiranje motenj v telesu, ki jih povzroča vnos substance)
Glavne prednosti	Lažje za interpretacijo (odločitev DA/NE)	Lahko testira katerokoli substanco ali metodo
	Uporabljena substanca je	Ista metodologija je lahko

	identificirana	uporabljena za detekcijo vseh substanc
Glavne pomanjkljivosti	Ni mogoče testirati snovi, ki imajo enako molekulsko strukturo kot telesu lastne	Težje interpretirati (vključuje naravno variacijo)
	Nov test mora biti razvit za vsako novo substanco	Doping substanca ali metoda ostane neznana.

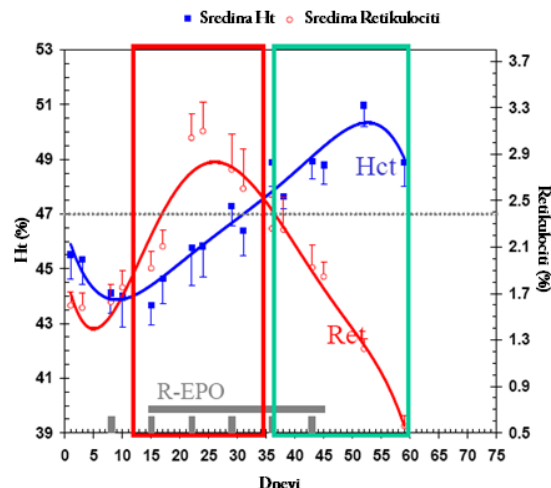
Decembra 2009 je WADA odobrila in vključila sistem biološkega potnega lista v Svetovni kodeks proti dopingu, zato se od leta 2010 naprej odstopanja v biološkem potnem listu obravnavajo kot dopinški prekrški [7]. Oktobra 2010 je glavni medicinski strokovnjak UCI dr. Mario Zorzoli razkril, da je bilo v okviru biološkega potnega lista v letih 2008 in 2009 narejenih več kot 19.000 testov (80 % izven tekmovanj) na 850 kolesarjih. Delež testov, ki kažejo sumljive vrednosti je v tem času padel z 11 na 2 – 3 % [41] in tako potrdil učinkovitost tega programa. Po naših izračunih to pomeni, da se je v omenjenem obdobju število sumljivih kolesarjev znižalo z 91 na 25 – 16,5. V uradnem poročilu UCI za leto 2009 je navedeno da so v dveh letih (2008 in 2009) podatki biološkega potnega lista vodili v 16 doping primerov [42]. Pri desetih so ob tarčnem testiranju, ki je bilo izpeljano na predlog ekspertnih skupin po ogledu sumljivega športnikovega biološkega lista, dokazali prisotnost prepovedane snovi v njihovih bioloških vzorcih [42]. Pri šestih primerih pa so bili eksperti na podlagi podatkov njihovih bioloških listov tako prepričani o prepovedani metodi prenosa kisika da so UCI priporočili sankcioniranje športnika [42].

6. Indirektno dokazovanje zlorabe rHuEPO

6.1. ON/OFF model

Razlog za razvoj indirektnih metode za dokazovanje dopingiranja z rHuEPO so bile olimpijske igre leta 2000 v Sydneyu, saj do takrat še ni obstajala metoda dokazovanja njegove zlorabe [22]. Leta 1999 so 30 rekreativnih športnikov načrtno dopingirali z rHuEPO [22]. rHuEPO je bil apliciran v odmerku 50 IU /kg TT, trikrat tedensko, štiri tedne zapored. To je izzvalo povečanje [Hg] s 148 (skupina 1) oz. 150 (skupina 2) na 159 oz. 166 g/L, ter povečalo skupno maso hemoglobina za 6,9 oz. 12,0 % in VO_{2max} za 6,3 oz. 6,9 % [43]. Ob tem so z rednimi krvnimi testi spremljali številne krvne kazalce in na podlagi sprememb le teh oblikovali dva statistična modela – “ON model”, ki naj bi detektiral tiste posameznike, ki trenutno uporabljajo rHuEPO, ter “OFF model”, ki naj bi identificiral posameznike, ki so ravno zaključili z rHuEPO terapijo (Slika 9) [22]. ON model, ki je vključeval meritve deleža retikulocitov, topnega transferinskega receptorja (sTfr), EPO, deleža makrocitov in hematokrita, je na podlagi spremenjenih krvnih vrednosti uspel identificirati 94 – 100 % rHuEPO uporabnikov v zadnjih dveh tednih dobe aplikacije [43]. Zabeležil pa je tudi en lažno pozitiven rezultat [43].

Slika 9.: Spremembe bioloških indirektnih kazalcev (prikazana Ht in delež retikulocitov). ON model je občutljiv v fazi aplikacije zdravila (rdeč okvir), OFF model pa v času zaključka terapije (zelen okvir) [44].



OFF model, ki je vključeval meritve povišanega hematokrita, znižanih retikulocitov in serumskega eritropoetina je po zaključku terapije z rHuEPO identificiral 67 – 72 % rHuEPO uporabnikov, brez lažno pozitivnih rezultatov [43]. Rezultati so pokazali, da ima oblikovan model dobro napovedno vrednost za identifikacijo posameznikov, ki zlorabljajo rHuEPO, kljub temu pa je zaradi možnosti lažno pozitivnih rezultatov, čeprav še tako majhne, za pozitivni dopinški prekršek poleg pozitivnega krvnega vzorca nujen tudi pozitiven urinski test [45], ki je bil razvit ravno v tem času. Leto 2001 so isti raziskovalci, na podlagi večjega števila merjencev in različnih ras merjencev, objavili novo definirane uteži posameznih krvnih kazalcev v omenjenih dveh modelih. Oba modela sta bila uporabna za oba spola, razlika je bila le v

postavljenih mejnih vrednostih. Da so lahko določili ustrezne mejne vrednosti, ob tem pa preučili še morebitne slabo nadzorovane dejavnike, ki vplivajo na merjene krvne kazalce, so raziskovalci opravili natančno analizo krvnih kazalcev na 1152 športnikih (739 moških in 413 žensk) iz dvanajstih držav, ki so prostovoljno darovali krvne vzorce za analizo [45]. Na podlagi pridobljenih vrednosti so se za vse omenjene parametre oblikovale normne vrednosti za vrhunske športnike (95 % interval zaupanja), ter ocenili vplivi spola, rase, vadbe, športne discipline, vpliva nadmorske višine, biološke variabilnosti ter analiznih metod nanje [45]. Potrjeno je bilo, da ima od omenjenih največji vpliv na krvne vrednosti bivanje na višji nadmorski višini (>610 m).

6.2. Druga generacija ON/OFF modela

Pri "drugi generaciji" ON in OFF modela so uporabili lažje (cenejše) določljive krvne kazalce, koncentracijo hemoglobina in delež retikulocitov [22]. Dodatni prednosti sta bili: zmanjšan vpliv shranjevanja in transporta na krvne kazalce in manjša odvisnost od celičnega volumna (katerega sprememba lahko vpliva na meritve) [22]. Oblikovane so bile enačbe, ki so danes pri nekaterih mednarodnih športnih zvezah vključene v modele ocenjevanja zdravja športnikov (npr. UCI uporablja OFF – hr vrednost $(=[Hb]-60\sqrt{RET\%})$) kot stimulacijski indeks) [22]. Sposobnost modelov druge generacije, da detektirajo dopingiranje z rHuEPO, je bila v splošnem večja od preteklih modelov, še posebej v obdobju, ko se je prenehalo s terapijo [22]. To je pomembno zaradi kratke razpolovne dobe hormona ter ugotovitve, da se športniki poskušajo izogniti detekciji z zmanjševanjem apliciranih odmerkov. Največja prednost takšnega pristopa ostaja dejstvo, da je uporaba OFF modela še zmeraj edini način identificiranja posameznikov, ki so prenehali z uporabo rHuEPO en teden ali več pred tekmovanjem [22]. Takšni športniki imajo značilno tekmovalno prednost pred ostalimi, obenem pa niso izpostavljeni rizikom doping testov, ki temeljijo na direktnem dokazovanju rHuEPO [22].

Enačbe druge generacije ON in OFF modela [5]:

$$\text{ON-he} = \text{Hb} + 9,74\ln(\text{EPO}) \quad (1)$$

$$\text{ON-hes} = \text{Hb} + 6,62\ln(\text{EPO}) + 19,4\ln(\text{sTfr}) \quad (2)$$

$$\text{OFF-hr} = \text{Hb} - 60\sqrt{\text{RET}\%} \quad (3)$$

$$\text{OFF-hre} = \text{Hb} - 50\sqrt{\text{RET}\%} - 7\ln(\text{EPO}) \quad (4)$$

Kljub temu pa so avtorji opozorili, da na vrednosti [Hb] značilno vpliva izpostavljanje višini, rasa in vzdržljivostni trening [5]. To otežuje postavitve mejnih vrednosti, saj s širjenjem mej model izgublja občutljivost (ne zazna resnično pozitivnega športnika). Nižanje mej pa povečuje možnost lažno pozitivnih rezultatov. Ena od možnosti je odločitev športnega telesa o določitvi meje, ki dopušča majhno možnost lažno pozitivnega rezultata. Tako je bilo ugotovljeno, da OFF – hr vrednost, ki ima mejo specifičnosti postavljeno na verjetnost 1:1000 (en nedopingiran športnik lahko doseže to vrednost na 1000 izmerjenih nedopingiranih športnikov, kar je torej en lažno pozitiven rezultat na 1000 meritev), še zmeraj odkrije od 20 do 80 % posameznikov, ki so nedavno prenehali z rHuEPO terapijo [5]. Leta 2002 dokažejo, da to velja le v primeru ko športniki uporabljajo kontinuirano rHuEPO terapijo. V primeru, da je ta prekinjajoča (npr. zaradi vmesnih tekem kjer izvajajo direktno dokazovanje rHuEPO), postane interpretacija indirektnih kazalcev tako problematična, da so raziskovalci, zaradi bojazni lažno pozitivnih rezultatov, odsvetovali njihovo uporabo za dokaz doping prekrška [46]. Leta 2004 je UCI uvedla predpis prepovedi nastopa (“*no start*”) za kolesarje in kolesarke, če presežejo mejo OFF – hr vrednosti 133 za moške in 123 za ženske. To je meja, ki po študiji dosega specifičnost 1:10.000 ali scenarij najslabšega primera na normalni nadmorski višini [5]. V letu 2007 so bili objavljeni podatki raziskave, s katero se je želelo preveriti učinkovitost odkrivanja dopinga z darbopoetinom s trenutno dostopnimi dokaznimi metodami (metoda IEF in ON - he oz. OFF - hr model) [47]. Raziskovalci so tri tedne zapored aplicirali darbopoetin v dozah, ki so izzvale dvig $\text{VO}_{2\text{max}}$ v povprečju za 8 %, kar je dovolj da izzove napredek v športnem nastopu. Le štiri osebe od dvanajstih so v katerem koli obdobju (med oz. po obdobju administracije darbopoetina) presegle vrednost za pozitiven vzorec v ON – he oz. OFF – hr modelu, pri katerem je bila meja postavljena v območje verjetnosti lažno pozitivnega rezultata 1:1000. Ugotovljena občutljivost ON –he oz. OFF - hr modela pri tej specifičnosti, ob uporabi neprekinjene terapije in optimalnemu času odvzema krvnega vzorca, je bila le 33,3 % [47].

6.3. Kako naprej?

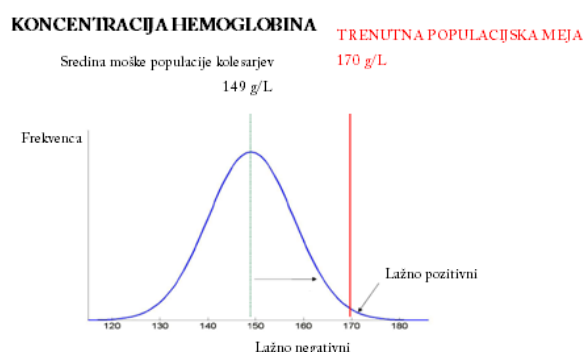
Uporaba določenih arbitrarno določenih mej (Tabela 3) v kritičnih hematoloških parametrih z namenom ugotavljanja primernosti športnika za tekmovanje ni le zelo nespecifična, temveč tudi zelo nizko občutljiva strategija dokazovanja prepovedanih metod [36].

Tabela 3.: Arbitrarno določene zgornje in spodnje meje za kolesarje in kolesarke ter leto njihove uveljavitve [48].

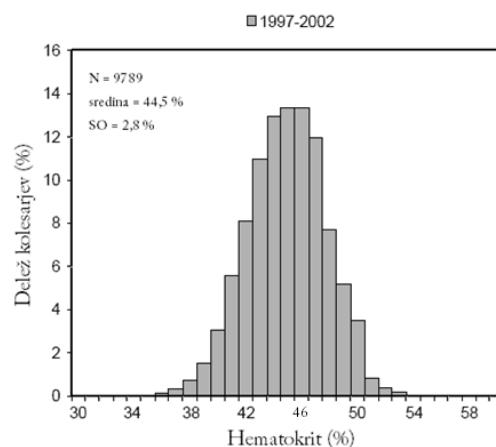
Kazalci	Leto uvedbe	Meja za moške	Meja za ženske
Hematokrit (%)	1997	50 %	47 %
Hemoglobin (g/dL)	2000	17 g/dL	16 g/dL
Prosti plazemski hemoglobin	2003	300 mg/dL	
Indeks stimulacije (OFF-hr)	2004	133	123
Delež retikulocitov (%)	2005	0,2 %	

Visoke naravne (biološke) variabilnosti povečujejo možnost lažno pozitivnih rezultatov (Slika 9), obenem pa namensko povečevanje plazemskega volumna dovoljuje nepoštenim športnikom, da obidejo zgornje meje [36]. Spodaj vidimo porazdelitev koncentracije hemoglobina zaporedij meritev pri moških kolesarjih (srednja vrednost 149 g/L) (Slika 10 levo). Arbitrarno določena meja za prepoved nastopa iz zdravstvenih razlogov je 170 g/L, ki ga naravno dosega po nekaterih podatkih do ~ 2,5 % kolesarjev [49]. Meja hematokrita 50 % iz leta 1997 predstavlja drugi standardni odklon od sredine porazdelitve hematokrita kolesarjev pod okriljem UCI (Slika desno [50]).

Slika 10. in 11.:



Leta
2003
Malco



vati s sodelavci predlaga, da bi morali začeti z ocenjevanjem zaporednih meritev hematoloških parametrov pri posamezniku [36]. Tako bi

definirali osnovni hematološki profil posameznika [36] oziroma oblikovanje individualnega hematološkega potnega lista. Prepričani so bili, da bi lahko, s kombiniranjem dolgoročnega spremljanja krvnih vrednosti (hematološki potni list) skupaj z drugo generacijo ON in OFF modela, oblikovali učinkovito metodo za detekcijo krvnega dopinga in omejili prihodnje nove načine le tega [36]. V ta namen so analizirali krvne podatke 923 poklicnih igralcev nogometa, od katerih je bilo pridobljenih 2506 krvnih vzorcev [36]. Analize pokažejo, da kljub homogenosti bioloških značilnosti preiskovane skupine (starost, spol in športna disciplina) obstajajo velike variabilnosti različnih hematoloških parametrov. Da bi odkrili vzrok variabilnosti krvnih vrednosti so opravili analizo variance, ki pokaže, da je pričakovano glavni vir variabilnosti različnih hematoloških parametrov varianca med posamezniki. Poleg tega pa so prišli še do pomembnejše ugotovitve, to je, da je varianca krvnih kazalcev med posamezniki značilno večja od posameznikove variance. Nazadnje je bilo s primerjanjem koeficienta variacije pri nogometaših, ki so imeli opravljene več kot štiri zaporedne meritve različnih krvnih kazalcev, ugotovljeno, da koncentracija hemoglobina kaže najmanjšo srednjo vrednost KV (2,89 %), sledijo pa mu hematokrit (3,10 %), % retikulocitov (16,39 %), feritin (23,51 %) in topni transferinski receptor (7,01 %). Nizek KV je s stališča boja proti dopingu pomemben, saj kaže na ozko nihanje vrednosti biokazalca okoli srednje vrednosti pri več zaporednih merjenjih in posledično lažjo odkritje abnormalnih odstopanj v primeru, da je tak biokazalec visoko odziven na krvni doping. Obratno pa visok KV omejuje uporabo biokazalca za namene boja proti dopingu. Te ugotovitve močno podprejo strategijo proti krvnemu dopingu, ki bi temeljila na zaporednih meritvah in primerjavi meritev z individualnimi referenčnimi vrednostmi določenih krvnih kazalcev. Poleg tega so bile z analizo hematoloških vrednosti nogometašev, pri katerih so bile opravljene več kot tri zaporedne meritve, z ustreznim matematičnim modelom izračunane "referenčne spremembe" individualnih krvnih kazalcev [51]. Ta matematični model sta opisala Harris in Yasaka leta 1983, ko sta želela odgovoriti na vprašanje: *"Kako značilna je opazovana razlika med dvema zaporednima meritvama?"* [51]. Vprašanje je izrednega pomena v zdravstvu, kjer mora zdravnik interpretirati podatke laboratorijskih meritev in odločiti o tem, kaj je najmanjša sprememba v izbranih laboratorijskih kazalcih, ki prikazuje potrebo po nadaljnjih zdravstvenih ukrepih pri pacientih [51]. V boju proti dopingu pa nas zanima, kaj je najmanjša sprememba v izbranih kazalcih, ki prikazuje morebitno bolezensko stanje oziroma uporabo prepovedane snovi

oziroma metode, ki lahko obe vodita v izključitev športnika iz tekmovanja (zaradi zdravstvenih oziroma etičnih razlogov). Malcovati s sodelavci definira individualne referenčne vrednosti tako, da se sredina zaporednih meritev uporabi kot homeostatična točka, variabilnost posameznikov vrednosti okoli srednje vrednosti pa se oceni na podlagi KV posameznikovih preteklih meritev. Ugotovljeno je bilo, da se lahko KV ustrezno oceni po vsaj petih ponovljenih meritvah (= petih krvnih vzorcih) vsakega posameznika [36]. Sredino napovedne porazdelitve torej določa sredina preteklih meritev športnika, KV opazovanih krvnih kazalcev pa se uporabi kot merilo razpršenosti napovedne porazdelitve in tako matematično opredeli možnost "pričakovanega" odstopanja naslednje meritve krvnega kazalca nogometaša. Z arbitrarno določitvijo mej (95 centil KV) pa so opredelili še "nenormalno" odstopanje naslednje meritve krvnega kazalca športnika [36]. Nato so oblikovali dva točkovna sistema, s katerima bi bilo mogoče na podlagi sprememb krvnih kazalcev identificirati posameznike, ki so izvajali krvni doping. Prvi tri točkovni model (upoštevali so meritve koncentracije hemoglobina, hematokrita in števila retikulocitov) je uspešno identificiral 66 % dopingiranih športnikov med in po obdobju administracije rHuEPO brez lažno pozitivnih primerov v kontrolni skupini [36]. Ko so uporabili pet točkovni model (poleg omenjenih treh krvnih kazalcev so vključili še meritve serumskega feritina in topnega transferinskega receptorja) se je občutljivost povečala, saj so uspeli uspešno identificirati 77 % dopingiranih športnikov brez lažno pozitivnih primerov [36]. Ta študija je podala osnovo za uvedbo individualnega hematološkega potnega lista v vzdržljivostne športe, saj bi bilo mogoče športnika z objektivno opredeljenimi značilnimi spremembami v zaporednih krvnih testih v primerjavi z njegovim individualnim izhodiščem, uspešno identificirati kot posameznika, ki izvaja krvni doping.

6.4. Tretja generacija ON/OFF modela

V letu 2006 je Sharpe s sodelavci objavil oblikovanje modela “tretje generacije” za ocenjevanje indirektnih kazalcev [52]. Pri tem pristopu niso le ugotovili trenutnega stanja športnika (kot pri modelu druge generacije) in njegove vrednosti primerjali z vrednostmi populacije domnevno nedopingiranih športnikov, temveč so jih začeli primerjati s športnikovimi preteklimi vrednostmi. Ta pristop je dokazal povečano možnost dokazovanja krvnega dopinga, saj je izločil vpliv variabilnosti krvnih vrednosti med posamezniki [52]. Z matematičnega stališča to pomeni odstraniti vpliv variance med posamezniki na merjeni biološki kazalec. Kritični element hematološkega potnega lista je bilo določanje normalnih fluktuacij v krvnih kazalcih, ki bi neodvisni avtoriteti omogočile razlikovanje med pričakovanimi in sumljivimi spremembami [54]. Ta model naj bi omogočil razlikovanje longitudinalnih sprememb v hemoglobinu in OFF vrednosti pri posameznikih tretiranih z rHuEPO in placebom, ki jih je bilo mogoče ločiti od naravnih (bioloških) sprememb teh kazalcev. Oblikovan je bil matematični model, ki je omogočil primerjavo trenutno izmerjenih krvnih kazalcev z preteklimi [52].

Model [53]

$[x_1, x_2, \dots, x_n]$ predstavlja n meritev biokazalca X izmerjenega pri istem posamezniku. Testni rezultat x se ima za izstopajočo vrednost v primeru, če pade izven $(1-\alpha)\%$ procentnega območja (kritično območje) pogojno verjetnostne porazdelitve $p(x|x_1, x_2, \dots, x_n)$, kjer je α vnaprej definirana napaka tipa 1, t.i. lažno pozitivni. V praksi, $[x_1, x_2, \dots, x_n]$ pogosto predstavlja časovno zaporedje meritev nekega biokazalca in $x = x_{n+1}$, naslednji testni rezultat. V našem primeru predpostavimo:

1. da je spremenljivka $X \approx N(\mu, \sigma)$ normalno porazdeljena ob tem, da so vse meritve neodvisne druga od druge;
2. da je vnaprej (*a priori*) znana skupna verjetnostna porazdelitev $p(\mu, \sigma)$, ki predstavlja posameznikovo variabilnost povprečja μ in variance σ za $X \approx N(\mu, \sigma)$;
3. da se analitična variabilnost in/ali negotovost meritev značilno ne spreminja med ocenjevanjem $p(\mu, \sigma)$ in aplikacijo modela.

Skupna verjetnostna porazdelitev $p(\mu, \sigma)$ opisuje verjetnost μ in σ že pred kakršnokoli meritvijo posameznika. Ta porazdelitev je običajno pridobljena s študijami z dolgim

opazovalnim obdobjem, ki obenem vključujejo veliko število kontrolnih oseb. Model ne zahteva natančnega poznavanja analitične variabilnosti in/ali negotovosti meritev, temveč le, da se ta variabilnost značilno ne spremeni od predhodnega oblikovanja predhodne (ang. prior) porazdelitve $p(\mu, \sigma)$ do aplikacije modela na nove posameznike. Ta predpostavka drži, ko so testni rezultati pridobljeni na osnovi standardiziranih merilnih postopkov. Običajna rešitev je nato izračun Z – vrednosti kot funkcija ustreznih ocen sredine μ_n in variance σ_n zaporedja $[x_1, x_2, \dots, x_n]$

$$Z_{n+1} = \frac{X_{n+1} - \mu_n}{\sigma_n} \quad (5)$$

in primerjava Z_{n+1} z Z – vrednostjo, ki ustreza želenim vrednostim lažno pozitivnih α . Ta metoda ne uporabi predhodnih informacij o parametrih μ in σ , temveč jih oceni neposredno iz meritve narejenih na posamezniku. Posledično mora biti število meritev n na posamezniku dovolj veliko, da se dobi ocena, ki dobro opisuje značilnosti posameznika. V praksi naj bi bila točnost Z_n dovolj blizu vrednostim določenim z α . Čeprav bi bilo teoretično sicer mogoče pridobiti oceno variance hemoglobina in OFF – hr vrednosti znotraj posameznika za vsakega športnika posebej, pa bi to na eni strani povzročilo drastično povečanje kompleksnosti modela, obenem pa bi zahtevalo odvzem vsaj šestih vzorcev za oblikovanje osnovne vrednosti, najverjetneje pa še več [52]. To je nesprejemljivo s stališča stroškov uvedbe takega testiranja za večje število športnikov [52]. Zato je bil predstavljen model, ki vključuje informacije iz populacije in obenem uporablja določeno varianco (σ^2_{uni}) za vse posameznike. Enačba v tem primeru postane

$$Z_{n+1} = \frac{X_{n+1} - \mu_n}{\sigma_{uni} \sqrt{1 + \frac{1}{n}}} \quad (6)$$

Ta druga metoda uporablja predhodno znanje variance σ^2 in je lahko uporabljena za $n = 1$. Odvisnost od n v imenovalcu dela specifičnost takega modela konstantno za katerikoli testni rezultat, ob predpostavki, da imajo vsi posamezniki enako varianco σ^2_{uni} . Žal je ta predpostavka za številne biokazalce nerealistična. Kot rezultat hipoteza nulte interindividualne variance porazdelitve $p(\sigma)$ izzove postopno izgubo občutljivosti s povečevanjem n pri osebah,

ki imajo varianco naravno manjšo od σ^2_{uni} . Neodvisnosti meritev po mnenju avtorjev zadostimo, ko se vzorci zbirajo v razmiku najmanj enega tedna [52]. Neodvisnost meritev pomeni, da se predpostavljamo, da so vsi vplivi, ki vplivajo na meritve znotraj enega posameznika, predpostavljene kot naključne. Nenazadnje pa vnaprej določena vrednost σ^2_{uni} vključuje sestavine variacij znotraj posameznika in dnevno variacijo (npr. vseeno je ali je vzorec odvzet v obdobju počitka ali tekmovanj), vključno z variacijami, izhajajočimi iz uporabe različnih merilnih inštrumentov [52]. Preden pa bi lahko uporabili enako varianco znotraj posameznika, je bilo potrebno ugotoviti, kakšna je med športniki. Do tedaj je bila znana le varianca znotraj posameznikov med tekmovalno sezono pri nogometaših. Tako je bilo treba najprej preveriti, ali je biološka variabilnost značilna za določene športe ali pa so te spremembe univerzalne v različnih športih [54]. Zato so raziskovalci preučili variacije koncentracije hemoglobina in retikulocitov pri veslačih in jih primerjali s podatki športnikov iz drugih disciplin. V ta namen so bili pridobljeni vzorci krvi od francoske veslaške reprezentance (N=83 moških, N= 31 žensk). Od vsakega posameznika so v obdobju od julija 2001 do marca 2004 pridobili med dva do osem krvnih vzorcev. Te vrednosti so nato primerjali z vzorcem 288 nogometašev. Meritve so pokazale, da je varianca znotraj posameznika za hemoglobin in retikulocite med nogometaši in veslači primerljiva [54]. Prav tako so bile primerljive tudi ostale komponente variance (Tabela 4) [54]. Kljub temu pa so raziskovalci pri ženskah naleteli na nepričakovano nižjo varianco hemoglobina med posameznicami, ki je niso znali razložiti in zaključili, da je potrebno pri ženskah opraviti še dodatne raziskave.

Tabela 4.: Komponente variance hemoglobina in retikulocitov v dveh skupinah športnikov [54].

	Veslači		Nogometaši
	M (n=83)	Ž (n=31)	M (n=288)
Hb (g/L)²			
Med posamezniki	45.1	18.3	49.7
Med dnevi	4.4	5.9	5.4
Znotraj posameznikov	18.9	13.5	17.3
Retics (√%)²			
Med posamezniki	0.0127	0.0139	0.0135
Med dnevi	0.0031	0.0043	0.0036
Znotraj posameznikov	0.0083	0.0103	0.0085

Varianca znotraj posameznika je bila pridobljena z dolgoročnim zbiranjem hematoloških podatkov v dolžini 33 mesecev (veslači) ali 38 mesecev (nogometaši).

Nato pa so bile z namenom, da se natančno oceni varianca znotraj posameznika (σ^2_{uni}) pregledane in izračunane komponente variance znotraj posameznika na osnovi francoskih, nemških, italijanskih in mednarodnih vzorcev športnikov, vključno z vzdržljivostnimi športniki (Tabela 9) [52]. Obenem pa je bilo na podlagi meritev v različnih dneh in zato razlik v pogojih delovanja in

rekalibraciji merilnih inštrumentov, mogoče oceniti koliko k variance znotraj posameznika prispevajo nepredvidljivosti analize faze (Tabela 5) [52]. Raziskovalci so ob tem ugotovili, da nemška skupina v vrednostih hemoglobina in OFF vrednosti izračunanih po modelu biološkega lista značilno odstopa od vrednosti pridobljenih na drugih skupinah. Kljub naknadnemu natančnemu pregledu podatkov avtorji niso uspeli najti razlage za tako atipične rezultate navedene skupine. Zaradi največje izmerjene variance v izračunu občutljivosti tega modela uporabijo njihove vrednosti [52].

Tabela 5.: Ocene varianc za koncentracijo hemoglobina in OFF vrednosti na osnovi različnih skupin športnikov [52]. Vsi športniki so moški. Športniki iz Francije so bili elitni veslači, iz Nemčije večinoma kolesarji, ter nogometaši in veslači, iz Italije pa elitni nogometaši.

	Francija	Nemčija	Italija	Mednarodno
Hb				
Št. oseb	80	124	288	630
Št. meritev	409	603	841	1731
Povprečno št. dni ko so bili zbirani podatki posameznikov (min/max)	622	349	25	10
Med posamezniki	(104-1502)	(31-662)	(6-1044)	(2-40)
Znotraj posameznikov	44.23	37.73	55.56	65.76
Med dnevi	19.27	26.95	17.35	15.41
Potni list za Hg (3. gen)	7.10	12.91	5.21	6.03
	26.37	39.86	22.56	21.43
OFF-hr				
Št. oseb	80	122	288	630
Št. meritev	409	546	841	1731
Povprečno št. dni ko so bili zbirani podatki posameznikov (min/max)	622	332	25	10
Med posamezniki	(104-1502)	(31-614)	(6-1044)	(2-40)
Znotraj posameznikov	84.66	66.19	83.67	124.41
Med dnevi	49.26	54.49	48.65	29.73
Potni list za OFF - hr (3. gen)	16.44	21.41	13.91	26.35
	65.70	75.90	62.56	56.08

Z – vrednost (ang. z-score) za koncentracijo hemoglobina je tako pridobljena na osnovi naslednje formule [52]:

$$Hg_{z-vrednost} = (Hg_{trenutna} - Hg_{sredina}) / \sqrt{\left(\sigma^2 \left(1 + \frac{1}{n} \right) \right)} \quad (7)$$

n = število vseh preteklih vzorcev, ki sestavljajo sredino

$Hg_{sredina}$ = povprečje vrednosti hemoglobina vseh preteklih vzorcev odvzetih pred trenutnim vzorcem

$Hg_{trenutna}$ = trenutno izmerjena vrednost hemoglobina (zadnji odvzet vzorec)

Da bi se olajšala interpretacija značilnega odklona nove vrednosti od izhodiščne vrednosti, se je izbral koncept oblikovanja določenih mej, povezanih z določenim deležem lažno pozitivnih rezultatov, kot že objavljen pri drugi generaciji multiparametričnih označevalcev [52].

Predlagani sta bili dve meji:

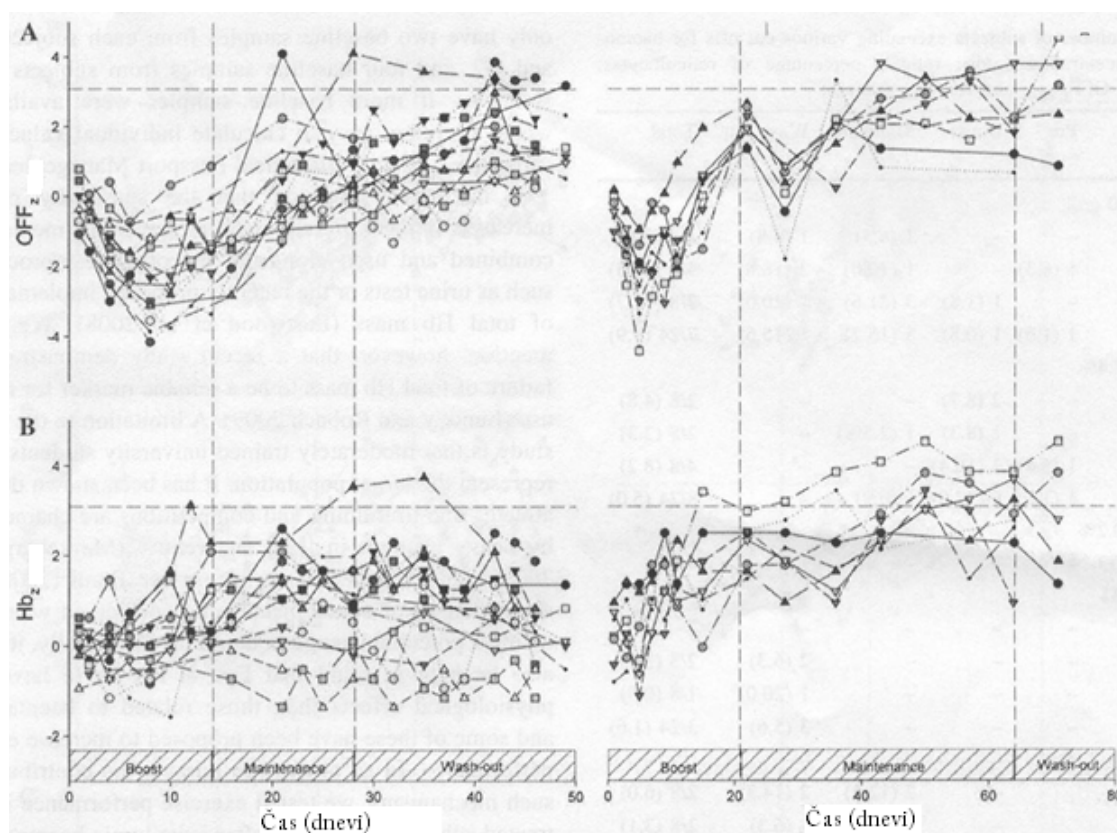
- verjetnost lažno pozitivnega testa 1:50, kot meja sumljivosti, ki zahteva tarčno testiranje in/ali zdravniško spremljanje; ter
- verjetnost lažno pozitivnega testa 1:1000, kot meja prepovedi udeležbe tekmovanja (“*no start*”).

Z-vrednost $\geq \pm 2,33$ oz. $\leq - 2,33$ je ekvivalentno meji 1:50 (en lažno pozitiven rezultat na 50 meritev), Z – vrednost $\geq + 3,09$ oz. $\leq - 3,09$ je ekvivalentno meji 1:1000 (en lažno pozitiven rezultat pri 1000 meritvah).

Kljub temu, da je danes znano, zakaj je bila vrednosti variance znotraj posameznika pri nemški skupinitako različna od ostalih skupin (dopingiranje kolesarjev z rHuEPO in uporaba prepovedane metode krvnih transfuzij [55]), pa model kljub uporabi (pre)velike σ^2_{uni} poda nove znanstvene dokaze o tem, da bo individualni hematološki potni list, ki se bo izognil variabilnosti, izhajajoči iz razlik med posamezniki, in uporabljal določeno varianco med posamezniki, močno izboljšal učinkovitost boja proti dopingu [52]. Kljub temu pa avtorji raziskave poudarijo, da lahko na merjene vrednosti značilno vpliva izpostavljanje višini, zato mora biti vpliv izpostavljanja višini še dodatno preučen, preden bi se ta model začel uporabljati [52]. Leta 2010 so raziskovalci objavili podatke o občutljivosti modela za spremljanje krvnih vrednosti tretje generacije (OFF - hr_z vrednost in Hg_z vrednost) na uporabo redkejšje aplikacije rHuEPO (1x tedensko v obdobju vzdrževanja), ki pa še zmeraj izzove pozitiven vpliv na vzdržljivostni nastop (Slika 12) [56]. Rezultati študije so pokazali, da je model hematološkega potnega lista s posrednimi kazalci, ki uporablja tretjo generacijo ocenjevanja krvnih vrednosti (dolgoročno spremljanje) uspel identificirati 58 % dopingiranih posameznikov (uporabljena σ^2_{uni} za hemoglobin je bila 39,86) [56]. Ker so bili krvni vzorci tem posameznikom vzeti pogosteje kot v običajni antidoping praksi (13 – 19 krvnih vzorcev na posameznika v obdobju desetih tednov, realno 2 – 3 v enakem obdobju), to pomeni, da je verjetnost odkritja športnika dopingiranega z rHuEPO v športni praksi še manjša. To kaže, kako težko je z uporabo indirektnih krvnih kazalcev (3 G model) detektirati uporabo nizkih doz rHuEPO (Slika 13 in Graf 2)[56]. Kljub temu pa uporaba hematološkega potnega lista

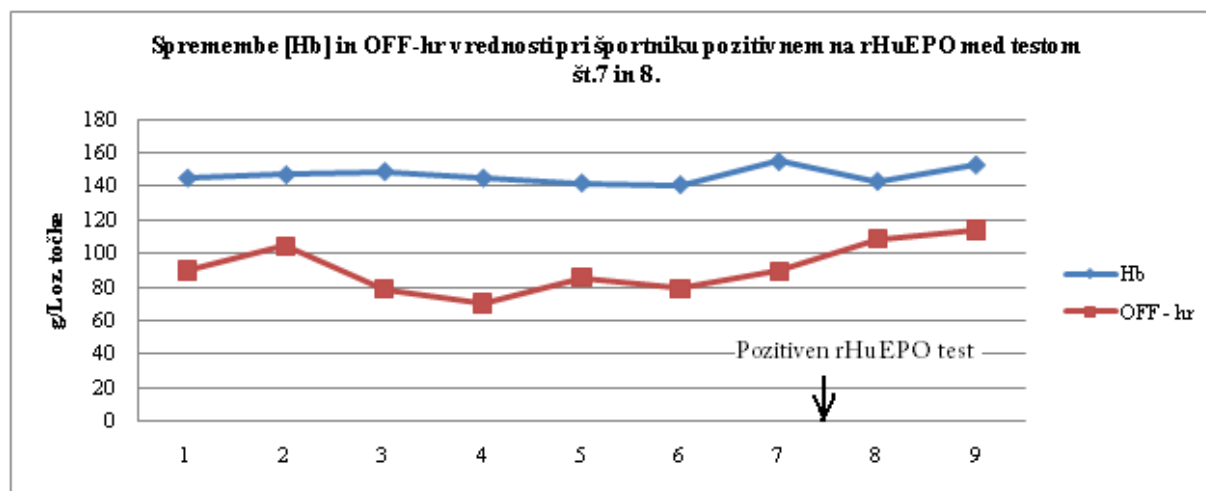
predstavlja napredek v boju proti dopingu, saj je uporaba Z - vrednosti (torej dolgoročno spremljanje in uporaba določene univerzalne variance znotraj posameznika) pokazala večjo učinkovitost kot katerikoli prej uveden krvni model/kazalec [56].

Slika 12.: Individualne spremembe OFF_z – hr_z in Hb_z vrednosti pri 24 osebah tretiranih z rHuEPO [56]. Mejna črtkana črta predstavlja Z – vrednost 3.09. Na levi strani so prostovoljci v obliki subkotalne injekcije v zgornji del roke v zgodnjem dopoldnevu prejeli epoetin β pri dozi 65 IU/kg TT. Prva dva tedna sta bila obdobja »spodbujanja«, ki mu sledita dva tedna »ohranjanja«. V obdobju »spodbujanja« so prostovoljci prejeli injekcijo rEPO vsak drugi dan (4 injekcije/teden), med obdobjem »vzdrževanja« pa eno injekcijo na teden. Nato je sledilo tri tedensko obdobje izpiranja, ko niso več prejeli nobene injekcije, zbiranje krvnih vzorcev pa se je nadaljevalo. Na desni strani pa so prostovoljci prejeli drugačno terapijo epoetin β . Prve tri tedne je potekalo »spodbujanje« (injekcije rEPO vsak drugi dan (60 IU/kg TT) prva dva tedna, nato rEPO injekcije tri zaporedne dni v tretjem tednu), nato pa je sledilo sedem tedensko obdobje »vzdrževanja« (ena injekcija/teden) in nato še en teden izpiranja.



Slika 13. in graf 2.: Resnični primer sprememb indirektnih kazalcev pri moškem kolesarju pozitivnem na direktnem urinskem rHuEPO testom v juniju 2008 [57]. Kratica PBO pomeni procent bazičnega območja EPO – IEF profila. Vrednost > 80 % je bil v preteklosti kriterij pozitivnosti po WADA kriteriju. Individualne spremembe OFF – hr_z in Hb_z vrednosti niso zaznale dopinga z nizkimi dozami rHuEPO, ki ga je odkril slučajen nenapovedan direktni urinski rHuEPO test v juniju 2008.

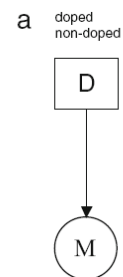
Datum odvzema	Tip testa	Hb (g/dL)	Ht (%)	%RET (%)	OFF-hr (Točke)	Hb _z -vrednost (SD)	OFF-hr _z vrednost (SD)	PBO (%)
Dec. 2007	Blood	14.5	43.7	0.84	90.0			
Jan. 2008	Blood	14.7	43.0	0.50	104.6	0.2	0.84	
Jan. 2008	Urine							9
Feb. 2008	Blood	14.9	45.2	1.37	78.8	0.3	-1.24	
Apr. 2008	Blood	14.5	43.2	1.55	70.3	-0.2	-1.48	
May 2008	Blood	14.2	44.7	0.88	85.7	-0.6	-0.01	
May 2008	Blood	14.1	43.9	1.07	78.9	-0.6	-0.52	
June 2008	Blood	15.5	47.5	1.20	89.3	1.3	0.35	
June 2008	Urine							82
July 2008	Blood	14.3	44.0	0.33	108.5	-0.4	1.78	
July 2008	Blood	15.3	47.4	0.42	114.1	1.0	2.00	
July 2008	Urine							16



6.5. Od tretje generacije ON/OFF modela do modela biološkega potnega lista

Leta 2006 raziskovalci objavijo dokončanje še tretje generacije multiparametričnih označevalcev. Tako je oblikovan multiparametrični kazalec imenovan ABPS – Abnormal blood profile score, ki se odziva na spremembe dvanajstih različnih posrednih krvnih kazalcev, ki lahko izhajajo iz uporabe rHuEPO ali krvne transfuzije [58]. Njegova občutljivost je trikrat večja od vseh modelov uporabljenih do takrat [58]. Leta 2007 je predlagano, da bi moral krvni test kombinirati ne le uporabo multiparametričnih označevalcev (OFF in ABPS vrednosti) z namenom povečane specifičnosti in vključevati hematološki potni list z individualnim slednjem, temveč bi moral upoštevati še vplive različnih heterogenih dejavnikov [59]. Heterogeni dejavniki so tisti dejavniki, za katere je znano, da imajo vpliv na biološki kazalec in so značilni za vsakega posameznika [60]. Zato raziskovalci natančno preučijo tudi, kako različni heterogeni dejavniki, kot so spol, rasa, starost, tip športa in uporaba različnih merilnih inštrumentov vpliva na merjene posredne krvne kazalce [45, 5, 61, 33, 62]. Nenazadnje je potrebno pri interpretaciji dolgoročnega hematološkega profila upoštevati tudi t.i. zunanje dejavnike. To so dejavniki, ki izhajajo iz aktivnosti posameznika in za katere je znano, da lahko vplivajo na merjene krvne kazalce, npr. vpliv spremembe nadmorske višine in kajenje. Poznavanje teh bi lahko ustrezno razložilo variacije krvnih kazalcev izhajajočih iz teh dejavnikov ter tako omogočilo boljšo specifičnost brez večje verjetnosti lažno pozitivnih rezultatov. Naslednji izziv je torej bil, kako te heterogene in zunanje dejavnike formalno upoštevati pri izračunu napovednih verjetnosti bioloških kazalcev. To so dosegli z uporabo Bayesovega verjetnostnega modela, v katerem so vzročne povezave med spremenljivkami interesa predstavljene kot verjetnosti (Enačba 8) [4]. Vzročna povezava med doping aktivnostjo (vzrok) in povzročeno spremembo v krvnih kazalcih (učinek) lahko grafično predstavimo kot mrežo (Slika 14).

Slika 14.: Štirikotnik predstavlja nominalno spremenljivko, krog pa zvezno spremenljivko. Puščica označuje vzročno zvezo. D predstavlja status športnika (dopingiran/nedopingiran). Doping (vzrok) ima učinek na krvni



kazalec (učinek). Cilj pa je vedeti ali je športnik v stanju nedopingiran oz. dopingiran v skladu z vrednostjo kazalca M. Ta problem je mogoče ustrezno rešiti le z uporabo Bayesovega teorema [4].

Cilj je odločitev, ali je športnik uporabljal doping s preverjanjem njegovih ali njenih indirektnih krvnih kazalcev [4]. Ta problem je mogoče rešiti le z uporabo Bayesovega teorema. Če je športnik prejel krvno transfuzijo (vzrok), se vrednost hemoglobina poveča (učinek). Če je model, ki povezuje vzrok in učinek, na voljo (npr. transfuzija ene vrečke krvi povzroči povečanje koncentracije hemoglobina za 10 g/L), lahko uporabimo Bayesov teorem, da sledimo smeri, ki je v nasprotju vzročnosti in odločimo ali je povišanje hemoglobina posledica transfuzije ali je posledica naravne variacije tega biokazalca [4]. V taki Bayesovi mreži je D nominalna spremenljivka z dvema vrednostima (~~dopingiran~~|~~nedopingiran~~), M pa zvezna spremenljivka, ki predstavlja rezultat merjenja določenega krvnega kazalca. Po Bayesovem teoremu lahko vzročno povezavo med M in D formuliramo takole [4]:

$$P(D|M) = \frac{P(M|D) * P(D)}{P(M)} \quad (8)$$

$P(D|M)$ predstavlja verjetnost da si v stanju D kot funkcija vrednosti spremenljivke M.

$P(M|D)$ predstavlja verjetnost izmeritve vrednosti M, vedoč da je športnik v stanju D.

Primer [4]: Če je M enako [Hb] in D=0 označuje nedopingirano stanje, je $P(Hb|D=0)$ dobro reprezentirana z normalno porazdelitvijo z sredino 149 g/L in standardnim odklonom 9 g/L za populacijo kavkaških moških športnikov starih med 19 – 24 let in živečih na nizki nadmorski višini izmerjenih z Advia hematološkim inštrumentom. Prednost pristopa po Bayesu je možnost uporabe funkcije pogojne verjetnosti $P(M|D)$ za določitev $P(D|M)$ funkcije, ki nas v boju proti dopingu dejansko zanima (vzrok-učinek razmerje je veliko lažje določiti, kot pa obratno razmerje učinek-vzrok). Da pa bi lahko določili $P(M|D)$ moramo definirati $P(M|D)*P(D)$. Nato pa se lahko določi odločitveno pravilo glede na dobljeno porazdelitev

POMO. Predhodna porazdelitev $P(D)$ predstavlja verjetnost, da je športnik v stanju D pred testiranjem. Danes vsa odločitvena pravila temeljijo izključno na specifičnosti kazalca (npr. ISU uporablja specifičnost 3 G modela za [Hb] in OFF – hr vrednosti 1:1000 za izključitev športnika iz tekmovanja [56]), s predpostavko, da je športnik nedopingiran (v skladu z predpostavko o nedolžnosti). V Bayesovem teoremu to definiramo z $\Pr(D=0)=1$; $\Pr(D=1)=0$. $\Pr$ v tem primeru predstavlja verjetnost stanja dogodka (P pa gostoto verjetnosti). Pri ocenjevanju krvnih vrednosti z matematičnim modelom (npr. 3 G model, model biološkega lista) vedno izhajamo iz predpostavke, da je v izhodišču športnik nedopingiran. Verjetnost nedopingiranega športnika je torej 1 ($\Pr(D=0)=1$). $\Pr$ in P ne gre zamenjevati. Zgornjo enačbo pa lahko razširimo tako, da vanjo vključimo vse podatke, ki se dolgoročno zbirajo. Če uporabimo dvo nivojni Bayesov model, je mogoče določiti spremenljivke, ki izražajo variacije znotraj posameznika, kot variacije zunaj posameznika [4]. Če predpostavimo, da se vsaka spremenljivka M porazdeljuje normalno, potem vsako spremenljivko ustrezno določata μ in σ^* [4]. V tem primeru učinek dopinga ni viden neposredno na spremembi določenega kazalca, temveč indirektno kot sprememba sredine in standardnega odklona kazalca [4].

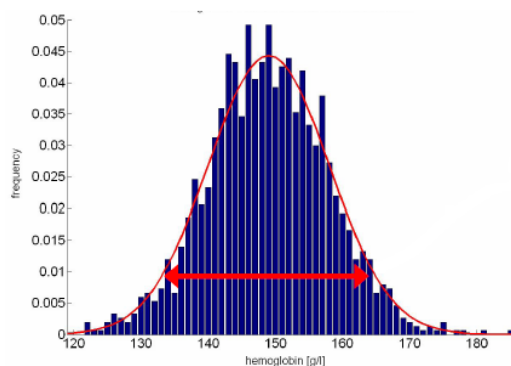
* Trenutno ni nobenih dokazov proti normalni porazdelitvi spremenljivk hemoglobina, OFF – hr vrednosti in ABPS vrednosti ob upoštevanju časovno odvisnih dejavnikov in če se vzorci zbirajo vsaj pet dni narazen [4]. Ne-linearne spremembe ABPS vrednosti zaradi sprememb v eritropoezi lahko kršijo pravilo normalnosti v primeru, da športnik spremeni nadmorsko višino [4].

To formuliramo tako [4]:

$$P(M, D, \mu, \sigma) = P(M|\mu, \sigma) * P(\mu|D) * P(\sigma|D) * P(D) \quad (9)$$

kjer je porazdelitev skupne verjetnosti $P(M, D, \mu, \sigma)$ jasno določena. $P(M|\mu, \sigma)$ je podana z normalno porazdelitvijo $N(\mu, \sigma)$. Podobno, $P(\mu|D)$ sledi normalni porazdelitvi z varianco enako notranji varianci posameznega kazalca (Slika 15).

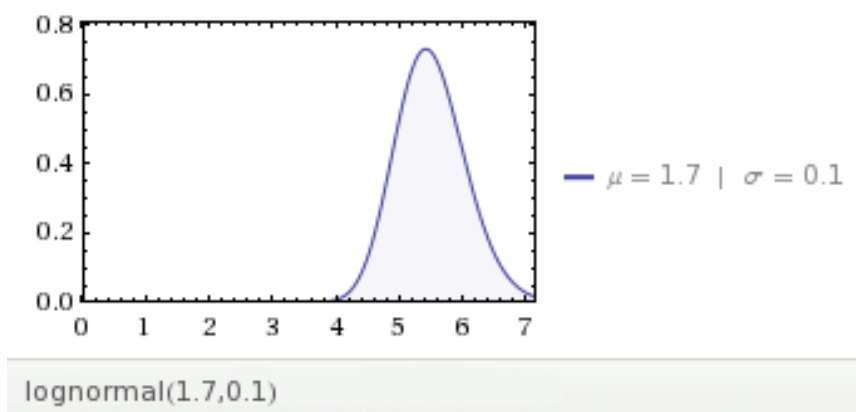
Slika 15.: Meritve večjega števila zaporedij meritev [Hb] pri moških športnikih (N = 101), ki jih je opravil Sottas s sodelavci [63], so razkrile, da se sredine posameznih (dolgoročnih) zaporedij meritev porazdeljujejo normalno z sredino 149 g/L in standardnim odklonom 7,6 g/L.



Za $P(\sigma|D)$ so bile predstavljene različne porazdelitve. Npr. hipoteza univerzalne variance biokazalca znotraj posameznika (kot v primeru 3 G modela) pomeni degenerirano porazdelitev z enojno vrednostjo kot varianco. Nasprotno pa, če predpostavljamo, da varianca znotraj posameznika ni enaka pri vseh posameznikih, se po Sottasu priporoča uporaba log – normalne porazdelitve [63]. Kakorkoli že, pa morajo biti v obeh primerih komponente

variance ocenjene na kontrolni skupini športnikov [63]. Na kontrolni skupini nedopingiranih športnikov (595 odvzetih vzorcev na 101 športniku, povprečno 5,9 vzorca/osebo) je bilo ocenjeno, da se variance zaporedij meritev [Hb] pri moških nedopingiranih športnikih porazdeljujejo po log normalni porazdelitvi s sredino 1,7 g/L in standardnim odklonom 0,1 g/L (Slika 16) [63].

Slika 16.: Log normalna porazdelitev varianc zaporedij športnikov [63].



Tako je bilo ugotovljeno, da je varianca, ki jo uporablja 3 G model močno precejšena ($Y_{39.55} = 6.31$). Pade namreč v območje nad 90 percentil te log normalne porazdelitve (Tabela 6) [63]. Vrednost 28,22 pa je blizu sredine te porazdelitve oz. malo pod 50. percentilom.

Tabela 6.: Percentili log normalne porazdelitve varianc zaporedij športnikov.

Primer [4]:

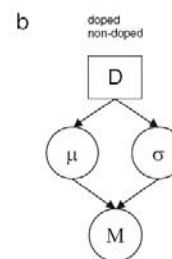
Če je M hemoglobin in D = 0 nedopingiran športnik, je P ($Hgb|D = 0$) dobro reprezentiran z normalno porazdelitvijo s sredino 149 g/L in standardno deviacijo 9 g/L za populacijo kavkaških moških športnikov, starih od 19-24 let, živečih na nizki nadmorski višini merjeno z Advia inštrumentom.

Percentiles :

1 st	4.338
5 th	4.644
10 th	4.816
25 th	5.117
50 th	5.474
75 th	5.856
90 th	6.222
95 th	6.453
99 th	6.908

lognormal(1.7,0.1)

Slika 17.: Longitudinalni pristop lahko modeliramo, če poznamo dve lastnosti spremenljivke: pričakovano sredino in standardni odklon M porazdelitve.

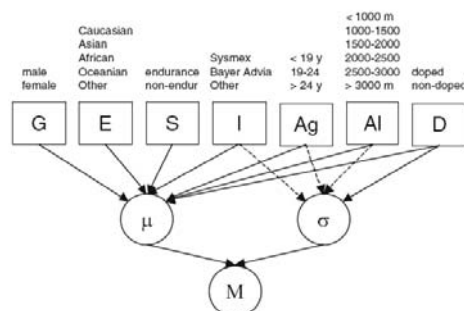


Struktura Bayesovega modela je dovolj fleksibilna, da upošteva tudi heterogene dejavnike.

Primer:

H predstavlja skupino heterogenih dejavnikov. Ker je ugotovljeno, da je koncentracija hemoglobina pri ženskah 16 g/L nižja kot pri moških, to lahko formaliziramo z nominalno spremenljivko G , ki določa dve stanji (moški/ženska), obenem pa uporabimo model $P(\mu|G) * P(\mu|G = 1)$, ki sledi normalni porazdelitvi s sredino 149 g/L ter $P(\mu|G = 2)$, ki sledi normalni porazdelitvi s sredino 133 g/L (standardni odklon 9 g/L pa je enak v obeh primerih). Bayesov model, ki je prikazan na spodnji sliki (Slika 9) vključuje ta heterogen faktor (spol) in njegovo vzročno povezavo, kot tudi raso (E), tip športa (S), starost (Ag), višino (Al) in tip analizatorja (I). Na tej sliki so heterogeni dejavniki predstavljeni kot neodvisni (ni puščic med heterogenimi dejavniki) z aditivnim učinkom na μ . Športnikov biološki potni list običajno vključuje te heterogene dejavnike skupaj z meritvami pridobljenimi na športniku v preteklosti. Sistem je nato popolnoma določen z skupno verjetnostno porazdelitvijo $P(M, \mu, \sigma, D, H)$ in vzročnimi povezavami navedenimi na spodnji sliki (Slika 18):

Slika 18.: Heterogeni dejavniki, za katere je poznano, da vplivajo na rezultate krvnih kazalcev, vključno z njihovimi razredi in vzročnimi povezavami. Spol, rasa in šport so določeni dejavniki, inštrument, starost in višina pa so časovno odvisni dejavniki.



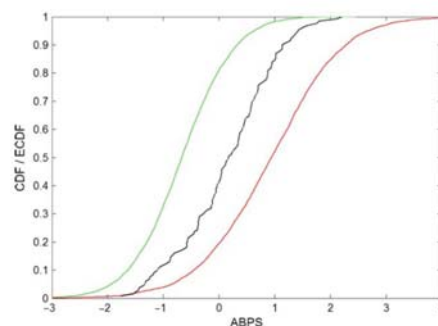
Leta 2008 vključijo v Bayesov model še en heterogen dejavnik - razširjenost dopinga med kolesarji [4]. Če definicijo prevalence ne omejimo le na medicinsko konotacijo, lahko prevelenco dopinga določimo kot delež dopingiranih športnikov v dani populaciji športnikov v določenem trenutku v času. Ankete temelječe na vprašalnikih, ki jih izpolnijo športniki in frekvenca senzacionalističnih člankov v športni literaturi lahko poda določen občutek o razširjenosti dopinga, vendar pa te informacije ne morejo biti uporabljene za resno oceno razširjenosti dopinga. Uporaba Bayesovega modela pa lahko služi oblikovanju ocene razširjenosti krvnega dopinga v tarčni populaciji [4]. Pred tem pa morata biti izpolnjena dva pogoja [4]:

- število testiranih športnikov mora biti veliko; idealno naj bil odvzet in analiziran vzorec za vsakega športnika;
- učinek krvnega dopinga (rHuEPO, krvna transfuzija, hormoni...) na krvne kazalce naj bi bil poznan in kvantificiran za tarčno populacijo, ki se preiskuje. Z drugimi besedami, moralo bi biti mogoče definirati model $P(M|D) = 1$.

Glede na prvi pogoj, je lahko prevelenca dopinga ocenjena takrat, ko se testira pomemben del športnikov, ki sodelujejo na tekmovanju. Natančnost ocene temelji na diskriminatorni moči posameznega kazalca. Npr. potrebno je okoli sto meritev, da se pridobi dobra ocena prevalence dopinga z rHuEPO preko uporabe ABPS kazalca [4]. Drugemu pogoju je mogoče zadostiti, če se upošteva podatke (1) pridobljene na kliničnih študijah, kjer so dopingirali prostovoljce in (2) z uporabo podatkov vzorcev pridobljenih od športnikov katerih doping status je popolnoma jasen [4]. Za ABPS kazalec je bila s pomočjo Bayesovega modela oblikovana komulativna funkcija (CDF – the cumulative distribution function) (Slika 19) [4]. Prikazano je tako nedopingirano stanje $D=0$ (zelena barva), kot dopingirano stanje $D=1$ (rdeča barva) temelječe na podatkih športnikov dopingiranih z nizkimi dozami rHuEPO ali transfuzijami. Katerakoli populacija športnikov s podobnimi značilnostmi, bi morala imeti empirično CDF pozicionirano med obema skrajnima CDF kot funkcijo prevalence dopinga. V tem posebnem primeru so značilnosti populacije športnikov starost med 20-24 let (30 %) ali

nad 24 let (70%), izpostavljeni višini <1000 m z krvnimi vzorci analiziranimi z inštrumenti Sysmex.

Slika 19.: Komulativna funkcija ABPS kazalca referenčne nedopingirane skupine športnikov (levo, zelena barva). 131 športnikov testiranih pred mednarodno kolesarsko dirko leta 2008 (sredina, črna barva). Športniki, ki so se dopingirali z nizkimi dozami rHuEPO ali krvnimi transfuzijami (desno, rdeča barva). Značilen odmik sredinske (črne) krivulje od leve (zelene) krivulje kaže, da je bilo na tem tekmovanju veliko športnikov (prevalenca 52 [43-60] %) v tej populaciji športnikov dopingiranih [4].



Danes boj proti dopingu, ki je osnovan na indirektnih krvnih kazalcih, temelji na pojmu praga specifičnosti [4]. S stališča forenzičnih znanosti, to predstavlja lažno – pozitivno zmoto [4]. Ta sofizem je v bistvu primer bolj splošne zmote tožilca, ki izhaja iz nerazumevanja pojma števila testov: povečevanje števila testov na populaciji z nično prevalenco povzroči povečanje verjetnosti pridobitve lažno pozitivnega rezultata testa [4]. Trenutno ne moremo izključiti možnosti, da so vsi pozitivni primeri določenega pravila, ki temelji na pragu specifičnosti, v resnici lažno pozitivni [4]. Ta logična zmota je še posebej problematična z zornega kota povečevanja števila antidoping testov [4]. V antidoping situaciji bo sprejemalec odločitev izrazil drugačno sodbo, če ve, da v določeni populaciji ni dopingiranih športnikov kot pa v primeru, da se ve, da je velik del populacije v resnici dopingiran [4]. Tako prag specifičnosti 99,9 % sprejemalcu odločitev ne pove nič o deležu resnično pozitivnih med izmerjenimi pozitivnimi (vsak primer je lahko lažno pozitiven). V nasprotju pa prag 99,9 %, ki se nanaša na napovedno verjetnost, da je športnik dopingiran (pozitivna napovedna vrednost), pomeni, da je v povprečju 999 primerov od 1000, v resnici dopingiranih [4]. Kakorkoli že pa naj bi bili rezultati Bayesovega modela, ne glede na nivo dokaza potrebnega za uvedbo disciplinskega ukrepa, uporabljeni skupaj z vsemi ostalimi elementi, ki se nanašajo na fiziološko in/ali patološko stanje športnika [4]. Podobno Bayesov model ne sme biti edini element, ki vodi odločitev: abnormalen profil (točen ali dolgoročen) utemeljen s strani Bayesovega modela daje ustrezno osnovo za začetek podrobnega pregleda primera, ki ga izvajajo ustrezni

strokovnjaki (v primeru krvnega dopinga večinoma hematologi) [4]. Šele njihova ekspertiza bo dala kvalitativno interpretacijo kvantitativnih vrednosti dokazov, ki jih daje Bayesov model [4].

6.6. Matematična osnova modela biološkega lista [53]

Da bi lahko upoštevali tudi heterogene in zunanje dejavnike so morali predhodno enačbo nekoliko spremeniti. Ideja je bila, da se vključi verjetnost $N(\mu, \sigma)$ novega izida x_{n+1} čez vse možne vrednosti parametrov μ in σ , glede na pretekle meritve $[x_1, x_2, \dots, x_n]$. Tako imamo

$$P(x_{n+1} | x_1, x_2, \dots, x_n) = \iint \pi(\mu, \sigma) N(x_{n+1} | \mu, \sigma) P(\mu, \sigma | x_1, x_2, \dots, x_n) d\mu d\sigma \quad (10)$$

kjer se $p(\mu, \sigma | x_1, x_2, \dots, x_n)$ lahko interpretira kot verjetnostna funkcija gostote. Uporaba Bayesovega teorema (torej: $p(\mu, \sigma | x_1, x_2, \dots, x_n) = p(x_1, x_2, \dots, x_n | \mu, \sigma) p(\mu, \sigma) / p(x_1, x_2, \dots, x_n)$) ob predpostavki da so vse meritve neodvisne (torej: $p(x_1, x_2, \dots, x_n | \mu, \sigma) = p(x_1 | \mu, \sigma) p(x_2 | \mu, \sigma) \dots p(x_n | \mu, \sigma) = \prod p(x_i | \mu, \sigma) = \prod N(x_i | \mu, \sigma)$), dobimo:

$$P(x_{n+1} | x_1, x_2, \dots, x_n) = \iint \pi(\mu, \sigma) \prod_{i=1}^{n+1} N(x_i | \mu, \sigma) d\mu d\sigma / P(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (11)$$

Zanimivo ta formula uporablja predhodno porazdelitvijo $p(\mu, \sigma)$ sredine in variance biokazalca, ki določa celotno populacijo. Proces prehoda od predhodne (ang. prior) porazdelitve k napovedni (ang. posterior) porazdelitvi preko predstavitve novih vrednosti je značilno za Bayesov pristop. Napovedna porazdelitev je usmerjena v točko, ki predstavlja kompromis med predhodno informacijo in izmerjenimi podatki. Kompromis je v večji meri na strani podatkov, ko se število n meritev poveča. Ko je $n = 0$, model detektira abnormalne “absolutne” vrednosti krvnega kazalca, glede na splošno znanje in se ko se n povečuje počasi razvija k detekciji abnormalnih relativnih odstopanj od spoznane individualne osnove (Slika 17 in 18). V primerjavi z preteklimi modeli, je ta model:

- lahko uporabljen za meritve $n = 0, 1, \dots, +\infty$.
- ima specifičnost, ki ni odvisna od števila n testnih rezultatov.

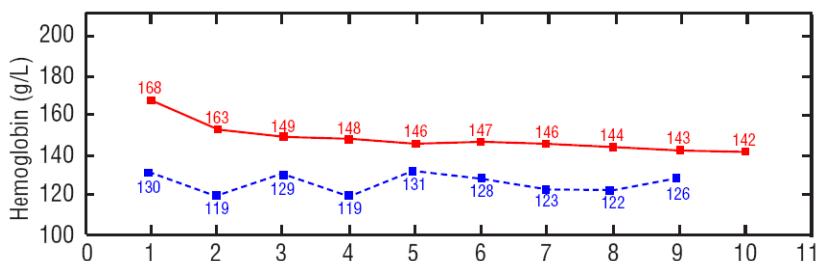
- omogoča najboljšo – v Bayesovem smislu – odločitev za vsak nov testni rezultat x_{n+1} na osnovi informacij, ki so dostopni za posameznika in populacijo.

Lažje je numerično izračunati skupno porazdelitev $p(x_1, x_2, \dots, x_n, x)$ (saj: $(\mu|\sigma)p(\sigma)=p(\mu,\sigma)$) kot funkcijo x

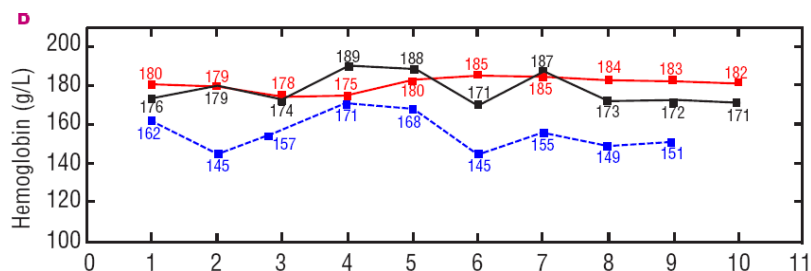
$$P(x_{n+1} | x_1, x_2, \dots, x_n, x_{n+1}) = \iint \prod_{i=1}^{n+1} (1)^{I(x_i = 1)} [N(\mu, \sigma)]^{I(x_i = 0)} P(\mu, \sigma) d\mu d\sigma \quad (12)$$

ter izračunati kumulativno funkcijo in možne izide x , z namenom da se določi mejne vrednosti, ki odgovarjajo kritični vrednosti definirani z $(1-\alpha)\%$. Nov testni rezultat x_{n+1} je nato primerjan k tem mejnim vrednostim.

Slika 20.: Rdeča črta predstavlja mejo specifičnosti 99,9 % za žensko osebo. Prva vrednost (168 g/L) predstavlja populacijsko mejo. 1 od 1000 oseb ženskega spola, kavkaškega porekla, vzdržljivostno treniranih in starih 28 let naj bi v povprečju preseglo mejo 168 g/L [59]. Mejna vrednost se takoj spremeni, ko se upošteva posameznikove krvne vrednosti. V primeru zelo velikega števila testov na posamezniku, zadnja mejna vrednost, tukaj 142 g/L, prikazuje individualno mejo, neodvisno od vseh populacijskih dejavnikov [59].



Slika 21.: Sledenje krvnih vrednosti [Hg] pri moškem vzdržljivostnem športniku [59]. Četrty, peti in sedmi testi so bili narejeni na višini nad 2000 m. Modra prekinjajoča črta predstavlja izmerjene vrednosti, rdeča in črna polna črta pa zgornjo mejo specifičnosti 99,9 % za tega športnika. Rdeča črta predstavlja meje specifičnosti brez upoštevanja heterogenega dejavnika – bivanja na višini. Črna črta predstavlja specifičnost 99,9 % ob upoštevanju heterogenega dejavnika. Dvig meje specifičnosti (npr. s 175 na 189 pri vzorcu št. 4) zmanjšuje možnost lažno pozitivnega rezultata.



Prav tako model, ki upošteva bivanja na višini, daje pri končni vrednosti nižje meje specifičnosti (171 nasproti 182), kar kaže večjo občutljivost na krvni doping [59].

6.6.1. Detekcija abnormalne vrednosti

Naj x predstavlja testni rezultat (npr. 153 g/L za [Hb]) in I nekaj informacij, ki so znane že pred testiranjem športnika. Cilj je, da se postavi verjetnostni okvir da se oceni pogojno verjetnost $P(x|I)$ [63]. Zaradi lažje predstave, naj ima spremenljivka x le eno skalarno komponento (sklepanje na multivariantni model je premočrtno). Ob predpostavki, da so za tega športnika znani že predhodni testni rezultati $\{x_1, \dots, x_{n-1}\}$ želimo oceniti verjetnost $P(x_n|x_1, \dots, x_{n-1}, I)$ novega testnega rezultata x_n [63]. Spremenljivka I konsolidira vse predhodno znanje ali dokazne vrednosti, ki jih prispevajo zunanji dejavniki in za katere je znano da vplivajo na x_n . Število in tip teh dejavnikov se lahko spreminja in njihova izbira je lahko odvisna od trenutnega znanja na teh področjih. V našem primeru se uporablja pet dejavnikov: spol (F_1), rasa (F_2), višina (F_3), starost (F_4), športna disciplina (F_5) in tip analizatorja (F_6). Pogojno verjetnostna porazdelitev $P(x_n|x_1, \dots, x_{n-1}, F_1, \dots, F_6)$ se nato lahko uporabi skupaj z odločitvenim pravilom za določanje referenčnih vrednosti za n -ti test za testiranega posameznika. Npr. če razširjenost dopinga ni znana in se predpostavi, da je nič (vsi so nedopingirani), se lahko uporabi odločitveno pravilo, ki odraža ustrezno specifičnost, običajno 99 ali 99,9 %. Športnike, ki prikazujejo nov testni rezultat x_n višji od 99 oz. 99,9 %, se lahko izloči iz tekmovanja. V modelu biološkega potnega lista se pogojna verjetnost $P(x_n|x_1, \dots, x_{n-1}, F_1, \dots, F_6)$ oceni s pomočjo Bayesove mreže [63]. Te so bile uspešno uporabljene v številnih realnih situacijah, kjer je verjetnost enega dogodka odvisna od verjetnosti preteklega dogodka. V takih primerih je pretekle in/ali objavljene podatke mogoče uporabiti za to, da se določi predhodne porazdelitve kot tudi vzročne povezave med spremenljivkami. Predpostavimo (1) normalno porazdeljeno spremenljivko in (2) definirajmo predhodno porazdelitev z sredino μ in standardno deviacijo σ v primeru normalne porazdelitve.

Bayesova mreža lahko interpretiramo kot hierarhični ali več nivojni model razdeljen v model znotraj posameznika [63]:

$$X_n | \mu, \sigma \sim N(\mu, \sigma^2)$$

Ter model med posamezniki (ali drugi nivo):

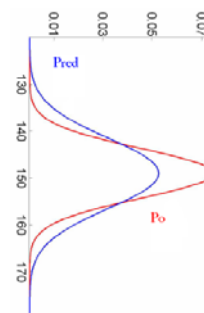
$$\mu | \mu_0, \tau \sim N(\mu_0, \tau^2)$$

$$\sigma | \phi, \varphi \sim \text{LogN}(\phi, \varphi)$$

Pri tem so dejavniki $F_1, \dots, F_6$ določeni ali pa časovno odvisne kovariate. Vrednosti μ_0 so lahko pridobljene iz široko zasnovane študije. Npr. za [Hb] je μ_0 enaka 149 g/L za kavkaške, moške, nevzdržljivostne športnike stare 19 – 24 let, ki trenirajo na nizki višini. Ostale tri parametre pa je bilo potrebno oceniti. Tako so bile podane ocene (τ, ϕ, φ) za [Hb], ki so 7.6, 1.7 in 0.10 [63]. Ko so določeni vsi parametri se lahko Bayesova mreža uporabi tako, da vsak nov testni rezultat proizvede novo napovedno porazdelitev (z drugačno sredino in varianco), kot funkcija dejavnikov $F_1, \dots, F_6$ (Slika 22). Nekateri od teh dejavnikov so fiksne kovariate (npr. spol športnika se ne spreminja), medtem ko so druge časovno odvisne (npr. športnik spremeni nadmorsko višino bivanja v času zaporednih meritev...). Mreža ne potrebuje ves čas poznati vseh dejavnikov. Dostopnost vseh dejavnikov enostavno pomaga zmanjšati skupno varianco krvnega kazalca: več informacij je na voljo, večja občutljivost [63].

Referenčne vrednosti za naslednji testni rezultat se pridobijo z odločitvenim pravilom za $P(m+1)$.

Slika 22: Sprememba napovedne porazdelitve z pridobitvijo začetne prve meritve. V tem primeru se je spremenila varianca porazdelitve, lahko pa bi se tudi sredina le te.



Pred prvim testom (=odvzetim vzorcem) sta μ in σ enaka za vse posameznike z istimi dejavniki (isti spol, rasa...) [63]. Predstavljajo predhodno variabilnost μ in σ med posamezniki. Takoj ko so na posamezniki opravljeni novi testi, se mreža postopno nauči značilnosti posameznika (=zmeraj bolj natančno določi njegovo individualno μ in σ za dani biokazalec),

tako da se porazdelitve μ in σ postopoma ožijo in pri velikem številu meritev natančno določijo vrednosti μ in σ posameznika (Slika 20)[63]. Kakorkoli že, pa je v modelu biološkega potnega lista vrednost posameznikove σ za določen biokazalec vnaprej določena, kar pomeni, da se program uči posameznikovih značilnosti le do vnaprej predpisane meje – vnaprej predpisane σ . Za [Hb] je vnaprej predpisana $\sigma = 28,22$ za OFF – hr vrednost pa 71,74, kar so po tem modelu pričakovane (»normalne«) variance omenjenih dveh biokazalcev. Uporaba predpisane variance je pri tem modelu namreč nujna zato, da se model ne bi »prilagodil« značilnostim športnika, ki se dopingira (npr. »nenormalno« veliki varianci). Predpostavlja se namreč, da izvedba doping praks povečuje varianco biokazalca pri dopingiranem posamezniku v primerjavi z nedopingiranimi [64]. Model biološkega potnega lista je bil validiran na podatkih večjega števila športnikov z znanim doping statusom [63]. Z uporabo ABPS biokazalca na vzorcu 1239 krvnih testov (1040 negativnih in 199 pozitivnih) od 122 športnikov je dosegel do tega trenutka nedoseženo občutljivost ob nizkem deležu lažno pozitivnih [63].

6.6.2. Detekcija abnormalnega zaporedja

Abnormalno zaporedje je zaporedje, ki vsebuje vsaj eno individualno abnormalno vrednost ali skupno visoko abnormalno varianco ali kombinacijo obeh [63]. Metoda, ki detektira katerokoli od omenjenih abnormalnosti, se lahko uporablja s strani neodvisnega telesa za iniciacijo tarčnega testiranja sumljivih športnikov in/ali vodi v sankcije, če je dokaz dovolj močan [63]. Za izračun sekvence se uporablja funkcija [63]:

$$L = [-\ln \{P(x_1, \dots, x_n, F_1, \dots, F_6)\}] / n \quad (13)$$

, kjer so dejavniki $F_1, \dots, F_6$ lahko ali pa ne odvisni o n (=števila vzorcev). Pogojno verjetnost se lahko oceni z Bayesovim teoremom ob rekurzivni zvezi [63]:

$$P(x_1, \dots, x_n | F_1, \dots, F_6) = P(x_n | x_1, \dots, x_{n-1}, F_1, \dots, F_6) * P(x_1, \dots, x_{n-1} | F_1, \dots, F_6) \quad (14)$$

Verjetnostna logaritemska funkcija L se lahko uporabi v kombinaciji z odločitvenim pravilom za razvrstitev celotnega zaporedja $\{x_1, \dots, x_n\}$ [63]. Odločitveno pravilo je lahko predpisana

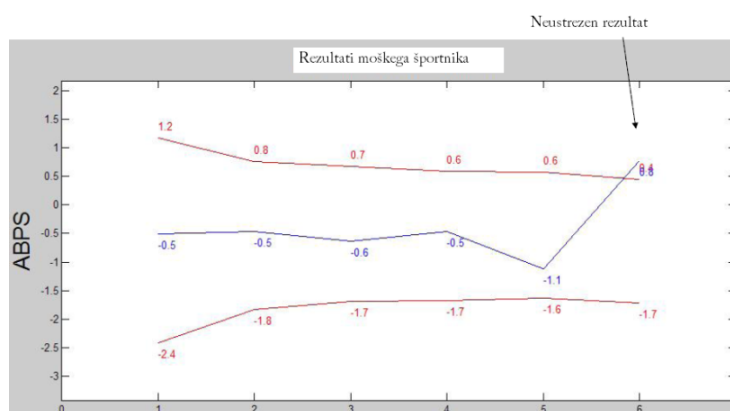
specifičnost, običajno 99 ali 99,9 %. Kljub prisotnosti dejavnika n v imenovalcu, občutljivost nasproti specifičnosti ostaja odvisna od števila n testnih rezultatov: v splošnem, večje število testov vodi v večjo občutljivost na danem nivoju specifičnosti. V primeru, da je zaželen konstantna specifičnost, bi se morala meja spreminjati kot funkcija števila n . V praksi lahko pričakujemo največjo občutljivost, če so testni podatki pridobljeni od vzorcev enako porazdeljenih v obdobja izven tekmovanj in pred/med tekmovanji.

6.6.3. Sekvenčna analiza: dve paradigmi

V kontekstu antidopinga lahko ločimo dve metodi sekvenčne analize [4]:

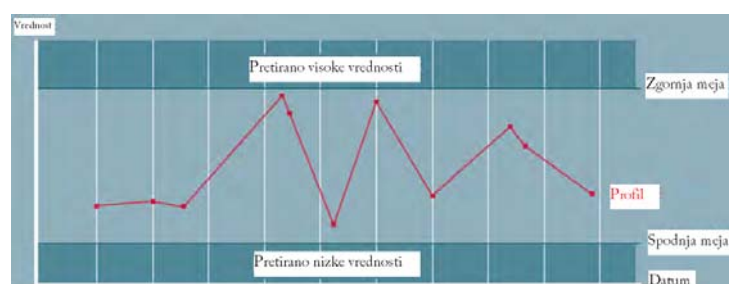
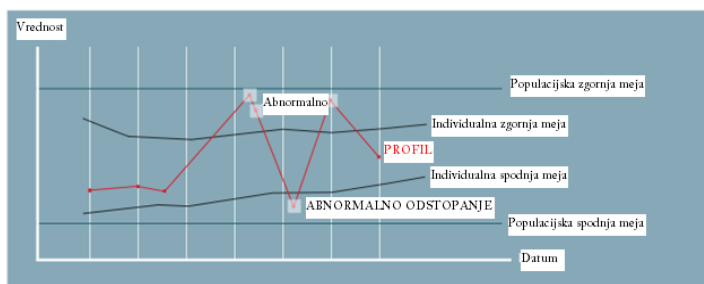
1. Analiza specifične meritve, kot funkcijo preteklih meritev športnika (Slika 23)

Slika 23.:



2. Analiza celotnega zaporedja kot funkcija ostalih kontrolnih zaporedij (Slika 24 in 25)

Slika 24 in 25.:

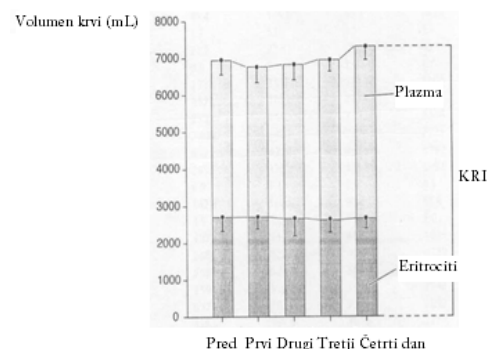


Prva metoda omogoča samo detekcijo abnormalne vrednosti v sekvenci, ob uporabi ene ali več osnovnih vrednosti športnika kot izhodišča. Običajno uporabo predstavlja test, ki je izveden tik pred tekmovanjem, ki pozitivnemu športniku prepreči sodelovanje (*no start rule*)

[4]. Druga metoda omogoča primerjavo celotnega zaporedja z zaporedji športnikov z določenim dopingiranim oziroma nedopingiranim stanjem, kot so prostovoljno sodelujoči športniki v klinični študiji [4]. Pozitivni rezultat v tem primeru lahko vodi v začasno izključitev (2-3 mesece), če je namen redefinirati biološki potni list z izvedbo novih testov [4]. Sankcija je lahko težja, upoštevajoč verjetnost dopinga. Druga metoda naj bi bila prednostna, saj lahko poleg odkrivanja ene ali več abnormalnih vrednosti odkrije tudi abnormalno variance ali kombinacijo rezultatov [4]. Druga metoda je torej veliko boljša od prve [4]. V praksi je občutljivost prve metode optimalna, ko se sprejete vrednosti nanašajo zgolj na stanje $D=0$ (nedopingiran) [4]. Torej, če se lahko predpostavlja, da je krvni doping bolj verjeten pred tekmovanjem, kot v obdobju izven tekmovanj, potem morajo biti rezultati, ki se uporabijo kot izhodiščni samo tisti, ki se pridobijo s testi izven obdobja tekmovanj, ne glede na to ali so pridobljeni nenapovedano ali napovedano [4]. Občutljivost druge metode pa je optimalna takrat, ko so vrednosti razporejene med dve vrednosti $D=0$ in $D=1$ [4]. Najboljša strategija je torej stremeti za tem, da se 50 % testov opravi na tekmovanjih (napovedano), 50 % pa izven tekmovanj (nenapovedano) [4]. Druga metoda naj bi bila prednostna za optimalno občutljivost [4].

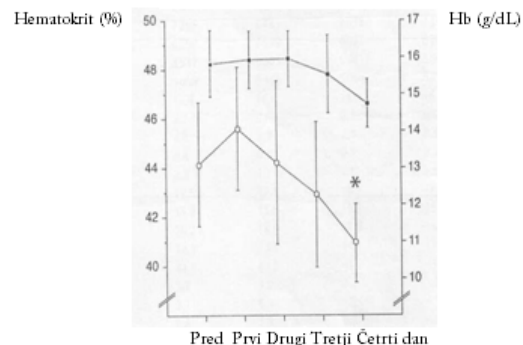
6.6.4. (Še) nerešeni problemi biološkega potnega lista?

Z uvedbo biološkega lista s strani UCI leta 2008, so indirektni testi postali podlaga za uvedbo ukrepov in sankcij proti športniku [22]. Žal pa so določeni krvni kazalci, kot je npr. hemoglobin, močno odvisni od volumna krvi (gre za koncentracijsko mero) in kažejo znižanje vrednosti kot posledico velikega fizičnega napora v zaporednih dneh [4]. Vzrok je znan, pride namreč do povečevanja volumna krvne plazme (Slika 26) [4]. Model, ki bi opisal vzročno zvezo med naporom in indirektnim biološkim kazalcem, v tem trenutku še ni validiran [4]. Posledično zato še ni mogoče uporabiti indirektnih bioloških kazalcev za dokaz dopinškega prekrška po nekaj dneh tekmovanj (npr. v drugem tednu največjih etapnih dirk) [4]. Prav tako trenutno ne poznamo modela za serijsko povezavo meritev, ki so med seboj ločene manj



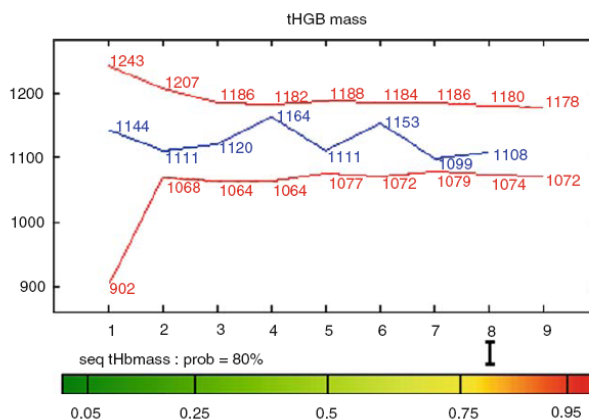
kot pet dni, zato je ob interpretaciji teh podatkov potrebna posebna previdnost [4].

Slika 26.: Akutno povečanje volumna krvi med štiri dnevno etapno dirko pri sedmih elitnih kolesarjih članih nemške mladinske reprezentance (povprečje 20.6 let, 181 cm, 69.7 kg, $VO_{2max} = 71.2$ ml/min/kg) [35]. Koncentracija hematokrita in hemoglobina se je v sedmih dneh dirkanja znižala z $44,1 \pm 2,5$ % in $15,8 \pm 0,9$ g/dL na $40,9 \pm 1,59$ in $14,7 \pm 0,7$ g/dL, medtem ko je skupna masa hemoglobina ostala nespremenjena (merjeno preko modificirane CO metode). Volumen plazme in krvi se je v tem času povečal v povprečju za 400 ml [35].



Septembra 2010 so nekateri avtorji močno izpostavili ta kritični problem pri ocenjevanju dolgoročnih hematoloških profilov pri športnikih [65], to je pomanjkanje dokazov o vplivu treninga in tekmovalne sezone na krvne kazalce, tako na dolgi rok (več zaporednih tekmovalnih sezon), kot znotraj tekmovalne sezone. V ta namen so preučili vse dosedanje raziskave dolgoročnega spremljanja krvnih kazalcev pri športnikih in potrdili, da nekateri krvni kazalci kažejo vpliv dolgoročnega treniranja kot tudi tekmovalnih obdobj. Tako je bilo npr. ugotovljeno, da lahko povprečno naravno (biološko) znižanje hemoglobina ([Hg]) med tekmovalno sezono dosega od 3 do 8 % [65]. Znižane vrednosti hemoglobina in hematokrita med intenzivnimi obdobji treninga so bile ugotovljene v različnih športnih disciplinah z izjemo nogometa, na katerem slonijo nekatera izhodišča biološkega potnega lista, kot so: utemeljitev ustreznosti uporabe univerzalne variance znotraj posameznika za [Hg] kljub izraženim a relativno majhnim vplivom tekmovalnega obdobja nanjo (ki so lahko pri drugih disciplinah drugačne), določitev ocene velikosti varianco znotraj posameznika za [Hg] (ki pa so jo pozneje še večkrat ocenili na drugih velikih vzorcih športnikov) in določitev števila potrebnih zaporednih meritev da se lahko ustrezno določi univerzalno varianco znotraj posameznika za [Hg] [66]. Prav tako so bili podani pomisleki o dolgoročnem ocenjevanju OFF – hr vrednosti z modelom biološkega potnega lista, kljub neustreznemu poznavanju sprememb razmerja med [Hg] in RET% med tekmovalno sezono in več tekmovalnih sezonah zapored, saj variacije RET% niso nujno povezane z variacijami [Hg] [66]. Ker ima

interpretacija dolgoročnega spremljanja krvnih vrednosti v okviru biološkega potnega lista za športnika lahko hude posledice, je po mnenju avtorjev nujno potrebno s stališča boja proti doping u pridobiti več podatkov o spremembah krvnih kazalcev pri športnikih (npr. kolesarjih) med sezono in v več zaporednih sezonah [65]. Do tega trenutka ni znanstvenih dokazov o ustrezni rešitvi navedenih problemov za [Hg], medtem ko so bili novi dokazi o pričakovanih spremembah deleža retikulocitov med tekmovalno sezono na velikem vzorcu športnikov nedavno podani [67]. Ker biološki potni list predstavlja formalni način, da se potrdi, kar je znano o normalnih fizioloških variacijah biokazalcev pri športnikih, pa po mnenju nekaterih forenzičnih strokovnjakov obstajajo utemeljeni dvomi o dopustnosti uporabe statističnih metod biološkega potnega lista za ocenjevanje dokazov in s tem uvajanja ukrepov in sankcij proti športniku [77]. Predstavljeni so pod hipotezo 8. Nenazadnje naj omenimo, da so raziskovalci leta 2010 predlagali, da bi k hematološkim biokazalcem, že merjenim v okviru biološkega potnega lista, dodali še en kazalec. To je meritev skupne mase hemoglobina (ang. Total haemoglobin mass oz. Hb_{mass}) [68], ki jo je mogoče meriti z pred kratkim razvito metodo preko vdihavanja CO [129]. Z uporabo te metode je bilo potrjeno, da je ta nov antidoping kazalec relativno stabilen v obdobju treninga [129] in tekmovanj [35, 68], ter da uporaba doping tehnik pri njem izzove značilne spremembe [70]. Prav tako je bilo potrjeno, da je z modificirano CO metodo te spremembe mogoče zanesljivo izmeriti [70]. Dolgoročno sledenje skupne mase hemoglobina pri športniku v obdobju enega leta, vmes nekajkrat med tekmovanjem, je prikazano na spodnji sliki (Slika 27) [71].



Slika 27.: Dolgoročno sledenje skupne mase hemoglobina v elitnem vzdržljivostnem športniku [71]. Sredinska (modra) črta: rezultati osmih testov izvedenih izven in med

tekmovanji. Zgornja in spodnja (rdeča) črta: individualne meje specifičnosti 99 %, za analitično napako 1,6 % in znotraj posameznikovo varianco biološkega izvora 56 g². Športnik ima srednjo skupno maso hemoglobina 1126 g. Deviacije od sredine niso presegle 40 g. Občutljivost za transfuzijo ene enote krvi (= 60g hemoglobina) je večja od 50 % za tega športnika s tem modelom [71].

7. Primer 1: izračun dovoljenih mej [Hb] s pomočjo programa biološkega potnega lista za rekreativnega kolesarja

Podatki o športniku

Moški. Nekadilec. V letu 2006 starost 52 let. Kolesarski trening običajno 10 h/teden. Ne trenira in ne biva na višini. Živi in trenira <1000 m nadmorske višine. Tekmuje na enodnevnih dirkah. Vrh sezone mu predstavlja maj in junij. Nikoli v obdobju od leta 2006 do 2010 ni uporabljal rHuEPO ali izvajal krvnega dopinga. V času krvnih testiranj ni bil nikoli bolan. V tem času je opravil 8 pregledov krvi v istem laboratoriju. Bivanje na nadmorski višini <1000 m v roku 14 dni pred vsakim odvzemom krvi.

Tabela 7.: podatki o krvni sliki rekreativnega kolesarja.

Datum testiranja	R.V.	11.5.2006	7.6.2006	19.7.2006	6.2.2007	27.2.2007	6.4.2007	3.5.2007	9.6.2010
Tekmovanja*		Pred	Izven	Izven	Izven	Izven	Izven	Pred	Izven
Eritrociti	4,5 - 6,3 * 10 ¹² /L	4,6	4,8	4,9	5	4,7	4,9	5	4,8
Hb	140 – 180 g/L	144	147	149	150	140	140	150	144
Ht	40 - 54 %	43	44	44	46	42	44	46	42
MCV	81 – 94 fL	92	92	90	92	91	91	91	89
MCH	26 -32 pg	31	31	31	30	30	29	30	30
MCHC	310 – 350 g/L	338	332	342	330	330	320	330	339
CRP	do 5 mg/L		5	5	5		5	5	<5

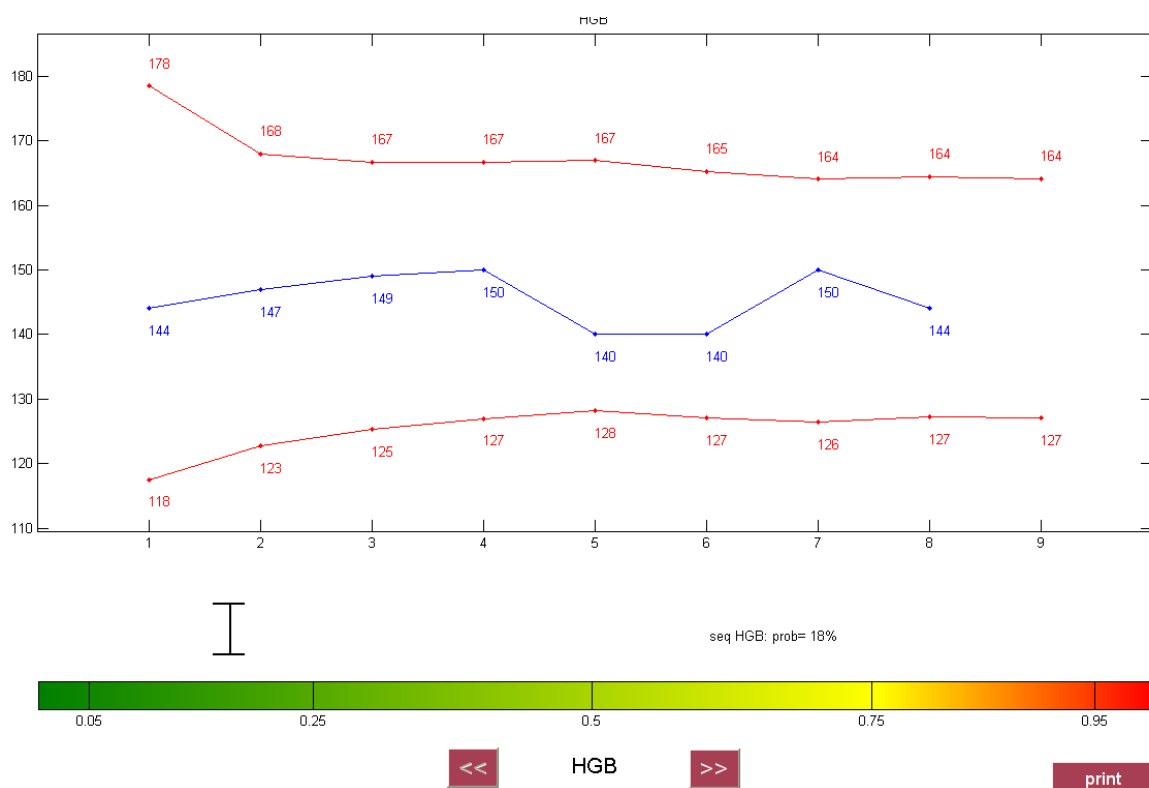
Feritin	30 - 400 ng/L	134,4	127,8	147,1	105,7		136,7		167,1
---------	---------------	-------	-------	-------	-------	--	-------	--	-------

*Pred – v obdobju pred tekmovanjem (športnik bo tekmoval v roku treh dni, ni pa tekmoval v zadnjih 48. urah)

Med – v obdobju tekmovanj (športnik je tekmoval v zadnjih 48. urah)

Izven – izven obdobja tekmovanj

Graf 3.: dovoljene meje odstopanja za vrednosti hemoglobina pri specifičnosti 99,9 %.



Analiza vrednosti [Hg] z programom biološkega potnega lista pri specifičnosti 99,9 % ne kaže izstopajočih vrednosti za tega športnika (Graf 3). Prav tako ne kaže na abnormalnost zaporedja (Graf 3).

8. Primer 2: izračun dovoljenih mej [Hb] s pomočjo programa biološkega potnega lista za poklicnega kolesarja

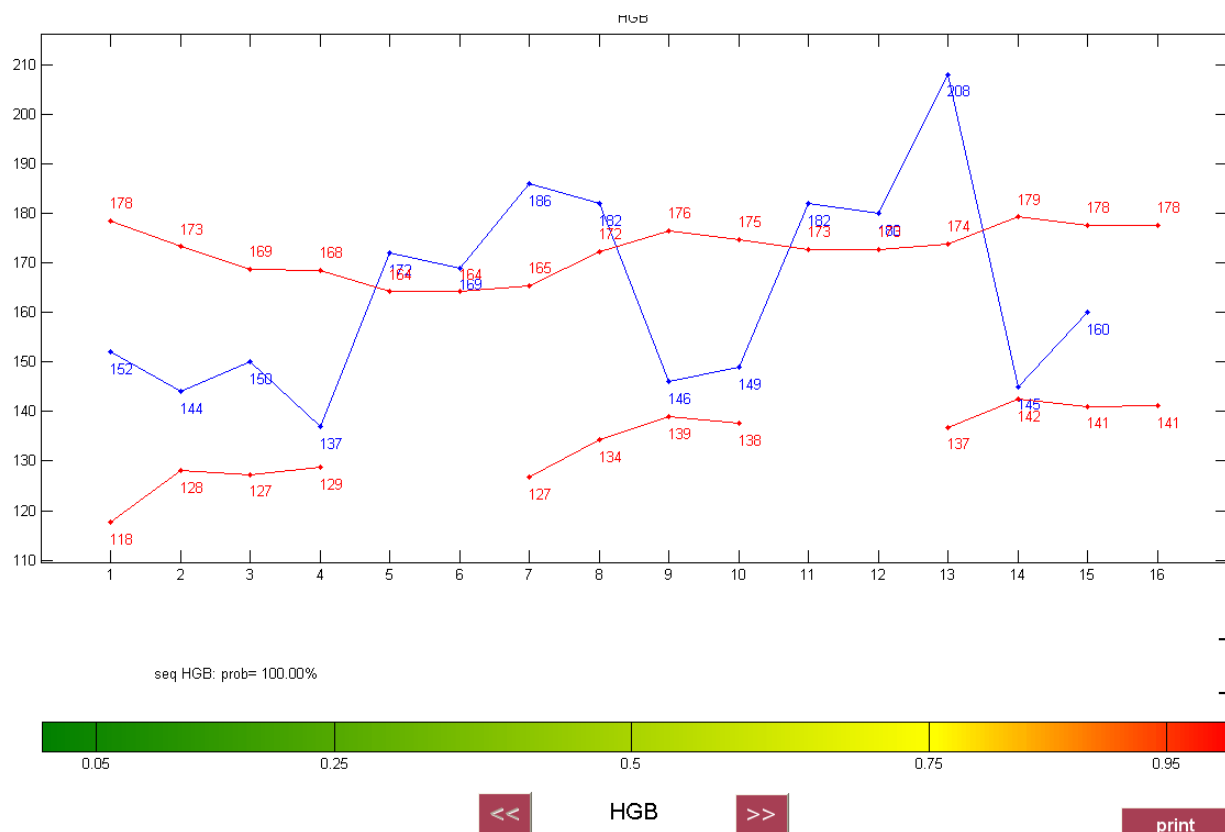
Marco Pantani (1970 - 2004). Moški. Nekadilec. Poklicni kolesar, tekmoval na največjih etapnih dirkah na svetu. Dokazan previsok hematokrit nad 50 %, na doping testu med etapno dirko 5. junija 1999 [69]. Sledi diskvalifikacija. V času aktivne kariere osumljen uporabe rHuEPO.

Tabela 8: Dostopne krvne vrednosti v obdobju 1992 - 2000, večina iz računalniških arhivov Univerze v Ferrari, najdene po zaslugi policijske akcije v okviru boja proti doping [69]:

Hb (g/L)	Ht (%)	Datum	Opombe
152		13.11.1992	
144	43.5	4.1.1994	
150	45.3	3.2.1994	
137	40.7	16.3.1994	
172	54.5	23.5.1994	Drugi dan Dirke po Italiji 1994
169	52.6	30.5.1994	Deveti dan Dirke po Italiji 1994
186	58	13.6.1994	En dan po Dirki po Italiji 1994 (Drugi v skupni uvrstitvi, dve (gorski) etapni zmagi)
182	57.2	27.6.1994	
			Vmes Dirka po Franciji leta 1994 (Tretji v skupni uvrstitvi, najboljši mladi kolesar)
	57.4	25.7.1994	Dva dni po Dirki po Franciji leta 1994 (Tretji v skupni uvrstitvi, dve drugi mesti na dveh etapah)
146	42.8	4.2.1995	
149	45	18.3.1995	
182	57.6	1.5.1995	Dan nesreče, vrednosti izmerjene v bolnici ob hospitalizaciji. Dirka po Italiji 1995 bi se začela na dan 13.5.1995. Ne more se je udeležiti.
180	56	22.6.1995	Dan zmage na dolgi gorski preizkušnji med Dirko po Švici leta 1995.
208	60.1	18.10.1995	Po svetovnem prvenstvu leta 1995 (4-8.10.1995). Osvojeno 3. mesto.
	47.2	Jan - jul 1997	Poteka antidoping preiskava proti Pantaniju. 13.1. in 14.3. 1997 je Pantani obiskal Center v Ferrari za obremenitveno testiranje na kolesu. Ni najdenih zabeleženih krvnih vrednosti.
	49.3	6.6.1998	Zjutraj pred kronometrom na Dirki po Italiji leta 1998. Na dirki po Italiji 1998 zmaga v skupni razvrstitvi, zmaga v gorski razvrstitvi, dve etapni zmagi.
	45.7	1998	V letu 1998 Pantani zmaga Dirko po Italiji, kot tudi Dirko po Franciji.
	45.8	Okoli jan - jul 1999	
	47.4	Okoli jan - jul 1999	

	53	5.6.1999	Doping test na Dirki po Italiji leta 1999. Sledi diskvalifikacija zaradi vrednosti hematokrita nad 50 %. V trenutku diskvalifikacije vodi v skupnem seštevku, osvojil je že štiri etapne zmage.
145	44.5	1.8.2000	28. v skupni razvrstitvi na Dirki po Italiji 2000. Dve etapni zmagi na Dirki po Franciji leta 2000, dirke ne konča.
160	49	5.9.2000	

Graf 4.: Dovoljene meje odstopanja biološkega potnega lista za vrednosti hemoglobina ob specifičnosti 99,9 %.



Analiza vrednosti [Hg] s programom biološkega potnega lista kaže navzgor izstopajoče vrednosti za tega športnika (Graf 4), prav tako kaže na abnormalnost zaporedja (Graf 4).

Abnormalni krvni profil ne dokazuje uporabe dopinga, temveč dokazuje, da so v profilu vrednosti, ki jih program biološkega potnega lista, ki predstavlja formalni način potrjevanja normalnih fizioloških variacij biokazalcev pri športnikih, ne more razložiti*. Obstaja več alternativnih hipotez razlage abnormalnih krvnih vrednosti pri športniku. Za presojanje

alternativnih hipotez abnormalnih krvnih vrednosti je pri UCI imenovana ekspertna komisija treh ekspertov (od devetih ekspertov), ki na podlagi športnikovega profila, drugih dostopnih informacij (podatki iz ADAMS, tekmovalni koledar, razlaga športnika) presodi, katera od hipotez je bolj in katera manj verjetna.

*Za meritve, ki se obdelujejo v programu biološkega potnega lista (ABP software) je zahtevano, da so pridobljene na ustrezen način (predpisani protokoli odvzema, transporta in analize ($KV < 1,5 \%$ za $[Hb]$)) [72]. Podatki krvnih vrednosti predstavljeni v primeru 2 niso pridobljeni na tak način, zato se predstavljene meje lahko nekoliko razlikujejo od ustreznih. Prav tako ni upoštevan vpliv višine, saj ni znano ali je in kdaj je omenjeni kolesar izvajal trening/bivanje na višini. Prikaz je zato le informativne narave.

9. Primer 3: Dokazovanje doping prekrška poklicnega kolesarja na podlagi podatkov biološkega potnega lista

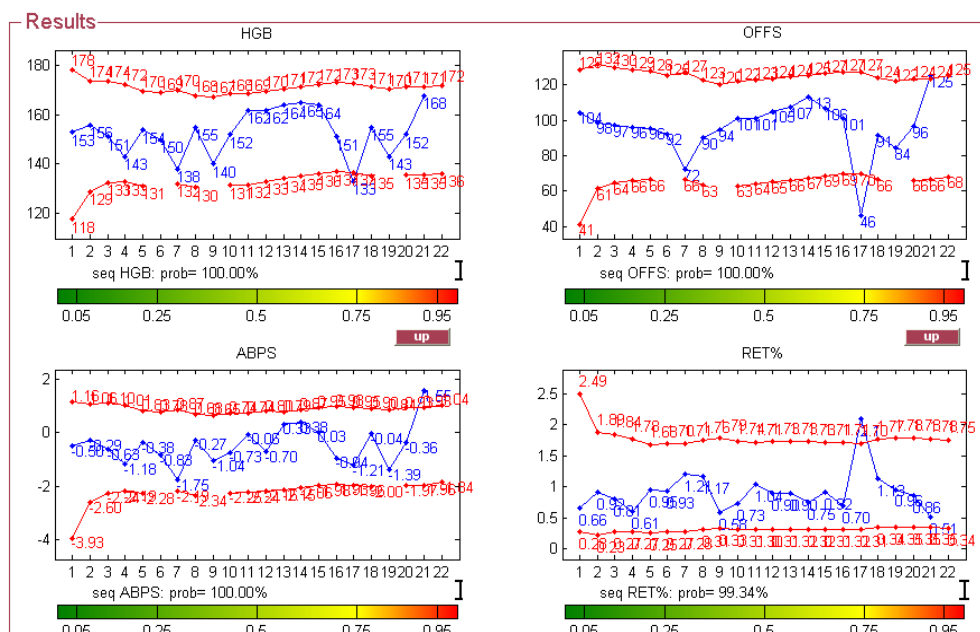
Obravnavali bomo primer športnika, ki je bil na podlagi podatkov v njegovem biološkem potnem listu (nedovoljenih sprememb koncentracije hemoglobina in OFF – hr vrednosti) s strani Mednarodne kolesarske zveze (UCI) obtožen, da je kršil člen 21.2 Protidopinških pravil UCI. Obtožen je bil uporabe prepovedanega postopka M1 - povečevanje prenosa kisika.

Tabela 9.: Rezultati nenapovedanih krvnih doping kontrol.

Datum testa	Čas testa	Ht (%)	Hb (g/l)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	MCV (fl)	OFF-vrednost	RBC: 10-6 μ L	RET: 10-6 μ L	RET%
21.3.0001	10:50	44	153	30.5	34.8	87.6	104.3	5.02	0.0331	0.66
19.4.0001	11:26	45.2	156	31	34.5	89.9	98.5	5.03	0.0463	0.92
24.4.0001	9:04	44.3	151	31.3	34.1	91.7	97	4.83	0.0391	0.81
5.5.0001	22:38	41.6	143	31.4	34.4	91.2	96.1	4.56	0.0278	0.61
8.5.0001	7:33	45.2	154	30.9	34.1	90.6	95.5	4.99	0.0474	0.95
20.5.0001	8:35	43.9	150	30.8	34.2	90.1	92.1	4.87	0.0453	0.93
12.6.0001	18:30	39.7	138	30.8	34.8	88.6	72	4.48	0.0542	1.21
3.7.0001	8:40	45.6	155	31.1	34	91.4	90.1	4.99	0.0584	1.17
15.7.0001	18:40	42	140	31	33.3	92.9	94.3	4.52	0.0262	0.58
27.8.0001	10:25	43.8	152	30.1	34.7	86.7	100.74	5.05	0.0369	0.73
26.9.0001	7:15	46.8	162	29.9	34.6	86.3	100.8	5.42	0.0564	1.04
30.11.0001	9:35	45.1	162	30.1	35.9	83.7	105.08	5.39	0.0485	0.9
13.12.0001	9:10	47.6	164	30.3	34.5	88	107.1	5.41	0.0487	0.9
15.1.0002	9:10	47.3	165	30.4	34.9	87.3	113.04	5.42	0.0407	0.75
11.2.0002	9:14	46.1	164	30.8	35.6	86.7	106.5	5.32	0.0489	0.92
11.3.0002	8:55	42.1	151	31.7	35.9	88.4	101	4.76	0.0333	0.7
19.4.0002	12:48	38.9	133	30.2	34.2	88.2	46.05	4.41	0.0926	2.1
7.5.0002	7:55	46.3	155	31	33.5	92.6	91.2	5	0.0565	1.13
31.5.0002	9:10	42.4	143	31	33.7	92	84.2	4.61	0.0443	0.96
27.8.0002	7:37	45.2	152	31	33.6	92.2	96.4	4.9	0.0421	0.86
29.8.0002	9:50	50	168	30.5	33.6	90.9	125.2	5.5	0.0281	0.51

9.1. Rezultati biološkega potnega lista

Slika 28.: Uradni prikaz rezultatov obdelave krvnih vrednosti športnika v programu biološkega potnega lista (verzija 2.2.1), ki je bil obremenjen za športnika (meje specifičnosti za uporabo prepovedanega postopka M1 - povečevanje prenosa kisika je po 23. členu antidoping pravil UCI (verzija 3.12.09) [73] postavljena na 99,9 % oz. verjetnost lažno pozitivnega rezultata 1:1000).



Slika 29.: Primer izpisa krvnih vrednosti v programu BPL (verzija 2.2.1), na podlagi katerih smo pridobili rezultate.

select #	Date [dd/mm/yyyy]	HGB [g/L]	HCT [%]	REB [10 ⁹ /mm ³]	RET# [fL]	RET% [%]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/dL]	EPO [mU/mL]	sTFR [mU/mL]	OFFS	ABPS	THGBm [g]	Altitude [m]	Analysar	Competition	Action
1	21/03/	153	44.0	5.02	331	0.66	87.6	30.5	34.8			104.3	-0.5			Sysmex	OOC	choose...
2	19/04/	156	45.2	5.03	483	0.92	89.9	31.0	34.5			98.5	-0.3			Sysmex	OOC	choose...
3	24/04/	151	44.3	4.83	391	0.61	91.7	31.3	34.1			97.0	-0.6			Sysmex	OOC	choose...
4	06/05/	143	41.6	4.58	278	0.61	91.2	31.4	34.4			96.1	-1.2			Sysmex	OOC	choose...
5	08/05/	154	45.2	4.99	474	0.95	90.6	30.9	34.1			95.5	-0.4			Sysmex	OOC	choose...
6	20/05/	150	43.9	4.87	453	0.93	90.1	30.8	34.2			92.1	-0.8	NaN		Sysmex	INC	choose...
7	11/12/	138	39.7	4.48	542	1.21	88.6	30.8	34.8			72.0	-1.8			Sysmex	OOC	choose...
8	04/08/	155	45.6	4.99	584	1.17	91.4	31.1	34.0			90.1	-0.3			Sysmex	OOC	choose...
9	15/07/	140	42.0	4.52	262	0.58	92.9	31.0	33.3			94.3	-1.0	NaN		Sysmex	INC	choose...
10	27/08/	152	43.8	5.05	389	0.73	86.7	30.1	34.7			100.7	-0.7			Sysmex	OOC	choose...
11	26/09/	162	46.8	5.42	584	1.04	86.3	29.9	34.6			100.8	-0.1			Sysmex	OOC	choose...
12	30/11/	162	45.1	5.39	485	0.90	83.7	30.1	35.9			105.1	-0.7			Sysmex	OOC	choose...
13	13/12/	164	47.6	5.41	487	0.90	88.0	30.3	34.5			107.1	0.33			Sysmex	OOC	choose...
14	15/01/	165	47.3	5.42	407	0.75	87.3	30.4	34.9			113.0	0.38			Sysmex	OOC	choose...
15	11/02/	164	46.1	5.32	489	0.92	86.7	30.8	35.6			106.5	0.03			Sysmex	OOC	choose...
16	11/03/	151	42.1	4.78	333	0.70	88.4	31.7	35.9			100.8	-0.9			Sysmex	OOC	choose...
17	18/04/	133	38.9	4.41	926	2.10	88.2	30.2	34.2			46.1	-1.2			Sysmex	OOC	choose...
18	07/05/	155	46.3	5.00	585	1.13	82.6	31.0	33.5			91.2	-0.0			Sysmex	OOC	choose...
19	31/05/	143	42.4	4.81	443	0.96	92.0	31.0	33.7			84.2	-1.4	NaN		Sysmex	INC	choose...
20	27/08/	152	45.2	4.90	421	0.86	92.2	31.0	33.6			96.4	-0.4			Sysmex	OOC	choose...
21	29/08/	168	50.0	5.50	281	0.51	90.9	30.5	33.6			125.2	1.55			Sysmex	OOC	choose...

Buttons: new, open, save, calculate, export, print, quit

Version: 2.2.1
Date: Pierre-Edouard Sottas

Slika 30: Rezultate obdelave v programu BPL (verzija 2.2.1) smo pridobili na osnovi spodnjih podatkov o športniku.

Athlete's Biological Passport ABP

Athlete ID:

Datasheet

☒ Athlete ☐ Haematology ☐ Steroidology ☐ Endocrinology ☐ Models ☐ Results

Athlete

photo:

lastname: firstname: nationality:

athlete ID: date of birth: / / 1977

sport: gender: ethnic origin: smoker: blood disorder:

body mass: kilos genotype UGT2B17:

other information:

load clear

help about

Slika 31: Rezultate obdelave v programu BPL (verzija 2.2.1) smo pridobili na osnovi spodaj navedenih modelov.

Athlete's Biological Passport ABP

Athlete ID:

Datasheet

☐ Athlete ☐ Haematology ☐ Steroidology ☐ Endocrinology ☒ Models ☐ Results

Models

Selection criteria

Blood

competition: ☒ in-competition ☒ pre-competition ☒ out-of-competition

analytical turnaround time: ☒ maximal time 36 hours

sampling time: ☐ hours 6:30 - 9:00 ☒ 2 h / effort

temperature conditions: ☒ optimal

Steroid

limit of quantification LOQ: ☒ higher concentrations **default**

Heterogeneous factors

Blood

☒ gender ☒ sport ☒ smoking ☒ ethnic origin ☒ altitude ☒ age ☒ analyser **default**

Steroid

☒ gender ☒ UGT2B17 genotype

Blood parameters

☒ Haemoglobin ☒ OFF-score ☒ ABPS ☒ tHGB mass

decision rule: specificity: 99.9 % ☐ upper-tailed ☒ two-tailed

HGB

BS var.: 57.15 WS var.: 28.22 BS WS var.: 0.00

ABPS

BS var.: 0.41 WS var.: 0.18 BS WS var.: 0.00

OFFS

BS var.: 105.27 WS var.: 71.74 BS WS var.: 0.00

tHGB mass

BS var.: 3994 TE: 1.64 % BioWS var.: 56.25

Steroid parameters

T/E: modal group

mean: GM: 1.401 GSD: 1.813 CV: GM: 0.175 GSD: 1.478

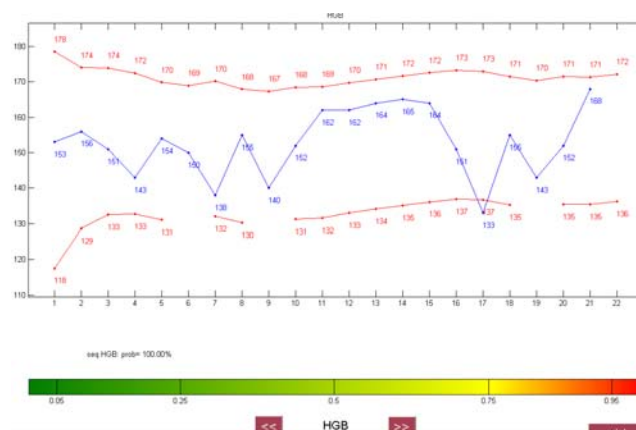
decision rule: specificity: 99 % ☐ upper-tailed ☒ two-tailed

heterogeneity tables **3rd gen.** **default**

help about

9.2. Hemoglobin

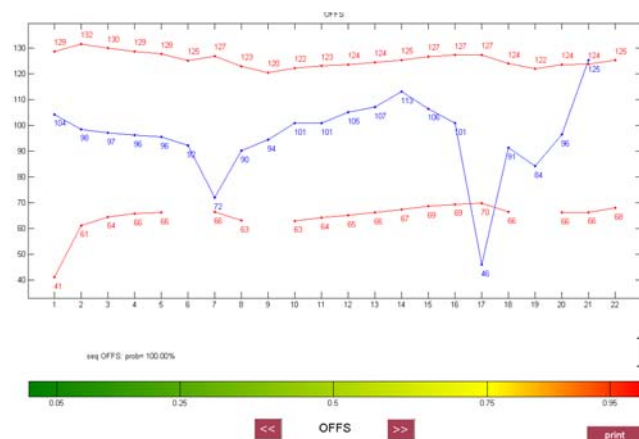
Graf 5: Prikaz zaporednih meritev vrednosti koncentracije hemoglobina pri športniku (modra črta) s pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi mejami specifičnosti 99,9 % (rdeča črta).



Športnik v opisanem obdobju enkrat preseže prag specifičnosti 99,9 % (verjetnost lažno pozitivnega rezultata 1:1000) za koncentracijo hemoglobina, in sicer pri 17. zaporedni meritvi (na dan 19.4.0002). Športnik v primeru koncentracije hemoglobina prikazuje abnormarno sekvenco meritev (preseganje praga specifičnosti 99,9 %).

9.3. OFF –hr vrednost

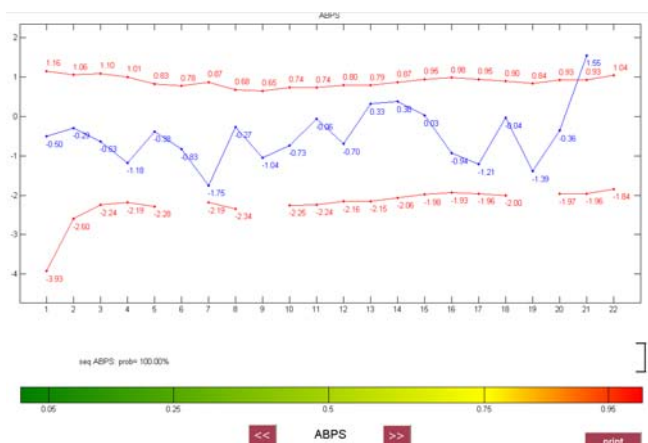
Graf 6: Prikaz zaporednih meritev OFF – hr vrednosti pri športniku (modra črta) z pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi mejami specifičnosti 99,9 % (rdeča črta).



Športnik v opisanem obdobju dvakrat preseže prag specifičnost 99,9 % (verjetnost lažno pozitivnega rezultata 1:1000) za OFF – hr vrednost. In sicer pri 17. in 21. zaporedni meritvi (na dan 19.4.0002 in 29.8.0002). Športnik v primeru OFF – hr vrednosti prikazuje abnormarno sekvenco meritev (preseganje praga specifičnosti 99,9 %).

9.4. ABPS

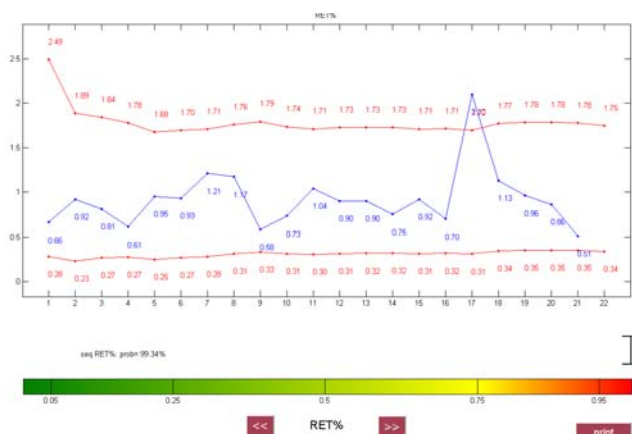
Graf 7.: Prikaz zaporednih meritev ABPS - vrednosti pri športniku (modra črta) z pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi mejami specifičnosti 99,9 % (rdeča črta).



Športnik v opisanem obdobju enkrat preseže prag specifičnost 99,9 % (verjetnost lažno pozitivnega rezultata 1:1000) za ABPS – vrednost, in sicer pri 21. zaporedni meritvi (na dan 29.8.0002). Športnik v primeru ABPS – vrednosti prikazuje abnormarno sekvenco meritev (preseganje praga specifičnosti 99,9 %). Biokazalec ABPS v primeru športnika ne velja za obremenilni dokaz.

9.5. RET%

Graf 8.: Prikaz zaporednih meritev deleža retikulocitov (RET%) pri športniku (modra črta) z pripadajočimi zgornjimi in spodnjimi mejami specifičnosti 99,9 % (rdeča črta).



Športnik v opisanem obdobju enkrat preseže prag specifičnost 99,9 % (verjetnost lažno pozitivnega rezultata 1:1000) za delež retikulocitov (RET%), in sicer pri 17. zaporedni meritvi (na dan 19.4.0002). Biokazalec RET% v primeru športnika ne velja za obremenilni dokaz.

9.6. Izračun mej in ustreznosti zaporedja [Hb] po metodologiji tehničnega dokumenta BPL

Prikaz izračuna mej in ustreznosti zaporedja meritev koncentracije hemoglobina po metodologiji tehničnega dokumenta biološkega potnega lista [72].

Tabela 10.:

Št. mer.	Meritve hemoglobina	PRED ME	PRED VAR	A	B	LF*	LF#	Število meritev	Max LF za specifičnost 99% **	Max LF za specifičnost 99.9%
1	153	148	85.37	0.5411	0.3446	0.1464	0.1464	1	3.317448356	5.413783112
2	156	151.3	47.11	0.6848	0.3156	0.1904	0.1904	2	2.302585093	3.45387764
3	151	153.2	39.54	-0.3499	0.3753	0.1474	0.1493	3	1.890811113	2.711039359
4	143	152.6	36.3	-1.5934	0.1121	0.4279	0.4359	4	1.659588017	2.308353369
5	154	150.4	34.5	0.6129	0.3306	0.3799	0.3843	5	1.508627247	2.051500566
6	150	151.2	33.36	-0.2078	0.3904	0.3201	0.3843	6	1.400991153	1.871478707
7	138	151.1	32.57	-2.2954	0.0286	0.6508	0.7593	7	1.319664779	1.737277596
8	155	149.4	31.99	0.9901	0.2444	0.6307	0.7208	8	1.255639689	1.632780097
9	140	150.3	31.55	-1.8337	0.0743	0.7474	0.7208	9	1.203666352	1.548731382
10	152	149.3	31.2	0.4834	0.3550	0.6844	0.6453	10	1.160462558	1.479414922
11	162	149.8	30.92	2.1940	0.0359	0.8410	0.8411	11	1.123862287	1.421096983
12	162	150.6	30.68	2.0582	0.0480	0.9474	0.9688	12	1.092373638	1.371228767
13	164	151.3	30.48	2.3004	0.0283	1.0780	1.1212	13	1.064932677	1.328006884
14	165	152.1	30.31	2.3431	0.0256	1.1971	1.2565	14	1.040758491	1.290116917
15	164	153.3	30.17	1.9480	0.0598	1.2438	1.3314	15	1.019263806	1.256576608
16	151	153.7	30.04	-0.4926	0.3534	1.1736	1.2402	16	0.999997716	1.226636088
17	133	153.6	29.93	-3.7654	0.0003	1.5216	1.5897	17	0.982607753	1.199712256
18	155	152.2	29.83	0.5127	0.3498	1.4444	1.5039	18	0.966814048	1.175344343
19	143	152	29.74	-1.6503	0.1022	1.4400	1.5039	19	0.952391292	1.153163052
20	152	151.3	29.66	0.1285	0.3957	1.3684	1.4174	20	0.939155869	1.132868665
21	168	151.3	29.59	3.0700	0.0036	1.5277	1.6196	21	0.926956493	1.114215191
		152.5	29.53							

A - kam bi ta meritev padla na standardni normalni porazdelitvi

$$A = \frac{([Hb]_{\text{meritev}} - [PRED_ME [Hb]])}{\sqrt{PRED_VAR za [Hb]}} \quad (15)$$

B - kakšna je verjetnost take meritve v standardni normalni porazdelitvi (PDF od standardne normalne)

$$B = \frac{e^{-\frac{x^2}{2}}}{\sqrt{2\pi}} \quad (16)$$

*LF je *likelihood function* ("LF") za zaporedje n opazovanj [72]. LF je negativni logaritem zmnožka standardne normalne porazdelitve ocenjene iz vrednosti zaporedja standardiziranega z pričakovano sredino in pričakovanim standardnim odklonom, deljeno z n minus 0,91894 [72]. Konstanta 0,91894 izhaja iz χ^2 statistike in pomeni $\ln(\sqrt{2\pi})$.

Za meritev št.3 ($n = 3$) torej:

$$LF_3 = \left(\frac{-\ln(S1 * S2 * S3)}{3} \right) - 0,91894 \quad (17)$$

Za meritev št.4 ($n = 4$):

$$LF_4 = \left(\frac{-\ln(S1 * S2 * S3 * S4)}{4} \right) - 0,91894$$

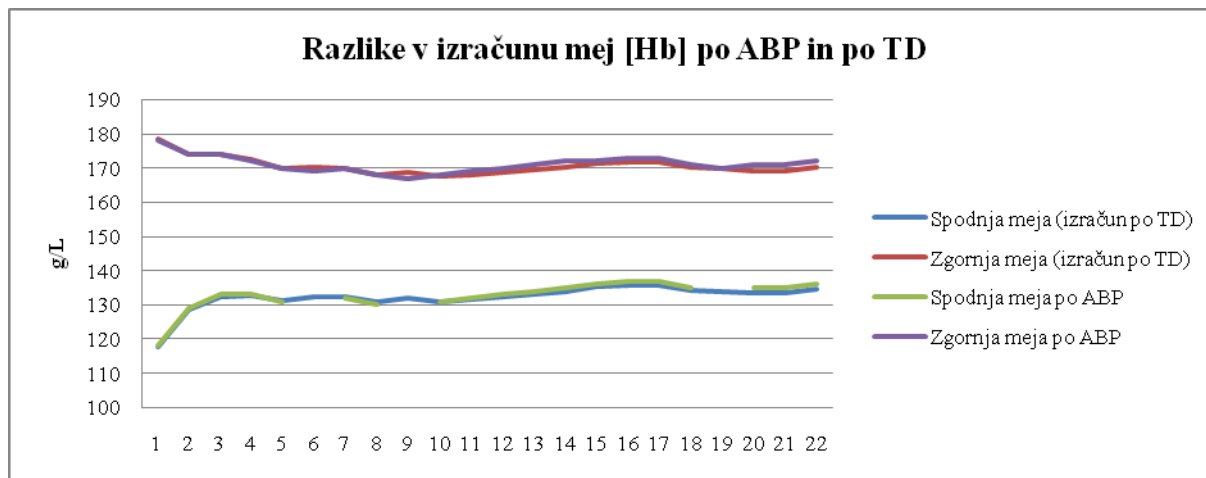
Opomba:

Dr. Sottas navaja (vir: dokumentacija UCI) da je v primeru kolesarjev, ki se udeležujejo etapnih dirk, v okviru ABP uveden dodaten varnostni ukrep. Tako se pri izračunu ustreznosti zaporedja vrednosti ne upoštevajo vrednosti meritev, ki so odvzete tri dni po tekmovanju v etapnih dirkah. Za športnika to pomenijo testi izvedeni na dan 20.5.0001 (št.6), 15.7.0001 (št.9) in 31.5.0002 (št.19). Kjer ni drugače navedeno vrednosti zapisane v diplomi striktno sledijo navodilom tehničnega dokumenta ABP [72], kjer omenjena korekcija ni navedena.

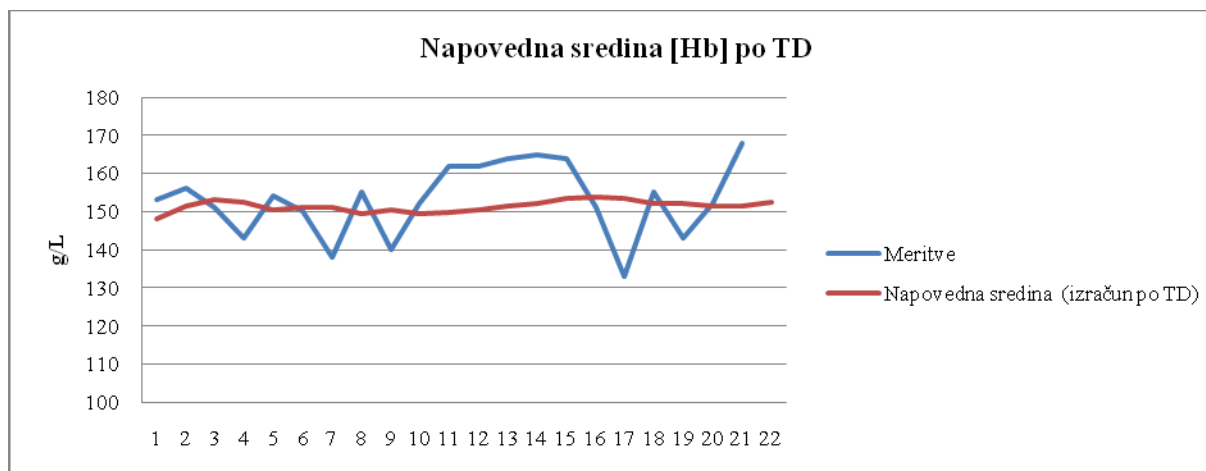
** Napovedna porazdelitev LF je gama funkcija* z parametrom oblike $n/2$ in parametrom merila $1/n$ [72]. Za vsak doping kazalec so pričakovana zaporedja verjetnega zaporedja pridobljena preko napovedne porazdelitve LF. Za specifičnost 99 %, oz. 99,9 % je maksimalna maja za zaporedje z n opazovanji 99 oz. 99,9 percentil napovedne porazdelitve pričakovanih zaporedij dolžine n [72]. Za meritev št.3 ($n = 3$) torej:

$$LF_{\max 99\%, \text{meritev št. 3}} = \text{GAMMAINV}(0.99, 3/2, 1/3) \quad (18)$$

Graf 9.: Razlike mej pridobljene na istih podatkih z BPL (ang. ABP) ali izračunom po TD.

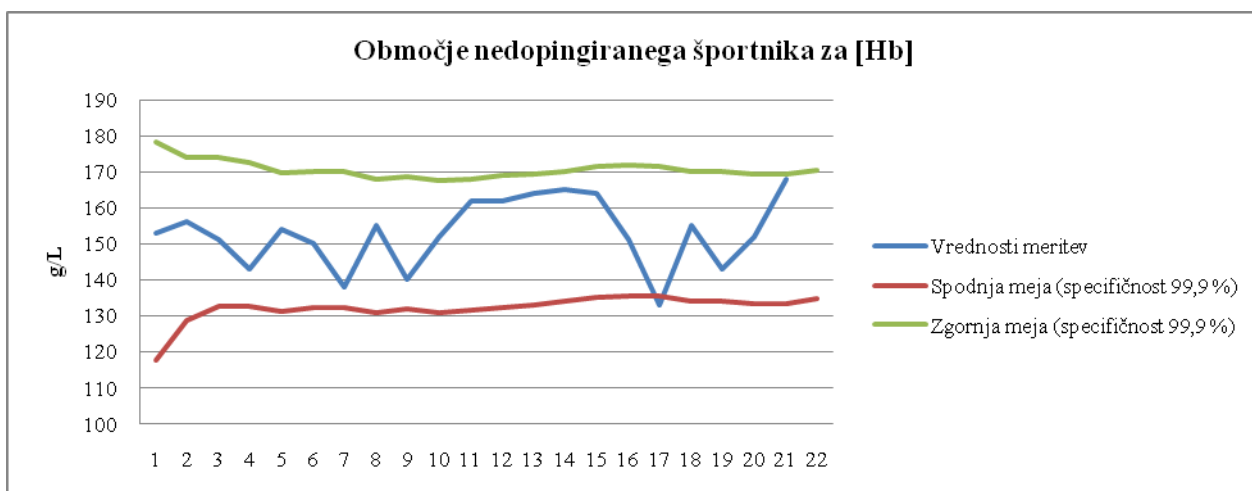


Graf 10.: Po TD izračunana napovedna sredina (PRED_ME za [Hb]) in podatki meritev.

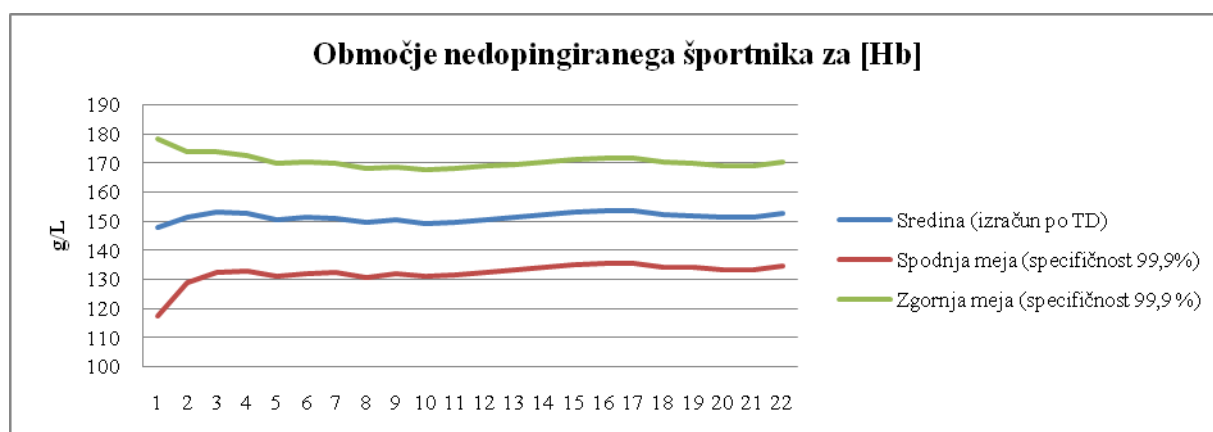


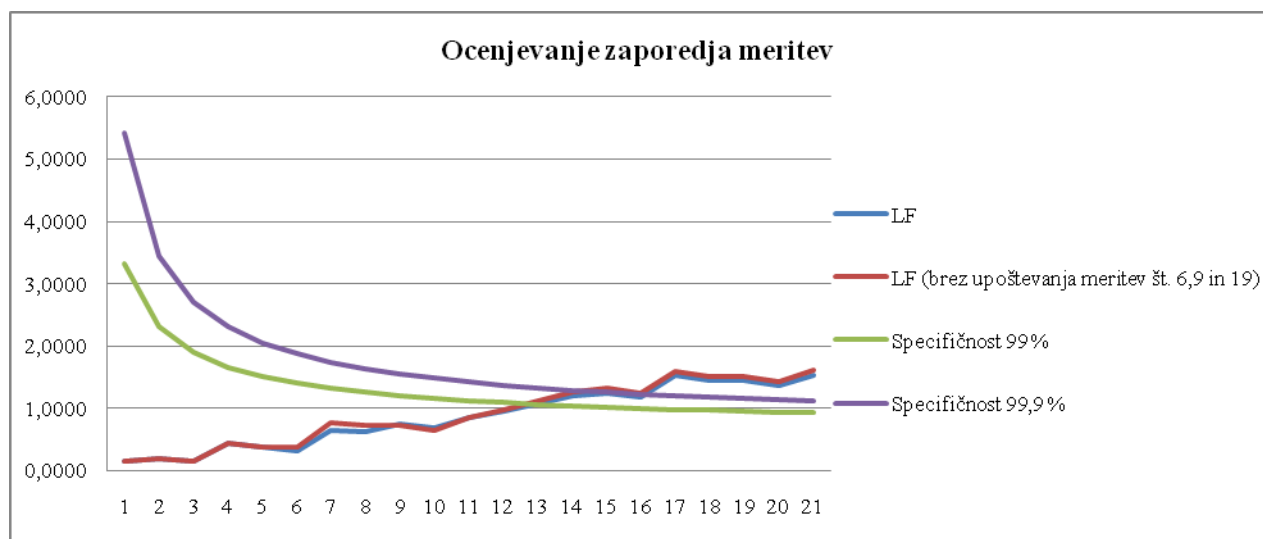
Graf 11.: Po TD izračunano območje kamor pade 99,9 % nedopingiranih športnikov.

Graf 12.: Po TD izračunano območje kamor pade 99,9 % nedopingiranih športnikov in športnikove meritve.



Graf 13: Prikaz po TD izračunane LF in napovedne porazdelitve za LF pri dani specifičnosti.





9.7. Upoštevanje bivanja na višini v okviru biološkega potnega lista

Biološki potni list nadmorsko višino upošteva kot časovno odvisni zunanji dejavnik [72]. Na ta način se zmanjšuje skupna varianca krvnega biokazalca [63]. To na eni strani zmanjšuje možnost lažno pozitivnega rezultata, na drugi strani pa povečuje njegovo občutljivost [63]. Nadmorska višina odvzema krvnega vzorca se določi z nadmorsko višino kraja, v katerem je bil vzorec odvzet. Bivanje na višini izvedeno pred odvzemom krvnega vzorca pa se določi na podlagi podatkov, ki jih športnik dnevno vnaša v ADAMS. Tehnični dokument biološkega potnega lista predpisuje upoštevanje višine v programu biološkega lista na naslednji način [72]:

“The altitude value is the average altitude at which the athlete stayed during the two weeks prior to the collection.” In še: *“If for any particular reason the choice of the category is uncertain, the value that penalizes the less the athlete shall be chosen”*. Športnik je na višini v letu 0002 bival večkrat:

- bivanje na višini 1300 m od januarja 0002.
- bivanje na višini 2100 m od 28.1.0002 do 7.2.0002.
- bivanje na višini ? od 1.4.0002 do 19.4.0002.
- bivanje na višini 2800 m od 5.7. do 26.7.0002
- bivanje na višini 3200 m od 12.8.0002 do 24.8.0002.

Po tehničnem dokumentu je vrednost višine torej povprečna višina, na kateri je športnik ostal dva tedna pred odvzemom vzorca. Vpliv višje nadmorske višine je torej potrebno upoštevati pri interpretaciji treh vzorcev; pri vzorcu št. 15 (11.2.0002), št. 20 in 21 (27 in 29.8.0002).

Tabela 11 in 12:

Dan	Mesec	Nadmorska višina	Št. dni pred odvzemom vzorca
28	jan	2100	
29	jan	2100	1
30	jan	2100	2
31	jan	2100	3
1	feb	2100	4
2	feb	2100	5
3	feb	2100	6
4	feb	2100	7
5	feb	2100	8
6	feb	2100	9
7	feb	2100	10
8	feb	?	11
9	feb	?	12
10	feb	?	13
11	feb	8	14

Vzorec št. 15 je bil odvzet v mestu, ki leži na nadmorski višini 8 m. Povprečna višina zadnjih 14 dni pred odvzemom vzorca je 1500 m.

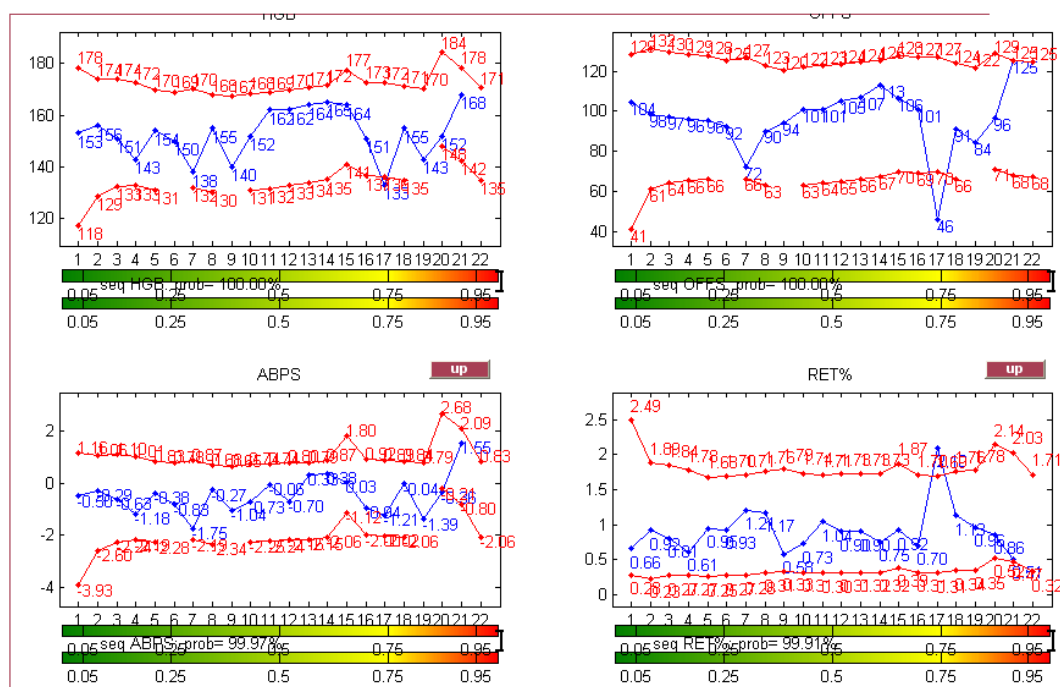
Dan	Mesec	Nadmorska višina	Št. dni pred odvzemom vzorca	
			Vzorec št.20	Vzorec št. 21
12	avg	3200		
13	avg	3200		
14	avg	3200	1	
15	avg	3200	2	
16	avg	3200	3	1
17	avg	3200	4	2
18	avg	3200	5	3
19	avg	3200	6	4
20	avg	3200	7	5
21	avg	3200	8	6
22	avg	3200	9	7
23	avg	3200	10	8
24	avg	3200	11	9
25	avg	?	12	10
26	avg	?	13	11
27	avg	300	14	12
28	avg	300		13
29	avg	300		14
30	avg			
31	avg			

Vzorca št. 20 in 21 sta bila odvzeta v istem mestu, na nadmorski višini 300 m. Povprečna višina zadnjih 14 dni pred odvzemom za vzorec št. 20 je 2536 m. Povprečna višina zadnjih 14 dni pred odvzemom za vzorec št. 21 pa 2121 m.

Slika 32.: Vneseni podatki o bivanju na višini v program biološkega potnega lista (verzija 2.2.1).

select #	Date [dd/mm/yyyy]	HGB [g/L]	HCT [%]	RBC [10 ⁹ /ml]	RET# [1/nL]	RET% [%]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/dL]	EPO mU/mL[[nM/L]	sTFR OFFS	ABPS	thGBm [g]	Altitude [m]	Analys	Competition	Action
2	19/04/	156	45.2	5.03	463	0.92	89.9	31.0	34.5		98.5	-0.3			Sysmex	OOO	choose..
3	24/04/	151	44.3	4.83	391	0.81	91.7	31.3	34.1		97.0	-0.6			Sysmex	OOO	choose..
4	06/05/	143	41.6	4.56	278	0.61	91.2	31.4	34.4		96.1	-1.2			Sysmex	OOO	choose..
5	08/05/	154	45.2	4.99	474	0.95	90.6	30.9	34.1		95.5	-0.4			Sysmex	OOO	choose..
6	20/05/	150	43.9	4.87	453	0.93	90.1	30.8	34.2		92.1	-0.8	NaN		Sysmex	INC	choose..
7	11/12/	138	39.7	4.48	542	1.21	88.6	30.8	34.8		72.0	-1.8			Sysmex	OOO	choose..
8	04/08/	155	45.6	4.99	584	1.17	91.4	31.1	34.0		90.1	-0.3			Sysmex	OOO	choose..
9	15/07/	140	42.0	4.52	262	0.58	92.9	31.0	33.3		94.3	-1.0	NaN		Sysmex	INC	choose..
10	27/08/	152	43.8	5.05	368	0.73	86.7	30.1	34.7		100.7	-0.7			Sysmex	OOO	choose..
11	26/09/	162	46.8	5.42	564	1.04	86.3	29.9	34.6		100.9	-0.1			Sysmex	OOO	choose..
12	30/11/	162	45.1	5.39	485	0.90	83.7	30.1	35.9		105.1	-0.7			Sysmex	OOO	choose..
13	13/12/	164	47.6	5.41	487	0.90	88.0	30.3	34.5		107.1	0.33			Sysmex	OOO	choose..
14	15/01/	165	47.3	5.42	407	0.75	87.3	30.4	34.9		113.0	0.38			Sysmex	OOO	choose..
15	11/02/	164	46.1	5.32	489	0.92	86.7	30.8	35.6		106.5	0.03	NaN	1500	Sysmex	OOO	choose..
16	11/03/	151	42.1	4.76	333	0.70	88.4	31.7	35.9		100.8	-0.9			Sysmex	OOO	choose..
17	19/04/	133	38.9	4.41	926	2.10	88.2	30.2	34.2		46.1	-1.2			Sysmex	OOO	choose..
18	07/05/	155	46.3	5.00	565	1.13	92.6	31.0	33.5		91.2	-0.0			Sysmex	OOO	choose..
19	31/05/	143	42.4	4.61	443	0.96	92.0	31.0	33.7		84.2	-1.4	NaN		Sysmex	INC	choose..
20	27/08/	152	45.2	4.90	421	0.86	92.2	31.0	33.6		96.4	-0.4	NaN	2536	Sysmex	OOO	choose..
21	29/08/	168	50.0	5.50	281	0.51	90.9	30.5	33.6		125.2	1.55	NaN	2121	Sysmex	OOO	choose..

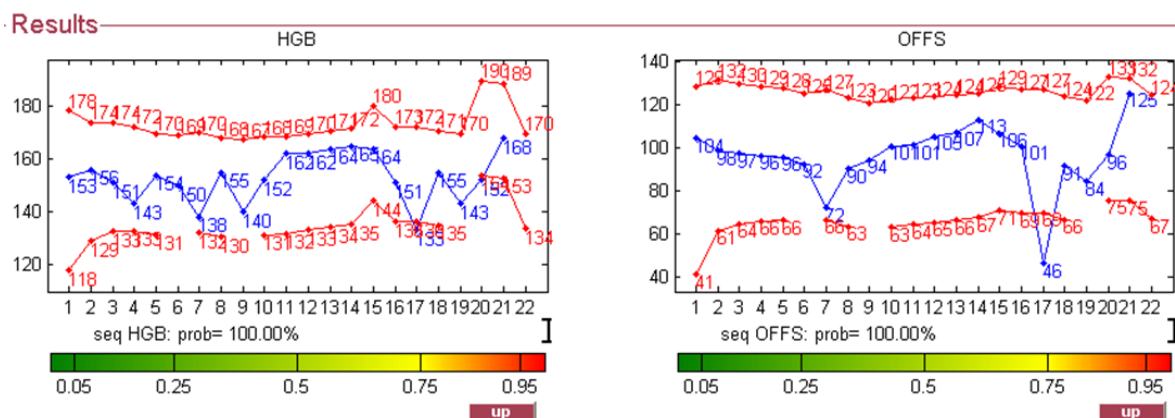
Slika 33.: Rezultati programa biološkega lista (verzija 2.2.1) pri specifičnosti 99,9 %.



Na sliki (Slika 33) vidimo, da tudi v tem primeru meritev št. 17 pri meritvah koncentracije hemoglobina odstopa navzdol. Prav tako pri isti meritvi odstopa OFF – hr vrednost. Razlika

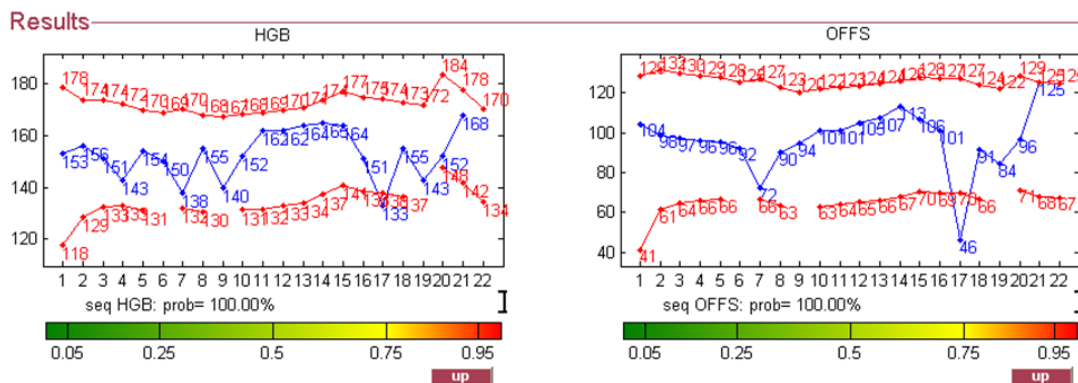
pa je vidna pri zadnji meritvi OFF – hr vrednosti, ki dosega (ne pa presega) dovoljeno mejno vrednost pri specifičnosti 99,9 %. Pri obeh omenjenih kazalcih je še zmeraj prisotno abnormalno zaporedje vrednosti.

Slika 34.: Upoštevanje enake višine za vzorec št. 20 in 21 (3200 m.n.v.), vzorec št. 15 (2100 m.n.v.).



Na sliki (Slika 34) vidimo, da tudi v tem primeru meritev št. 17 pri meritvah koncentracije hemoglobina odstopa navzdol. Prav tako pri isti meritvi odstopa OFF – hr vrednost. Razlika pa je vidna pri zadnji meritvi OFF – hr vrednosti, ki več ne dosega dovoljene mejne vrednosti pri specifičnosti 99,9 %. Opazna pa je nova izstopajoča vrednost pri meritvah koncentracije hemoglobina – meritev št.20. Pri obeh omenjenih kazalcih je še zmeraj prisotno abnormalno zaporedje vrednosti.

Slika 35.: Upoštevanje bivanja na višini 1300 m pri vseh meritvah leta 0002, vse ostalo nespremenjeno (vzorec št. 15 (1500 m.n.v.), št. 20 (2500 m.n.v.), št. 21 (2000 m.n.v.)).



Na sliki (Slika 35) vidimo, da tudi v tem primeru meritev št. 17 pri meritvah koncentracije hemoglobina odstopa navzdol. Prav tako pri isti meritvi odstopa OFF – hr vrednost. Razlika pa je vidna pri zadnji meritvi OFF – hr vrednosti, ki dosega (ne pa presega) dovoljeno mejno vrednost pri specifičnosti 99,9 %. Pri obeh omenjenih kazalcih je še zmeraj prisotno abnormalno zaporedje vrednosti.

Ugotovimo lahko:

Kljub večkratnemu pregledu izračuna mej natančno po navodilih tehničnega dokumenta BPL se naši izračuni še zmeraj nekoliko razlikujejo od podatkov pridobljenih s programsko opremo biološkega potnega lista (Athlete's Biological Passport, verzija 2.2.1). Razlik ne znamo pojasniti.

Navodilo o upoštevanju vpliva višine v tehničnem dokumentu po našem mnenju dovoljuje različne interpretacije. Da je potrebno standardizirati način, kako naj se upošteva bivanje (trening) na višini v okviru biološkega potnega lista, je leta 2008 opozoril tudi dr. Sottas sam [63]. Iz predpisov tehničnega dokumenta biološkega potnega lista iz januarja 2009 izhaja ugotovitev, da natančne standardizacije upoštevanja faktorja višine v okviru biološkega potnega lista ni [72]. Po našem mnenju to lahko povzroči probleme v interpretaciji hematoloških profilov pri športnikih, še posebej pri tistih, ki pogosto bivajo/trenirajo na višini.

Zaradi tega razloga smo za primer športnika naredili dodatne izračune nekaterih mogočih drugih scenarijev upoštevanja bivanja na višini v okviru biološkega potnega lista. Iskali smo načine vnosa bivanja na višini, ki bi bil domnevno še skladen s tehničnim dokumentom BPL, obenem pa bi kar »najmanj penaliziral« športnika pri [Hb] in OFF – hr vrednosti.

Ugotovili smo, da v primeru drugačnega upoštevanja bivanja na višini, športnikov profil pri [Hb] in OFF – hr vrednosti ne daje več povsem enake interpretacije podatkov, kot obremenilni dokaz. Npr. slika 33 kaže, da ni več navzgor izstopajoče OFF – hr vrednosti pri meritvi na dan 29.8.0002. Po tehničnem dokumentu BPL se za abnormalno vrednost štejejo tiste vrednosti, ki presegajo (ne pa dosegajo) predpisano mejo specifičnosti [72]. Ne glede na to, pa je pri vseh alternativnih scenarijih upoštevanja bivanja na višini, ki smo jih preizkusili, vedno prisotna

abnormalna vrednost meritve št. 17 in abnormalnost zaporedja vrednosti tako pri [Hb], kot tudi OFF – hr vrednosti. Zdi se, da v primeru obtožbe športnika, bivanje na višji nadmorski višini ni bilo upoštevano na način, ki ga predpisuje tehnični dokument biološkega potnega lista. Kljub temu pa nekateri alternativni scenariji upoštevavanja bivanja na višini niso povzročili odstranitve vseh izstopajočih vrednosti. Tako je abnormalnost meritve [Hb] in OFF – hr vrednosti pri meritvi št. 17 vedno prisotna. Prav tako je pri tem športniku pri obeh omenjenih biokazalcih vedno prisotna abnormalnost zaporedja vrednosti. Kakorkoli že, pa vseh mogočih scenarijev upoštevavanja bivanja na višini, kot jih po našem mnenju dopušča tehnični dokument biološkega potnega lista, še zdaleč nismo preizkusili. To pomeni, da je z ustrežnejšim upoštevanjem bivanja na višini, ki bo skladen s trenutnimi predpisi tehničnega dokumenta, mogoče priti do ocen krvnih vrednosti, ki se lahko razlikujejo od opisanih.

9.8. Predstavitev argumentov razlage ugotovljenih abnormalnih vrednosti pri športniku

Abnormalni krvni profil ne dokazuje uporabe dopinga, temveč dokazuje, da so v profilu vrednosti, ki jih program biološkega potnega lista, ki predstavlja formalni način potrjevanja normalnih fizioloških variacij biokazalcev pri športnikih, ne more razložiti. Ob tem velja opozoriti, da je vsako mnenje pri interpretaciji podatkov, izhajajočih iz biološkega potnega lista, neobhodno močno odvisno od statistike. Obstaja več alternativnih hipotez razlage abnormalnih krvnih vrednosti pri športniku:

- 1.) uporaba krvnega dopinga
- 2.) uporaba rHuEPO
- 3.) uporaba transfuzij
 - a) homologna krvna transfuzija
 - b) avtologna krvna transfuzija
- 4.) bivanje na višini, uporaba hipoksičnih naprav
- 5.) patologija, bolezen
- 6.) napaka izhajajoča iz vzorčenja (npr. napaka predanalizne faze - vzorec krvi odvzet prej, kot po predpisanih desetih minutah sedenja [74])
- 7.) napaka inštrumentov/nadzorov kvalitete
- 8.) statistična napaka/napaka programa

Za presojanje alternativnih hipotez abnormalnih krvnih vrednosti je pri UCI imenovana ekspertna komisija treh ekspertov, ki na podlagi športnikovega profila, drugih dostopnih informacij (podatki iz ADAMS, tekmovalni koledar, razlaga športnika) presodi, katera od hipotez je bolj in katera manj verjetna. Nato poda svoje ekspertno mnenje o primeru. Le v primeru, da vsi trije neodvisni eksperti podajo enako hipotezo o vzroku abnormalnega profila (soglasno mnenje), se proti športniku uvede disciplinski postopek. Tak način presojanja hipotez je lahko problematičen v primerih, ko ekspertna skupina ne pozna vseh mogočih (novih) načinov dopinga. Poročanje medijev so ta pomislek potrdili ko je eden od devetih ekspertov UCI potrdil, da je šele informacija skesanega kolesarja lahko razložila vrednosti opažene v določenih hematoloških profilih kolesarjev za katere sam ekspert (dr. Michael Ashenden) ni našel razumljive razlage [75]. Po mnenju ekspertne skupine UCI, na podlagi ocene* krvnih kazalcev z matematičnim modelom biološkega potnega lista (*kjer vpliv nadmorske višine domnevno ni upoštevan v skladu z tehničnim dokumentom BPL) in pridobljenimi dodatnimi informacijami o športniku, te razlike izhajajo iz zlorabe prepovedanega postopka M1 - povečevanje prenosa kisika (pod ta prepovedani postopek se uvrščajo hipoteza 1, 3a in 3b).

Po mnenju športnika so odstopanja v hematološkem profilu posledice kronične bolezni (želodčni ulkus, hipoteza 5), ki se je aprila leta 0002 manifestirala s spremembo krvnih kazalcev, ter slučajnega spleta okoliščin v avgustu 0002 (izvajanja višinskega treninga in uporabe hipoksičnih naprav (hipoteza 4) ter pika ose in posledično terapije z glukokortikoidom, ki so povzročile spremembe krvnih vrednosti med doping testoma v avgustu leta 0002, hipoteza 5).

9.8.1. Alternativne hipoteze - zakaj ja, zakaj ne?

Vsi argumenti ekspertne skupine, ki zožujejo možnosti alternativnih hipotez razlage abnormalnega profila pri športniku, niso v celoti znani. Predstavljeni argumenti o večji ali manjši možnosti alternativne hipoteze o abnormalnem profile športnika so zato izključno podani kot mnenje avtorja tega dela, še posebej zato, ker obstaja možnost pristranske obravnave dokazov zaradi pomanjkanja znanja o obravnavani temi avtorja diplomskega dela (več o tem pri argumentaciji hipoteze 8). Možnosti razlage abnormalnega profila in argumentov, zakaj je določena hipoteza zavrnjena:

- 1.) uporaba krvnega dopinga (Hipoteza 1 ni zavrnjena.)
- 2.) uporaba rHuEPO (Ni pozitivnega testa na rHuEPO, kljub temu ostaja možnost zlorabe rHuEPO na način, ki je nedokazljiv). Hipoteza 2 ni zavrnjena.
- 3.) uporaba transfuzij:
 - a) homologna (Od leta 2004 dokazljiva na doping testu [71], detekcijsko okno je dolgo nekaj tednov (čas prisotnosti tujih eritrocitov v krvnem obtoku) [71]. Ni pozitivnega testa na homologno krvno transfuzijo.). Hipoteza 3a je zavrnjena.
 - b) avtologna (Brez uporabe metodologije biološkega potnega lista trenutno nedokazljiva, tudi ta metoda ocenjevanja krvnih vrednosti pa še more potrditi svojo učinkovitost v dokazovanju le te. Ponavljajoči indici na vrhunskih kolesarjih kažejo visoko razširjenost uporabe te metode pri kolesarjih. Krvne vrednosti ocenjene z uporabo metodologije biološkega potnega lista kažejo na možnost uporabe le te.). Hipoteza 3b ni zavrnjena.
- 4.) bivanje na višini (Je upoštevano v programu biološkega potnega lista, vendar navodila o upoštevanju bivanja na višini v programu biološkega potnega lista po našem mnenju dopuščajo možnost različne interpretacije. Ni konsenza v interpretaciji sprememb % retikulocitov takoj po vrnitvi z višine [76]. Ni konsenza o soodvisnosti % retikulocitov z koncentracijo hemoglobina [65] kar posledično otežuje interpretacija sprememb OFF – hr vrednosti, ki kombinira oba parametra), uporaba hipoksičnih naprav (Je upoštevana v programu biološkega potnega lista, a športnik na zaslišanju pove, da ga na uradnih doping testih nikoli niso vprašali o uporabi hipoksičnih naprav, vpliv uporabe le teh na njegove biokazalce zato ni jasen.). Hipoteza 4 ni zavrnjena.

- 5.) patologija, bolezen (Po mnenju ekspertne skupine krvne vrednosti športnika ne kažejo znakov bolezni, ki bi lahko razložila opazovane abnormalne krvne vrednosti, proti temu govori tudi tekmovalna uspešnost športnika v sezoni 2002. Športnik in zdravnik specialist (priča obrambe) vztrajata pri razlagi). Hipoteza 5 ni zavrnjena.
- 6.) napaka izhajajoča iz vzorčenja (Natančen pregled podatkov vzorčenja in zaslišanje športnika, po mnenju ekspertne skupine ni razkrilo napak izvirajočih iz vzorčenja). Hipoteza 6 je zavrnjena.
- 7.) napaka inštrumentov/nadzorov kvalitete (Športnik je podal argumente o napaki inštrumentov, vendar je natančen pregled dokumentacijskih paketov večine odvzetih vzorcev in dodatna analiza pridobljenih meritev krvnih vzorcev brez dokumentacijskih paketov razkrila, da vsi vzorci ustrezajo predpisanim kriterijem za krvne vzorce, ki se lahko uporabijo v analizi biološkega potnega lista). Hipoteza 7 je zavrnjena.
- 8.) statistična napaka/napaka programa (Program biološkega potnega lista (Athlete's Biological Passport software) je ustrezno validiran, edina pomanjkljivost, ki jo priznavajo avtorji, je neupoštevanje sprememb krvnih vrednosti zaradi vadbenih obremenitev [4]. Iz tega dejstva izhajajo določeni problemi, ki so bili septembra 2010 tudi javno izpostavljeni [65]. Prav tako je bil izražen dvom o ustreznosti statističnih metod biološkega potnega lista za ocenjevanje dokazov [77, 78]). Hipoteza 8 ni zavrnjena.

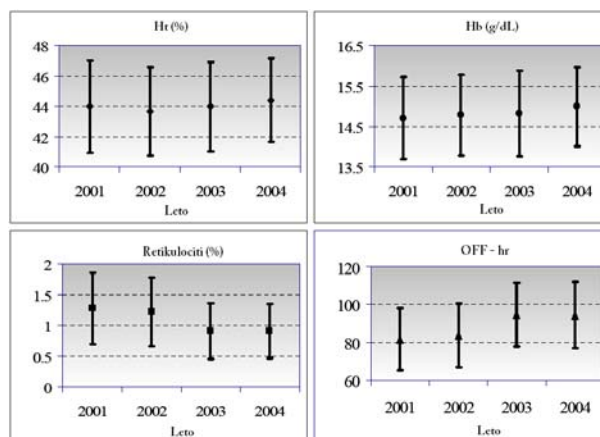
V nadaljevanju se bomo seznanili z argumenti, ki govorijo za in proti razlagi ne zavrnjenih hipotez za razlago ugotovljenih obremenilnih abnormalnosti biokazalcev ([Hb] in OFF – hr vrednosti) pri športniku.

9.8.2. Zakaj uporaba krvne transfuzije?

Krvni doping je prepovedana metoda namenjena povečevanju dostave kisika tkivom in s tem aerobnega nastopa, preko povečevanja skupne mase hemoglobina, večinoma v vzdržljivostnih športih. Skozi desetletja so se oblikovale različne strategije doseganja tega cilja, vključujoč uporabo homologne, avtologne krvne transfuzije, uporabo rekombinantnega humanega eritropoetina in drugih spodbujevalcev eritropoeze, uporaba avtolognih transfuzij skupaj z rHuEPO in uporaba umetnih nosilcev kisika [36]. Dokazovanje teh v športu nesprejemljivih metod je izjemno težavno [36]. Leta 2005 je glavni medicinski strokovnjak UCI dr. Mario

Zorzoli s sodelavci, predstavil spremembe krvnih biokazalcev pri kolesarjih in kolesarkah v obdobju 2001-2004 in podal razloga zanje (Slika 36) [48].

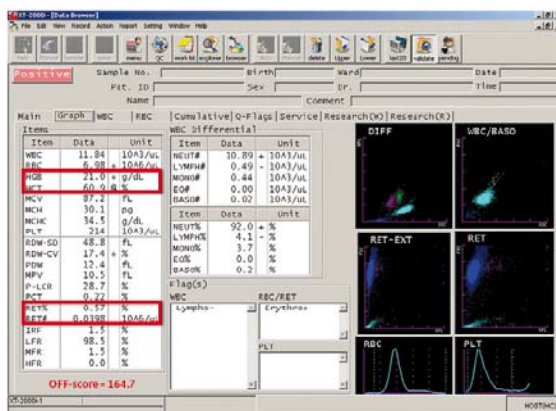
Slika 36: Hematološki rezultati od leta 2001 do 2004 izraženih kot sredine $\pm$ standardni odklon. Podatki so od športnikov in športnic. Število analiziranih vzorcev v letih in spolu: 2001 [2495(M)/1541(Ž)], 2002 [3033/2352], 2003 [2890/2073] in leta 2004 [2285/2001] [48].



Navajamo dobesedno [48]: “Na sliki (Slika 36) vidimo srednje vrednosti hematokrita, hemoglobina, retikulocitov in stimulacijskega indeksa od leta 2001. To je leto, ko se začne z merjenjem retikulocitov. Ob tem lahko omenimo, da je od leta 1997, leta uvedbe prvih nenapovedanih krvnih testov, opazen postopen a kontinuiran upad sredine hematokrita in hemoglobina (neprikazani podatki), ki pa so se ponovno začele dvigovati v letih 2003 in 2004. Kljub temu da so bile izmerjene vrednosti še zmeraj v normalnih fizioloških mejah, ki so pri poklicnih vzdržljivostnih športnikih pričakovane, pa je bilo to dejstvo presenetljivo. V istem času so se sredine retikulocitov v letih 2001-2002 znižale do 2003-2004. Še več, opazni sta bili dve različni porazdelitvi retikulocitov. Ena za leti 2001 in 2002, druga za leti 2003 – 2004, ob tem da se populacija športnikov izpostavljena zdravstvenim pregledom ni spremenila, prav tako se ni spremenil način kontrole ali uporaba tehnologije za izvedbo analiz. Kako razložiti nepričakovano evolucijo krvnih kazalcev? Pomembno se je osredotočiti na rezultate retikulocitov, saj je povečano število le teh posledica stimulacije kostnega mozga, ki lahko izvira iz uporabe zdravil za spodbujanje eritropoeze (rHuEPO, darbepoetin, CERA...). Seveda retikulocitoza ni ustrezen dokaz uporabe prepovedanih zdravil, saj lahko druga stanja ali situacije povzročijo podoben rezultat, kljub temu pa lahko izzove sum. Na drugi strani pa poznejša prisotnost povečanega števila krožečih eritrocitov, posledica stimulacije kostnega mozga ali uporabe krvne transfuzije (homologne, avtologne), izzove negativni fiziološki odgovor na proizvodnjo rdečih krvničk ki se demonstrira z zmanjšanim številom krožečih retikulocitov. Pri tem je potrebno opozoriti, da zelo nizko število krožečih retikulocitov ne

more izvirati iz drugih – dovoljenih – načinov povečevanja skupnega števila eritrocitov, kot sta npr. bivanje na višini ali uporaba naprav za simulacijo višine. Naj omenimo, da je pomembna retikulocitopenija prisotna pri nekaterih težkih medicinskih stanjih, vendar so te patologije nezdržljive z športom na vrhunski ravni in zato ne morejo razložiti takšnih rezultatov pri športniku, ki tekmuje. Še več, v članku Gora in sodelavcev piše: “opozoriti je potrebno na dejstvo, da hematološko stanje povečanega hemoglobina skupaj z abnormally nizkimi retikulociti v medicinski literaturi ni bilo nikoli pripisano nobeni znani patološki abnormalnosti.” Ker takšna kombinacija rezultatov biokazalcev v medicinski stroki še ni bila opisana, je njeno prisotnost mogoče v celoti pripisati uporabi prepovedanih substanc, ki izzovejo stimulacijo kostnega mozga ali transfuziji krvi (Slika 37).”

Slika 37: Analiza sumljivega krvnega vzorca športnika z inštrumentom Sysmex XT-2000i [79]. Zaradi sumljivih krvnih vrednosti je bil športnik posledično izpostavljen nenapovedanemu doping testu na rHuEPO, ki pa je bil negativen. To ni presenetljivo, saj visoka OFF – hr vrednost kaže da je športnik že prenehal z uporabo rHuEPO. Klub temu pa je športnik zaradi visokih OFF – hr vrednosti dobil prepoved udeležbe na tekmovanju (no start) [79].



“Analiza rezultatov pridobljenih v letih 2001 do 2004, kaže da se je število vzorcev z izjemno visokimi vrednosti % retikulocitov ($> 2.5\%$) statistično značilno znižalo od let 2001-2002 na 2003-2004, v istem času pa se je povečalo število vzorcev z zelo nizkimi vrednosti % retikulocitov ($< 0.4\%$ in 0.2%).” Rezultati so prikazani v spodnji tabeli (Tabela 13).

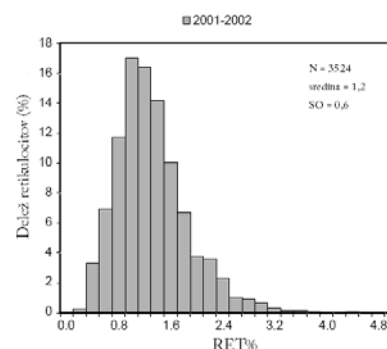
Tabela 13.: Število analiziranih vzorcev ter absolutne in relativne vrednosti visokih in nizkih vrednosti retikulocitov v obdobju od leta 2001 do 2004 [48].

	2001	2002	2003	2004
Vzorci (število)	1541	2351	2073	2029
Ret > 2.5%	52 (3.4%)	59 (2.5%)	14 (0.7%)	9 (0.4%)
Ret < 0.4%	33 (2.1%)	58 (2.5%)	192 (9.3%)	193 (9.5%)
Ret < 0.2%	1 (0.06%)	1 (0.04%)	41 (2.0%)	38 (1.9%)

“Določimo lahko dve obdobji: prvo med leti 2001 in 2002, ter drugo v letih 2003-2004. Razlike med tema dvema obdobjema (zmanjšano število vzorcev kaže retikulocitozo povečano število vzorcev pa retikulocitopenijo), povezano z povečanim hemoglobinom, nas vodi k razlagi da se je sprememba zgodila na način da je omejeno število športnikov začelo uporabljati krvni doping. Razlike v retikulocitih/hemoglobinu, kot tudi govorice na terenu, so UCI (in druge športne federacije) v letu 2005 pripeljale do naslednjih ugotovitev:

- Darbepoetin se manj uporablja zaradi težav določanja ustrezne doze in pogostosti aplikacije, kot tudi lažje in dolge odkriljivosti le tega na doping testu. Zaradi večje potentnosti od rHuEPO, je njegova uporaba povzročila nekatere abnormalne visoke vrednosti retikulocitov (do 3 - 4 %) v obdobju 2001-2002 (Graf 14), ki so v letih 2003-2004 izginili.

Graf 14.: Porazdelitev retikulocitov pri vseh kolesarjih testiranih v okviru UCI v letu 2001-2002 [50].



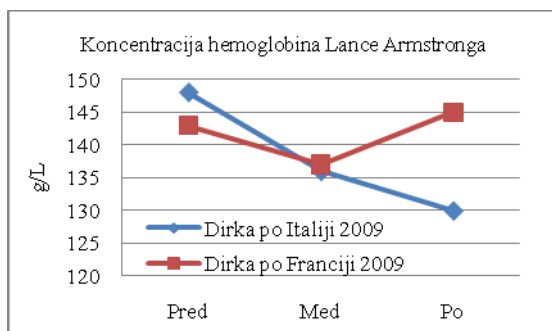
- rHuEPO se je začel uporabljati drugače od preteklih let in uporaba krvnih transfuzij se je vrnila. Z namenom izogibanja odkrivanja rHuEPO pri urinskem testu na tekmovanju, nova doping strategija temelji na zmanjševanju doz, ki so sedaj aplicirane intravensko (na ta način se skrajša detekcijsko okno za rHuEPO) v obdobjih veliko pred tekmovanjem. Ker dokazovanje uporabe krvne transfuzije (homologne) do avgusta 2004 ni bilo mogoče, so se nekateri športniki odločili za to obliko dopinga. Posledice teh manipulacij so se na krvnih testih izvedenih na tekmovanju demonstrirale kot visok hemoglobin in retikulocitopenija, kar je značilno za predhodno manipulacijo krvi. Športniki, ki kažejo takšne abnormalne vrednosti ali abnormalno evolucijo krvnih kazalcev, so lahko osumljeni krvnega dopinga in bi morali biti izpostavljeni nenapovedanim doping testom med in izven obdobja tekmovanj.”

Po prvih pozitivnih doping primerih športnikov na homologno krvno transfuzijo v letu 2004, je hitro sledila prilagoditev doping strategije z namenom, da bi se dopingirani športniki izognili tako urinskemu rHuEPO testu kot testu na homologno krvno transfuzijo. Tako so nekateri športniki začeli kombinirati injekcije rHuEPO z avtologno krvno transfuzijo. Terapijo

z rHuEPO so izvajali med mrtvo sezono (zima za kolesarje, poletje za tekače na smučeh), nato odvzeli kri, jo shranili za dalj časa in jo nato dodali nazaj med tekmovanjem. Tako je španska policija maju leta 2006 v tajni policijski akciji zasegla več kot 200 polnih krvnih infuzijskih vrečk skupaj z doping dnevniki in številnimi drugimi doping produkti [40]. Ob tem so preiskovalci uspeli povezati kodna imena športnikov, vključno s kolesarji, z njihovimi visoko detajlnimi doping dnevniki [40]. Analize vrečk krvi so razkrile, da so nekatere od le teh poleg rdečih krvnih celic vsebovale tudi rekombinantni humani eritropoetin [80]. Ta ugotovitev je nakazala na uporabo tega zdravila med mrtvo sezono z namenom dviga količine funkcionalnega hemoglobina pred ekstrakcijo (tako se lahko neomejeno trenira) [80]. Postalo je jasno, da je avtologna krvna transfuzija postala »doping metoda izbire«, za športnike, ki so želeli ilegalno izboljšati svoj vzdržljivostni nastop. Zaseženi doping dnevniki so razkrili, da so kolesarji prejeli eno do dve enoti krvi pred enodnevnimi tekmovanji in tri enote krvi pred največjimi etapnimi dirkami (Dirka po Franciji, Dirka po Italiji, Dirka po Španiji) [81]. Sum na uporabo avtologne krvne transfuzije pri kolesarju Lance Armstrongu med etapno dirko leta 2009, kjer je osvojil 3 mesto pri starosti 38 let, je javno izrazil dr. Mørkeberg, sam trenutno eden najvidnejših strokovnjakov za dokazovanje avtologne krvne transfuzije [82]. Ugotovil je, da Armstrongove krvne vrednosti med Dirko po Franciji niso padle, kar bi bilo običajno (in se je pri tem kolesarju zgodilo med Dirko po Italiji dober mesec prej), temveč so ostale na istem nivoju, kar je mogoče razložiti s prejemom krvne transfuzije med dirko (Graf 15). Prav tako je bil delež retikulocitov pred in med dirko po Franciji znižan v primerjavi s podatki tega kolesarja izven sezone (Priloga 6, športnik C). To po njegovem mnenju niso normalne krvne vrednosti kolesarja med etapno dirko [82]. Kako je mogoče razložiti dejstvo, da vrednosti retikulocitov ob tem niso prešle spodnjih mej (pod 0,2 ali 0,4 %), je šele maja 2010 podal skesan kolesar Floyd Landis. Povedal je, da se avtologna krvna transfuzija med etapno dirko uporablja skupaj z kratko delujočimi rHuEPO, ki zagotovijo ustrezno vrednost retikulocitov, kljub povečanju skupne mase krožečih eritrocitov zaradi transfuzije, ob tem pa se izloči pred direktnim testom na rHuEPO [75]. Ta uspešna strategija hkratne uporabe avtologne krvne transfuzije in rHuEPO med etapno dirko, kljub nenehnim nenapovedanim doping kontrolam, je bila ekspertom UCI, zadolženim za interpretacijo krvnih profilov, do tistega trenutka neznana [75].

Graf 15.: Spremembe [Hb] pri kolesarju Lance Armstrongu med dvema tritedenskima etapnima dirkama.

Do tega trenutka ne obstaja direktna metoda detekcije avtologne krvne transfuzije [81]. Edini mogoči način posrednega dokazovanja avtologne krvne transfuzije je biološki potni list, ki pa še mora potrditi svojo učinkovitost. Vendar



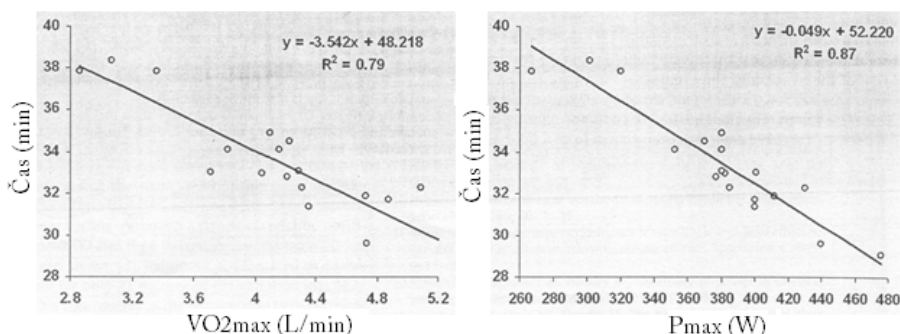
ga zaradi že navedenih razlogov ni mogoče uporabiti za dokaz doping prekrška med etapno dirko [4]. Prav tako je nedavni preizkus njegove učinkovitosti za dokazovanje avtologne krvne transfuzije, na podlagi meritev [Hb] in OFF – hr vrednosti, pokazal nizko občutljivost, saj je ob specifičnosti 99,9 % kljub optimalnem času odvzemov krvi odkril le 18 % uporabnikov avtologne krvne transfuzije, a brez lažno pozitivnih rezultatov [81]. To je zaskrbljujoče, saj ponavljajoči indici med vrhunskimi kolesarji, tudi po letu 2005, kažejo na veliko razširjenost njene uporabe. Uporabo ali namen uporabe avtologne krvne transfuzije so na podlagi dokazov afere Puerto iz leta 2006 dokazali trem kolesarjem, uvrščenim med prvih deset na Dirki po Franciji v letih 2005-2009. Ujemanje DNK, pridobljene iz krvi najdene v infuzijskih vrečkah v okviru afere Puerto, s krvjo odvzeto med doping testi, je bilo potrjeno in javno objavljeno v primeru nemškega kolesarja Jana Urlicha (3. mesto na Dirki po Franciji leta 2005) [83] in Španca Alejandra Valverda (6. mesto na Dirki po Franciji leta 2007 in 9. mesto leta 2008) [84]. Na podlagi zbranih dokazov v okviru iste doping afere so obsodili tudi Italijana Ivana Bassa, absolutnega favorita za zmago na Dirki po Franciji leta 2006, saj je leto prej na tej dirki dosegel 2. mesto, takoj za Američanom Lance Armstrongom. Na zaslišanju je priznal le namen uporabe nedovoljene tehnike avtologne krvne transfuzije [83]. Pozneje, leta 2007, so na Dirki po Franciji zlorabo homologne krvne transfuzije dokazali kazahstanskemu kolesarju Aleksandru Vinokouruvu (3. mesto na Dirki po Franciji 2003, 5. mesto leta 2005), dan po tem, ko je zmagal še drugi individualni kronometer [85]. Uporabo avtologne krvne transfuzije, hkrati z dokazano uporabo CERA, je v letu 2008 priznal tudi Avstrijec Bernard Kohl (3. mesto na Dirki po Franciji leta 2008) [86]. Uporabo avtologne krvne transfuzije skupaj z rHuEPO izven sezone od leta 2003 je priznal tudi Floyd Landis, pretekli zmagovalec Dirke po Franciji leta 2006 (naslov odvzet zaradi pozitivnega vzorca na testosteron) [87]. Leta 2005 je

na isti dirki osvojil 9. mesto. Ugotovimo lahko, da je uporaba krvnih transfuzij med tekmovalci uvrščenimi med prvih deset na Dirki po Franciji po letu 2005, kamor se uvršča tudi obtoženi športnik, močno prisotna. Razlog, da se (pre)pogosto najde pri najbolj uspešnih posameznikih morda ni naključen. Lahko je le dokaz njenega velikega učinka na športni nastop (Slika 38).

9.8.3. Učinek krvne transfuzije na športni vzdržljivostni nastop

Ekblom in sodelavci so leta 1972 prikazali zvezo med koncentracijo hemoglobina, volumnom krvi in maksimalno aerobno močjo [88]. Študija je potrdila, da krvna transfuzija, pri kateri posamezniku najprej odvzamejo, nato pa po štirih tednih vrnejo 800 ml njegove krvi, takoj izboljša VO_{2max} za 9 % in posledično vzdržljivostni nastop [88]. Dokazano je, da uporaba rHuEPO terapije ali krvne transfuzije ne povzroči značilne razlike v spremembi VO_{2max} za vsak gram povečanja koncentracije hemoglobina [22]. Tako je bilo ugotovljeno, da povečanje koncentracije hemoglobina, dosežene preko terapije z rHuEPO povzroči podobno povečanje v VO_{2max} in časa do utrujenosti med standardnim obremenitvenim testiranjem kot uporaba krvne transfuzije [22]. Leta 1987 so natančno vodene raziskave potrdile, da so dobro trenirani tekači na smučeh izboljšali svoj čas na 15 km tekmi za 4 do 6 % tri ure in tudi 14 dni po enkratnem prejemu 1350 mL lastne krvi [89]. Na podlagi teh in podobnih ugotovitev so raziskovalci prišli do ugotovitve, da lahko krvni doping skrajša čas vrhunskega vzdržljivostnega nastopa tudi do 10 % in tako premakne smučarja tekača s tridesetega mesta na zmagovalne stopničke [38]. Tehnika krvnega dopinga tako predstavlja daleč najbolj učinkovit način manipulacije športnega rezultata v vzdržljivostnih panogah [38]. Višji VO_{2max} je povezan z boljšim rezultatom kolesarskega kronometra na 20 km peljanega na valjih (Slika 37) [90]. Tako je najhitreje omenjeni kronometer prepeljal kolesar, ki je na standardiziranem stopnjevanem testu (30 W/min) razvil največjo moč 476 vatov (kronometer je zmožel v času 29. minut, njegov absolutni VO_{2max} je bil 5.3 L kisika, izraženo relativno pa 75.3 ml/kg/min), najpočasneje pa kolesar, ki je na predhodnem testu razvijal največjo moč 267 vatov (čas 38 minut, absolutni $VO_{2max} = 2.9$ L ali 46.8 ml/kg/min) [90]. Vsi, ki so imeli absolutni VO_{2max} znotraj teh dveh mej, so imeli znotraj teh dveh mej tudi svoje tekmovalne čase, ne glede na to, da so bili merjenci stari od 18 pa vse do 52 let [90].

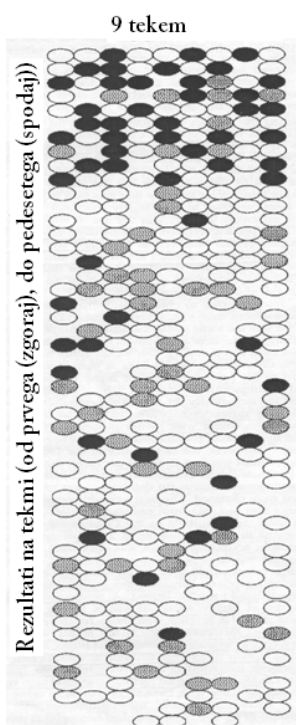
Slika 37.: Slika kaže povezavo med doseženim časom na 20 kilometrskem kronometru peljanem na valjih (s tem se izloči vpliv zračnega upora) in največjo močjo (P_{max}) ter VO_{2max} doseženo na stopnjevanem testu (test 30W/min) pri različno treniranih posameznikih [90]. Korelacije med največjo močjo doseženo na stopnjevanem testu in doseženim časom na kronometru so visoke ($R^2=0.87$), prav tako za absolutni VO_{2max} ($R^2= 0.79$) [90], kar kaže na pomembnost teh dveh kazalcev vzdržljivosti s stališča športnega nastopa.



Izboljšanje VO_{2max}

pri elitnih kolesarjih v eni sezoni, kot posledica vadbe, za 8.2 – 8.4 %, veljajo trenutno za najvišje opisane v strokovni literaturi [91, 92], opisane pa so bile tudi nižje (~5 %, [104, 105]). Podobno velja za vrhunske tekače na smučeh (5 – 10 % na sezono), manj pri starejših od 20 let [93]. Presečne študije, ki so primerjale različne skupine kolesarjev, so potrdile, da se največji napredki v VO_{2max} ob izvajanju kroničnega vzdržljivostnega treninga pri moških kolesarjih zgodijo v obdobju rasti, to je, med 15. in 17. letom starosti, vrh te sposobnosti pa se doseže med 21. in 23. letom [94]. Najnovejše longitudinalne raziskave na istih elitnih kolesarjih, ki so jih testirali pet let zapored v istem obdobju sezone, so pokazale, da od starosti 22.6 let niso več napredovali v VO_{2max} [95]. To kaže na to, da je napredek v tem vzdržljivostnem kazalcu iz sezone v sezono majhen, ter se z naraščanjem starosti zmanjšuje, ter pozneje doživi plato, kar je značilno tudi za najboljše kolesarje na svetu [95]. Ker povečanje VO_{2max} , ne glede na način, kako ga dosežemo (trening, krvni doping...), izzove napredek v športnem vzdržljivostnem nastopu, so “umetni” načini za doseganje tega napredka za kolesarje izjemno zanimivi. Še posebej zato, ker prejem 800 ml krvi v nekaj dneh prinese izjemno tekmovalno prednost, primerljivo ali večjo kot ga izzove pol leta težkega kolesarskega treninga pri mladih ljudeh (oz. 471 ur treninga [91]). Da to drži, kažejo številne afere v kolesarskem svetu, ki kažejo na uporabo prepovedanih snovi ali metod katerih osnovni namen je povečevanje VO_{2max} . Težave njihovega dokazovanja ob hkratnem velikem učinku na športni nastop vodi v večji rezultatski pritisk na poštene nedopingirane športnike, ki želijo

biti uspešni. Da te bitke ne dobivajo nedopingirani športniki so šokantno potrdile meritve hemoglobina in hematokrita 146. športnic in športnikov (oz. 68 % vseh na tekmovanju sodelujočih) na svetovnem prvenstvu tekačev na smučeh leta 2001 (Slika 38)[38]. Le te so pokazale, da je imelo 50 % nosilcev medalj visoko abnormalno vrednost hemoglobina in hematokrita (hemoglobin nad 17.2 g/mL oz. hematokrit nad 50 % pri moških, ter nad 15.8 g/mL oz. nad 47 % za ženske) [38]. Med tekmovalci uvrščenimi od 4 do 10 mesta pa jih je 33 % imelo abnormalne vrednosti (nad 16.4 g/mL oz. nad 48 % za moške, ter nad 15 g/mL oz. nad 45 % za ženske) hemoglobina in hematokrita, kar je višje od vrednosti, ki jih dosega 97,5 % športnikov[38]. Ti rezultati so bili drastično različni od smučarjev tekačev, ki so bili na istem prvenstvu uvrščeni od 41. do 50. mesta, kjer jih je le 3 % imelo visoko abnormalne vrednosti hemoglobina [38]. Športniki z visoko abnormalnimi vrednostmi hemoglobina so bili razvrščeni v vrh tekmovalnih rezultatov in so osvojili polovico vseh medalj na omenjenem prvenstvu, ter tretjino ostalih uvrstitev do desetega mesta [38]. Med športniki uvrščenimi med



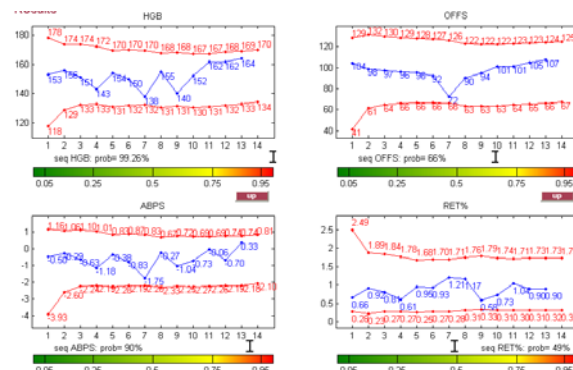
prvih 50 na tem prvenstvu, jih je 36 % imelo visoko abnormalne ali abnormalne hematološke profile [38]. Raziskovalci so na osnovi teh podatkov prišli do ugotovitve, da je ekstremno malo verjetno, da bi lahko takšne vrednosti hemoglobina ti športniki dosegli preko uporabe višinskega treninga ali hipoksične klime, saj so do takrat objavljene raziskave poročale o veliko manjših učinkih omenjenih postopkov naravnega dvigovanja koncentracije hemoglobina [38]. Ugotovljeno je bilo, da bi lahko v omenjenih okoliščinah zmagal »čist«, le resnično nadpovprečno talentiran športnik [38].

Slika 38.: Slika prikazuje hematološke profile tekačic in tekačev na smučeh na svetovnem prvenstvu leta 2001 (Lahti) [38]. Prikazani so podatki prvih petdesetih tekačic in tekačev na devetih tekmah. Vrstni red tekem je pomešan, da iz objave ne bi bilo mogoče identificirati hematoloških profilov posameznih tekmovalcev. Črni krogci predstavljajo tekače z visoko abnormalnimi vrednostmi hematoloških vrednosti, sivi krogci predstavljajo abnormalne vrednosti, beli krogci pa normalne vrednosti (dosega jih 97,5 % vseh zdravih nedopingiranih vrhunskih športnikov). Manjkajoči krogci, tekmovalci niso bili izmerjeni.

9.8.4. Primerjava krvnih vrednosti v letu 0001 in 0002

Primerjava krvnih vrednosti pri istem športniku v dveh različnih sezonah ni enostavna saj se sezoni lahko razlikujeta v vadbenih obremenitvah (ki po nekaterih raziskavah dokazano vplivajo na meritve določenih biokazalcev [36]), času odvzema meritev (med/izven sezone), času bivanja na višini in številu odvzetih meritev če omenimo le najbolj očitne. Več kot jasno je, da objektivno primerjavo obeh sezon poleg 3 G modela, omogoča le še model biološkega potnega lista, ki je bil razvit ravno v ta namen. Ta model je za tega športnika (ob neupoštevanju bivanja na višini) ugotovil *abnormalna odstopanja* (pri specifičnosti 99,9 %) določenih krvnih kazalcev v aprilu in avgustu letu 0002, medtem ko jih v istem obdobju sezone v letu 0001 ni. Poleg tega je ta model dokazal *abnormalnost zaporedja meritev* (pri specifičnosti 99,9 %) izvedenih v letih 0001 in 0002, medtem ko ni pokazal abnormalnosti zaporedja (pri specifičnosti 99,9 %) vseh meritev izvedenih v letu 0001 (ob neupoštevanju vpliva nadmorske višine na meritve, saj niso znane) (Graf 16). Prav tako je model biološkega potnega lista pokazal na abnormalna odstopanja in abnormalnost zaporedja (pri specifičnosti 99,9 %) tudi v primeru, če so bili v izračunu uporabljene meritve le iz sezone 0002 (tako kot v obremenilnem dokazu, tudi tu ni bil upoštevan vpliv nadmorske višine, Graf 17). To je pričakovano, saj model biološkega potnega lista penalizira športnike, ki prikazujejo (abnormalno) visoko varianco meritev biokazalcev, ki se lahko teoretično pričakuje tudi pri krvnem dopingu (več o tem v nadaljevanju).

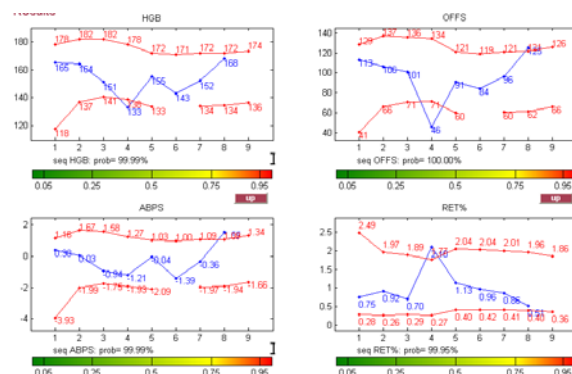
Graf 16.: Podatki športnika z mejami specifičnosti 99,9 % samo za leto 0001 (ni upoštevan vpliv nadmorske višine).



Graf 17.: Podatki športnika z mejami specifičnosti 99,9 % samo za leto 0002 (ni upoštevan vpliv nadmorske višine).

(Le) na osnovi informacij pridobljenih z validiranim modelom biološkega potnega lista ter športnikovih meritev, lahko trdimo, da se podatki meritev iste osebe v sezoni 0002 razlikujejo od podatkov meritev te osebe v sezoni 0001.

Vzrok teh razlik ni znan.



9.8.5. Argumentacija hipoteze 3b (uporaba avtologne krvne transfuzije)

9.8.5.1. Dokazi o odvzemu krvi

Avtologna krvna transfuzija zahteva odstranitev krvi, njegovo shranjevanje pri + 4° C nekaj tednov ali pri temperaturi pod lediščem za nedoločen čas, ter ponovno reinfuzijo v krvni obtok donatorja [96]. V primeru suma športnika na zlorabo avtologne krvne transfuzije morajo biti v njegovem krvnem profilu vidne posledice naslednjih intervencij:

1. odvzema krvi samemu športniku;
2. reinfuzije krvi nazaj v športnika.

Ugotovljeno je, da se pri zdravih posameznikih volumen plazme obnovi v 6 – 8 urah po doniranju ene enote krvi [91]. Odstranitev 480 ml krvi tako v šestih urah privede do znižanja hematokrita za 8,3 % od predhodnega [91]. Odvzem krvi v količini 800 ml povzroči znižanje koncentracije hemoglobina za 13 % (oz. 18 % pri odvzemu 1800 ml krvi), ter znižanje rezultata vzdržljivostnega nastopa za približno 30 % v obeh zadnjih primerih [88]. Ko so zdravim prostovoljcem odstranili del krvi z namenom oblikovanja modela dokazovanja avtologne krvne transfuzije, so ugotovili naslednje spremembe: pri šestih prostovoljcih je odvzem ene enote krvi (59 g hemoglobina oz. 7,1 % njihove skupne mase hemoglobina) povzročil povprečno znižanje hematokrita in hemoglobina z 45,3 % in 157 g/L na 42,2 in 138 g/L (oz. za 6,8 in 12,1 %). Pri štirih prostovoljcih pa je odvzem dveh enot krvi (108,3 g hemoglobina oz. 12,9 % njihove skupne mase hemoglobina) povzročil povprečno znižanje

hematokrita in hemoglobina z 45 % in 154 g/L na 39,8 % in 134 g/L (oz. za 11,6 in 13 %) [70]. Ko so zdravim, netreniranim moškim postopno odvzeli tri enote krvi z namenom avtologne krvne transfuzije, ob tem pa merili spremembe krvnih kazalcev, so ugotovili, da je v povprečju odvzem ene enote krvi (450 ml) znižal [Hg] za 5 % [96]. Odvzem krvi športniku torej povzroči značilen padec hematokrita in hemoglobina. Pri športniku je sprememba koncentracije hemoglobina januar – marec oz. april v rangi 8,2 – 19,1 %, kar ustreza vrednostim količine odvzete krvi v višini okoli 450 – 1800 ml (Tabela 14).

Tabela 14.:

Datum	Hemoglobin (g/L)	Hematokrit (%)
15/01/0002	165	47.3
02/11/0002	164	46.1
03/11/0002	151	42.1
19/04/0002	133	38.9
% Razlike jan-feb/marec	Znižanje za 8,2 %	9,9 %
% Razlike jan-feb/april	Znižanje za 19,1 %	16,7 %

Vendar pa v tem primeru nismo upoštevali vpliva znižanja krvnih vrednosti športnika zaradi vadbenih obremenitev (npr. izvajanja težkega visoko intenzivnega treninga v času priprav na pomembno etapno dirko), vpliva bivanja na višini v aprilu in naključja (npr. zaužitje velike količine tekočine pred odvzemom krvi). Za oceno vpliva vadbene obremenitve na meritve imamo več možnosti: (a) vrednosti navedene v strokovni literaturi, (b) primerjava krvnih vrednosti športnika izven in med sezono v obdobju, v katerem ni suma o uporabi dopinga (prednost te metode je ugotovitev vrednosti, ki so značilne za posameznika) in (c) primerjava upada krvnih vrednosti pri posamezniku med večtedensko etapno dirko, ki je dober približek izvedbi večtedenskega zahtevnega treninga v predtekmovalnem obdobju.

- a) Ugotovljene povprečne vrednosti padca hemoglobina med tekmovalno sezono v primerjavi z vrednostmi izven sezone pri vrhunskih kolesarjih so: - 6 % [98], - 4,3 do - 2, 5 % [49] in - 4 % [91]. Septembra 2010 je bilo ugotovljeno, da lahko znižanje hemoglobina ([Hg]) med tekmovalno sezono pri različnih športnih disciplinah dosega v povprečju od 3 do 8 % [65].

- b) Tabela 15.: Meritve [Hb] pri športniku v sezoni 0001 (ni izključeno, da so vrednosti izven sezone že izven normalnega (biološkega) območja, saj presegajo povprečne vrednosti navedene v strokovni literaturi):

Sezona 0001 (mar - sept)*	Izven sezone (okt - feb)**	Razlika
150,4 g/L	163,8 g/L	+ 8,9 %

*N = 11, **N=4

- c) Graf 18.: Spremembe koncentracije hemoglobina med etapno dirko 1 leta 0001 in 0002.

Uvrstite

v

športnik

a: med

petnajste

rico leta

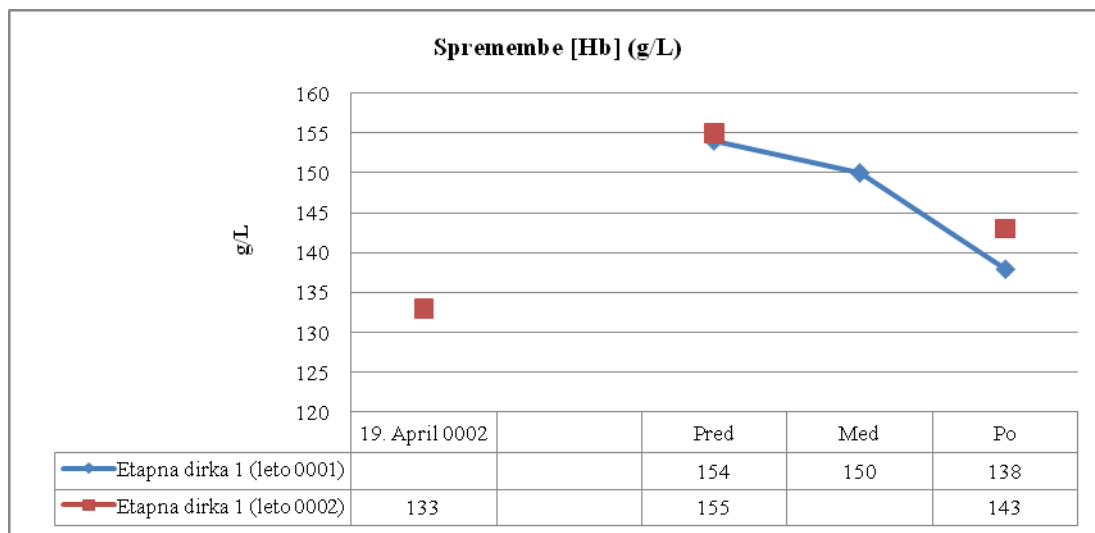
0001,

med

deseteric

o leta

0002.



Zadnji dan naporne tritedenske etapne dirke 1 leta 0002 odpeljani zelo dobro, so zabeležene vrednosti hematokrita 42,4 % in hemoglobina 143 g/L. Padec koncentracije hematokrita in hemoglobina v višini 8,4 % oz. 7,7 %, je v skladu s padcem hemoglobina izmerjenim pri poklicnih nedopingiranih kolesarjih na Dirki po Franciji leta 2007 (izmerjen povprečen padec koncentracije hemoglobina je bil 11,5 %, z individualnimi vrednostmi upada od 7,0 do 20,6 %) [98]. Razlog je hemodilucija kot posledica velikega fizičnega napora [4]. Model, ki bi opisal vzročno zvezo med naporom in indirektnim biološkim kazalcem, v tem trenutku še ni validiran [4], zato spodnja meja v biološkem potnem listu v primeru, da je vzorec odvzet med ali po etapni kolesarski dirki, ni določena (preprečuje lažno pozitiven rezultat). Vrednosti hematokrita (42,4 %) in hemoglobina (143 g/L) izmerjeni na zadnji dan etapne dirke 1 leta 0002, sta višji od aprilskih vrednosti 0002 (38,9 % in 133 g/L) izmerjeni pri istem posamezniku istega leta. To kaže, da tritedenski izjemni naponi (izenačitev najboljšega rezultata kariere na tej tekmi) niso povzročili takega upada v rdeči krvni sliki, kot je zabeležen v aprilu 0002. To govori o tem, da samo ekstremne obremenitve (torej tudi trening v pripravi na etapno dirko 1 leta 0002) niso izzvale takega znižanja krvnih vrednosti kot so se zgodile v aprilu 0002.

Če povzamemo:

Tabela 16: Povprečen padec koncentracije hemoglobina, ki ga lahko med tekmovalno sezono pričakujemo pri športniku zaradi vadbenih obremenitev, je v povprečju do 8 %, pri vrhunskem kolesarju do 6 %, pri opazovanem športniku v domnevno nedopingiranem obdobju med 8,9 % in 7,7 % (povprečno 8,3 %). Kaj to pomeni za opazovan padec krvnih vrednosti v aprilu?

Datum	Hemoglobin (g/dL)	Korekcija 8 %	Korekcija 6 %	Korekcija 8,9 %	Korekcija 7,7 %	Korekcija 8,3 %
15.1.0002	16.5					
11.2.0002	16.4					
11.3.0002	15.1					
19.4.0002	13.3					
% Razlike jan-feb/marec	Znižanje za 8,2 %	0,2 %	2,2 %	/	/	0,1 %
% Razlike jan-feb/april	Znižanje za 19,1 %	11,1 %	13,1 %	10,2 %	11,4 %	10,8 %

Ugotovimo lahko, da je znižanje krvnih vrednosti v primerjavi jan-feb/april za 10,2 – 13,1 % večje, kot ga lahko v povprečju pričakujemo pri vrhunskem športniku zaradi sprememb izhajajočih iz vadbenih obremenitev izven in med sezono. To drži tako v primerjavi z vrednostmi poznanimi iz strokovne literature kot tudi v primerjavi s športnikovimi lastnimi meritvami v domnevno nedopingiranih obdobjih. Ali bi takšen padec vrednosti hemoglobina lahko pripisali naključju (npr. pretiranemu vnosu tekočine)? Raziskavo profesorja Bengt Saltina, ki je leta 2006 preučil omenjene vplive na merjenje krvne koncentracije hemoglobina pri vrhunskih tekačih na smučeh, je pokazala, da je vnos 0,5 L vode znižal [Hg] za 3 – 4 g/L (-2,1 do -2,7 %), vnos 2 L vode pa za -3,8 % [99]. Druga raziskava je potrdila, da se lahko koncentracijo hemoglobina umetno zniža za okoli 6 % v dolžini 75 minut po tekmovalju z zaužitjem 1 L slane vode takoj po tekmovalju [100]. Tudi, če upoštevamo najstrožjo korekcijo (zaužitje 1 L slane vode tik pred odvzemom krvi), ostane nepojasnjena razlika 4,2 – 7,1 %. Velikost te razlike govori o odvzemu krvi vsaj v višini ene enote krvi (450 mL). Ker je nenamerno zaužitje tako velike količine slane vode oziroma še večje količine običajne vode malo verjetno (ob tem proti hipotezi hemodilucije govori hkratno povišanje % retikulocitov, več o tem v nadaljevanju), neupoštevanje vpliva morebitne hemodilucije daje velikost nepojasnjene razlike, ki jo lahko razložimo z odvzemom krvi v višini dveh enot krvi (450 – 900 mL).

Vpliva bivanja na višini na spremembo krvnih kazalcev ni lahko oceniti, ve pa se, da do sprememb prihaja [65]. Ugotovljeno je, da je večje povečanje [Hb] v primerjavi z Ht po akutnem bivanju na višini znak dehidracije na višini [45]. Zmanjšanje volumna krvne plazme za 7 – 10 % pa je dobro znana posledica prihoda z nižine na višino 2000 m.n.v. [45]. Vpliva na krvne meritve v primeru športnika ni mogoče podati, saj ni znana višina bivanja na višini v aprilu 0002. Lahko rečemo le to, da na višini pride do zmanjšanja volumna krvi in zato navideznega povečanja (ne pa zmanjšanja) krvnih vrednosti (dvig [Hb] in Ht). Volumen krvi se ob vrnitvi na nizko višino normalizira. Čeprav vpliva bivanja na višini na vrednosti krvnih kazalcev ne moremo oceniti, pa lahko ugotovimo, da bivanje na višini ne more biti razlog nizkih vrednosti [Hb] v aprilu 0002. Ugotovljene nizke vrednosti krvi v aprilu 0002 lahko torej izvirajo le iz izgube krvi. Vzrok izgube krvi je lahko:

- a) bolezen, ali
- b) odvzem krvi.

Po mnenju športnika je odstopanje v hematološkem profilu v aprilu posledica kronične bolezni (želodčni ulkus), ki se je aprila leta 0002 manifestirala s spremembo krvnih kazalcev, zaradi, po njegovem mnenju, nenamenske uporabe dvotirne terapije z nesteroidnimi antirevmatiki (Naprosyn[®] (na recept) in Aspirin[®] (jemanje na lastno pest))* . Čeprav je znano, da je uporaba nesteroidnih antirevmatikov pri športnikih pogosta, pa je po podatkih iz tujine znano, da uživa več nesteroidnih antirevmatikov naenkrat le majhen delež športnikov (trije od 446. ih [101]). Kljub temu pa je na športnikih potrjeno, da uživanje derivatov salicilne kisline (npr. Aspirin[®]) najpogosteje privede do težav z želodcem [101]. Torej je razlaga športnika mogoča. Obstaja pa tudi alternativna razlaga: uporaba nesteroidnih antirevmatikov zaradi prehlada, ki bi naj bi privedla do močne krvavitve v prebavila, je razlaga, ki je bila po podatkih iz medijev že v preteklosti uporabljena za prikrivanje ekstrakcije krvi za namen krvne transfuzije pri kolesarju [102]. Po poročanju medijev je bil v istem obdobju kot naš primer zaradi abnormalnih krvnih vrednosti v svojem biološkem potnem listu (nenormalno nizke vrednosti hemoglobina in hematokrita ob visokem % retikulocitov na dan 20. april 0002) suspendiran španski kolesar, ki je kot razlog abnormalnih vrednosti v aprilu 0002 navedel krvavitev zaradi hemoroidov [103]. Bolezen mora biti torej takšna, da bistveno ne vpliva na trening športnika (športnik je na zaslišanju priznal poslabšan a neprekinjen trening v

aprilu 0002). Popolna prekinitev treninga (zaradi poškodbe...) namreč pri vrhunskih športnikih vodi v padec VO_{2max} v višini 4 – 14 % v obdobju krajšem od štirih tednov, ob tem, da je bilo predlagano, da je upad večji pri bolj treniranih športnikih v primerjavi z manj treniranimi [104]. Kljub temu pa so določene študije poročale o ohranjanju VO_{2max} pri športnikih kljub prenehanju treniranja [104]. Te razlike je najverjetneje mogoče razložiti z razlikami v količini telesne aktivnosti, ki so jo ti športniki opravljali po prekinitvi treninga [104]. Kakorkoli že, pa bi samo za nadomestitev takšne izgube (če bi se zgodila) športnik glede na trenutne dokaze potreboval vsaj pol leta težkega treninga [91, 92, 105, 106]. Za izboljšanje predhodnega stanja (doseganje športne forme) pa še ustrezno več. Padec VO_{2max} po prekinitvi treninga razlagajo z zmanjšanjem volumna plazme in krvi (od 5 – 12 %), ki se lahko pojavi že po prvih dveh dneh neaktivnosti [104]. Zmanjšan volumen krvi vodi v zmanjšanje maksimalnega utripnega volumna srca, ki pa se takoj popravi do stanja blizu predhodnega v primeru da se volumen krvi umetno povrne [104]. Zmanjšanje maksimalnega utripnega volumna srca (za 10 – 17 % v 12. do 21. dneh prekinitve rednega treninga), kot posledica zmanjšane krvnega volumna (in posledično polnjenja srca), je dokazano odgovorno za zmanjšanje aerobne sposobnosti športnika v stanju akutno zmanjšane treniranosti [104]. Prav tako je znano, da se je vzdržljivostni nastop pri srednje treniranih moških in ženskah (VO_{2max} 46-69ml/min/kg) obnovil 20. dan po odvzemu 550 ml krvi [107]. V vmesnem času je bil poslabšan [107]. Ob znižanju vadbene obremenitve pa hitro pride tudi do morfoloških sprememb srca. Tako je bilo že po treh tednih drastičnega zmanjšanja vadbene obremenitve izmerjena zmanjšana masa levega ventrikla (za 19,5 %) in znižana debelina stene levega ventrikla (za 25 %) [104]. Uvrstitev na kratki etapni dirki 1 (začetek deveti dan po ugotovljeni nizki [Hb]) kaže na znižanje kondicije, a le majhno glede na pretekla leta. Poleg tega športnik z visoko uvrstitvijo na etapni dirki 1 (največji uspeh športnika do sedaj), dokazuje ne le visoko stopnjo športne forme, temveč tudi to, da mu izguba krvi v zadnjem mesecu pred etapno dirko 1 (znižane krvne vrednosti ugotovljene 20 dni pred začetkom tri tedenske etapne dirke) ni povzročila bistvene izgube treninga v pripravljalnem obdobju. To pomeni, da je športnik (kljub domnevni bolezni) tudi v aprilu 0002 ne le neprekinjeno treniral temveč tudi (uspešno) tekmoval. Če povzamemo:

Dokazi o krvavitvi v prebavila?

- ni objektivnih dokazov o krvavitvi v prebavila (po mnenju eksperta UCI noben izvid gastroskopije ne kaže akutnih hemoragičnih lezij, ni pozitivnega testa blata na kri, ni znakov pomanjkanja železa (npr. znižan feritin ali zmanjšan MCV));
- ni objektivnih dokazov o povezavi znižanih krvnih vrednosti s krvavitvijo v prebavila;
- subjektivno pričanje športnika, domačega zdravnika in zdravnika specialista (priča obrambe) povezuje znižane krvne vrednosti z boleznijo (krvavitev v prebavila).

Proti krvavitvi v prebavila govori:

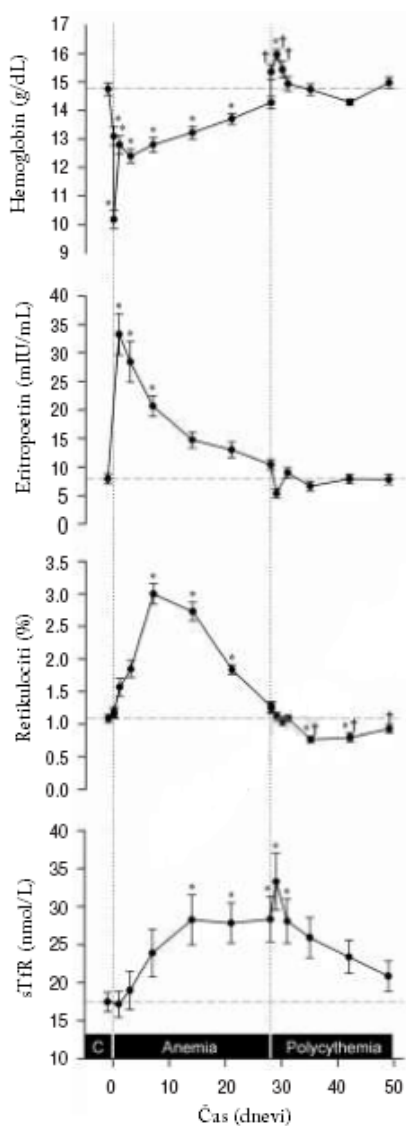
- izjemno dobra uvrstitev na etapni dirki 1, kar kaže na reden in učinkovit trening med pripravo na dirko;
- odsotnost spremembe krvnih vrednosti v pretekli sezoni, kljub domnevnim kroničnim težavam (bi se morale zelo verjetno demonstrirati z padcem krvnih vrednosti že v preteklosti);
- odsotnost obiska zdravnika v aprilu, maju in juniju v letu 0002*;
- izjemno hitra obnova krvi do etapne dirke 1*.

*Časovna shema poteka sezone je v prilogi.

9.8.5.2. Dokazi o reinfuziji krvi

Štiri tedne po odvzemu krvi, njena reinfuzija (800 ml) povzroči 13 % dvig koncentracije hemoglobina od tiste izmerjene pred ekstrakcijo [88]. Obenem se za 9 % izboljša VO_{2max} in za 23 % izboljša vzdržljivostni nastop [88]. Danes je najboljša indikacija na njeno uporabo sprememba hematoloških parametrov. Že 60 let je znano, da infuzija krvi rezultira v dvigu števila eritrocitov, koncentracije hemoglobina in hematokrita [96]. Leta 2006, ko postane očitno, da so vzdržljivostni športniki ponovno začeli z uporabo prepovedane metode krvne

transfuzije, so raziskovalci z namenom dokazovanja krvne transfuzije preko sprememb indirektnih krvnih kazalcev natančno preučili dnevne spremembe bioloških kazalcev pri mladih moških (N=10) med odvzemom 1300 mL krvi (~20 % njihove krvi) in vrnitvijo (800 mL) le te po štirih tednih [108]. Ugotovili so naslednje spremembe (Slika 39 in Tabela 17) [108]:



Hematološki kazalci po odvzemu krvi in reinfuziji.

Dnevi	Kontrola	Odvzem krvi						Reinfuzija					
	C	1	3	7	14	28	0	1	3	7	14	21	
Hb, g/dL	14.8±0.2	12.8±0.3*	12.4±0.2*	12.8±0.3*	13.2±0.2*	14.3±0.2	15.4±0.3*†	16.0±0.2*†	15.4±0.3*†	14.9±0.3	14.7±0.2	15.0±0.2	
Hct, %	42.9±0.6	36.3±0.9*	35.5±0.7*	36.9±0.7*	38.9±0.6*	41.9±0.5	45.4±0.8†	47.1±0.5*†	45.2±0.8†	44.0±0.5	43.4±0.5	43.6±0.6	
ret, %	1.1±0.1	1.6±0.1	1.9±0.1	3.0±0.2*	2.7±0.1*	1.3±0.1	1.3±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1†	0.8±0.1*†	0.8±0.1*†	0.9±0.1†	
s-EPO, mIU/mL	7.9±0.9	33.3±3.6*	28.5±3.6*	20.7±1.9*	14.8±1.4	10.5±0.9	NA	5.4±1.0	NA	9.0±0.9	6.6±0.9	7.8±0.9	
sTfR, nmol/L	17.5±1.3	17.2±1.7	19.0±2.5	23.9±3.1	28.3±3.3*	28.4±3.0*	NA	33.3±3.7*	NA	28.1±2.9*	25.9±2.6	20.9±2.0	
OFF-hr	85±3	53±5	43±5	24±4	33±4	75±3	87±4	96±3	87±3	95±3	90±2	92±3	

Vrednosti so sredine ± SNM za 10 moških subjektov. Hb, koncentracija hemoglobina; Hct, hematokrit, ret, retikulociti, s-EPO, serumski eritropoetin, sTfR, topni transferinski receptor, NA, not available (ni dostopno). *Značilno različno od kontrole (p pod 0,05).† Značilno drugačno od vrednosti pred infuzijo (p pod 0,05).

Slika 39 in Tabela 17:

Odvzem krvi je povzročil padec [Hb] za ~ 15 % v roku dveh tednov. % Retikulocitov se je po sedmih dneh povečal za 2,4 krat in ostal povečan še dodatnih sedem dni. Po vrnitvi krvi se je [Hb] akutno povečala za 8 % in se vrnila na izhodiščno vrednost v roku dveh dni. [s-EPO] je ostal nespremenjen, medtem ko se je % retikulocitov zmanjšal za 25-37 % od dneva 7 do 21. Najvišja OFF-hr vrednost je bila dosežena na drugi dan (126). Le en posameznik (od skupno desetih) je prešel mejo [Hg] 17 g/dL. Meritve sprememb [Hb] so prinesle predlog raziskovalcev, da variacije pri vrhunskih vzdržljivostnih športnikih v [Hg], ki med vzorci presegajo vrednost 15 % med predpostavljenim obdobjem odvzema (obdobje »anemije«) ali tik pred pomembnim tekmovanjem kaže na avtologno krvno transfuzijo. Pri športniku je opaženo znižanje vrednosti [Hb] za > 15 % v obdobju »anemije«. To je pri

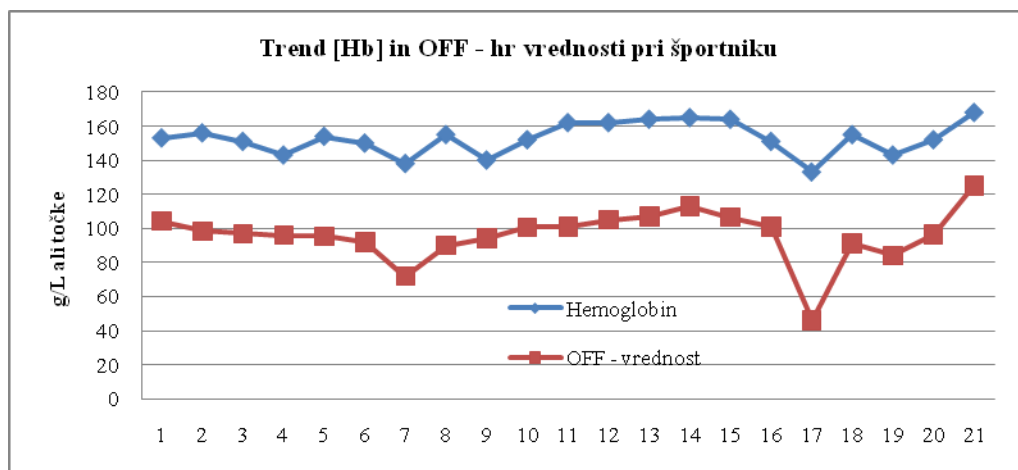
primerjavi [Hb] v obdobju jan-feb/april (brez upoštevanja korekcije zaradi vadbenih obremenitev). Tudi to je po mnenju Damsgaarda in sodelavcev pri elitnih vzdržljivostnih športnikih nedvoumen znak odvzema krvi z namenom avtologne krvne transfuzije [108]. V času “anemije” je pri športniku opazno tudi povečanje % retikulocitov (na vrednosti nad 2 % po študiji Damsgaard-a [108] ostajajo po tretjem dnevu po odvzemu in se ohranjajo tam še vsaj 14 dni od odvzema). Pri športniku je opazno hkratno močno povečanje [Hb] in OFF – hr vrednosti v času treh dni, tik pred začetkom etapne dirke. To je optimalni čas za prejem infuzije z namenom pozitivnega vpliva na športni nastop, obenem pa tudi idealen čas izvedbe nenapovedane doping kontrole da se odkrije športnika, ki želi zlorabiti prepovedano metodo krvne transfuzije. Pozneje z namenom, da se oblikujejo novi, bolj občutljivi indirektni kazalci avtologne krvne transfuzije zdravim, netreniranim moškim ponovno (zdaj postopno) odvzamejo tri enote krvi, ki jih shranijo za 4 ali 10 tednov, nato pa izvedejo reinfuzijo [96]. Ob tem so merili spremembe krvnih kazalcev. Ugotovili so, da pri zdravih prostovoljcih odvzem treh enot krvi (1350 ml) povzroči odklon OFF – hr vrednosti v območje 43,3 točke oz. 24 – 27 točk pod običajno vrednostjo. Lahko pa tudi nižje. Pri reinfuziji krvi se je ta vrednost povečala nad 100 točk ali višje (vrednost 125,6 je pri vsaj eni meritvi je preseglo le 25 % posameznikov, ki so prejeli infuzijo 4 oz. 10 tednov po odvzemu). Doseganje in spreminjanje OFF – hr vrednosti v taki dinamiki brez drastičnega odvzema in reinfuzije krvi (tri enote krvi oz. 3 x 450 ml = 1350 ml) pri zdravih prostovoljcih je torej neobičajno in se običajno ne bi moglo zgoditi (vrednosti kontrolne skupine so več ali manj konstantne). Pregled OFF – hr vrednosti športnika v obdobju dveh let razkrije dve takšni povsem neobičajni* vrednosti (*identificirani kot abnormalni po metodologiji biološkega potnega lista pri specifičnosti 99,9 %), ki jih pri nedopingiranem športniku ne bi smeli najti:

- vrednost 46,5 točke na dan 19.4.0002 (lahko kaže na odvzem treh enot krvi v roku zadnjih treh tednov);
- vrednost 125,2 na dan 29.8.0002 (lahko kaže na reinfuzijo treh enot krvi v zadnjih dveh tednih).

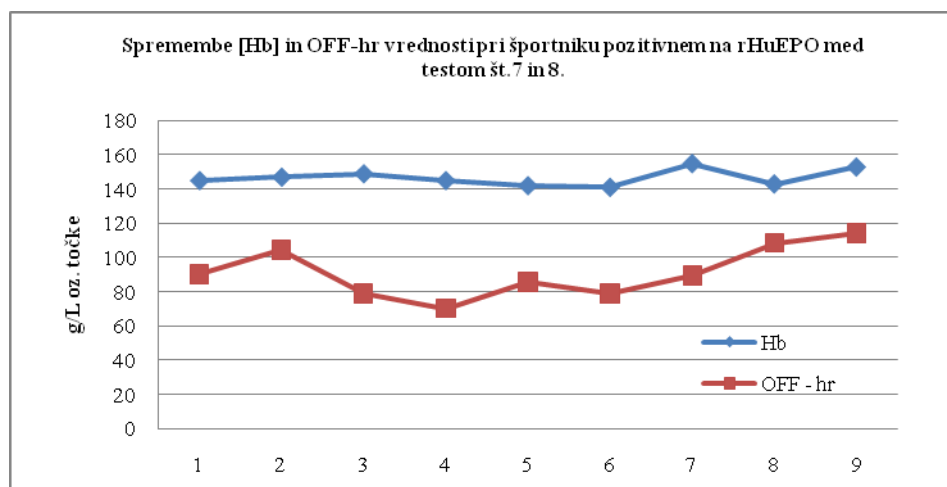
Prisotnost teh dveh izstopajočih vrednosti kaže na podobno dinamiko sprememb OFF – hr vrednosti kot pri eksperimentu odvzema in reinfuzije krvi pri zdravih prostovoljcih (obe

kontrolni skupini ne kažeta take dinamike sprememb v OFF – hr vrednosti). Ob tem je potrebno poudariti, da je preizkus občutljivosti metod biološkega potnega lista na avtologno krvno transfuzijo (ena do tri enote krvi) pokazal, da je biološki potni list ob meji specifičnosti 99,9 % iz spremljanja OFF – hr vrednosti uspešno identificiral le 18 % uporabnikov avtologne krvne transfuzije, a brez lažno pozitivnih rezultatov [81]. To pomeni, da so bili vsi rezultati, ki so presegali mejo specifičnosti 99,9 %, resnično pozitivni. Vendar so v omenjeni raziskavi uporabili nekoliko drugačne variance med in znotraj posameznika za hemoglobin (BS_VAR = 68,195, WS_VAR = 26,03) [81].

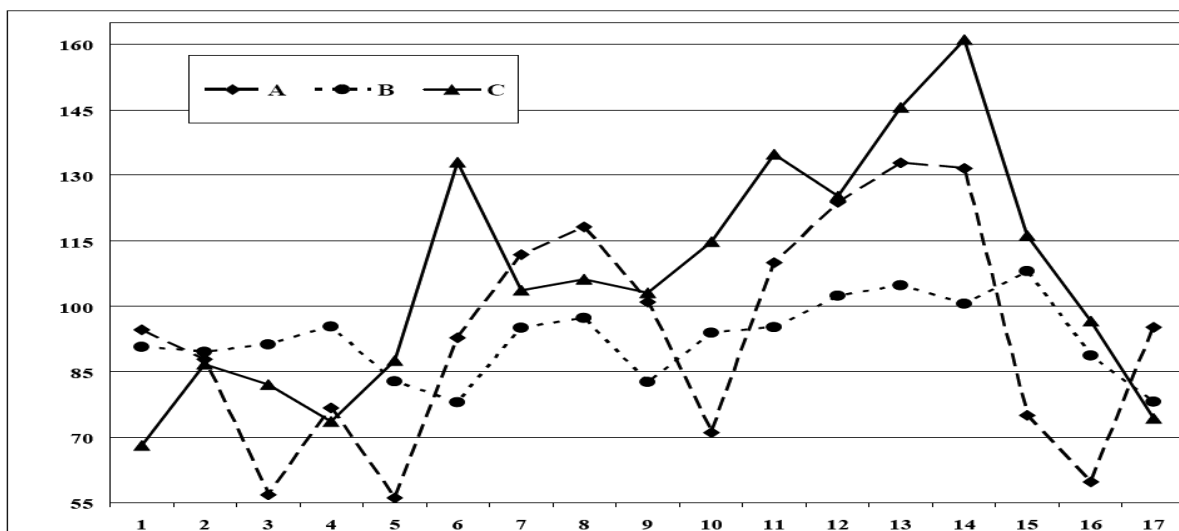
Graf 19: Trend sprememb [Hb] in OFF – hr vrednosti pri športniku.



Graf 20.: Primer sprememb indirektnih kazalcev pri moškem kolesarju pozitivnem na direktnim urinskem rHuEPO med vzorcem št.7 in 8. [57]. Ni vidnih nenadnih padcev OFF – hr vrednosti.



Graf 21.: Prikaz trenda sprememb OFF – hr vrednosti pri treh kolesarjih. Športnik A kaže visoko sumljivo variacije tega biokazalca (kontrola od 5 do 10 in od 10 do 16). To je vodilo v tarčno doping testiranje, ki je razkrilo krvni doping pri tem športniku. Športnik B kaže po mnenju strokovnjakov normalni profil, vključno z biološkimi spremembami, ki niso v skladu z krvnim dopingom. Športnik C ni bil nikoli pozitiven, vendar je bil pri eni od kontrol (številka 14) razglašen za ne pripravljen za tekmovanje (*no start*). Od takrat so njegove vrednosti padle v normalno območje [48].



9.8.5.3. Nenavadno hitra obnova krvi

Po mnenju ekspertne skupine UCI ni možno, da bi se športnikova krvna slika v le 18 dneh* izboljšala tako, kot se je, če bi dejansko šlo za krvavitev iz prebavil. Senata nacionalne antidoping komisije (NAK) prav tako ni prepričala navedba ekspertne skupine UCI, češ da je čudno, da bi športnik ob tako slabem zdravstvenem stanju, kot ga je navajal, lahko zgolj 18 dni kasneje nastopil na Etapni dirki 1, na katerem je dosegel zelo dobro uvrstitev. Športnik trdi, pridružuje pa se mu tudi mnenje zdravnika specialista, da je do krvavitve verjetno prišlo že pred 19. 4. 0002 in je bilo torej več časa za regeneracijo krvne slike. Poleg tega je senat NAK ugotovil, da ima športnik izjemne fiziološke sposobnosti, kar ga loči od povprečnega človeka. Senat NAK zato meni, da ni nemogoče, da ima športnik poleg izjemnih regeneracijskih sposobnosti v smislu fizične zmogljivosti, ki jih je potrdila tudi njegov pretekli trener in ki so mu omogočile dober rezultat na Etapni dirki 1 kljub predhodni bolezni, tudi sposobnost hitrejšega obnavljanja krvi kot povprečen človek.

*Časovna shema poteka sezone je v prilogi.

Raziskave ugotavljajo:

- Pri sedmih zdravih moških je štiri tedne po doniranju dveh enot krvi volumen rdečih krvničk obnovljen na 92 % izhodiščne vrednosti [109].
- Raziskava, ki je direktno merila skupno maso hemoglobina ob ponovnih odvzemih, poroča, da se skupna masa hemoglobina pri 91 posameznikih v povprečju ni v celoti obnovila še vsaj 56 dni po odvzemu 440 ml krvi [110].
- Raziskava na zmerno aktivnem moškem, ki je doniral 490 ml krvi kaže, da je obnova skupne mase hemoglobina pri njem trajala okoli 60 dni [111].
- Ko so zdravim, netreniranim moškim odvzeli 1,3 L krvi, je bila [Hg] značilno znižana še 14 dni po odvzemu [108]. Na podobno vrednost kot izhodiščna pa se je vrnila v roku 28 dni [108].
- Pri zdravih prostovoljcih, ki so jim naenkrat odvzeli dve enoti krvi, nato pa čez en teden še eno enoto krvi, ter jim kri nato shranili za štiri tedne (pri + 4° C), preden so jim jo vrnili v krvni obtok, se koncentracija hemoglobina v 28 dneh še ni vrnila do izhodiščnih vrednosti [96].

- Pri zdravih prostovoljcih, ki so jim odvzeli eno enoto krvi vsake 6-7 dni zapored (skupaj tri enote krvi v roku treh tednov), ter jim kri nato shranili za deset tednov (pri -80°C) preden so jim jo vrnil v krvni obtok, se je koncentracija hemoglobina na vrednost podobno izhodiščni (pred odvzemom) vrnila v roku okoli 35 - 40 dni [96].
- Meritve obnove skupne mase hemoglobina z novo metodo vdihovanja CO, pri devetih srednje treniranih moških in ženskah ($\text{VO}_{2\text{max}}$ 46-69ml/min/kg) po odvzemu 550 ml krvi (povprečna izguba hemoglobina $77,0 \pm 21,7$ g) se je popolnoma obnovila na 26. dan [107]. Z novo metodo merjenja skupne mase hemoglobina je bilo to izgubo mogoče zanesljivo izmeriti v roku dvanajstih dni. $\text{VO}_{2\text{max}}$ je bil znižal še deset dni po odvzemu, in se vrnil na stanje pred odvzemom na 20. dan [107]. V omenjenem času je bil vzdržljivostni nastop poslabšan [107].

Če povzamemo:

Vsi zgoraj navedeni podatki kažejo na enako opažanje – obnova eritrocitov in posledično krvnih kazalcev rdeče krvne slike je po odvzemu večje količine krvi pri zdravih mladih ljudeh počasna – traja okoli 4 tedne ali več. Športnik je bil v času obnove kazalcev rdeče krvne slike, po njegovih besedah bolan (krvavitev), obenem pa je še treniral in tekmoval. V tem času je kljub temu dosegel hitrejšo vrnitev kazalcev rdeče krvne slike kot so jo dosegli mladi zdravi ljudje, ki zraven niso izvajali treninga (kronično vnetja, pogost spremljevalec težkega vzdržljivostnega treninga in/ali tekmovanja, zavirajo eritropoezo na ravni matičnih celic v kostnem mozgu [112]). Lahko trdimo, da gre pri športniku za neobičajno hitro obnovo krvi. Čeprav gre v našem primeru za elitnega vrhunskega športnika, pa je glede na dostopne podatke, sicer pridobljene na zdravih mladih ljudeh, ne pa elitnih športnikih, malo verjetno, da bi ta športnik naravno doživel takšno izboljšanje krvne slike v tako kratkem časovnem obdobju ob rednem treningu/tekmovanju kot ga je ta športnik. Mogoče je predvidevati druge alternativne scenarije za neobičajno hitro obnovo krvi pri vrhunskem kolesarju, kot pa je nadnaravna sposobnost obnove krvi:

- reinfuzija določenega dela shranjene krvi nazaj že pred Etapno dirko 1 (tako zaradi priprav na dirko, kot tudi strahom pred novimi nenormalnimi vrednostmi v biološkem potnem listu, športniku vidnemu v ADAMS).

- uporaba kratko delujočih težko dokazljivih eritropoetinov (intravenozna aplikacija rHuEPO pri športnikih, ki imajo trikrat hitrejšo kinetiko izplavljanja (6,5 ml/h/kg) v primerjavi z nešportniki, ni več dokazljiva po 2-3 urah po aplikaciji [20]).
- uporaba kombinacije reinfuzije in uporabe rHuEPO – omenjeno v doping aferi operacije Puerto [80], doping primeru Kohl [86] in doping primeru Landis [113].
- manipulacija volumna krvi z uporabo shranjenih albuminov – osmotsko aktivnih delcev – uporaba omenjena v doping primeru Kohl [86].
- drugo.

9.8.5.4. Vrednosti retikulocitov

Katerakoli stimulacija ali inhibicija eritropoeze se pokaže kot sprememba v dinamiki eritropoeze in posledično v deležu retikulocitov [114]. Najzgodnejši hematološki znak močne stimulacije kostnega mozga je sprememba deleža retikulocitov [76]. Na pomembnost retikulocitov s stališča boja proti dopingu kaže ugotovitev, da se referenčni interval retikulocitov med športniki in splošno populacijo ne razlikuje [76]. Kljub podobnosti referenčnih intervalov med športniki in ne-športniki pa retikulocitne abnormalnosti niso ustrezen dokaz dopinga pri športnikih, saj na število retikulocitov lahko vplivajo različne patologije, kot tudi doping [76]. Zato so po mnenju strokovnjakov potrebne še dodatne študije, ki bodo določile tudi vpliv treninga in tekmovanj na število retikulocitov [76]. Podatkov je malo, do kontroverznih situacij pa lahko po mnenju strokovnjakov pride tudi v primeru uporabe višinskega treninga [76]. Zato je nujno potrebno določiti definicijo variabilnosti retikulocitov [76]. Ko so pred analizi pogoji standardizirani in rezultati meritev točni in zanesljivi, se zdi smiselno uporabiti vzorec retikulocitov kot indikator mogoče manipulacije z maso rdečih krvničk, celo takrat ko koncentracija hemoglobina ne daje zanesljive slike (dokazano je, da se lahko koncentracijo hemoglobina umetno zniža za okoli 6 % v dolžini 75 minut po tekmovanju z zaužitjem 1 L slane vode [100]) [114]. Ker delež retikulocitov ni odvisen od volumskih sprememb, le ta odraža spremembe v eritropoezi [114]. Pri doniranju krvi pride do modifikacije retikulocitov. Tako raziskava doniranja 450 ml krvi pri 21 –ih prostovoljcih, merjenih drugi, četrty in druge dni po donaciji, zazna povišanje retikulocitov že drugi dan po donaciji [115]. Najvišjo koncentracijo pa doseže 9 dan po donaciji, z največjim povečanjem za 178 % merjeno z Bayer Advia 120®. Čas za značilno spremembo v

retikulocitih je bil ocenjen na en dan [115]. Ko so 28 darovalcem odvzeli kri (450 mL), nato pa jih razdelili v dve skupini (eno so tretirali z rEPO, eno pa ne – placebo), so se hipokromni retikulociti povečali od dneva 1 do dneva 4 po donaciji krvi v obeh skupinah. Razlika je bila v tem, da je v skupini tretirani z rEPO prišlo do značilno večjega povečanja retikulocitov (+232 % na 11 dan, nasproti 158 %) v primerjavi z placebo skupino [115]. Meritve dinamike sprememb % retikulocitov pri moških prostovoljcih, z namenom ocenjevanja sprememb zaradi avtologne krvne transfuzije (odvzem krvi za 4 do 10 tednov, nato reinfuzija) so

pokazale, da je pri skupini kjer so odvzeli tri enote krvi (skupaj 1350 ml), vsako z 6 do 7 dni razmika, največji delež retikulocitov (2,2 %) dosežen tri tedne po odvzemu prve enote krvi [96]. Pri skupini, kjer so odvzeli najprej dve enoti krvi, nato pa čez en teden še eno enoto krvi, je delež retikulocitov dosegel največje vrednosti (2,6 %) osem dni po odvzemu prvih dveh enot krvi [96]. V obeh skupinah je preseganje meje 2 % retikulocitov trajalo vsaj en teden, ob tem da so vsi posamezniki presegli to mejo vsaj pri eni meritvi [96]. Študija avtologne krvne transfuzije Damsgaard-a in sodelavcev pa je pokazala, da je odvzem 1300 mL krvi povzročil povečanje % retikulocitov za 2,4 krat v sedmih dneh, ki so ostali povečani še dodatnih sedem dni [108]. Na vrednost višji od 2 % so prišli po tretjem dnevu in nad to vrednostjo vztrajali še 14 dni po odvzemu, nato so se znižali [108]. Po reinfuziji krvi pride do padca v deležu retikulocitov. Vrnitev treh enot krvi naenkrat je povzročilo padanje deleža retikulocitov, ki so dosegli najnižje vrednosti ena do dva tedna po reinfuziji (povprečje 0,6 %) [96]. Po vnitvi 800 mL krvi se je % retikulocitov zmanjšal za 25-37 % od dneva 7 do 21 [108]. Najvišja OFF-hr vrednost (126) je bila dosežena na drugi dan [108].

Datum	%RET	%RET*
21/03/0001	0.66	0.66
19/04/0001	0.92	0.92
24/04/0001	0.81	0.81
05/05/0001	0.61	0.61
05/08/0001	0.95	0.95
20/05/0001	0.93	0.93
06/12/0001	1.21	1.21
07/03/0001	1.17	1.17
15/07/0001	0.58	0.58
27/08/0001	0.73	0.73
26/09/0001	1.04	1.04
30/11/0001	0.9	0.9
13/12/0001	0.9	0.9
15/01/0002	0.75	0.75
02/11/0002	0.92	0.92
03/11/0002	0.7	0.7
19/04/0002	2.1	
05/07/0002	1.13	1.13
31/05/0002	0.96	0.96
27/08/0002	0.86	0.86
29/08/0002	0.51	
Povprečje	0.92	0.88
SD	0.33	0.18
Varianca	0.11	0.03
Max	2.1	1.21
Min	0.51	0.58

Tabela 18.: Vrednosti meritev % retikulocitov pri športniku. Spodaj navedene izračunane vrednosti povprečja, standardnega odklona in variance. Desni stolpec (*) prikazuje izračun teh vrednosti brez upoštevanja dveh najbolj izstopajočih vrednosti.

Maksimalna vrednost (2,1 %) v obdobju dveh let je pri športniku izmerjena na dan 19.4.0002 (Tabela 18). To je 228-239 % nad povprečjem tega športnika oz. 300 % nad zadnjo predhodno meritvijo. Dvig deleža retikulocitov v podobnem območju (>2 %) je bil večkrat opisan v primeru odvzema krvi z namenom avtologne krvne transfuzije [96, 108]. Ta vrednost kaže na to, da je pri športniku lahko prišlo do krvavitve v velikosti dveh ali treh enot krvi v roku enega do treh tednov pred meritvijo na dan 19. April 0002. Torej v začetku aprila 0002. Krvavitev v začetku aprila potrjuje tudi sam športnik (pričanje in pisni zagovor), kot zdravnik specialist (priča obrambe). Najnižja vrednost 0,51 % je pri športniku izmerjena na dan 29.8.0002 (Tabela 18). Le ta je nižja od povprečja tega športnika (0,92 oz. 0,88 %) za 55 oz. 58 %. Povprečje % retikulocitov tega športnika je znotraj območja gibanja povprečja % retikulocitov elitnih kolesarjev med tekmovalno sezono (0,8 – 1,1 %) [98]. Pri športniku je viden padec % retikulocitov za 40 % od pretekle vrednosti (oz. za 55-58 % od povprečja) v roku dveh dni (iz 27 na 29.8.0002) ob hkratnem dvigu hemoglobina (+10,5 %). Nenavaden dvig OFF – hr vrednosti* (*abnormalen po metodologiji biološkega potnega lista pri specifičnosti 99,9 %) govori v prid reinfuzije krvi (dvig hemoglobina in znižanje deleža retikulocitov). Ker se to zgodi na dan pomembne tritedenske etapne dirke, to lahko kaže na uporabo avtologne krvne transfuzije z namenom pozitivnega vpliva na športni nastop.

Ugotovimo lahko:

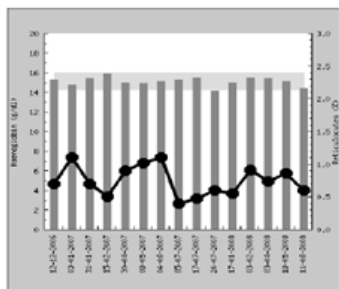
Športnikovi podatki v letu 0002 so po metodologiji BPL različni od podatkov športnika iz leta 0001. V letu 0002 so prisotna abnormalna odstopanja določenih biokazalcev. Spremembe različnih biokazalcev (obravnavanih ločeno ali skupaj) močno govorijo v smer uporabe avtologne krvne transfuzije pri športniku. Upoštevanje argumentov obrambe ne more vzbuditi dovolj velikega dvoma v ugotovljene večkratne spremembe različnih (tudi med seboj neodvisnih) biokazalcev, ki z veliko gotovostjo sledijo smerem opisanih pri uporabi avtologne krvne transfuzije. Zato hipotezo 5 zavrnemo. Hipoteze 3b ne zavrnemo.

9.8.6. Argumentacija hipoteze 2 (uporaba rHuEPO)

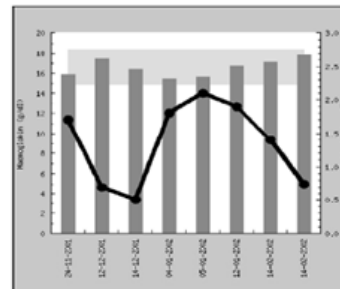
Značilen dvig retikulocitov je viden dva dni po začetku terapije z velikimi dozami rEPO (200 U/kg) [116]. Število retikulocitov, ki so bili sicer šteti ročno, je ostalo povišano do dvanajstega dne od začetka terapije, ter se spustilo na nivo pred terapijo v 24 dneh, ko so bili nižji v tretiranih osebah, kot v kontrolni skupini [116]. Po 24 dneh, v skladu z življenjskim obdobjem rdečih krvničk, se je povečala koncentracija hemoglobina in hematokrita, medtem ko so bili retikulociti nizki [116]. V študiji načrtovani za modeliranje farmakokinetike eritropoetina pri športnikih, so se retikulociti povečali na tretji dan po subkutani terapiji rEPO ob običajni dozi (50 U/kg) [117]. Kakorkoli že, pa dopingiranje z rHuEPO ne vodi nujno v povečano število retikulocitov, saj najnovejši podatki kažejo, da je povečanje retikulocitov med podaljšano terapijo z nizkimi dozami rEPO le prehodno in ni več odkrivljivo po nekaj tednih terapije [118]. Med ali po uporabi zdravila, ki vpliva na eritropoezo, se bo torej povečalo število in delež retikulocitov, medtem ko se bo po prenehanju uporabe število in delež retikulocitov strmo zmanjšalo, ter tako izzvalo nazobčan vzorec deleža retikulocitov, ki lahko preidejo normalne

zgornje ali spodnje meje 0.4 – 2.4 % retikulocitov (Slika 40)[114]. V tipičnih primerih bo oster padec retikulocitov po prenehanju uporabe EPO in dvig koncentracije hemoglobina rezultiral v dvigu OFF vrednosti, ki kombinira oba parametra [114].

CSC kolesar - normalne variacije retikulocitov Športnik (ni kolesar) - pozitiven na rHuEPO



Krvni profil z koncentracijo hemoglobina (sivi stolpci) in % retikulocitov (črna krivulja). Kolesar je v prikazanem časovnem intervalu opravil tudi 8 nenapovedanih testov na rHuEPO in steroide, pozneje pa so bile opravljene še dodatne preiskave preteklih krvnih vzorcev na homologo krvno transfuzijo - vsi rezultati so bili negativni.



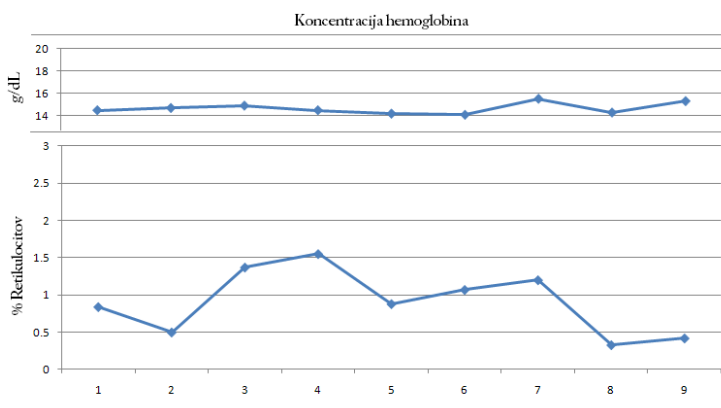
Krvni profil z značilnim vzorcem % retikulocitov v obliki "vala" pri športniku (črna krivulja), ki je bil pozitiven na direktni test rHuEPO v februarju 2002. Reticulociti kažejo velike spremembe z hkratnim posledičnim povečanjem koncentracije hemoglobina (sivi stolpci).

Slika 40: Prikaz normalne variacije % retikulocitov pri nedopingiranem kolesarju kolesarskega moštva CSC v obdobju dveh let (12.2.2006 – 11.6.2008) (levo) [119]. Na desni sliki prikaz sprememb % retikulocitov pri športniku (tekač na smučeh), ki je bil pozitiven na

rHuEPO na direktnem testu februarja 2002 (prikazano obdobje 24.11.2001 – 14.2.2002) [119].

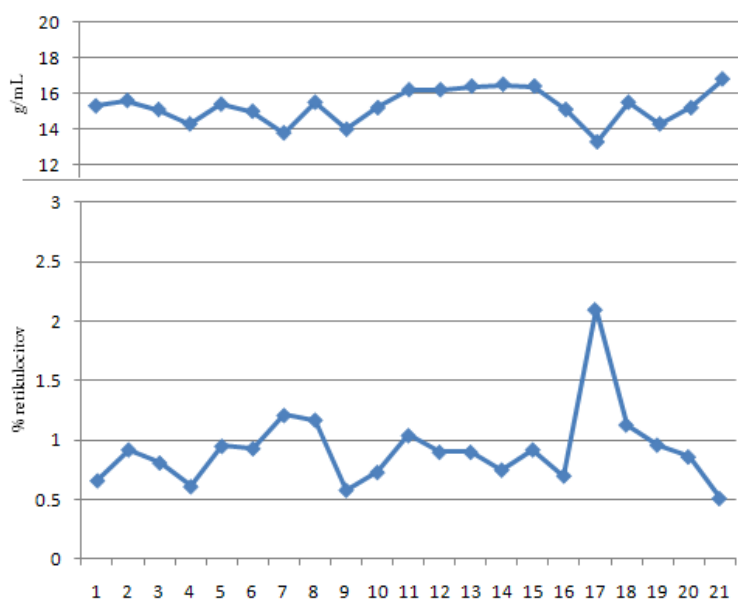
Porazdelitev rezultatov deleža retikulocitov pri 11.600 vzorcev drsalcev (od 1652 drsalcev; 680 žensk, 972 moških) kaže, da je 11 vzorcev imelo delež retikulocitov pod 0,4 % (kar pomeni 1 promil vseh vzorcev) [114]. Le en drsalec je pokazal nižjo vrednost pri dveh zaporednih meritvah, medtem ko je bila pri ostalih devetih drsalcih ta vrednost izmerjena le enkrat. 271 vzorcev (od 116 drsalcev) je presegalo vrednost 2,4 % retikulocitov (2,3 % vseh vzorcev) [114]. Le pri 52 -ih drsalcih je bil delež retikulocitov nad 2,4 % izmerjen pri vsaj dveh zaporednih odvzemih [114]. Od teh sta imela dva sistematično dvignjen delež retikulocitov, medtem ko je ostalih 50 drsalcev to vrednost doseglo le občasno 2 do 3 x, medtem ko so bile ostale vrednosti v območju normale [114]. Po mnenju Banfija, se lahko serija meritev deleža retikulocitov izven normalnih vrednosti, ob tem da ima posameznik normalne vrednosti v drugih obdobjih, ima za abnormalno in je lahko povezano z uporabo zdravil za spodbujanje eritropoeze [76].

Graf 22.: Primer sprememb indirektnih kazalcev pri moškem kolesarju pozitivnem na direktnim urinskem rHuEPO testom med krvnima testoma št. 7 in 8 [57].



Zdi se, da meritve odvzetih krvnih vzorcev pri športniku ne prikazuje značilnega vzorca "vala" (Slika 40), vendar je potrebno omeniti, da vzorci niso odvzeti enakomerno. Manko meritev v kritičnih obdobjih otežuje primerjavo. Tako graf športnika pozitivnega na rHuEPO (Graf 22) ne kaže oblike »vala«, temveč odklona krivulj navzgor ([Hb]) in navzdol (% retikulocitov, upad pod 0,5 %) [57]. Pri športniku je podoben trend opazen v avgustu (sočasen dvig [Hb] in padec retikulocitov (na najnižjo vrednost v zadnjih 18 mesecih)). Ker te spremembe pri športniku niso prisotne dva dni prej, ob tem da dvig [Hb] ob uporabi rHuEPO ne moremo pričakovati tako hitro, to bolj govori v prid reinfuziji krvi v obdobju dveh dni.

Graf 23: Meritve koncentracije hemoglobina (zgoraj) in % retikulocitov pri športniku (spodaj).



Primerjava trenda vrednosti % retikulocitov z drugimi primerljivimi vrhunskimi športniki (vsi udeleženci etapne dirke 1, vsi uvrstitev med petnajsterico – priloga 6), pokaže da le naš športnik prikazuje močno izstopajočo vrednost retikulocitov nad 2 %. Pri športniku je maksimalna vrednost retikulocitov v obdobju dveh let (2,1 %) izmerjena na dan 19.4.0002. To je 228-239 % nad povprečjem tega športnika oz. 300 % nad zadnjo predhodno meritvijo. Razlika od povprečja je v rangi, ki je lahko pripisana uporabi rHuEPO po odvzemu krvi, čeprav so bile podobne vrednosti izmerjene tudi le po odvzemu večje količine krvi (1300 mL) pri zdravih prostovoljcih. Najnižja vrednost deleža retikulocitov (0,51 %) je pri športniku izmerjena na dan 29.8.0002 in nastopa skupaj z najvišjo [Hb] in posledično najvišjo OFF – hr vrednostjo. Tudi to lahko govori v prid zlorabe rHuEPO (manj verjetno) ali reinfuzije krvi (bolj verjetno), kljub temu da športnik ob tem nikoli ni bil pozitiven na uporabo rHuEPO (podatki o opravljenih rHuEPO testih niso znani).

Ugotovimo lahko:

Ker so pri meritvah krvnih vzorcev prisotne variacije, ki jih pri nedopingiranem športniku ne moremo pričakovati, ob tem da je v opazovanem obdobju viden tako velik padec kot velik dvig koncentracije hemoglobina, kot tudi deleža retikulocitov, lahko trdimo da ta športnik prikazuje večjo verjetnost zlorabe avtologne krvne transfuzije kot zlorabe rHuEPO. Kljub temu pa zlorabe rHuEPO na podlagi dostopnih podatkov ne moremo izključiti. Na podlagi navedenih ugotovitev hipoteze 2 ne zavrnemo.

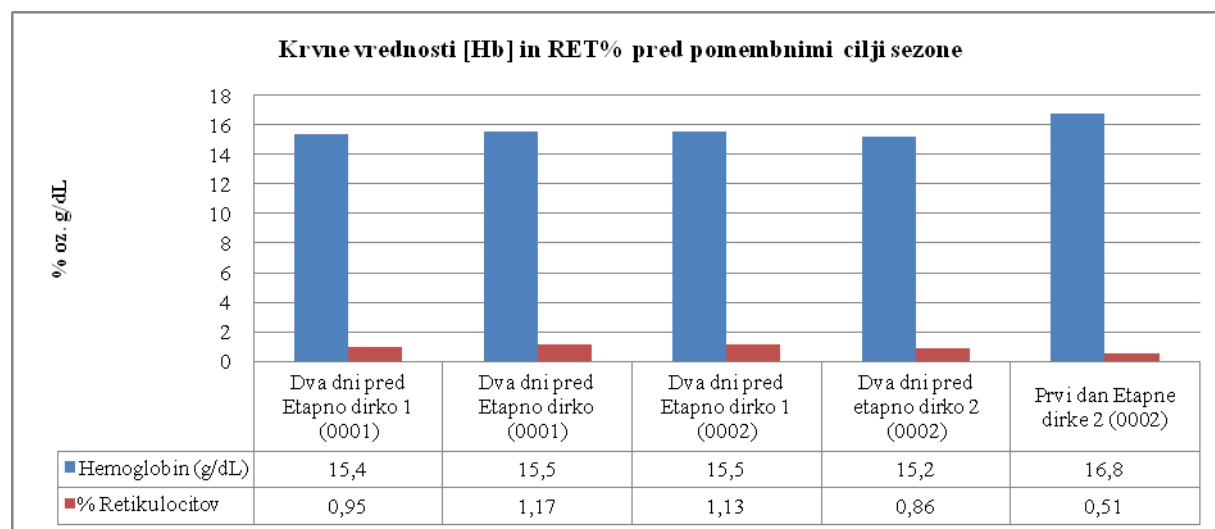
9.8.7. Argumentacija hipoteze 4 (uporaba višinskega treninga in hipoksičnih naprav)

Med trenerji, športniki in znanstveniki velja prepričanje, da višinski trening lahko izboljša vzdržljivostni nastop na nizki nadmorski višini. Danes številne študije, ki vključujejo kontrolne skupine dokazujejo da protokol: živeti visoko - trenirati nizko, izboljšuje športni nastop na nizki nadmorski višini za ~ 1.0 % pri nastopih, ki trajajo od 45 sekund do 17 minut [120]. Prevladujoča paradigma adaptacije na hipoksijo je ta, da nizek parcialni tlak kisika povezan z višjo nadmorsko višino, povzroči večjo produkcijo hormona EPO nastajajočega primarno v ledvicah. Le ta povzroči povečanje produkcije rdečih krvničk v kostnem mozgu ter poveča maksimalno porabo kisika (VO_{2max}) in s tem izboljša športni nastop. Mejna višina, ki povzroči stabilno povečanje krvne koncentracije EPO je ~ 2200 m [121]. Med neprekinjenim izpostavljanjem višini serumska koncentracija EPO doseže vrh v obdobju 24 – 48 h, nato pa se v približno enem tednu zniža do normalne koncentracije (~ 10 IU/L) [121]. Razpolovni čas serumskega EPO je ocenjen na 5,5 h, zato je pri protokolu: živi visoko - treniraj nizko, pomemben čas bivanja na višini saj krajše izpostavljanje višini ne dosega želenega učinka s stališča povečane produkcije EPO. Številni eksperimenti so pokazali, da bivanje na višini 8-9 h/dan ne povzroči merljivega dviga serumske koncentracije EPO [121]. Prav tako so številni eksperimenti (tudi dvojno slepi), potrdili, da s prekinjajočo izjemno močno hipoksijo (5 minut na 5000 m, ki ji sledi 5 minut normoksije, 1 h/dan, 4 tedne zapored ali pa 3h/dnevno na 4000 – 5500 m, dvajset zaporednih dni) ni mogoče doseči povečanja števila rdečih krvnih celic pri visoko treniranih športnikih, kljub velikemu povečanju izločanja telesu lastnega EPO [121].

Športnik glede krvne slike 27. 8. 0002 navaja, da je pred tem bival v pogojih pomanjkanja kisika (bivanje na višini 1300 m in v hipoksični sobi na simulirani višini od 2800 do 3200 m). Iz zdravniškega potrdila izhaja, da je športnik 25. 8. 0002 zaradi pika insekta (ose) prejel terapijo, in sicer kortikosteroid metilprednizolon v odmerku 80 mg (intravenozna aplikacija), z navodilom lečечеlega zdravnika, naj v naslednjih 24 urah uživa kar največ mogoče tekočine. Iz mnenja in pričanja zdravnika specialista izhaja, da metilprednizolon zadržuje tekočino v človekovem telesu, kar je bil poleg pitja večjih količin tekočine po njegovem mnenju razlog za hemodilucijo in s tem nizko vrednost Hb kljub daljšemu bivanju v višinskih pogojih na dan 27.8.0002. Glede krvne slike 29. 8. 0002 pa je športnik navajal, da je visoka vrednost hemoglobina (Hb) posledica bivanja v že omenjenih pogojih pomanjkanja kisika, pri čemer je

v dveh dneh izzvenel učinek hemodilucije. Zdravnik specialist je v svojem mnenju zapisal, da bi bila vrednost Hb 27. 8. 0002 brez pika ose zelo verjetno enaka vrednosti z dne 29. 8. 0002. Pri tem je zdravnik specialist v mnenju pojasnil, da je normalno, da delež retikulocitov pade, ko športnik ne biva več v pogojih pomanjkanja kisika, ter tako v celoti potrdi navedbe športnika v zvezi s temi meritvami. Po mnenju ekspertne skupine UCI bi moral športnik v primeru potencialnega anafilaktičnega napada zaradi alergije po trenutnih zdravstvenih smernicah prejeti injekcijo glukokortikoidov, ne pa kortikosteroida. Če že, pa se v primeru anafilaktične reakcije uporabi 250 – 500 mg metilprednizolona, kar je značilno več kot 80 mg, ki jih je prejel športnik. Nazadnje menijo, da ima metilprednizolon le minimalni mineralkortikoidni učinek. Prav tako izločitev meritve z dne 27.8.0002 iz športnikovega biološkega profila nima učinka na abnormalnost rezultata z dne 29.8.0002. Zato menijo da razlaga športnika ne zadošča.

Graf 24: Podatki krvnih preiskav opravljenih dva dni pred glavnimi cilji sezone kažejo visoke in podobne vrednosti [Hb] v sezoni 0001 in 0002. Izjema je meritev na prvi dan Etapne dirke 2 v letu 0002.



Meritev koncentracije hemoglobina na dan 27.8.0002 je pri tem športniku skladna z meritvami koncentracije hemoglobina dva dni pred pomembnimi tekmami v sezoni 0001 in 0002 (Graf 24). Izjema je meritev na prvi dan Etapne dirke 2 na dan 29.8.0002.

Meritev na dan 29.8.0002 pokaže najvišje izmerjene vrednosti hemoglobina od vseh v zadnjih dveh sezonah ob hkratni najnižji vrednosti % retikulocitov od vseh dosedanjih meritev. Ker so krvne vrednosti izmerjene dva dni prej skladne z preteklimi meritvami pred pomembnimi dirkami, je povišanje hemoglobina in znižanje % retikulocitov v roku dveh dni neobičajno. Spremembe gredo v smer pozitivnega vpliva na rezultat - višji hemoglobin (hematokrit točno do dovoljene vrednosti 50 %) in najnižji % retikulocitov od vseh meritev v zadnjih dveh letih pa govori v prid uporabe prepovedane metode krvne transfuzije. To kaže tudi visoka vrednost kazalca, ki kombinira oba parametra. OFF – hr vrednost (125.2 na dan 29.8.0002) je najvišja od vseh v zadnjih dveh sezonah (Tabela 9) in po metodologiji biološkega potnega lista (specifičnost 99,9 %) je abnormalna. Izjemno visoka vrednost hemoglobina, ki dokazano izboljšuje vzdržljivostni nastop, izmerjene v dopoldanskem času (9:50), tik pred začetkom prve etape etapne dirke 2 (l. 0002), govori o tem, da najverjetneje ne gre za naključje. Kakorkoli že, pa vpliv višinskega treninga na delež retikulocitov po protokolu: živeti visoko - trenirati nizko zaradi uporabe različnih vadbenih obremenitev, višin, časa izpostavljanja hipoksiji in treniranosti športnikov v različnih študijah, trenutno še ni jasen [76]. Potrjeno pa je bilo, da bivanje na srednji višini (1425 m) povečuje delež retikulocitov v primerjavi z bivanjem na normalni višini (< 750 m). Za 0,24 % pri moških in za 0,27 % pri ženskah [114]. Pozitivno a manjšo korekcijo napovedne sredine z povečevanjem nadmorske višine za % retikulocitov določa tudi tehnični dokument biološkega potnega lista (pri moških: za 1000 – 1500 m.n.v. (+0,02 %), 1500 – 2000 (+0,03 %), 2000-2500 (+ 0,05 %), 2500-3000 (+ 0,07 %), nad 3000 (+ 0,08 %)) [72]. Meritev % retikulocitov na dan 27.8.0002, tretji dan po vrnitvi z višine (3200 m, 11 dni, čas bivanja na višini v enem dnevu ni znan) je 0,86 %. Povprečje vseh meritev % retikulocitov pri tem športniku do takrat je 0,95 % (oz. 0,88 % če izključimo vrednost na dan 19.4.0002). V obeh primerih je vrednost na dan 27.8.0002 nižja od predhodnega povprečja, kot tudi meritev pet dni po vrnitvi z višine na dan 29.8.0002. Znižanje % retikulocitov po vrnitvi z višine, zaradi odsotnosti hipoksije je mogoče, kar meritve v nekaterih študijah podpirajo, v drugih pa ne (nespremenjeno stanje) [122]. Leta 2009 objavijo študijo pri kateri so prvič izmerili spremembe v skupni masi hemoglobina pri treniranih kolesarjih (22 let, $VO_{2max} = 4.6$ L/min oz. 62.2 mL/kg/min), ki je bila dosežena z izvajanjem višinskega treninga po protokolu: živi visoko – treniraj nizko (ang. LHTL) na višini 14 h/dan na višini 3000 m tri tedne zapored, ob tem pa so izvajali vzdržljivostni trening (380 – 780

prevoženih kilometrov/teden) [121]. Čeprav niso merili sprememb % retikulocitov, pa so ugotovili, da se je po prvem in drugem dnevu bivanja na višini serumska koncentracija endogenega EPO v povprečju povečala za 46 in 54 % nad nivo dosežen na normalni nadmorski višini. Nato se je naslednjih 19 dni serumska koncentracija EPO počasi zmanjševala, ter takoj po prenehanju bivanja na višini strmo padla pod nivo dosežen pred izpostavljanjem višini (- 26 % dva dneva po tritedenski dobi na višini), ter se nato v roku enega tedna vrnila na stanje pred bivanjem na višini. Znižanje % retikulocitov takoj po vrnitvi z višine je mogoče, vzrok je lahko začasno znižana koncentracija endogenega EPO. Čeprav je potrjeno, da izpostavljanje enaki višini vodi do individualno pogojenih sprememb koncentracije EPO pri različnih športnikih [123], pa lahko predpostavimo, da bi bil ta trening za športnika učinkovit (ob bivanju na višini minimalno 12 h/dan) in bi teoretično izzval povišanje skupne mase hemoglobina za okoli 2 %, ter izboljšal športni nastop (pet kolesarjev, ki so bivali na višini 3000 m, 18h/dan, 11 dni zapored, so peti dan po vrnitvi z višine izboljšali čas 40 km kronometra za 4 % glede na čas dosežen pred izpostavljanjem višini [124]). Obenem pa bi povzročil tudi verjeten padec produkcije EPO po vrnitvi z višine. Kakšen bi bil ta padec, ni mogoče oceniti, prav tako na podlagi trenutnih raziskav ni mogoče oceniti vpliva na retikulocite pri meritvah blizu vrnitve z višine. Kakorkoli že, pa je delež retikulocitov tretji dan po vrnitvi z višine blizu povprečne vrednosti za tega športnika. Ker so spremembe v deležu retikulocitov ob odvzemu krvi ali terapiji z rEPO merljive že v roku enega dne [76], bi se vpliv vrnitve z višine najverjetneje že moral pokazati tretji dan po vrnitvi z višine. Ali bi zato lahko peti dan po prihodu z višine pričakovali zmanjšanje deleža retikulocitov je stvar špekulacije. A bolj verjetno ne. Ne glede na neznan vpliv vrnitve z višine na delež retikulocitov, pa je nedvoumno dokazano, da ob reinfuziji krvi pride do počasnega padca v deležu retikulocitov do podobnih vrednosti kot pri športniku na dan 29.8.0002 [108, 96]. Primerjava sprememb vrednosti retikulocitov med tekmovalno sezono pri primerljivih dveh vrhunskih športnikih, ki sta izvajala višinski trening (Priloga 6), pokaže, da vrednosti retikulocitov pri enem od njih v bližini in med etapno dirko večkrat zaporedoma dosežejo vrednost 0,5 %. Ker so te vrednosti močno različne od vrednosti % retikulocitov pri tem športniku izven sezone, je to po mnenju enega najvidnejših strokovnjakov za dokazovanje avtologne krvne transfuzije eden od dokazov uporabe avtologne krvne transfuzije pri

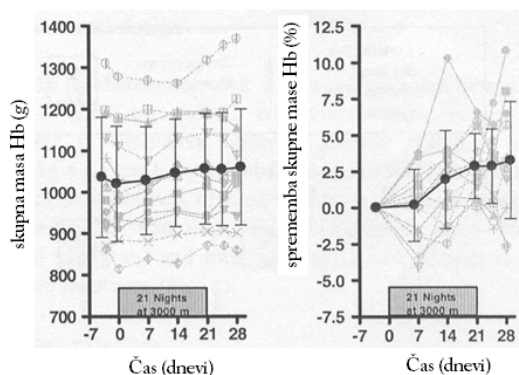
športniku (Priloga 6). Krvna koncentracija hemoglobina ([Hb]) se lahko enostavno manipulira z npr. z že omenjenim povečanim vnosom (slane) vode [99, 100].

Tabela 19:

Datum	Hemoglobin (g/L)	Hematokrit (%)	% Retikulocitov
27/08/0002	152	45.2	0.86
29/08/0002	168	50	0.51
Razlika	16 g/L ali + 10,5 %	4,8 % ali + 10,6 %	0,35 ali - 40,7 %

Ugotovimo lahko da se koncentracija hemoglobina pri športniku razlikuje za 10,5 % (Tabela 19). Če bi želel športnik vrednosti koncentracije hemoglobina z dne 29.8.0002 teoretično znižati do vrednosti izmerjene na dan 27.8.0002 bi moral, glede na dostopno gradivo [99, 100], zaužiti okoli 5 L vode ali nekoliko manj slane vode (vsaj 1,75 L). Ker ni verjetno, da bi bil v času tik pred začetkom tritedenske etapne dirke (zjutraj na dan 29.8.0002) dehidriran, to kaže na izjemno nenavadno velikost razlike vrednosti hemoglobina med dvema meritvama. Ker lahko sklepamo, da bi bil zaradi domnevnega mineralkortikoidnega učinka metilprednizolona in še dodatnega uživanja tekočin na dan 27.8.0002 ustrezno hidriran oz. prehidriran, ni jasno, kako bi lahko prišlo do takšnega povečanja koncentracije hemoglobina v roku dveh dni. V primeru, da bi izgubil vso presežno količino vode in ob predpostavki, da na dan tekme ni dehidriran (podobna razlika v [Hb] in hematokritu med meritvama izključuje volumnske razlike), bi torej moral z enajstdnevnim višinskim treningom doseči dvig koncentracije hemoglobina za najmanj 10,5 %, ki bi morala biti pripisana izključno povečanju skupne mase hemoglobina. Na dvanajstih kolesarjih (22 let, $VO_{2max} = 4.6$ L/min oz. 62.2 mL/kg/min), ki so bivali na višini 14 h/dan na višini 3000 m tri tedne zapored, ob tem pa izvajali vzdržljivostni trening (380 – 780 prevoženih kilometrov/teden) so izmerili povprečno povečanje skupne mase hemoglobina za 3.3 % [121]. Skupna masa hemoglobina se je povečevala s hitrostjo 1 % / teden, kar se je ohranilo še tudi en teden po prenehanju vadbe na višini (Slika 41)[121].

Slika 41: Spremembe skupne mase hemoglobina pri kolesarjih ob uporabi LHTL protokola (3000



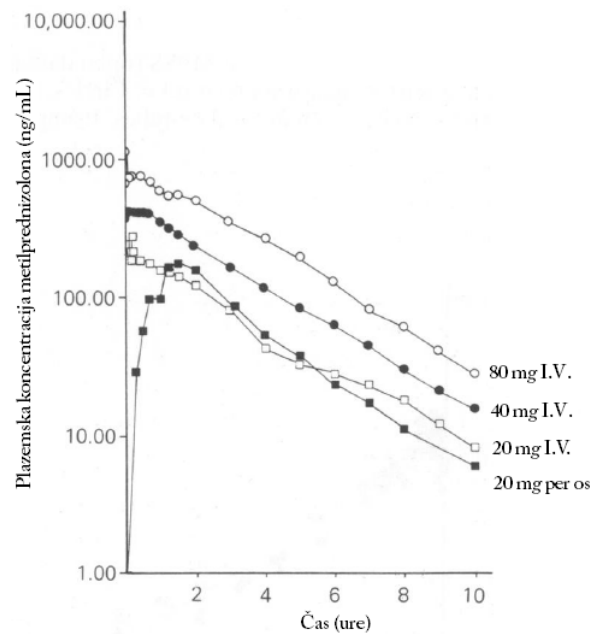
m.n.v., tri tedne, 14 h/dan) [121]. Črna črta povprečje, črtkane črte individualne vrednosti.

Ko so avtorji zbrali vse študije, ki so uporabljali protokol: živi visoko – treniraj nizko, ter na zbranih podatkih določili krivuljo, ki se jim najbolj prilagaja, so prišli do ugotovitve, da tudi te študije podpirajo ugotovitev, da se skupna masa hemoglobina ob izpostavljanju višini vsaj za 12h/dnevno povečuje s hitrostjo 1 % /teden oz. 1 % / 100 h hipoksije [121]. Podobno dostopne raziskave navajajo manjše razlike v koncentraciji hemoglobina in hematokrita pri uporabi podobnih protokolov bivanja na višini. Učinek desetdnevnega protokola LHTL (9 vzd. športnikov, 2700 m, 12 h/dan) na koncentracijo hemoglobina izmerjeno en teden po vrnitvi z višine je bil + 3 %, hematokrit pa je bil znižan za – 4 % [125]. Sedem dni po vrnitvi z simulirane višine po protokolu LHTL (šest visoko treniranih vzd. športnikov ($VO_{2max} = 70,2$ ml/kg/min), 3000 m, 8-10 h/dan, 23 dni) je povečalo svojo [Hb] za – 0,7 % [122]. Bivanje na višini 2000 m.n.v. v dolžini 26 dni (vmes prekolesarili 2778 km) je enajstim elitnim kolesarjem dvignilo [Hb] izmerjeno en teden po vrnitvi na nižino za + 9,6 % [122]. Še en teden pozneje je bila vrednost + 6,9 % [122]. Ob predpostavki skupne mase hemoglobina v krvi in volumna krvi, lahko izračunamo koncentracijo hemoglobina. Meritve mladinske nemške kolesarske reprezentance ($N = 7$, povprečje 20.6 let, 181 cm, 69.7 kg, $VO_{2max} = 71.2$ ml/min/kg, koncentracija hematokrita in hemoglobina $44,1 \pm 2,5$ % in $15,8 \pm 0,9$ g/dL) je razkrila da dosegajo ti posamezniki skupno maso hemoglobina 958 ± 123 g in 6940 ± 662 mL krvi [35]. Čeprav je ugotovljeno, da imajo odrasli moški vzdržljivostni športnik skupno maso hemoglobin v območju enega kilograma, pa je zanjo značilna veliko variabilnost med posamezniki (Graf 26) [126]. Raziskava, ki je vključevala dve skupini visoko treniranih mladih kolesarjev (~ 21 let, 74,1 – 69,8 kg), ki se niso značilno razlikovali v VO_{2max} (povprečni VO_{2max} skupine = 65,1 in 67,4 ml/min/kg), so se pa značilno razlikovali v količini skupne mase hemoglobina, je razkrila da je skupina z nizko vrednostjo skupne mase hemoglobina v povprečju dosegla vrednost 826,8 g, skupina z visoko vrednostjo le te pa 1009,3 g [127]. Za našega elitnega vzdržljivostnega športnika (171 cm, 59 kg) predpostavimo visoko skupno maso hemoglobina 1000 g in 6500 mL volumna krvi, kar da koncentracijo hemoglobina 15,4 g/dL. Ob predpostavki, da se skupni volumen krvi ne spreminja (ta predpostavka na dolgi rok drži, saj je bilo dokazano da povečanje skupne mase eritrocitov z rHuEPO terapijo izzove enako znižanje plazme krvi tako da skupen volumen krvi ostaja

nespremenjen tudi v času povišanih vrednosti [Hb] [128]) povečanje skupne mase hemoglobina za + 2 % (po [121] pričakovana sprememba po 11 dneh LHTL na 3000 m.n.v.) izzove linearno povečanje vrednosti koncentracije hemoglobina na 15,7 g/dL, kar je + 1,9 % nad izhodiščno vrednostjo. Povečanje skupne mase hemoglobina za + 4 % (še enkrat večja sprememba od pričakovane) nam da, po formuli iz [35], vrednost [Hb] = 16 g/dL ali +3,9 % nad izhodiščno vrednostjo. Povečanje skupne mase hemoglobina za + 10 % (5 x večje od pričakovane) nam da vrednost [Hb] = 16,9 g/dL, kar je 9,7 % nad izhodiščno vrednostjo. Povečanje skupne mase hemoglobina za 10 % nam da skupno maso hemoglobina 1100 g. Ena vrečka krvi vsebuje približno 60 g hemoglobina [71]. To kaže, da ugotovljeno razliko (~10 %) v koncentraciji hemoglobina in hematokrita lahko brez zadržkov pripišemo tudi reinfuziji dveh enot krvi. Ugotovimo lahko, da ob zgoraj navedenih predpostavkah (odsotnost dehidracije športnika pri meritvah na dan 27 in 29.8.0002), tudi ob neznanem mineralkortikoidnem učinku metilprednizolona, višinski trening ne more biti razlog izjemnega povečanja vrednosti koncentracije hemoglobina in hematokrita v roku dveh dni. Če predpostavimo obraten scenarij, torej vrednosti z dne 29.8.0002 kot izhodiščne (predpostavka ustrezne hidriranosti, skupna masa hemoglobina 1000 g, skupen volumen krvi 5952 mL, vrednost [Hb] = 16,8 g/dL), vidimo, da bi moral športnik, da bi dosegel vrednost hemoglobina z dne 27.8.0002 ([Hb]= 15,2 g/dL), ob konstantni skupni masi hemoglobina, svoj volumen krvi povečati na 6578,9 mL (+ 626,9 mL ali + 10,5 %). Takšno akutno povečanje volumna krvi je teoretično mogoče doseči z zaužitjem 5 L vode ali 1,75 L slane vode blizu odvzema vzorca (v primeru slane vode 75 minut prej). Ob izraženem mineralkortikoidnem učinku metilprednizolona morda nekoliko manj (koliko ni mogoče reči). Takšno nadhidriranost bi zaradi povečane diureze lahko vzdrževal relativno kratek čas, najverjetneje ne čez noč. Ker sta bila oba vzorca odvzeta dopoldne (ob 7:37 na dan 27.8. in ob 9:50 na dan 29.8.) bi se takšno nadhidriranost lahko pričakovalo le v primeru namernega povečanega vnosa tekočin tik pred nenapovedanim doping testom z namenom sprememb krvnih vrednosti. Edina razumna razlaga bi torej bil močno izražen mineralkortikoidni učinek metilprednizolona. Podatki o zdravilu (SmPC) z učinkovino v obliki natrijeve soli metilprednizolonhidrogensukcinata, dostopni v uradni bazi podatkov o zdravilih v RS (www.zdravila.net), kažejo: »*pri intravenskem infundiranju vodne raztopine metilprednizolona v dozi 30 mg/kg telesne teže (TT) v 20 minutah ali 1 g/kg TT v 30-60 minutah je najvišja koncentracija metilprednizolona v*

plazmi (skoraj 20 µg / ml) dosežena po približno 15 minutah. Po enkratnem intravenskem infundiranju 40 mg so najvišje koncentracije metilprednizolona v plazmi, izmerjene po približno 25 minutah in znašajo 42-47 µg / 100 ml. Pri ljudeh se metilprednizolon šibko veže z albuminom in transkortinom. Veže se približno 40 do 90 % tega zdravila. Klinični odziv je mogoče opaziti 4 do 6 ur po aplikaciji. Razpolovni čas natrijeve soli metilprednizolonhidrogensukcinata v plazmi je 2,3 do 4 ure in videti je, da ni povezan z načinom aplikacije. Farmakološki učinek se nadaljuje tudi potem, ko v plazmi nivojev ni več mogoče izmeriti. Metilprednizolon le v najmanjši možni meri učinkuje kot mineralkortikoid (200 mg metilprednizolona je enako 1 mg deoksikortikosterona). Metilprednizolon se presnavlja v jetrih. Po i.v. aplikaciji metilprednizolona, označenega s C^{14} , se je 75 % skupne radioaktivnosti izločilo v urinu v 96 urah, 9 % v blatu po 5 dneh in 20 % v žolču.« Športnik je na dan pika ose (25.8.0002) prejel enkratno intravensko injekcijo metilprednizolona v dozi 80 mg (pri uradni teži 59 kg to pomeni dozo 1,35 mg/kg TT) in navodilo “naj pije kolikor more v naslednjih 24-ih urah”. Študija farmakokinetike metilprednizolona pri petih zdravih prostovoljcih je razkrila linearno kinetiko, ter razpolovni čas metilprednizolona intravenozne injekcije pri dozi 80 mg, na $1,70 \pm 0,12$ h (Graf 25) [129]. Razpolovni čas zdravila se pri uporabi različnih doz v območju 20 – 80 mg značilno ne razlikuje [129]. Iz podatkov o farmakokinetiki metilprednizolona lahko ugotovimo, da bi bila največja koncentracija metilprednizolona v plazmi športnika prisotna prej kot v roku ene ure po prejemu terapije. Nato bi se koncentracija enakomerno zmanjševala. Ker se zdravilo večinoma izloča preko urina, bi dodatno uživanje tekočin najverjetneje pospešilo izločanje zdravila iz organizma športnika. Na osnovi dostopnih podatkov lahko z visoko gotovostjo trdimo, da zdravila v plazmi športnika ne bi več mogli zaznati v roku 24 ur. Ker čas terapije ni znan, krvni vzorec nenapovedanega doping testa pa je bil odvzet dva dni pozneje v dopoldanskih urah, je razumno pričakovati, da je bil vzorec odvzet znotraj obdobja 36 – 48 ur po terapiji.

Graf 25: Linearnost kinetike natrijeve soli metilprednizolonsukcinata pri intravenozni infuziji, ne glede na uporabljeno dozo (20 – 80 mg) [129]. Prikazane so sredine meritev. Povprečni razpolovni čas estra metilprednizolonsukcinata v plazmi je kratek. Ocenjen je bil na $4,14 \pm 1,62$ minut za vse uporabljene doze [129].



Čeprav bi bil farmakološki učinek lahko prisoten dalj časa, pa bi bil metilprednizolon v plazmi (morda) dostopen v zelo nizki koncentraciji, zato je njegov vpliv na povečano zadrževanje tekočine v organizmu športnika vprašljiv. Ker za metilprednizolon ob tem velja, da ima že v terapevtskih dozah minimalne mineralokortikoidne učinke, ter ga je bilo v plazmi športnika v času odvzema najverjetneje izjemno malo (če sploh), menimo da ne more biti vzrok domnevne hemodilucije pri športniku. Na podlagi teh ugotovitev sklepamo, da prejetje terapije metilprednizolona (v RS za I.V. aplikacijo, na osnovi uradne baze podatkov o zdravilih v RS (kjer je športnik prejel to terapijo), dostopen le v obliki natrijeve soli metilprednizolonhidrogensukcinata) nikakor ne more biti vzrok večjega zadrževanja tekočine v telesu športnika na dan 27.8.0002. Edina razlaga domnevno znižanih krvnih vrednosti na dan 27.8.0002 v primerjavi z vrednostmi na dan 29.8.0002, zaradi hemodilucije, je mogoče tako razložiti le z vnosom velike količine tekočin tik pred odvzemom krvi. Nenameren (naključen) vnos tako velike količine tekočine v dopoldanskem času je malo verjeten.

Ugotovimo lahko:

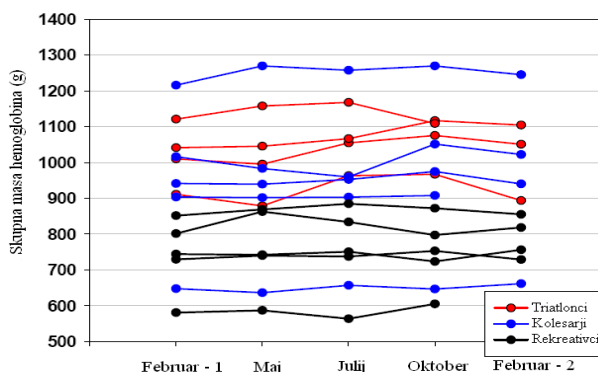
Znižan delež retikulocitov (0,51 %) nastopa hkrati z visoko vrednostjo [Hb] (16.8 g/dL), [Ht] (50 %) in posledično visoko OFF – hr* vrednostjo (125,2) (*abnormalna po metodologiji BPL pri specifičnosti 99,9 %), kar so vrednosti podobne tistim, ki se zgodijo ob reinfuziji krvi. Poleg tega so te krvne vrednosti ugotovljene na dan začetka tritedenske etapne dirke (zjutraj). Argumenti obrambe, kljub nemogoči oceni vpliva vrnitve z višine na meritve retikulocitov ter

zavrnitvi mogoče hemodilucije kot posledice terapije z metilprednizolonom in posledičnim večjim vnosom tekočine, ne vzbudijo dovolj velikega dvoma v razlago športnikovih vrednosti v prid reinfuzije krvi v obdobju med 27-29.8.0002. Ker pa obstaja možnost, da bivanje na višini ni bilo ustrezno upoštevano pri analizi športnikovih vrednosti v programu BPL, kar lahko bistveno vpliva na podano oceno abnormalnosti meritev v avgustu, hipoteze številka 4 ne zavrnemo.

9.8.8. Argumentacija hipoteze 8 (Statistična napaka/napaka programa ABP)

Vsako mnenje pri interpretaciji podatkov izhajajočih iz biološkega potnega lista je potrebno močno odvisno od statistike. Zato je vprašanje ustreznosti modela biološkega potnega lista za ocenjevanje krvnih vrednosti ključno. Večkratne zaporedne meritve skupne mase hemoglobina v obdobju enega leta pri vzdržljivostno treniranih športnikih in rekreativcih so pokazale, da je le ta med letom zelo stabilna. Spremembe le te znotraj športnika v obdobju enega leta so bile manjše od 6 % (Graf 26) [130]. Odrasli moški vzdržljivostni športnik ima skupno maso hemoglobina v območju enega kilograma, z veliko variabilnostjo med posamezniki [126].

Graf 26.: Stabilnost skupne mase hemoglobina pri športnikih, izmerjenih petkrat letno, v obdobju enega leta [25].

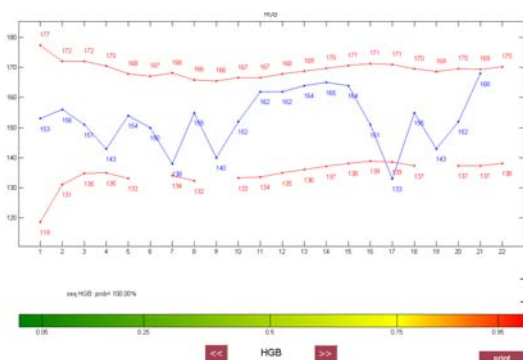
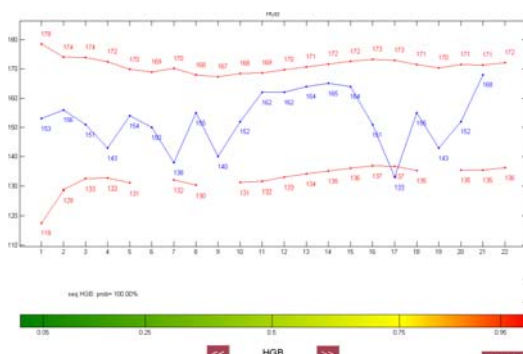
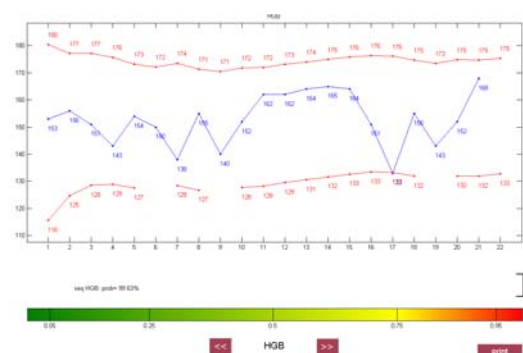


V nasprotju z meritvijo skupne mase hemoglobina, ki ni odvisna od volumskih sprememb, pa kažejo meritve koncentracije hemoglobina veliko večje spremembe pri posamezniku v obdobju tekmovalne sezone. Te izvirajo iz dolgoročnih (trening, izpostavljanje hipoksiji), srednjeročnih (npr. napor tritedenske etapne dirke) in kratkoročnih (temperature, telesni položaj (npr. stati/sedeti), vnos tekočin) vplivov. Ti vplivi omejujejo informativno vrednost tega biokazalca. V programu biološkega potnega lista so za koncentracijo hemoglobina poleg heterogenih dejavnikov (vpliv spola, rase, starosti...) upoštevani še zunanji dejavniki (bivanje na višini in kajenje) [4]. Napor tritedenskih etapnih dirk, ki pogosto izzovejo nepredvidljiv padec krvnih vrednosti so v programu BPL upoštevani z nedoločeno (manjkajočo) spodnjo

mejo in z neupoštevanjem pri izračunu ustreznosti zaporedja pri vzorcih odvzetih med ali v roku treh dni po etapni dirki (vir: gradivo UCI). Zmanjšanje vplivov predanalizne faze na meritev na minimum je bila dosežena z predpisanim protokolom odvzema krvnega vzorca (odvzem krvi v sedečem položaju, po najmanj 10 minutah sedenja...) [4]. Od navedenih mogočih vplivov na meritve koncentracije hemoglobina je ostalo nerešeno vprašanje vpliva vadbenih obremenitev (treninga). To negotovost (vključno z negotovostjo merilnih inštrumentov) v okviru biološkega potnega lista upoštevamo v vrednosti variabilnosti biološkega kazalca znotraj posameznika (t.i. varianca znotraj posameznika ang. WS_VAR), ki je bila osnovana na podatkih različnih skupin športnikov testiranih izven in v obdobju tekmovanj [36]. V obdobju prvih sankcij proti športnikom, osnovanih le na ocenah krvnih vrednosti z modelom biološkega lista, je prišlo do dvoma o ustreznosti izbrane variance za [Hb] in OFF – hr vrednosti [65]. Zaradi razlogov, ki so že bili podani, adaptivni model biološkega potnega lista uporablja univerzalno, arbitrarno določeno varianco znotraj posameznika za koncentracijo hemoglobina in OFF – hr vrednosti. Eksperti UCI izbiro le te utemeljujejo na naslednjih raziskavah: *»Čeprav so bili uporabljene različne procedure zbiranja krvi, transporta in analiz, so ocene variance znotraj posameznika hemoglobina, ki so dostopne v znanstveni literaturi, zelo podobne. Pri zdravih posameznikih, je varianca znotraj posameznika 20.0 [131], 20.6 v [132], 24 v [133], 20.0 v [134] in 28.2 v [135]. V pričakovano nedopingiranih vzdržljivostnih športnikih so bile variance hemoglobina v podobnem območju: 26.4, 22.6 in 21.4 za tri različne skupine v [52], 19.4 v [63], 22.7 v [36], 26.0 v [129] in 26.3 v [81]. Če povzamemo, so vse ocene v območju 19.2 – 28.4. Za elitne športnike, je bila podana ena višja ocena variance znotraj posameznika (vrednost 39.9, [52]), toda danes je znano, da je bila uporabljena populacija sestavljena iz mnogih dopingiranih kolesarjev (podatki so bili pridobljeni na kolesarskem moštvu T-Mobile od leta 2000 do 2006, ki je bil del organiziranega doping programa v Freiburgu, Nemčija [55]). Ob neupoštevanju te izjeme, dejstvo da so vse objavljene ocene v istem območju, kaže da »krvni kazalci nimajo heterogenosti variance znotraj posameznika [136]« in zato mora biti uporabljena univerzalna varianca znotraj posameznika [52]. Zaradi teh razlogov ima »adaptivni model«, ki se uporablja za ocenjevanje krvnih vrednosti univerzalno varianco znotraj posameznika za hemoglobin, to je, 28.2.«* Dr. Sottas k temu dodaja (vir: gradivo UCI): *»Nenazadnje je bilo na sestanku, ki ga je organizirala WADA leta 2006 in pri katerem so sodelovali eksperti v*

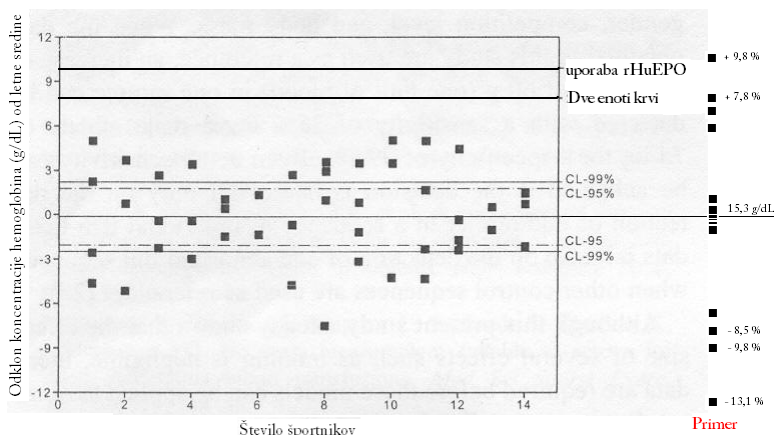
hematologiji in krvnem dopingu, odločeno, da se uporabi univerzalna varianca znotraj posameznika 28,2 za vzdržljivostne športnike.” Ta varianca vključuje že tudi negotovost merilnih inštrumentov, kar pomeni da velja le v primeru da se za analizo krvnih vzorcev uporabljajo predpisane analizne naprave (Advia, Sysmex).

Graf 27, 28 in 29: Prikaz pomembnosti variance znotraj posameznika (WS_VAR) na rezultate biološkega potnega lista na primeru [Hb] športnika. V primeru uporabe večje variance znotraj posameznika (3 G model) ta športnik ne kaže izstopajočih (abnormalnih) vrednosti in zaporedja za koncentracijo hemoglobina pri specifičnosti 99,9 %. Zmanjševanje variance povečuje abnormalnost izstopajočih vrednosti.



Primerjava odklonov [Hb] od individualne sredine športnika z odkloni od letne sredine izmerjenimi pri nedopingiranih vzdržljivostnih športnikih (izmerjeni 5 x letno v roku 12. mesecev) pokaže naslednjo sliko (Graf 30):

Graf 30.: Individualni odkloni [Hb] od letne sredine pri vzdržljivostnih športnikih (N = 14, izmerjeni 5 x letno z inštrumentom ADVIA 120 [130]) in primeru športnika (shematski prikaz, sredina [Hb] športnika je določena brez dveh najbolj izstopajočih



vrednosti, izmerjen 21 x v 18. mesecih z Sysmex XT-2000i). Na sliki zgoraj desno določene pričakovane spremembe [Hb] v primeru reinfuzije dveh enot krvi oz. uporabe rHuEPO z namenom pozitivnega vpliva na športni nastop. CL – 95 oz. 99 % označuje interval zaupanja meritev [Hb] pri specifičnosti 95 oz. 99 % z ADVIA 120 inštrumentom (KV = 1,4 %) [130]. Vrednosti znotraj CL – 99 % so v okviru napake inštrumenta, vrednosti izven intervala zaupanja inštrumenta pa je mogoče z ustrezno gotovostjo pripisati normalnim biološkim nihanjem [Hb] okoli individualne sredine pri nedopingiranih vzdržljivostnih športnikih (triatlonci, kolesarji) v obdobju enega leta (povprečna varianca [Hb] znotraj posameznika (WS_VAR) za 30 merjencev (prikazanih 14) je 26 [17 – 44; 95 % CI] [130]. V primeru da je KV inštrumenta za merjenje [Hb] > 1,5 % ne sme biti uporabljen v analizi biološkega lista.

Ugotovimo lahko, da odkloni meritev [Hb] od sredine športnika odstopajo navzgor v meri, ki je lahko pričakovana ob uporabi nedovoljenih snovi (rHuEPO) ali metod (transfuzija krvi). Prisotno je tudi močno nihanje navzdol, ki dosega vrednosti ki jih je mogoče interpretirati kot namenski odvzem krvi za reinfuzijo v poznejših obdobjih sezone. Prav tako so pri športniku vidna večja nihanja vrednosti, kot pri nedopingiranih vzdržljivostnih športnikih. Kakorkoli že, pa le ti niso elitni vzdržljivostni športniki, kamor spada obtoženi športnik. Zato smo podatke športnika primerjali še z javno dostopnimi podatki primerljivih elitnih vzdržljivostnih športnikov v podobnem časovnem obdobju kot športnik (več kot ena sezona), ki izvajajo

višinski trening z namenom pozitivnega vpliva na športni nastop ter so med sezono izpostavljenimi primerljivim vadbenim obremenitvam.

Tabela 20.:

*Športnik B. Izvaja višinski trening. Osumljen uporabe avtologne krvne transfuzije v sezoni 0002.

**Športnik C. Izvaja višinski trening. Uporaba prepovedane avtologne krvne transfuzije ni izključena. Sum na uporabo le te v sezoni 0002 je javno izrazil dr. Mørkeberg, sam trenutno eden najvidnejših strokovnjakov za dokazovanje avtologne krvne transfuzije [82]. Originalni podatki krvi v prilogi 2.

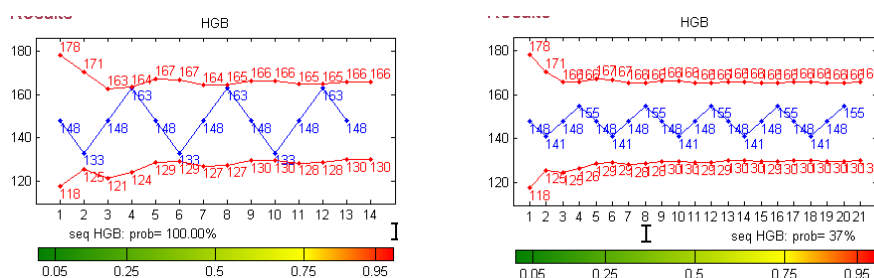
***Športnik A. Izvaja višinski trening [137]. Je doping povratnik v kolesarstvu po dveletni prepovedi zaradi priznanja poskusa uporabe avtologne krvne transfuzije v okviru doping afere Puerto [138]. Po transparentni vrnitvi v tekmovalni šport, na zahtevo svojega trenerja, redno opravlja merjenja skupne mase hemoglobina, ter rezultate meritev redno javno objavlja (najvišja vrednost je 104,5 % nad povprečjem vseh meritev skupne mase hemoglobina opravljenih v obdobju navedenih vrednosti [Hb] v tabeli. To najverjetneje izključuje možnost krvne manipulacije v njegovem primeru). Originalni podatki krvi v prilogi 3.

	Športnik C**		Športnik A***		Športnik B*	
Št. meritev	Datum	HGB	Datum	HGB	Datum	HGB
1	16.10.0001	143	2.5.0001	142	21.3.0001	153
2		150		141		156
3		144		142		151
4		143		143		143
5		154		142		154
6		141		148		150
7		152		141		138
8		150		142		155
9		145		138		140
10		149		160		152
11	7.5.0002	148		144		162
12	18.5.0002	136		150		162
13	31.5.0002	130		154	13.12.0001	164
14		160		137	15.1.0002	165
15		160	18.5.0002	135		164
16		143		132		151
17		140		142		133
18		137		136	7.5.0002	155
19		144		147	31.5.0002	143
20		140		136		152
21	25.7.0002	145		132	29.8.0002	168
22				139		
23			24.8.0002	145		
	Sredina	145.4		142.1		152.9
	SD	7.4		6.9		9.5
Var		55.1		44.5		90.2
Var (izločeni meritvi št. 17 in 21)						65.5

Ugotovimo lahko, da športnik dosega visoko vrednost variance hemoglobina znotraj posameznika, tako v primerjavi z zdravimi ljudmi, nedopingiranimi vzdržljivostnimi športniki, kot tudi domnevno nedolžnimi vrhunskimi vzdržljivostnimi športniki primerljive kakovosti (tudi ob mogoči uporabi različnih analiznih inštrumentov (Advia ali Sysmex), ki za športnika A in C niso znane, medtem ko so vse meritve športnika B narejeno z uporabo enake analizne naprave, to je, Sysmex XT-2000i). Visoka variabilnost krvnih vrednosti bo v okviru

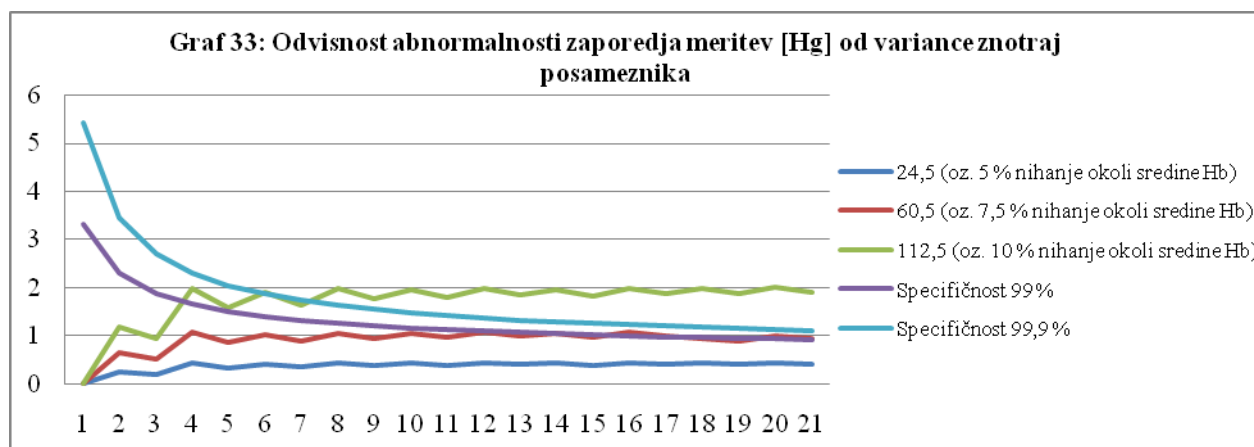
biološkega potnega lista, v skladu z pričakovanimi spremembami ob krvnem dopingu, vodila do abnormalnih krvnih vrednosti (abnormalne izstopajoče vrednosti ali abnormalnosti zaporedja). Na spodnjem grafu (Graf 31) že vidimo abnormalnost zaporedja vrednosti [Hb], kljub temu da nobena vrednost ne preseže mejne vrednosti. Ta hipotetični primer nihanja krvnih vrednosti okoli sredine ($[Hb] = 149,1 \text{ g/L}$) dosega varianco hemoglobina znotraj posameznika 120 (oz. 112,5 pri 21 meritvah). Nihanje [Hb] okoli sredine z varianco 25,8 ne izzove abnormalnosti zaporedja, četudi se število meritev poveča na 20 (Graf 32).

Graf 31 in 32.: Abnormalnost zaporedja pri visokem nihanju krvnih vrednosti (levo).



Ugotovimo lahko, da lahko že visoka variabilnost krvnih vrednosti okoli (nespremenjene) sredine pri športniku izzove abnormalni rezultat v okviru modela biološkega potnega lista. Pričakovano nihanje krvnih vrednosti [Hb] v okviru tega modela opisuje varianca vrednosti 28,22, kar torej razumemo kot »normalno« nihanje vrednosti tega biokazalca znotraj tekmovalne sezone in zaporednih sezon. Dejavniki, ki lahko vplivajo na nihanje [Hb] so številni in že omenjeni. Ker vemo, da je športnikovo zaporedje [Hb] in OFF – hr vrednosti pri obremenilnem dokazu model biološkega potnega lista ocenil kot abnormalno, se postavi pomembno vprašanje na katerega je treba odgovoriti pred interpretacijo zaporednih vrednosti v okviru biološkega potnega lista, to je, kakšna varianco zaporednih vrednosti bo biološki potni list predvidel kot abnormalne pri specifičnosti 99,9 %? V ta namen smo sestavili tri zaporedja sestavljena iz 21 zaporednih vrednosti. Vse meritve so bile nastavljene tako da enakomerno nihajo okoli sredine z absolutnim odklonom 5, 7.5 ali 10 %. Enakomernost nihanja sicer krši pravilo neodvisnosti meritev (pričakuje se naključna vrednost, ne vzorec), vendar pa so v okviru modela pri športniku mogoča vsa zaporedja. Torej tudi takšna, kot smo jih predpostavili mi. Takšno nihanje je dalo varianco 21. meritev 24,5 (pri 5 % nihanju okoli

sredine $[Hb] = 148 \text{ g/L}$), 60,5 (pri 7,5 %) in 112,5 (pri 10 %). Nato smo na podlagi navodil tehničnega dokumenta potnega lista za vsako zaporedje vrednosti izračunali napovedno sredino, napovedno varianco, ter na njihovi osnovi še LF funkcijo. Ker je pri vsakem zaporedju sredina in varianca meritev nespremenjena lahko prekoračitev odločitvene gama krivulje pri dani specifičnosti pripišemo le različni varianci meritev (ne pa tudi morebitni spremembi sredine ali varianci meritev znotraj enega zaporedja). Rezultati so prikazani na spodnjem grafu (Graf 33).



Ugotovimo lahko, da model biološkega potnega lista pri specifičnosti 99,9 % dovoljuje nihanje okoli sredine (variance znotraj posameznika) v višini še nekoliko večji od 60,5. Ta vrednost pa doseže kriterij specifičnosti 99 % že pri 12 zaporedni meritvi. To pomeni da bodo vrednosti variance znotraj posameznika za $[Hb]$, višje od te vrednosti kmalu penalizirale športnika. Ta vrednost pade že nad 99 percentil pričakovane variance $[Hb]$ pri nedopingiranih športnikih (Tabela 21). Ker odločitvena funkcija 99,9 % predstavlja verjetnost, da takšno zaporedje lahko pričakujemo pri nedopingiranem športniku le pri enem od 1000 izmerjenih, to pomeni, da je takšna varianca zaporednih meritev pri nedopingiranem športniku redka. Nenazadnje lahko ugotovimo, da relativno visoka variabilnost zaporednih meritev $[Hb]$ pri istem posamezniku lahko izvira iz redke visoke biološke variabilnosti znotraj posameznika (npr. morda se lahko pričakuje večje nihanje pri športnikih izpostavljenim zahtevnemu tekmovalnemu obdobju in pogostejšemu testiranju, v primerjavi z tistimi z manj zahtevnim in manjšim številom meritev) in občasne uporabe višinskega treninga. Samo visoka varianca

torej načelno ne more biti dokaz »dopingiranosti«, čeprav je višja varianca krvnih vrednosti pri dopingiranih športnikih glede na nedopingirane pričakovana in ob abnormalnih zaporedjih meritev ocenjenih z biološkim potnim listom že po predpostavkah modela vedno prisotna. Kljub temu pa velja opozoriti na dejstvo, da že varianca 65,5 ($\sqrt{65,5} = 8,09$) pade izven 99 percentila porazdelitve varianc nedopingiranih športnikov (Tabela 21) in je s tega stališča že tako oddaljena od pričakovane porazdelitve, da je težko trditi da pripada tej skupini. S stališča nedopingiranega športnika je še bolj (oz. povsem) neobičajna tudi varianca 90,2.

Tabela 21.: Percentili log normalne porazdelitve varianc zaporedij večjega števila nedopingiranih športnikov (N=101) [63].

Percentili	
1 st	4.338
5 th	4.644
10 th	4.816
25 th	5.117
50 th	5.474
75 th	5.856
90 th	6.222
95 th	6.453
99 th	6.908
lognormal(1.7,0.1)	

Kakšen del variance meritev [Hb] športnika bi odstranilo ustrezno upoštevanje bivanje na višini, zaradi nejasnih kriterijev upoštevanja višine, ni lahko predvideti. Prav tako lahko ugotovimo da varianca športnika v domnevno neproblematični sezoni 0001 (vse meritve od marca do decembra 0001, torej tudi med in izven sezone), v kateri je športnik že izvajal višinski trening, dosega izjemno visoko vrednost 66,6. To dejstvo govori v smer rednega občasnega bivanja na višini in tudi naravno visoke variance [Hb] pri tem posamezniku. Kljub temu pa upoštevanje le meritev odvzetih v sezoni 0002 vrne varianco 141,8. To je vrednost, ki je dvakrat večja od izmerjene pri tem športniku v sezoni 0001. To lahko kaže na to, da so se v sezoni 0002 pojavili dejavniki, ki so močno vplivali na merjene krvne kazalce npr. bolezen ali doping. Bivanje na višini pa najverjetneje lahko izključimo v razlagi razlike variance zaporedja v sezoni 0002 v primerjavi z sezono 0001, saj naj bi ga športnik, glede na pričanje, redno izvajal že več let, torej tudi v sezoni 0001.

Kakorkoli že, pa je že vrednost variance zaporedja meritev [Hb] v domnevno nedopingirani sezoni že izjemno visoka. Je takšno varianco meritev [Hb] mogoče pričakovati pri nedopingiranem športniku, ki pogosto biva na višini? Iz strokovne literature povzemimo dva primera športnikov, eden biva na nižini, drugi pa občasno biva na višini (primera vzeta iz [59]). Krvni podatki »športnice na nižini« so od elitne vrhunske športnice stare 28 let, kavkaškega porekla, ki živi in trenira na nizki nadmorski višini [59]. Krvni podatki »športnika

na višini« so od elitnega vrhunskega športnika starega 36 let, ki občasno živi in trenira na višini 2000 m [59]. Izračun variance [Hb] devetih zaporednih meritev razkrije drastično razliko med posameznikoma (21,4 nasproti 90,4) (Tabela 22 in 23).

Tabela 22 in 23.:

Športnica na

Ker oba veljata za nižini

nedopingirana

športnika, lahko

visoko varianco

krvnih vrednosti pri

moškem športniku, ki

občasno biva na

višini, razložimo le z

učinkom občasnega

bivanja na višini in

morebitne sočasne

naravne (biološke)

visoke variabilnosti

[Hb] pri tem

športniku. Če

izključimo vse

Športnik na višini

Št. meritev	Hb (g/L)
1	130
2	119
3	129
4	119
5	131
6	128
7	123
8	122
9	126
POVP	125.2
VAR	21.4

Št. meritev	Nadmorska višina (m)	Hb (g/L)	Odstranitev meritev
1		162	162
2		145	145
3		157	157
4	2000	171	
5	2000	168	
6		145	145
7	2000	155	
8		149	149
9		151	151
POVP		155.9	151.5
VAR		90.4	46.3

meritve izvedene na višini je varianca znotraj posameznika še zmeraj relativno visoka, to je 46,3. To govori o tem, da je naravna (biološka) variabilnost [Hb] pri tem športniku visoka, ter višja od »športnice na nižini«. Zdi se torej, da se določeni športniki lahko razlikujejo v variabilnosti [Hb], ki se lahko še poveča ob občasnem bivanjem in treniranjem na višini. Tako je variabilnost 23. zaporednih krvnih vrednosti športnika A v tabeli , ki velja za nedolžnega tudi na osnovi večkratnih zaporednih meritev skupne mase hemoglobina v opazovanem obdobju (najvišja vrednost 104,5 % nad povprečjem meritev, kar je po [130] znotraj območja napake meritev ter biološke variabilnosti), relativno visoka, to je, 44,5. Izločitev meritev v času ko je ta športnik bival na višini (na visoki nadmorski višini je bival od 3.4. – 17.4.0002 [137], v aprilu je opravil pet nenapovedanih krvnih kontrol – izločitev vseh petih aprilskih

meritev) da varianco hemoglobina znotraj posameznika v obdobju opazovanja (16 mesecev) 21,4. Ker se zdi, da lahko občasno bivanje na višini povečuje varianco zaporedja meritev [Hb] pri posamezniku, bi povečanje variance zaporedja športnikovih meritev zaradi višinskega treninga lahko delno razložilo visoko varianco športnikovih meritev. To domnevo smo želeli potrditi na skupini vrhunskih športnikov, ki občasno bivajo na višini. Poleg tega tehnični dokument biološkega potnega lista predvideva arbitrarno določeno spremembo napovedne sredine v primeru da športnik spremeni nadmorsko višino bivanja (npr. + 5 g/L za meritev odvzeto med 1500 – 2000 m.n.v. za [Hb]), obenem pa ne predvidi morebitne spremembe variance meritev odvzetih na višini. Zato nas je zanimalo ali meritve odvzete na višini kažejo drugačno varianco kot meritve odvzete na nižini pri skupini istih posameznikov. To vprašanje je pomembno, saj bi lahko neupoštevanje morebitne spremembe variance meritev krvnih vzorcev odvzetih na višini, v primeru da športnikove meritve odvzete na višini demonstrirajo večjo varianco znotraj posameznika, vodilo v večjo verjetnost lažno pozitivnega rezultata. Z namenom da se bolje preuči vpliv višine na variabilnost zaporednih meritev [Hb] pri vrhunskih športnikih smo zbrali krvne podatke skupine vrhunskih domnevno nedopingiranih slovenskih tekačev in tekačic na smučeh v obdobju 8 do 15 –ih tednov rednega vzdržljivostnega treninga, ki so vmes tri tedne bivali na nadmorski višini 1600 m. Postavili smo dve hipotezi:

Hipoteza 1:

Varianca posameznikovega zaporedja za [Hb] ne bo različna od univerzalne arbitrarno določene variance zaporedja za [Hb] v okviru biološkega lista, če bodo v zaporedje vključene tudi meritve posameznika odvzete med bivanjem na višini 1600 m.n.v.

Hipoteza 2:

Varianca meritev [Hb] posameznikovega zaporedja na nižini se ne bo razlikovala od variance zaporedja meritev [Hb] posameznika odvzetih med bivanjem na višini.

Protokol:

Vrhunski vzdržljivostni športniki obeh spolov (starost $21,6 \pm 2,6$ let), tekači na smučeh, so v juniju in juliju leta 2010 ob rednem treningu izvajali bivanje na višini po protokolu: spi visoko – treniraj nizko.

Bivanje na višini 1600 m (>12 h/dan), od 20.6.2010 do 11.7.2010.

Odvzem vzorca v dopoldanskih urah. Prvi odvzem krvi cca. 10 dni pred izpostavljanjem višini (7-10.6.2010). Drugi, tretji in četrti odvzem med bivanjem na višini (21.6., 28.6., 5.7.2010). Peti odvzem dan po prihodu z višine (12.7.2010), šesti odvzem štirinajst dni po vrnitvi z višine (26.7.2010), sedmi odvzem štiri tedne po vrnitvi z višine (6-7.8.2010). Osmi (zadnji) odvzem deseti teden po vrnitvi z višine (21-22.9.2010).

Hematološki analizator ADVIA 2120, KV za Hb: 0,93 %.

Statistična obdelava s programom SPSS 13.0 for Windows.

Rezultati in diskusija:

Tabela 24.: Variance znotraj posameznika (ang. WS_VAR) za [Hb] v 8 tedenskem obdobju spremljanja (7 meritev), razen pri posameznikih št. 5 do 10 (označeni z rdečo barvo), ki so bili spremljani 15 tednov (8 meritev).

Št. Osebe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Spol	Ž	Ž	Ž	Ž	M	M	M	M	M	M	M	M	M
WS_VAR	13.1	16.8	17.2	16.9	38.8	22.0	26.2	33.7	9.8	29.1	8.0	7.6	24.8

Tabela 25: Ocena variance znotraj posameznika [Hb] za skupino, vključno z intervalom zaupanja.

	Brez korekcije višine	Z korekcijo višine
Ocena variance znotraj posameznika (WS_VAR)	18,12	14,99
Interval zaupanja (95 %)	[13,82 – 24,8]	[11,43 – 20,51]

Tabela 26.: Variance znotraj posameznika [Hb] za posameznike med bivanjem na nižini.

Nadmorska višina (m)	Št. vz./Št. Osebe	5	6	7	8	9	10
300	1	162	156	145	150	162	157
300	7	152	152	138	151	153	151
300	8	157	154	138	159	157	145
WS_VAR		25.0	4.0	16.3	24.3	20.3	36.0

Povprečna $WS_VAR_{nižina} = 21.0$

Tabela 27.: Primerjava razlik variance znotraj posameznika [Hb] za iste posameznike med bivanjem na nižini ter med bivanjem na višini.

Nadmorska višina (m)	Št. vz./Št. osebe	5	6	7	8	9	10	Razlika glede na nižino
1600	2	148	163	151	167		163	
1600	3	153	162	147	161	158	159	
1600	4	160	164	141	162	155	155	
300	5	143	159	142	154	155	153	
WS_VAR (2 - 4)		36.3	1.0	25.3	10.3	4.5	16.0	$P > 0,05$
WS_VAR (2 - 5)		52.7	4.7	21.6	28.7	3.0	19.7	$P > 0,05$
WS_VAR (3 - 5)		73.0	6.3	10.3	19.0	3.0	9.3	$P > 0,05$

Opisane variance znotraj posameznika vključujejo naravno (biološko) variabilnost, variabilnost izhajajočo iz uporabe analizne naprave in variabilnosti izhajajoče iz predanalizne faze meritev. KV analizne naprave ADVIA 2120 za [Hb] je enak 0,93 % (zahteve za meritve [Hb] v okviru biološkega potnega lista je $KV < 1,5 \%$ [4]), kar pomeni da vrednosti variance znotraj posameznika dosegajo primerljivo variabilnost izhajajočo iz uporabe analizne naprave

kot jih dosegajo meritve odvzete v okviru biološkega potnega lista. Negotovosti izhajajoče iz predanalizne faze meritev ni mogoče oceniti in so lahko prispevale k večji variabilnosti meritev v primerjavi z meritvami pridobljenimi v okviru biološkega potnega lista. Ugotovimo lahko, da dosega ocena variance znotraj posameznika za [Hb] na skupini slovenskih nedopingiranih vrhunskih športnikov obeh spolov, v osem oz. petnajst tedenskem obdobju opazovanja (vključno z tritedenskim bivanjem na nadmorski višini 1600 m), vrednost 18,12 z 95 % intervalom zaupanja [13,82 – 24,8] (Tabela 25)(Vsi podatki v prilogi 7). Ocena variance znotraj posameznika za [Hb] pri mešani skupini (moški in ženske) je podobna povprečnim vrednostim moških navedenim v strokovni literaturi (19,2 – 28,4) [52, 63, 36, 130, 81]. V primeru da smo upoštevali bivanje na višini, se je ocena variance znižala na 14,99 z 95 % intervalom zaupanja [11,43 – 20,51]. V obeh primerih interval zaupanja ne vsebuje vrednosti 28,22. Naši podatki z veliko verjetnostjo (več kot 95 %) izhajajo iz populacije z manjšo varianco kot je 28,22. Hipoteze 1 zato ne zavrnamo. Ugotovimo lahko da zaporedja meritev [Hb] naše mešane skupine (N = 13), kljub temu da so bile nekatere meritve odvzete med tritedenskim bivanjem na višini 1600 m.n.v. ni izzvalo večje variance zaporedja meritev kot je predpostavljena za »normalno« v biološkem potnem listu. To je presenetljiva ugotovitev, saj je korekcija višine za bivanje nad 1000 m.n.v. v okviru biološkega potnega lista predpisana kot obvezna za vsakega posameznika. Kakorkoli že, pa velja opozoriti da gre v našem primeru za majhno skupino športnikov zato ugotovitev ne smemo posploševati. Na drugi strani pa sta že v tej majhni skupini dva moška športnika (15,4 % vseh) že demonstrirala (abnormalno) visoki varianci meritev v 15 tedenskem obdobju spremljanja (38,8 in 33,7) (Tabela 24, vsi zbrani podatki v prilogi 7). Mogoče je da imata ta dva posameznika že naravno tako visoko varianco meritev [Hb] oz. se na višino odzivata drugače kot ostali ali pa je to posledica naključja (takšna dva posameznika sta zelo redka). Morda zaporedja meritev [Hb] pri nekaterih posameznikih v naši (majhni) skupini demonstrirajo večjo varianco meritev v primeru če vsebujejo meritve odvzete na višini (razlogi so številni, med drugim tudi dokazan individualni odziv povečane produkcije EPO na enak hipoksičen dražljaj [139]). Kakorkoli že, pa na podlagi podatkov naše (majhne) skupine ne moremo razložiti abnormalno visoke variance osumljenega športnika že v domnevnem obdobju nedopingiranosti. Morda bi jo lahko razložili z pogostejšimi bivanji na (višji) nadmorski višini ter dalšim obdobjem spremljanja.

Da pa bi preverili resničnost hipoteze 2 smo bili prisiljeni v zmanjšanje skupine, saj smo le za omejeno število športnikov imeli dovolj odvzemov krvi na nižini (vsaj tri), na podlagi katerih smo določili variance zaporedij na nižini, ki smo jih lahko primerjali z variancami vzorcem odvzetih na višini. V ta namen je bilo za skupino šestih moških športnikov iz te skupine pridobljena še osma meritev, izvedena v času desetega tedna po vrnitvi z višine. Za oceno variance znotraj posameznika za [Hb] pri moških vzdržljivostnih športnikih, ki redno vadijo a ne bivajo na višini so bile uporabljene tri vrednosti. Vzorec št. 1, odvzet deset dni pred bivanjem na višini, vzorec št. 7, odvzet štiri tedne po vrnitvi z višine (ob predpostavki da so učinki bivanja na višini že izzveneli - tudi tehnični dokument biološkega potnega lista predvideva korekcijo višine le za meritve odvzete v roku 14. dni po vrnitvi z višine) ter vzorec št. 8, odvzet deset tednov po vrnitvi z višine. Povprečna varianca znotraj posameznika za [Hb] skupine šestih moških športnikov, v obdobju petnajstih tednov je bila 21,0 (Tabela 26). Ta vrednost je, kljub majhnemu številu meritev v 15 tedenskem obdobju opazovanja, podobna vrednostim navedenim v strokovni literaturi. Povprečna vrednost [Hb] meritev dosega pri prvi od treh meritev vrednost 149,5 g/L, kar je na spodnji meji primerljive skupine (N=32) nedopingiranih moških tekačev na smučeh ([Hb] = 152 g/L, 95 % interval zaupanja [150 – 154 g/L]) opazovanih v obdobju treh let [140]. Varianca med posamezniki pa vrednosti od 32,3 do 69,5 (odvisno od meritve). Srednja vrednost [Hb] in variance med posamezniki je podobna srednjih vrednosti [Hb] in varianci med posamezniki (srednja vrednost [Hb] = 152 g/L 95 % interval zaupanja [130 – 174 g/L]; BS_VAR = 70; 95 % interval zaupanja [28 – 196]) ugotovljeni pri skupini nedopingiranih vzdržljivostnih športnikov obeh spolov (N=24, triatlonci in kolesarji), ki naj bi dobro reprezentirala skupino elitnih vzdržljivostnih športnikov [130]. Ugotovimo lahko da ta majhna skupina moških športnikov dobro reprezentira populacijo elitnih moških nedopingiranih vzdržljivostnih športnikov. Primerjava varianc meritev odvzetih na nižini, z variancami meritev odvzetih na višini (vzorec št. 2, 3 in 4) ni vrnila statistično značilnih razlik T – testa za odvisne vzorce ($P > 0,05$) (Tabela 27). Ker je bil prvi vzorec krvi odvzet na višini (št. 2) odvzet prvi dan bivanja na višini in zaradi pričakovano počasnejše spremembe skupne mase hemoglobina se morda lahko pričakuje manjše razlike v [Hb] kot bi jih lahko pričakovali ob poznejših odvzemih krvi na višini. Zato smo v analizo zajeli še vzorec št. 5, ki je bil odvzet naslednji dan po vrnitvi z višine in ga upoštevali kot vzorec odvzet na višini. Tudi ta primerjava varianc zaporedja odvzetega na višini

(sestavljenega iz vzorcev št. 2, 3, 4 in 5) ni vrnila statistično značilnih razlik ($P > 0,05$) (Tabela 27). Primerjava varianc zaporedja meritev na nižini, z zaporedjem vzorcev, ki po našem mnenju lahko kaže največji vpliv bivanja na višini (vzorec št. 3, 4 in 5), prav tako niso vrnila statistično značilnih razlik ($P > 0,05$) (Tabela 27). Zato hipoteze 2 ne zavrnilo. Ugotovimo lahko, da se varianca zaporedja meritev [Hb] odvzetih na višini pri naši (majhni) skupini vzdržljivostnih športnikov ne razlikuje od variance zaporedij meritev [Hb] odvzetih na nižini. To pomeni da na podlagi podatkov naše (majhne) skupine vrhunskih športnikov, korekcija variance meritev odvzetih na višji nadmorski višini v okviru biološkega potnega lista ni potrebna in ne bi vodila v penalizacijo športnika z naravno visoko variabilnostjo krvnih vrednosti. Seveda je mogoče, da je bil naš vzorec premajhen da bi zaznal obstoječe razlike oz. je bilo bivanje na višini prenizko, da bi se lahko demonstrirali večji učinki na [Hb]. Kakorkoli že, pa je s stališča uporabe modela biološkega potnega lista, za pridobivanje informacij potencialnega doping prekrška, nujno potrebno vplive bivanja na višini na krvne biokazalce še natančneje preučiti na velikih vzorcih ter na višjih višinah, ter tako dokazati da se variance zaporedja meritev odvzetih na višini res ne razlikujejo od tistih odvzetih na nižini. Menimo namreč da ta dokaz še ni bilo predstavljen v strokovni literaturi.

Ker bi lahko visoka varianca športnika v domnevno nedopingiranem obdobju izhajala tudi iz daljšega obdobja spremljanja in pogostega testiranja v času velikih vadbenih obremenitev, smo pod obljubljenostjo anonimnosti za potrebe diplomskega dela uspeli pridobiti nekaj longitudinalnih hematoloških podatkov (trenutnih in preteklih) poklicnih športnikov različnih tekmovalnih disciplin (kolesarji ($N=3$), tekači na smučeh ($N=3$), plavalci ($N=3$)), ki niso bili nikoli pozitivni na doping (Tabela 29). S tem smo želeli pridobiti informacije s katerimi bi bolje razumeli tako dolgoročne spremembe biokazalca [Hb] pri aktivnih športnikih obenem pa pokazali, da model biološkega lista penalizira športnike z visoko vrednostjo variabilnosti v [Hb]. Meritve športnikov so bile pridobljene v času njihove aktivne kariere pred uvedbo hematološkega oz. biološkega potnega lista (pred letom 2008). Vzorci krvi niso bili pridobljeni nenapovedano, temveč prostovoljno z namenom spremljanja njihovega zdravstvenega stanja. Vzorci krvi torej niso bili pridobljeni v okviru boja proti doping. Čeprav podatki o morebitnem bivanju na višini niso dobro znani (navedeni športniki ga po zagotovilih vira v opazovanem obdobju naj ne bi izvajali) pa so znani podatki o analiznih

inštrumentih (vse meritve pri vseh merjencih so bile narejene z Advia 120 inštrumentom, kar pomeni da podatki ustrezajo zahtevam za podatke, ki se ocenjujejo z modelom biološkega potnega lista). Kljub temu pa ostajajo neznani predanalizni pogoji (neznani protokol odvzema), kar lahko vodi v večje variacije pridobljenih podatkov. Športniki so bili merjeni pogosto (enkrat na dva meseca ali več) v daljšem časovnem obdobju (12 mesecev ali več) (Tabela 28).

Tabela 28.: Povprečno število meritev športnikov na leto*.

	Nedopingirani športniki (N = 5)	Domnevno dopingirani športniki (N = 4)
Povprečno št. meritev/leto	8,6	8,5

*V primeru da so bili za športnika dostopne meritve pridobljene v obdobju opazovanja daljšega od enega koledarskega leta, so bili v analizi variance upoštevane vse dostopne meritve. Vsi podatki v prilogi 8.

Rezultati in diskusija:

Tabela 29: Variance znotraj posameznika (ang. WS_VAR) za [Hb] vseh športnikov. Pri vsakem športniku v izračunu upoštevane vse meritve.

Tabela 29	WS_VAR za [Hb]	Specifičnost 99 %	Specifičnost 99,9 %
Športnik 1	154.2	Abnormalno	Abnormalno
Športnik 2	23		
Športnik 3	30.8		
Športnica 4	18.7		
Športnik 5	86.8	Abnormalno	
Športnik 6	14		
Športnik 7	24.7		
Športnik 8	18.1		
Športnik 9	11		
POVP WS_VAR	42.4		

Izračun varianc znotraj športnika za [Hb] pri vsakem športniku, je razkril zelo različne variance dolgoročnih zaporedij med posamezniki. Program biološkega lista je le pri enem športniku njegovo zaporedje pri zahtevani specifičnosti (specifičnost zahtevana za dokazovanje doping prekrška povečevanja prenosa kisika je 99,9 % [73]) prepoznal kot

abnormalo (Športnik 1, Tabela 29). Blizu abnormalnosti pa je bilo tudi zaporedje športnika 5 (percentil napovedne porazdelitve zaporedja za [Hb] je 99,7 %). Pri specifičnosti 99 %, kar je po nekaterih virih kriterij za ogled anonimnega profila s strani ekspertne skupine [64, 141], je program biološkega lista identificiral dva športnika (Športnik 1 in 5). Ugotovimo lahko, da program biološkega potnega lista uspešno prepozna izjemno visoke variance [Hb] znotraj posameznega športnika. Ker pa dolgoročne meritve teh športnikov kažejo zelo različne variance med različnimi posamezniki obstaja možnost, da imajo nekateri od teh naravno visoke variance [Hb] znotraj posameznika, lahko pa gre tudi za neodkrите doping prakse v preteklosti. Natančen pregled zaporedij [Hb] pri športniku št. 1 in 5 je razkril, da pri obeh zaporedjih močno odstopa le ena vrednost (odstranitev le te vrne varianco zaporedja v normalnem območju). To se zdi neobičajno. Pri enem vrednost odstopa močno navzgor, kar je skladno z pozitivnim vplivom na športni nastop (doping), pri drugem pa navzdol (bolezen (krvavitev), nadhidracija ali odvzem krvi z namenom dopinga). Ker je že sama analiza dolgoročnih zaporedij [Hb] pri kar dveh športnikih razkrila abnormalnosti, ki bi jih lahko razlagali tudi kot dokaz doping praks, smo z modelom biološkega potnega lista ocenili še drug biokazalec pri športnikih. V primeru spremljanja [Hb] in OFF – hr vrednosti (pri specifičnosti 99,9 %), ki se trenutno uporabljata za dokazovanje doping prekrška [72], so abnormalno vrednost ali zaporedje vrnil kar štirje športniki (Športnik(-ca) 1, 4, 5 in 6) od devetih (44 %). Ta ugotovitev nas je pripeljala do zaključka, da se v omenjeni skupini, kljub domnevni nedolžnosti, potencialno nahaja večje število dopingiranih športnikov. Meritve teh športnikov je torej potrebno interpretirati skrajno previdno, ter jih ne zamenjevati z meritvami, ki bi jih lahko našli pri dolgoročnih hematoloških profilih nedopingiranih športnikov. Podatki teh športnikov zato po našem mnenju ne morejo služiti oceni dolgoročnih sprememb [Hb] značilnih za nedopingirane vrhunske športnike. Zato smo ta namen opustili.

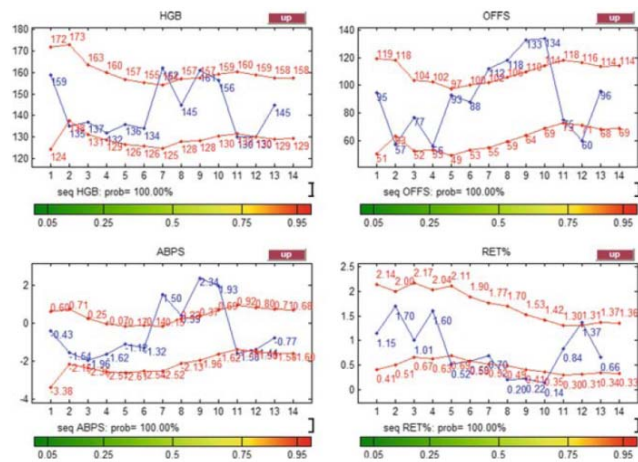
Ugotovimo lahko da visoke variance športnika v domnevno nedopingiranem obdobju na podlagi naših podatkov ne moremo razložiti kot pričakovane za nedopingiranega športnika. Kljub temu ne moremo izključiti možnosti, da je le ta lahko le posledica naravne danosti (sicer izjemno redka) in/ali pogostega bivanja na visoki nadmorski višini. Prav tako menimo, da vprašanje variance zaporedij meritev [Hb] pri aktivnih športnikih, ki so pogosto merjeni ter med sezono izpostavljeni velikim vadbenim obremenitvam, ki dokazano vplivajo na merjene

krvne biokazalce [66] (čeprav nekatere raziskave opravljene na majhnih vzorcih temu nasprotujejo [130]), kljub predstavljeni porazdelitvi Sottasa in sodelavcev [63] še ni ustrezno rešeno. Še posebej zato, ker so od le te odvisne vse nadaljne ocene krvnih meritev, ki jih podaja biološki potni list. V ustreznost te porazdelitve, vključno z izbrano univerzalno varianco za [Hb], je zaradi pomembnosti le te dvom več kot upravičen. Še posebej zato ker je bila porazdelitev varianc [Hb] nedopingiranih športnikov po Sottasu osnovana na kratkih zaporedjih in majhnih vzorcih (595 odvzetih vzorcev na 101 športniku, povprečno 5,9 vzorca/osebo) prav tako pa tudi validacija ustreznosti merjenja abnormalnega zaporedja kljub odlični diskriminativni moči ABPS kazalca (82 kontrolnih subjektov z 957 meritvami (11,7 meritev/osebo) ter 16 dopingiranih subjektov z 255 meritvami (16 meritev/osebo)) [63] ob tem da vadbene obremenitve, ki so jim bili ti športniki izpostavljeni niso znane. Ali lahko te predpostavke upravičeno prenašamo na kolesarje merjene pogosto v daljšem časovnem obdobju (npr. pri osumljenem športniku 21 meritev v 18 mesecih) ob pogostih in težko ponovljivih ekstremnih obremenitvah (ki morda lahko izzovejo velike variance zaporedja meritev brez dopinga), je potrebno po našem mnenju dokazati. Menimo da ti argumenti še niso bili ustrezno predstavljeni v strokovni literaturi. Če izjemno dobro ne poznamo mogočih variabilnosti biokazalcev pri športnikih, ne moremo in ne smemo na osnovi ocenjevanja le teh uvesti sankcij proti športniku. V nasprotnem primeru je po našem mnenju namreč mogoče pričakovati večje število lažno pozitivnih športnikov, ki imajo v teh primerih minimalne možnosti obrambe.

Če izhajamo iz predpostavke, da porazdelitev Sottasa in sodelavcev drži, ter da je način ocenjevanja zaporedja ustrezen, pa lahko naši podatki na drugi strani služijo kot dokaz sprememb, ki se jih lahko pričakuje pri športnikih, ki so izvedli potencialne doping prakse ali so bili izpostavljeni bolezni. Kakšne spremembe variance znotraj posameznika za [Hb] lahko pričakujemo v teh primerih, zaradi težave zbiranja teh podatkov, namreč ni dobro znano. Edini dokumentiran primer za skupino elitnih športnikov, ki je bila delno sestavljena iz dopingiranih športnikov, je povprečna vrednost 39.9 [52], kar je nad 90 percentilom pričakovane porazdelitve za nedopingirane športnike po Sottasu [63]. Drugo oceno variance dopingiranega športnika smo dobili iz objavljenih krvnih podatkov športnika, ki je bil v obdobju opazovanja pozitiven na homologno krvno transfuzijo (Slika 42) [71]. Varianca 13.

zaporednih vrednosti odvzetih v obdobju štirih let je 126,9, ob tem da je pričakovana sprememba [Hb] le navzgor, ne pa tudi navzdol kot pri odvzemu krvi z namenom poznejše reinfuzije pri tehniki avtologne krvne transfuzije. To je podobno vrednosti variance zaporedja [Hb], ki jo dosega športnik na osnovi vseh meritev, še bolj pa v primeru če se upoštevajo le meritve iz leta 0002 (varianca 141,8). Naj še enkrat omenimo, da je (naj)višja varianca [Hb] tudi v primerjavi z športnikom, ki je izvedel homologno krvno transfuzijo, v primeru izvedbe avtologne krvne transfuzije (zaradi vmesne samodejne obnove krvne slike) pri dopingiranem športniku pričakovana.

Slika 42.: Dolgoročno spremljanje vzdržljivostnega športnika, kateremu so z uporabo neposredne metode (dokaz prisotnosti tujih eritrocitov) dokazali zlorabo homologne (tuje) krvne transfuzije [71]. Prikazana je dinamika indirektnih pokazateljev krvnega dopinga [71]: [Hb] (HGB), OFF – hr vrednost (OFFS), ABPS in delež retikulocitov (RET%).



Povprečna varianca zaporedja [Hb] skupine domnevno dopingiranih športnikov, osnovane na abnormalnosti meritev [Hb] ali OFF – hr vrednosti pri specifičnosti 99,9 %, je 68,4 (Tabela 30). Na osnovi podatkov naše (majhne) skupine, lahko ugotovimo da domnevno dopingirani športniki prikazujejo večjo varianco meritev [Hb] kot jo pričakujemo pri nedopingiranih športnikih, kar je v skladu z konceptom biološke lista [64]. Kljub temu pa podrobnejši pregled vrednosti pokaže, da polovica skupine ne prikazuje abnormalne variance meritev [Hb]. To kaže na to, da razlike v OFF – hr vrednosti, ki kombinira vrednosti [Hb] in % retikulocitov, izhajajo iz sprememb % retikulocitov, ne pa sprememb [Hb]. Podroben pregled podatkov to domnevo potrdi (vsi podatki v prilogi 8). Tudi v primeru teh dveh športnikov (Športnica 4 in športnik 6) v

Tabela 30	WS_VAR za [Hb]
Športnik 1	154.2
Športnik 4	18.7
Športnik 5	86.8
Športnik 6	14
POVP WS_VAR	68.4

zaporedju vrednosti % retikulocitov močno odstopa le ena vrednost. To se zdi neobičajno in je pri tekmujočih športnikih z veliko verjetnostjo povezano z izvedbo doping praks, v tem primeru ko obe vrednosti odstopata močno navzgor, z domnevno občasno uporabo rHuEPO (Slika 40). Ugotovimo torej lahko, da meritve [Hb] pri športniku, ki jih program biološkega potnega lista prepozna kot normalne ne izključujejo možnosti da je športnik dopingiran. Lahko gre le za posameznika ki prikazuje nizko varianco znotraj posameznika za [Hb], ki je tudi v doping obdobju še v okviru “pričakovanih sprememb”. Na ta problem je že leta 2007 opozoril tudi dr. Sottas sam [53]. Zaradi tega razloga se v biološkem potnem listu hkrati spremlja več med seboj neodvisnih kazalcev odzivnih na krvni doping (delež retikulocitov), vključno z multiparametričnimi kazalci (OFF – hr, ABPS...). Čeprav je to s stališča boja proti doping u razumljiva strategija, pa to dejstvo na drugi strani povečuje možnost odkritja abnormalnih vrednosti tudi pri športnikih, ki so nedolžni (lažno pozitivni). Govorimo o učinku multiplega testiranja. Povečevanje števila testov na populaciji z nično prevelenco namreč povzroči povečanje verjetnosti pridobitve lažno pozitivnega rezultata testa [4]. Dr. Faber je na konferenci o novih poteh v kolesarstvu (27 – 28. September 2010 v Avstraliji) na svojem predavanju plastično demonstriral ta problem: *»Predstavljajmo si loterijo z le eno dobitno srečko. Zmaga v tej loteriji je indirektni dokaz goljufanja, saj večina poštenih igralcev izgubi. Verjetnost dobitka brez goljufanja posameznik povečuje z številom kupljenih srečk. Analogno se v modelu biološkega potnega lista verjetnost za prikaz »abnormalnega profila« povečuje z večanjem števila testov, ki jim jih je posameznik izpostavljen. To ni bilo upoštevano v sedanjem konceptu biološkega potnega lista. Ko je športnik obtožen, ni obrambe. Športnik enostavno ne more razložiti slučajnega dogodka.«* Povečevanje števila antidoping testov oz. tudi povečanje spremljanja večjega števila krvnih biokazalcev z namenom dokazovanja doping prekrškov v okviru modela biološkega potnega lista, teoretično vodi v večje število lažno pozitivnih športnikov. Vendar pa faktorja povečanja ne moremo izračunati, saj je odvisen od korelacije med temi spremenljivkami, ki pa javno ni znana. Zato menimo, da informacije pridobljene z modelom biološkega potnega lista, ne morejo in ne smejo biti uporabljene za uvedbo sankcij proti športniku. V besedah dr. Fabra [145]: *»Najdejo eno ali dve abnormalni vrednosti in na podlagi tega kar vidijo, postavljajo hipoteze. Nato potrdijo krivdo na podlagi istih podatkov. Če postaviš sum na osnovi istih podatkov na katerih dokazuješ krivdo je to zloraba podatkov. Potrebuješ neodvisne podatke, da potrdiš hipotezo.«*

V uradnem poročilu UCI za leto 2009 je navedeno da so v dveh letih (2008 in 2009) podatki biološkega potnega lista vodili v 16 doping primerov [42]. Pri desetih so ob tarčnem testiranju, ki je bilo izpeljano na podlagi predlogov tričlanskih ekspertnih skupin oblikovanih za vsak primer posebej, dokazali prisotnost prepovedane snovi v njihovih bioloških vzorcih [42]. Predlogi o tarčnem testiranju so bili s strani ekspertnih skupin oblikovani po ogledu športnikovega biološkega lista [42]. Pri šestih primerih pa so bili eksperti na podlagi podatkov njihovega biološkega lista tako prepričani o prepovedani metodi prenosa kisika da so UCI priporočili sankcioniranje športnika [42]. Slednje lahko razlagamo tudi z dejstvom, da kljub domnevni izvedbi tarčnih testiranj športnikov pri njih niso dokazali prisotnosti prepovedanih snovi oz. metod. To je opravičljivo le v primeru, da se v model ocenjevanja krvnih vrednosti ne dvomi. Če to ne drži (po našem mnenju ustrezni argumenti o pomembnih predpostavkah modela biološkega lista do tega trenutka še niso bili predstavljeni strokovni jasnosti, zato menimo da lahko pozitiven doping primer izhaja tudi iz neustrezne interpretacije meritev z modelom biološkega potnega lista), je potrebno za pozitiven doping primer med drugim dokazati prisotnost prepovedane snovi ali metode v bioloških vzorcih športnika. Neodvisen dokaz o zlorabi avtologne krvne transfuzije pri športnikih, ki so na podlagi informacij njihovega biološkega lista osumljeni uporabe te prepovedane tehnike, bi po našem mnenju bila detekcija telesu tujih snovi v vzorcih krvi in urina športnika, ki se razširijo med odstranitvijo, shranjevanjem in reinfuzijo krvi [71]. Primeri le teh so metaboliti plastifikatorjev, ki se sproščajo iz krvnih infuzijskih vrečk ali ostanki topil, ki se uporabljajo za shranjevanje krvi [71]. Čeprav obstaja prepričanje, da direktno dokazovanje v primeru avtologne krvne transfuzije ni najbolj primerno, saj dokazuje le elemente procesa transfuzije, ne pa substance same (npr. športniki bi lahko začeli uporabljati zbirnike krvi, ki ne bi odpuščali plastifikatorjev in aditivov...), pa bi bila prisotnost ali večja vsebnost plastifikatorjev v določenih vzorcih športnika in odsotnost le teh v ostalih, v vzorcih že osumljenega športnika po našem mnenju neodvisen dokaz za potrditev po mnenju ekspertov najbolj verjetne hipoteze na osnovi krvnih podatkov športnika, to je, zlorabe prepovedane metode avtologne krvne transfuzije. Po poročanju medijev trenutno poteka validacija teh metod [142]. V primeru našega osumljenega športnika bi pričakovali prisotnost oz. večjo vsebnost plastifikatorjev v zadnjem vzorcu krvi športnika (29.8.0002), odvzetem po domnevni izvedbi reinfuzije krvi, ter odsotnost oz. manjšo vsebnost le teh v vseh ostalih odvzetih krvnih

vzorcih tega športnika. Odsotnost le teh v vzorcih osumljenega športnika pa bi bil dokaz proti najbolj verjetni hipotezi. Na koncu moramo omeniti omejitve našega pristopa, ki so naslednje: neupoštevanje bivanja na višini je lahko penaliziralo nedolžne športnike, ki so bivali na višini a njihovega bivanja na višini nismo upoštevali v analizi krvnih vrednosti. Obratno ne velja: neupoštevanje vpliva višine ni moglo športnika uvrstiti med nedopingirane. Model biološkega potnega lista, ki uporablja določeno varianco znotraj posameznika, lahko pri velikem številu zaporednih meritev v večji meri identificira tiste posameznike, ki naravno (biološko) dosegajo večjo variance biokazalcev, kot npr. v času bolezni, ki značilno vpliva na krvne kazalce. Ni znano ali so omenjeni športniki v času opazovanja utrpeli bolezen ali poškodbo.

V letu 2009 pa so bili izraženi tudi prvi dvomi o ustreznosti statističnih metod biološkega potnega lista za ocenjevanje dokazov [77, 78]. Podrobneje so predstavljeni nekateri pomisleki, ki jih je podal dr. Faber že v okviru primera Pechstein [78]. Dobesedna navedba je v poševnem tisku.

Namen biološkega potnega lista?

Dr. Sottas trdi, da sledijo naslednjemu namenu: “The aim is to allow anti-doping organizations to bring reliable evidence of blood manipulation in front of a disciplinary panel [63].” (Cilj je, da se protidopinškim organizacijam omogoči pridobiti zanesljive dokaze krvne manipulacije z namenom predstavitve pred disciplinsko komisijo). Ta razlog je močno in dobro predstavljen v strokovni literaturi [63]. Razloči se lahko dve stopnji:

- *Med prvo stopnjo se podatki športnika zbirajo daljše obdobje, za katero se domneva da je športnik “čist”. Ti podatki služijo izračunu preteklega izhodišča, ki je prirejen vsakemu posamezniku. Z drugimi besedami, v biološkem potnem listu posameznikove meje nadomestijo populacijske meje, ki so uporabljene v običajnih pristopih.*
- *Med drugo stopnjo se novi podatki primerjajo z posameznikovimi mejami in odstopanja so ocenjena z statistično pridobljenim odločitvenim pravilom. Preprosto rečeno, na osnovi preteklega izhodišča, številke pridobljene v drugi stopnji govorijo same zase.*

Ponovno je treba potrebno poudariti, da se populacijske meje nadomestijo z individualnimi omejitvami. To zahteva identifikacijo obdobja, za katerega se predvideva da je bil športnik »čist«.(opomba avtorja diplomskega dela: to pravzaprav ni nujno, je pa dejstvo da bo

“prenehanje obdobja dopingiranja” lahko vodilo v abnormalne krvne vrednosti (=povečalo varianco meritev biokazalcev). Na konferenci o novih poteh v kolesarstvu (27 – 28. September 2010 v Avstraliji) so nekateri strokovnjaki zato trdili, da biološki potni list nekatere kolesarje sili v nepretrgano dopingiranje z mikro odmerki [64]) *Kako to, da ta ambiciozen cilj ni bil dosežen v primeru športnice? Ali enostavneje: številke ne govorijo same zase? Na to odgovori že dr. Sottas sam, kjer pravi: “Kakorkoli že pa bi predlagal, da se predvidijo ene od omenjenih oblik krvnega dopinga le v primeru, da obstajajo trdni dokazi o tem, da športnik ne kaže katere od klinično tihih krvnih bolezni. Zato močno priporočam izvedbo dodatnih testov da se ta možnost izključi.”*Dr. Sottas torej pravi da ugotovljene abnormalnosti lahko izvirajo tudi iz neodkrite bolezni ali drugih vzrokov. Potrebno je poudariti, da bi pravilna uporaba načel in konceptov biološkega potnega lista morala izključiti “to možnost” že od vsega začetka.«

V članku iz leta 2009 dr. Sottas namen biološkega lista že utemeljuje drugače, namreč: *»abnormalen profil (točen ali dolgoročen) utemeljen s strani Bayesovega modela daje ustrezno osnovo za začetek podrobnega pregleda primera, ki ga izvajajo ustrezni strokovnjaki (v primeru krvnega dopinga večinoma hematologi). Šele njihova ekspertiza bo dala kvalitativno interpretacijo kvantitativnih vrednosti dokazov, ki jih daje Bayesov model [4].«*

Način izračuna lažno pozitivnega rezultata?

*V znanstvenih člankih biološkega potnega lista se predpostavlja sprejemljivo verjetnost (1:1000) lažno pozitivnega rezultata, čeprav je ta verjetnost desetkrat višja od vrednosti ki jo predstavlja Sonksen [143]: “Športne oblasti niso nikoli objavile “sprejemljivega rizika” (za lažno pozitiven rezultat doping testa), toda delavnica v okviru našega projekta GH-2000 (projekt razvoja testa za dokazovanje zlorabe rekombinantnega humanega ravnega hormona), na kateri je sodeloval tudi starejši odvetnik MOK-a se je sporazumela da je riziko 1:10.000 “sprejemljiv”. Ta številka se je pozneje uporabila v številnih pogovorih in objavah.”*Zanesljiva ocena resnične številke lažno pozitivnih, ki se jih doseže v praksi, ne obstaja. Razlog je očiten, lažno pozitivni niso odkriti. Kakorkoli že, pa se lahko smiselna domneva postavi na osnovi podatkov, ki sta jih podala raziskovalca Van Eenoo in Delbeke, ki

sta opazila da se pozitivni A test izpodbija v približno 0,5 do 1 % pozitivnih testov (dolgoročno povprečje v obdobju: 1996-2007) [143]. Glede na to, da dobimo pozitiven rezultat pri približno 2 % vzorcev, lahko z preprostim množenjem pridemo na verjetnost izpodbijanega A-vzorca kot takega med 1 na 10.000 in 2 na 10.000. To naj bi bilo dejansko zgornje območje sprejemljivega rizika lažno pozitivnega rezultata: več lažno pozitivnih, več ljudi bi se verjetno pritožilo. Iz tega sledi, da je že verjetnost, ki jo je predpostavil Sonkson relativno visoka. Če bi bila tarčna vrednost 1 pri 10.000 dejansko dosežena v praksi, bi bil znaten del izpodbijanih A – vzorcev dejansko lažno pozitivnih (skoraj vsi pozitivni bi bili lažno pozitivni, kar najverjetneje ne drži, op. avt. diplome). Iz tega sledi, da bi verjetnost izbrana v kontekstu biološkega potnega lista hitro vodila v desetkratno povečanje števila lažno-pozitivnih, čez tiste, ki so prisotni že sedaj. Izbira takšne verjetnosti se zdi neodgovorna. Dr. Sottas do sedaj ni podal načina izračuna lažno pozitivnega rezultata. Dobro je namreč znano, da sta za ustrezen izračun potrebna dve značilnosti (specifičnost in občutljivost) (doping testa op. avt. diplome), kot tudi populacijske značilnosti (razširjenost dopinga v preučevani populaciji (op.avt.diplome: podatek, ki ga je praktično zelo težko natančno določiti, prav tako je mogoče da se nenehno spreminja)).Pravilen izračun verjetnosti lažno pozitivnega rezultata je naslednji:

Primer uporabe Bayesovega teorema je ocena testnih rezultatov. Predpostavimo da določen doping test dosega 99 % občutljivost in 99 % specifičnost. To pomeni da bo pravilno identificiral dopingiranega športnika v 99 % primerov, ter obenem da bo pravilno identificiral neuporabnika v 99 % primerov. To se zdi relativno točen test, toda Bayesov teorem se lahko uporabi tudi v smeri da se pokaže visoko verjetnost da le ta identificira neuporabnika dopinga kot uporabnika le tega. Predpostavimo da se korporacija odloči za testiranje njenih uslužbencev na doping in da le 0,5 % uslužbencev dejansko uporablja drogo. Kakšna je verjetnost da ob pozitivnem doping testu, uslužbenec dejansko je uporabnik droge? Predpostavimo da "D" predstavlja uporabnika dopinga in "N" predpostavlja da je le ta neuporabnik dopinga. Naj bo "+" dogodek pozitivnega doping testa. Vedeti moramo naslednje:

- $P(D)$ je verjetnost da je uslužbenec uporabnik dopinga, ne glede na vse ostale informacije. Ta je 0,005, saj je resničnih uporabnikov doping 0,5 %. To je prihodna verjetnost (ang. prior probability) D -ja.
- $P(N)$ ali verjetnost da uslužbenec ni uporabnik dopinga. Ta je $1 - P(D)$ ali 0,995.
- $P(+|D)$ ali verjetnost da je testni rezultat pozitiven, glede na to da je uslužbenec uporabnik dopinga. To je 0,99, ker je test 99 % občutljiv.
- $P(+|N)$ ali verjetnost da je test pozitiven, glede na to da uslužbenec ni uporabnik dopinga. To je 0,01, glede na to da lahko test da lažno pozitiven rezultat za 1 % neuporabnikov.
- $P(+)$ ali verjetnost pozitivnega rezultata, ne glede na ostale informacije. To je 0,0149 ali 1,49 %, ki se dobi z dodajanjem verjetnosti da se bo dobil pozitiven rezultat ($=0,99 \times 0,005 = 0,495$ %) plus verjetnost da se dobi lažno pozitiven rezultat ($=0,01 \times 0,995 = 0,995$ %). To je prihodna verjetnost (ang. prior probability) $+$.

Na podlagi teh informacij lahko izračunamo prihodnjo verjetnost (ang. prior probability) $P(D|+)$ uslužbenca, ki je bil pozitiven na doping testu, da je dejansko uporabnik dopinga:

$$\begin{aligned}
 P(D|+) &= \frac{P(+|D)P(D)}{P(+)} \\
 &= \frac{P(+|D)P(D)}{P(+|D)P(D) + P(+|N)P(N)} \\
 &= \frac{0,99 \times 0,005}{0,99 \times 0,005 + 0,01 \times 0,995} \\
 &= 0,3322
 \end{aligned}$$

Kljub takšni specifičnosti in občutljivosti testa, je verjetnost da je uslužbenec, ki je bil pozitiven na doping testu, res uporabnik dopinga le 33 %. To dejansko pomeni, da je za tega uslužbenca bolj verjetno da ni uporabnik dopinga. Bolj redko je stanje, ki ga testiramo, večji delež pozitivnih testov

bo lažno pozitivnih. Biološki potni list se predstavlja kot forenzični pristop. Vendar ta trditev ne drži. Ravno obratno, borci proti dopingu bi morali resno razmisliti o prilagoditvi sistema na nivo sprejemljivih forenzičnih metod. Trditev: "Obstaja trdna statistična podlaga, na kateri lahko zaključimo da rezultati domnevnega osumljenca izhajajo iz uporabe prepovedane metode", predpostavlja, da so bili materialni dokazi (=rezultati krvnih testov) ustrezno ocenjeni, kar v primeru biološkega potnega lista ne drži. Brez ocene verjetnosti lažno pozitivnega sklepa, konstrukt "trdna statistična podlaga" nima nobenega pomena.«

»Argument iz nevednosti

*Argument iz nevednosti, poznan tudi kot argumentum ad ignorantiam ("pritožba na nevednost"), argument pomankanja domišljije ali negativni dokaz, je logična zmota pri kateri se trdi, da je domneva resnična samo zato, ker ni bilo dokazano nasprotno, ali je napačna samo zato, ker ni bilo dokazano da je resnična."*Običajno v argumentu iz osebne neprepričanosti ali argumenta iz nevednosti, govorec meni, ali trdi, da je nekaj napačno, nemogoče, ali ni jasno njemu osebno in poskuša uporabiti to vrzel v znanju kot "dokaz" v prid alternativnemu pogledu na njegovo izbiro. Primeri te zmote so pogosto očitne v izjavah mnenja, ki se začnejo: »Težko je razumeti kako...,« ali »Očitno je, da ... " (če je" očitno ", uporabljena z namenom predstavitve zaključka, kot pa konkretnega dokaza v podporo določenega pogleda)." Dva najpogostejša argumenta iz nevednosti, oba varljiva, se lahko skrčita na dve spodnji obliki:

- *Nekaj je trenutno nerazložljivo ali razloženo, zato ni (oz. ne more biti) res.*
- *Ker se zdi, da obstaja pomanjkanje dokazov za eno hipotezo, se druga izbrana hipoteza šteje za dokazano.*

Zakon

V večini sodobnih kazensko pravnih sistemih obstaja domneva nedolžnosti, in zato je odgovornost tožilstva da dokaže (običajno "onkraj razumnega dvoma"), da je tožena stranka dejansko storila določeno kaznivo dejanje. Logična zmota je domnevati, da že samo pomanjkanje dokazov o nedolžnosti kriminala nadomesti dokaz o krivdi. Podobno, le pomanjkanja dokazov o krivdi se ne more sprejeti kot dokaz o nedolžnosti. Kot hipotetičen primer "argumenta iz osebne neprepričanosti", ki je že opredeljen zgoraj, predvidevajmo da nekdo trdi:

- *Za osebo P si ne morem predstavljati kakršnega koli drugega načina izvršitve ukrepa X, ne da bi ta naredil kaznivo dejanje Y.*
- *Zato mora biti oseba P krivega kaznivega dejanja Y*

Argument iz nevednosti ne bi smel biti, ne glede na verjetnost, uporabljen kot podpora k odločitvi o krivdi.«

»Pristranskost obravnavanja dokazov

V psihologiji in kognitivni znanosti pristranskost izhaja iz težnje po iskanju ali interpretaciji novih informacij na način, ki potrjuje lastne predsodke in iracionalno izogibanje informacij in njihovih interpretacij ki nasprotujejo tem pogledom. Pristranskost je vrsta kognitivnih zmot in predstavlja napako induktivnega sklepanja, ali oblike pristranskosti izbora k potrditvi hipoteze v raziskavi ali zavračanja alternativne hipoteze.“

Npr. trditev, da je model biološkega potnega lista neustrezen, ker “domnevno neproblematični krvni podatki športnika” vrnejo abnormalno oceno njegovih krvnih rezultatov. Gre za lasten predsodek o tem, da je športnik dejansko nedolžen.

Zmota tožilca

Za presojanje alternativnih hipotez abnormalnih krvnih vrednosti je pri UCI imenovana ekspertna komisija treh ekspertov, ki na podlagi športnikovega profila, drugih dostopnih informacij (podatki iz ADAMS, tekmovalni koledar, razlaga športnika) presodi katera od hipotez je bolj in katera manj verjetna. Nato poda svoje ekspertno mnenje o primeru. Le v primeru, da vsi trije neodvisni eksperti podajo enako hipotezo o vzroku abnormalnega profila (soglasno mnenje), se proti športniku uvede disciplinski postopek. Na nedavni konferenci o novih poteh v kolesarstvu (27 – 28. September 2010 v Avstraliji) se pravni strokovnjaki niso strinjali z načinom, kako je bila obtožba v primeru športnika podana [64]. Menijo namreč, da ekspertna skupina ne more oziroma ne sme podajati verjetnosti krivde (“... *abnormalnega profila ni mogoče razložiti na noben drug način, kot da gre za uporabo prepovedane metode...*”) to lahko naredi le neodvisna inštitucija (CAS, WADA...). Napaka strokovnjakov leži v zamenjavi dveh različnih vprašanj, namreč [64]:

- 1) Kakšna je verjetnost, da se najde dokaze, ob predpostavki da je obtoženi nedolžen?
- 2) Kakšna je verjetnost da je obtoženi nedolžen glede na dokaze?

Razlika med vprašanjema ni očitna takoj, vendar bi morala postati jasna, če se predpostavi dva različna vprašanja z enako logično strukturo:

- 1) Kakšna je verjetnost da ima žival štiri noge, v primeru da je krava?
- 2) Kakšna je verjetnost da je žival krava, v primeru da ima štiri noge?

V primeru biološkega potnega lista se lahko dokaz ekspertnega mnenja postavi na dva načina:

- 1) Kakšna je verjetnost za abnormalno krvno vrednost ob tem, da je bil športnik na višini?
- 2) Kakšna je verjetnost, da je športnik nedolžen ob prisotnosti abnormalnih krvnih vrednosti?
- 3) Kakšna je verjetnost abnormalne krvne vrednosti ob tem, da je športnik izvedel krvni doping?
- 4) Kakšna je verjetnost, da je športnik izvedel krvni doping ob prisotnosti abnormalnih krvnih vrednosti?

Izjavi 1) in 3) sta dovoljeni kot dokaz, medtem ko izjavi 2) in 4) nista. WADA smernice o biološkem potnem listu trdijo, da je mnenje Ekspertne komisije o visoki verjetnosti, da je športnik izvedel krvni doping glede na njegove krvne vrednosti nedopustno podobno izjavi 2) in 4) [64]. Ta nedopustnost je znana kot zmota tožilca [64]. V primeru postopka biološkega potnega lista je zmota tožilca institucionalizirana v trenutku, ko Ekspertna komisija poda njihovo "mnenje" [64].

Ugotovimo lahko:

Ocenjevanje krvnih biokazalcev z modelom biološkega lista je upravičeno le na veljavnih predpostavkah modela. Nedavno so bili izpostavljeni tehtni argumenti, ki določene predpostavke tega modela, do pridobitve tehtnih protiargumentov, postavljajo pod vprašaj. Prvič: ni določena ustrezna porazdelitev varianc zaporedij znotraj posameznika za [Hb] pri nedopingiranih kolesarjih ki so zelo pogosto testirani v daljšem časovnem obdobju in obenem izpostavljeni velikim vadbenim obremenitvam saj je le ta lahko različna od trenutno predstavljene. Drugič: ni korekcije učinka multiplega testiranja. Tretjič: ni podane ocene verjetnosti lažno pozitivnega rezultata. Četrtič: nedopustna nedorečenost načina upoštevanja bivanja/treniranja na višini. Vse to lahko vodi v večje število lažno pozitivnih doping primerov športnikov če se meritve krvnih biokazalcev pri različnih športnikih ocenjuje z modelom biološkega potnega lista. Nedorečenost bivanja na višini potrjujejo tudi naši podatki.

Naši podatki tudi potrjujejo, da program biološkega potnega lista (Athlete's Biological Passport, verzija 2.2.1) ne podaja enakih vrednosti mej, kot jih dajejo naši izračuni podani na osnovi sledenja navodilom tehničnega dokumenta. Lahko gre za napako naših izračunov, napako predpisov tehničnega dokumenta ali napako programa. Prav tako način trenutnega ocenjevanja abnormalnih profilov športnikov s strani ekspertne skupine UCI, po mnenju nekaterih pravnikov, kaže na zmoto tožilca. Nenazadnje kljub razumni razlagi abnormalnega profila športnika po našem mnenju ostaja veliko prostora za pristransko obravnavo informacij pridobljenih z modelom biološkega potnega lista in velika nevarnost argumenta iz nevednosti. Zato menimo, da uvedba sankcij proti športniku, utemeljenih izključno le na informacijah izhajajočih iz uporabe modela biološkega potnega lista ni upravičena. Na podlagi predstavljenih argumentov hipoteze 8 ne zavrnamo. Model biološkega potnega lista, skupaj z analizo ekspertov, pa po našem mnenju lahko služi kot izjemno učinkovit način odkrivanja potencialno sumljivih športnikov.

Menimo, da bi prisotnost plastifikatorjev v določenih vzorcih športnika, že osumljenega uporabe avtologne krvne transfuzije kljub nedopustnim nedorečenostim modela biološkega potnega lista in neustreznosti upoštevanja bivanja na višini na podlagi katerih je bil ta sum podan, lahko bila dokaz za uvedbo sankcij proti športniku.

10. Zaključek

Biološki potni list je najnovejši model ocenjevanja sprememb indirektnih krvnih biokazalcev pri športnikih. Predstavlja formalni način potrjevanja normalnih fizioloških variacij biokazalcev. Abnormalni krvni profil športnika ne dokazuje uporabe dopinga, temveč dokazuje, da so v profilu vrednosti, ki jih program biološkega potnega lista ne more razložiti. Obstaja več alternativnih hipotez razlage abnormalnih krvnih vrednosti pri športniku. Za presojanje alternativnih hipotez abnormalnih krvnih vrednosti je pri UCI imenovana ekspertna komisija treh ekspertov, ki na podlagi športnikovega profila, drugih dostopnih informacij (podatki iz ADAMS, tekmovalni koledar, razlaga športnika) presodi, katera od hipotez je bolj in katera manj verjetna. V nalogi smo predstavili nekatere naše argumente o večji ali manjši možnosti alternativnih hipotez abnormalnega krvnega profila poklicnega športnika. Zavrnili smo vse alternativne hipoteze razen možnosti uporabe avtologne krvne transfuzije (hipoteza 3b), uporabe rHuEPO (hipoteza 2), bivanja na višini (hipoteza 4) ali napake modela biološkega potnega lista (hipoteza 8). Dodatne dokaze za upravičenost oz. neupravičenost hipoteze zlorabe avtologne krvne transfuzije bi po našem mnenju prinesla analiza prisotnosti plastifikatorjev v (določenih) krvnih vzorcih športnika. Ker je ocenjevanje krvnih biokazalcev z modelom biološkega lista upravičeno le na veljavnih predpostavkah modela, smo želeli preveriti ustreznost določenih predpostavk modela na osnovi krvnih profilov skupine slovenskih vrhunskih tekačev na smučeh in skupini športnikov različnih disciplin spremljanih v daljšem časovnem obdobju. Na osnovi naših meritev smo prišli do ugotovitve, da upoštevanje zunanjega dejavnika bivanja na višini pri tritedenskem bivanju na višini 1600 m.n.v. pri [Hb] ni potrebno, čeprav je po tehničnem dokumentu biološkega potnega lista predpisano za vsako meritev odvzeto na višini višji od 1000 m.n.v.. To kaže na neskladnost sprememb tega biokazalca z predvidenimi pri modelu biološkega potnega lista. Kljub temu pa zaradi majhnega vzorca teh ugotovitev ne moremo posploševati. Na osnovi skupine športnikov različnih disciplin pa smo prikazali način odkrivanja abnormalnih profilov športnikov. Pri tem smo opozorili na problem neustrezne korekcije učinka multiplega testiranja. Ugotovili smo tudi minimalna odstopanja vrednosti dovoljenih mej izračunanih na

podlagi navodil tehničnega dokumenta v primerjavi z izračunanimi z programom biološkega lista (Athlete's Biological Passport, verzija 2.2.1). Nenazadnje so bili nedavno izpostavljeni tehnični argumenti, ki določene predpostavke tega modela, do pridobitve tehničnih protiargumentov, postavljajo pod vprašaj. Menimo da ni določena ustrezna porazdelitev varianc zaporedij znotraj posameznika za [Hb] pri nedopingiranih kolesarjih ki so zelo pogosto testirani v daljšem časovnem obdobju in obenem izpostavljeni velikim vadbenim obremenitvam, saj je le ta lahko različna od trenutno predstavljene. Prav tako menimo da ni podana ustrezna ocena verjetnosti lažno pozitivnega rezultata. Nenazadnje menimo da je v okviru modela biološkega lista trenutno dopustna nedorečenost načina upoštevanja zunanjega dejavnika bivanja/treniranja na višini. Vse to lahko vodi v večje število lažno pozitivnih doping primerov športnikov če se meritve krvnih biokazalcev pri različnih športnikih ocenjuje z modelom biološkega potnega lista. Prav tako način trenutnega ocenjevanja abnormalnih profilov športnikov s strani ekspertne skupine UCI, po mnenju nekaterih pravnikov, kaže na zmoto tožilca. Nenazadnje kljub razumni razlagi abnormalnega profila športnika po našem mnenju ostaja veliko prostora za pristransko obravnavo informacij pridobljenih z modelom biološkega potnega lista in velika nevarnost argumenta iz nevednosti. Zato menimo, da uvedba sankcij proti športniku, utemeljenih izključno le na informacijah izhajajočih iz uporabe modela biološkega potnega lista ni upravičena. Model biološkega potnega lista, skupaj z analizo ekspertov, pa po našem mnenju lahko služi kot izjemno učinkovit način odkrivanja potencialno sumljivih športnikov.

11. Viri:

1. Müller RK. History of doping and doping control. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(195):1-18.
2. Catlin DH, Fitch KD, Ljungqvist A. Medicine and science in the fight against doping in sport. *J Intern Med* 2008;264(2):99-114.
3. Kustec Lipicer S. Cena uspeha, evalvacijska analiza javne politike boja proti dopingu v vrhunskem športu v Sloveniji. Fakulteta za družbene vede; Ljubljana 2007.
4. Sottas PE, Robinson N, Saugy M. The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(195):305-26.
5. Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ in sod. Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003;88(3):333-44.
6. <http://www.uci.ch/templates/UCI/UCI2/layout.asp?MenuId=MTU4ODY&LangId=1>
7. <http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Athlete-Biological-Passport/Operating-Guidelines/>
8. Osredkar J. Doping, definicija, lista prepovedanih snovi in postopkov. *Delo in zdravje* 2006;29(2):3-4.
9. <http://www.olympic.si/index.php?id=41>
10. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf
11. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/code_v3.pdf
12. Mitchell GJ (2007). Report to the commissioner of baseball of an independent investigation into the illegal use of steroids and other performance enhancing substances by players in major league baseball.
13. Osredkar J (1997). Doping in šport. Olimpijski komite Slovenije – Združenje športnih zvez, Ministrstvo za šolstvo in šport.
14. Eenoo PV, Delbeke FT. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control – New steroids and new insights. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2006;101:161-178.

15. Thevis M, Schänzer W. Synthetic anabolic agents: steroids and nonsteroidal selective androgen receptor modulators. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(195):99-126.
16. Massé R, Ayotte C, Bi HG in sod. Studies on anabolic steroids.III. Detection and characterization of stanozolol urinary metabolites in humans by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1989;497:17-37.
17. Hoffman JR, Kraemer WJ, Bhasin S in sod. Position stand on androgen and human growth hormone use. *J Strength Cond Res* 2009;23(5 Suppl):S1-S59.
18. Joyner M J. VO2max, blood doping, and erythropoietin. *Br J Sports Med* 2003;37:190–191.
19. <http://www.google.com/search?q=Blood+doping%2C+erythropoietin+and+altitude+training&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:en-US:official&client=firefox-a#q=Blood+doping.+erythropoietin+and+altitude+training&hl=en&client=firefox-a&hs=jRy&rls=org.mozilla:en-US:official&prmd=ivb&ei=RnXGTI-XMoiSOsn03LMB&start=10&sa=N&fp=9a951961ff9ba31d>
20. Varlet-Marie E, Gaudard A, Audran M in sod. Pharmacokinetics-pharmacodynamic modelling of recombinant human erythropoietin in athletes. *Int J Sports Med* 2003;24(4):252-7.
21. Lippi G, Franchini M, Kayser B. Comment to: recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica* 2008;93:313-4.
22. Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and analogs. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(195):251-294.
23. Ayotte C. Detection the administration of endogenous anabolic androgenic steroids. *Handb Exp Pharmacol* 2010;195:77-98.
24. Thevis M, Thomas A, Kohler M in sod. Emerging drugs: mechanism of action, mass spectrometry and doping control analysis. *J Mass Spectrom* 2009;44(4):442-60.
25. http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Scientific%20Events/Tokyo_Symposium_2009/WADA_Tokyo_Symposium_Dr.Schmndt.pdf
26. Štrukelj B, Kos J (2007). *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo. Ljubljana.
27. <http://www.cpjjournal.ca/doi/pdf/10.3821/1913-701X-143.3.134>

28. Španinger K, Debeljak N. Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija. Farm vest 2009;60: 279-285.
29. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. Nature 2000;405:635.
30. Gaudart A, Varlet-Marie E, Bressolle F in sod. Drugs for increasing oxygen transport and their potential use in doping. Sports Med 2003;33(3):187-212.
31. Osredkar J (1998). Vloga eritropoetina v športu in možnosti njegovega odkrivanja kot doping. V: Dnevi medicine športa – VIII / Dnevi medicine športa – VIII, Celje, 25. In 26.9.1998. Slovensko zdravniško društvo:118-123.
32. Wide L, Bengtsson C, Berglund B in sod. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. Med Sci Sports Exerc 1995;27:1569-76.
33. Robinson N, Schattenberg L, Zorzoli M in sod. Haematological analysis conducted at the departure of the Tour de France 2001. Int J Sports Med 2005;26(3):200-7.
34. Perneger T V. Speed trends of major cycling races: does slower mean cleaner? Int J Sports Med 2010;31(4):261–4.
35. Schumacher YO, Pottgiesser T, Ahlgrim C in sod. Haemoglobin mass in cyclists during stage racing. Int J Sports Med 2008;29(5):372-8.
36. Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. Haematologica 2003;88:570-581.
37. Žiberna L, Žiberna K, Štrukelj B, Mlinarič - Raščan I (2007). Možnosti uporabe genskega dopinga in problemi njegove detekcije. Farmacevtski vestnik;58:139–144.
38. Stray-Gundersen J, Videman T, Penttilä I in sod. Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or? Clin J Sport Med 2003;13(3):132-7.
39. <http://isu.org/vsite/vnavsite/page/directory/0,10853,4844-128618-129926-nav-list,00.html>
40. Lippi G, Franchini M, Guidi GC. Tour de chaos. Br J Sports Med 2007;41(10):625-6.
41. <http://www.cyclingnews.com/news/uci-reveal-biological-passport-data-in-defence-of-cycling>
42. <http://www.uci.ch/Modules/BUILTIN/getObject.asp?MenuId=&ObjTypeCode=FILE&type=FILE&id=NjI3MTQ&LangId=1>
43. Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR in sod. A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes.

- Haematologica 2000;85(6):564-72.
44. http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Scientific%20Events/Tokyo_Symposium_2009/WADA_Tokyo_Symposium_Dr.Saugy.pdf
 45. Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR in sod. Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. Haematologica 2002;87:1248-1257.
 46. Robinson N, Saugy M, Buclin T in sod. The interpretation of secondary blood markers can get hazardous in case of a discontinuous rHuEPO treatment. Haematologica 2002;87(6):ELT28.
 47. Mørkeberg J, Lundby C, Nissen-Lie G in sod. Detection of darbepoetin alfa misuse in urine and blood: a preliminary investigation. Med Sci Sports Exerc 2007;39(10):1742-7.
 48. Zorzoli M. Blood monitoring in anti-doping setting. V: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck (ured.) Recent advances in doping analysis (13). Sport und Buch Strauß, Köln 2005:255-264.
 49. Schumacher YO, Grathwohl D, Barturen JM in sod. Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists. Are the control values for blood testing valid? Int J Sports Med 2000;21(5):380-5.
 50. Robinson N, Mangin P, Saugy M. Erythropoietin Abuse in Sport. Sysmex J Int 2003;13(2):75-77.
 51. Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a “reference change” for comparing two consecutive measurements. Clin Chem 1983;29:25-30.
 52. Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO. A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. Haematologica 2006;91:356-363.
 53. Sottas PE, Baume N, Saudan C in sod. Bayesian detection of abnormal values in longitudinal biomarkers with an application to T/E ratio. Biostatistics 2007;8(2):285-96.
 54. Ashenden MJ, Lacoste A, Orhant E in sod. Longitudinal variation of hemoglobin and reticulocytes in elite rowers. Haematologica 2004;89(11):1403-4.
 55. <http://www.uniklinik-freiburg.de/presse/live/abschlussbericht/Abschlussbericht.pdf>
 56. Bornø A, Aachmann-Andersen NJ, Munch-Andersen T in sod. Screening for

- recombinant human erythropoietin using [Hb], reticulocytes, the OFF(hr score), OFF(z score) and Hb(z score): status of the Blood Passport. *Eur J Appl Physiol* 2010;109(3):537-43.
57. Morkeberg J, Belhage B, Damsgaard R. Strategies to combat doping in cycling. *International SportMed Journal* 2008;9(4):155-161.
 58. Sottas PE, Robinson N, Giraud S in sod. Statistical Classification of Abnormal Blood Profiles in Athletes. *Int J Biostat* 2006;2(1):3.
 59. Robinson N, Sottas PE, Mangin P in sod. Bayesian detection of abnormal hematological values to introduce a no-start rule for heterogeneous populations of athletes. *Haematologica* 2007;92(8):1143-4.
 60. Sottas PE Saugy M, Saudan C. Endogenous steroid profiling in the athlete biological passport. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(1):59-73.
 61. Ashenden MJ, Sharpe K, Damsgaard R in sod. Standardization of reticulocyte values in an antidoping context. *Am J Clin Path* 2004;121:816-825.
 62. World Health Organisation (2001). Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control, a guide for programme managers. WHO publications, Geneva.
 63. Sottas PE, Robinson N, Saugy M. A forensic approach to the interpretation of blood doping markers. *Law, Probability and Risk* 2008;7(3):191-210.
 64. <http://www.newcyclingpathway.com/wp-content/uploads/2010/09/21-NOW-FINAL-.pdf>
 65. Banfi G, Lundby C, Robach P in sod. Seasonal variations of haematological parameters in athletes. *Eur J Appl Physiol* 2010; [Epub ahead of print] Published online 15.sept 2010.
 66. Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica*. 2003 May;88(5):570-81.
 67. Schumacher YO, Sahm D, Baumstark MW in sod. Reticulocytes in athletes: longitudinal aspects and the influence of long- and short-term exercise. *Drug Test Anal* 2010 Sep 30. [Epub ahead of print].
 68. Garvican LA, Eastwood A, Martin DT in sod. Stability of haemoglobin mass during a 6-day UCI ProTour cycling race. *Clin J Sport Med* 2010;20(3):200-4.
 69. Rendell, M (2006). The death of Marco Pantani. Weidenfeld & Nicolson. London.

70. Pottgiesser T, Umhau M, Ahlgrim C in sod. Hb mass measurement suitable to screen for illic autologous blood transfusions. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39:1748-1756.
71. Giraud S, Sottas PE, Robinson N in sod. Blood transfusions in sports. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(195):305-26.
72. Athlete's Passport Hematological Module Interpretation Technical Document, Swiss Laboratory for Doping Analyses, 2009.
73. <http://www.uci.ch/Modules/BUILTIN/getObject.asp?MenuId=MjI0NQ&ObjTypeCode=FILE&type=FILE&id=NDc3MDk&LangId=1>
74. Ahlgrim C, Pottgiesser T, Robinson N in sod. Are 10 min of seating enough to guarantee stable haemoglobin and haematocrit readings for the athlete's biological passport? *Int J Lab Hematol* 2010;32(5):506-11.
75. <http://www.cyclingnews.com/news/biological-passport-expert-taking-landis-seriously>
76. Banfi G. Reticulocytes in sports medicine. *Sports Med* 2008;38(3):187-211.
77. Faber K, Sjerps M. Anti-doping researchers should conform to certain statistical standards from forensic science. *Sci Justice* 2009;49(3):214-5.
78. <http://www.chemometry.com/Index/Anti-doping/Pechstein/2009-10-13%20Expert%20opinion%20Faber.pdf>
79. Robinson N. Fighting for fair competition: blood doping – a persistent challenge and smart approaches to detect it. *Diagnostic Perspectives* 2010;1:20-27.
80. Mallorqui J, Segura J, De Bolos C in sod. Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica* 2008;93(2):313-4.
81. Mørkeberg J, Sharpe K, Belhage B in sod. Detecting autologous blood transfusions: a comparison of three passport approaches and four blood markers. *Scan J med Sci Sports* 2009; Nov 9. [Epub ahead of print].
82. <http://www.cyclingnews.com/features/analysis-armstrongs-tour-blood-levels-debated>
83. <http://autobus.cyclingnews.com/news.php?id=news/2007/apr07/apr04news>
84. <http://autobus.cyclingnews.com/news.php?id=news/2009/feb09/feb11news3>
85. http://en.wikipedia.org/wiki/Alexander_Vinokourov
86. <http://autobus.cyclingnews.com/news.php?id=news/2009/jun09/jun09news2>
87. <http://www.cyclingnews.com/news/landis-confesses-to-doping-implicates-armstrong-and-bruyneel>

88. Ekblom B, Glodborg AN, Gullbring B. Response to exercise after blood loss and reinfusion. *J Appl Physiol* 1972;33:175–180.
89. Leigh-Smith S. Blood boosting. *Br J Sports Med* 2004;38:99-101.
90. Zavorsky G S, Murias J M, Gow J in sod. Laboratory 20-km cycle time trial reproducibility. *Int J Sports Med* 2007;28:743–748.
91. Zapico A G, Calderon F J, Benito P J. Evolution of physiological and haematological parameters with training load in elite male road cyclists: a longitudinal study. *J Sports Med Phys Fitness* 2007;47:191–6.
92. Sassi A, Impellizzeri FM, Morelli A in sod. Seasonal changes in aerobic fitness indices in elite cyclists. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33(4):735-42.
93. Rusko H K. Development of aerobic power in relation to age and training in cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24(9):1040–1047.
94. Schumacher Y O, Mroz R, Mueller P in sod. Success in elite cycling: A prospective and retrospective analysis of race results. *Journal of Sports Sciences* 2006;24(11):1149–1156.
95. Santalla A, Naranjo J, Terrados N. Muscle efficiency improves over time in world-class cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41(5):1096–101.
96. Mørkeberg J, Belhage B, Ashenden M in sod. Screening for autologous blood transfusions. *Int J Sports Med* 2009;30:285-292.
97. Ruttman TG, Roche AM, Gasson J in sod. The effects of a one unit blood donation on auto-haemodilution and coagulation. *Anaesth Intensive Care* 2003;31(1):40-3.
98. Mørkeberg, J, Belhage B, Damsgaard, R. Changes in blood values in elite cyclist. *Int J Sports Med* 2009;30(2):130–8.
99. <http://www.fis-ski.com/data/document/fis-fact-sheet-wada-supported-variation-study.pdf>
100. Schmidt W, Biermann B, Winchenbach P in sod. How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations? *Int J Sports Med* 2000;21:133-138.
101. Alaranta A, Alaranta H, Heliovaara M in sod. Ample use of physician- prescribed medications in finnish elite athletes. *Int J Sports Med* 2006;27:919-925.
102. <http://www.oocities.com/veloepododo/art/6/6juin/Cyclingnews26.html>
103. <http://www.cyclingnews.com/news/rosendos-blood-readings-due-to-haemorrhoids>

104. Mujika I, Padilla S. Detraining: Loss of training – induced physiological and performance adaptations. Part I: short term insufficient training stimulus. *Sports Med* 2000;30(2):79-87.
105. Lucia A, Hoyos J, Perez M in sod. Heart rate and performance parameters in elite cyclists: a longitudinal study. *Med Sci Sports Med* 2000;32(10):1777-1782.
106. Impellizzeri FM, Marcora SM. The physiology of mountain biking. *Sports Med* 2007;37(1):59-71.
107. http://journals.lww.com/acsm-msse/Fulltext/2007/05001/Timeframe_to_Detect_Blood-Withdrawal_Associated.703.aspx
108. Damsgaard R, Munch T, Mørkeberg J in sod. Effects of blood withdrawal and reinfusion on biomarkers of erythropoiesis in humans: Implications for anti-doping strategies. *Haematologica* 2006;91(7):1006-8.
109. Valeri CR, Ragno G, Srey R. Restoration of red blood cell volume following 2-unit red blood cell apheresis. *Vox Sang* 2003;85(2):85-7.
110. Heaton A, Holme S. Blood donation and red cell volume (RCV) regeneration in donors of different weights. *Vox Sang* 1994;67(3):.
111. Eastwood A, Hopkins WG, Bourdon PC in sod. Stability of hemoglobin mass over 100 days in active men. *J Appl Physiol* 2008;104(4):982-5.
112. Črne-Finderle N, Sket D. Vnetje. V: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije (9. izdaja), Urednik Ribarič S. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo 2001.
113. <http://sports.espn.go.com/oly/cycling/news/story?id=5222488>
114. Kuipers H, Dubravcic-Simunjak S, Moran J in sod. Blood testing in sport: hematological profiling. *Int J Sports Med* 2010;31:542-547.
115. Starklint J, Bech JN, Aagaard O in sod. Hypochromic reticulocytes, hypochromic erythrocytes and p-transferrin receptors in diagnosing iron-deficient erythropoiesis. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:691-702.
116. Souillard A, Audran M, Bressolle F in sod. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes: blood sampling and doping control. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:355-64.
117. Varlet Marie E, Gaudart A, Audran M in sod. Pharmacokinetic-pharmacodynamic

- modelling of Ret human erythropoietin in athletes. *Int J Sports Med* 2003;24:252-7.
118. Lundby C, Thomsen JJ, Boushel R in sod. Erythropoietin treatment elevates hemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. *J Physiol* 2007;578:309-14.
 119. http://www.team-saxobank.com/pdf/CSC_Saxo_Bank_second_AD_report.pdf
 120. Gore CJ, Hopkins WG. Counterpoint: positive effects of intermittent hypoxia (live high:train low) on exercise performance are not mediated primarily by augmented red cell volume. *J Appl Physiol* 2005;99(5):2055-7;razprave 2057-8.
 121. Clark SA, Quod MJ, Clark MA. Time course of haemoglobin mass during 21 days live high:train low simulated altitude. *Eur J Appl Physiol* 2009;106(3):399-406.
 122. Ashenden MJ, Gore CJ, Parisotto R in sod. Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003;88:1053-1062.
 123. http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Scientific%20Events/Tokyo_Symposium_2009/WADA_Tokyo_Symposium_Dr.Gore.pdf
 124. Mattila V, Rusko H. Effect of living high and training low on sea level performance in cyclists. *Med Sci Sports Exerc* 1996;28(Suppl.5):S157.
 125. Millet GP, Roels B, Schmitt L in sod. Combining hypoxic methods for peak performance. *Sports Med* 2010;40(1):1-25.
 126. Schmidt W, Prommer N. The optimised CO-rebreathing method: a new tool to determine total hemoglobin mass routinely. *Eur J Appl Physiol* 2005;95:486–495.
 127. Ahlgrim C, Pottgiesser T, Kron J in sod. Relations between haemoglobin mass, cardiac dimensions and aerobic capacity in endurance trained cyclists. *J Sports Med Phys Fitness* 2009;49:364-71.
 128. Lundby C, Thomsen JJ, Boushel R in sod. Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. *J Physiol* 2007;578(Pt1):309-314.
 129. Al-Habet SM, Rogers HJ. Methylprednisolone pharmacokinetics after intravenous and oral administration. *Br J Clin Pharmacol* 1989;27(3):285-90.
 130. Prommer N, Sottas PE, Schoch C in sod. Total haemoglobin mass – a new parameter to detect blood doping? *Med Sci Sports Exerc* 2008;40:2112-2118.

131. Ahluwalia N, Lamni-Keefe CL, Haley NR, Beard JL. Day-to-day variation in iron-status indexes in elderly women. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 414-419.
132. Dot D, Miró J, Fuentes X. Within-Subject biological variation of hematological quantities and analytical goals. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:825-826.
133. Gallagher SK, Johnson LK, and Milne DB. Short-term and long-term variability of indices related to nutritional status. I: Ca, Cu, Fe, Mg, and Zn.. *Clin Chem* 1989;35:369-373.
134. Hölzel WGE. Influence of hypertension and antihypertensive drugs on the biological intraindividual variation of electrolytes and lipids in serum. *Clin Chem* 1988;34:1485-1488.
135. Looker AC, Sempo CT, Liu K, Johnson CL, Gunter EW. Within-person variance in biochemical indicators of iron status: effects on prevalence estimates. *Am J Clin Nutr* 1990;52:541-547.
136. Fraser CG, Wilkinson SP, Neville RG, Knox JDE, King JF, MacWalter RS. Biologic variation of common hematologic laboratory quantities in the elderly. *Am J Clin Pathol* 1989;92:465-470.
137. <http://autobus.cyclingnews.com/riders/2009/diaries/basso/?id=basso0905>
138. http://en.wikipedia.org/wiki/Ivan_Basso
139. Ge RL, Witkowski S, Zhang Y in sod (2002). Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 2002;92(6):2361-7.
140. Berglund B, Ekblom B, Ekblom E in sod. The swedish blood pass project. *Scan J Med Sci Sports* 2007;17(3):292-7.
141. http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Scientific%20Events/Tokyo_Symposium_2009/WADA_Tokyo_Symposium_Dr.Zorzoli.pdf
142. <http://www.cyclingnews.com/news/plasticisers-in-contadors-urine-could-indicate-blood-transfusion>
143. <http://www.bmj.com/content/337/bmj.a584/reply>
144. P. Van Eenoo and F.T. Delbeke. Response on “Regulations in the field of residue and doping analysis should ensure a well-defined risk of a false positive declaration” by N. M. Faber. *Accreditation and Quality Assurance* 2009;14:219-221.

145. <http://www.cyclingnews.com/news/is-the-ucis-biological-passport-flawed>

12. Priloge

Priloga 1 – shematski časovni prikaz domnevnega doping primera športnika.

Datum		Opombe	Hematokrit (%)	Hemoglobin (g/L)	% RET	OFF – hr vrednost	Opombe
0002							
15	januar		47.3	165	0.75	113.04	Doping test
11	februar		46.1	164	0.92	106.5	Doping test
11	marec		42.1	151	0.7	101	Doping test
30	marec	Obisk zdravnika, ki predpiše jemanje Operila, Naprosyna in Ciprobaya. Sam jemlje še Aspirin.					
1	april	Začetek višinske priprave.					
2	april						
3	april						
4	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				Domnevni čas krvavitve po pričanju zdravnika
5	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				Domnevni čas krvavitve po pričanju zdravnika
6	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				Domnevni čas krvavitve po pričanju zdravnika
7	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				Domnevni čas krvavitve po pričanju zdravnika
8	april		Domnevna krvavitev po mnenju				Domnevni čas krvavitve po pričanju

			zastopnikov				zdravnika
9	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				
10	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				
11	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				
12	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				
13	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				
14	april		Domnevna krvavitev po mnenju zastopnikov				
15	april						
16	april						
17	april						
18	april		Hematokrit	Hemoglobin	% Ret	OFF – hr vrednost	
19	april	Konec višinske priprave.	38.9	133	2.1	46.05	Doping test
20	april						
21	april						
22	april						
23	april						
24	april						
25	april						
26	april						
27	april						
28	april	Kratka etapna dirka 1					
29	april	Kratka etapna dirka 1					
30	april	Kratka etapna dirka 1					
1	maj	Kratka etapna dirka 1					

2	maj	Kratka etapna dirka 1					
3	maj	Kratka etapna dirka 1					
4	maj						
5	maj						
6	maj		Hematokrit	Hemoglobin	% Ret	OFF - hr vrednost	
7	maj		46.3	155	1.13	91.2	Doping test
8	maj						
9	maj	Začetek etapne dirke 1					
10	maj						
11	maj						
12	maj						
13	maj						
14	maj						
15	maj						
16	maj						
17	maj						
18	maj	Prost dan					
19	maj						
20	maj						
21	maj						
22	maj						
23	maj						
24	maj						
25	maj						
26	maj	Prost dan					
27	maj						
28	maj						
29	maj						
30	maj		Hematokrit	Hemoglobin	% Ret	OFF - hr vrednost	
31	maj	Konec etapne dirke 1	42.4	143	0.96	84.2	Doping test
1	junij						
2	junij						
3	junij						
4	junij						
5	junij						
6	junij						
7	junij						
8	junij						
9	junij						

10	junij					
11	junij					
12	junij					
13	junij	Kratka etapna dirka 2				
14	junij	Kratka etapna dirka 2				
15	junij	Kratka etapna dirka 2				
16	junij	Kratka etapna dirka 2				
17	junij	Kratka etapna dirka 2				
18	junij	Kratka etapna dirka 2				
19	junij	Kratka etapna dirka 2				
20	junij	Kratka etapna dirka 2				
21	junij	Kratka etapna dirka 2				
22	junij					
23	junij					
24	junij					
25	junij					
26	junij					
27	junij					
28	junij					
29	junij					
30	junij					
4	julij					
5	julij	Začetek višinske priprave.			2800 m	
6	julij				2800 m	
7	julij				2800 m	
8	julij				2800 m	
9	julij				2800 m	
10	julij				2800 m	
11	julij				2800 m	
12	julij				2800 m	
13	julij				2800 m	
14	julij				2800 m	
15	julij				2800 m	
16	julij				2800 m	
17	julij				2800 m	
18	julij				2800 m	
19	julij				2800 m	

20	julij				2800 m		
21	julij				2800 m		
22	julij				2800 m		
23	julij				2800 m		
24	julij				2800 m		
25	julij				2800 m		
26	julij	Prekinitev višinske priprave.			2800 m		
27	julij						
28	julij						
29	julij	Ponovno bivanje na višini.					
30	julij	Obisk osebnega zdravnika.					
31	julij	Konec bivanja na višini.					
1	avgust						
2	avgust						
3	avgust						
4	avgust						
5	avgust						
6	avgust						
7	avgust	Osební zdravnik izda potrdilo o težavah z želodcem.					
8	avgust						
9	avgust						
10	avgust						
11	avgust						
12	avgust						
13	avgust	Začetek višinske priprave.			3200 m		
14	avgust				3200 m		
15	avgust				3200 m		
16	avgust				3200 m		
17	avgust				3200 m		
18	avgust				3200 m		
19	avgust				3200 m		
20	avgust				3200 m		
21	avgust				3200 m		
22	avgust				3200 m		
23	avgust				3200 m		
24	avgust	Konec višinskih priprav.			3200 m		
25	avgust	Pik ose, terapija z metilprednizolonom.					
26	avgust		Hematokrit	Hemoglobin	% Ret	OFF – hr vrednost	

27	avgust		45.2	152	0.86	96.4	Doping test
28	avgust						
29	avgust	Začetek etapne dirke 2	50	168	0.51	125.2	Doping test
30	avgust						
31	avgust						
1	september						
2	september	Prost dan					
3	september						
4	september						
5	september						
6	september						
7	september						
8	september						
9	september						
10	september	Prost dan					
11	september						
12	september						
13	september						
14	september						
15	september						
16	september						
17	september						
18	september						
19	september						
20	september	Konec etapne dirke 2					

Priloga 2 - Krvne vrednosti kolesarja A

Lance Armstrong – Blood/Urine Testing Results

Sample Date	Agency	Urine/Blood	EPO	Hemoglobin	Hematocrit (%)	Reticulocytes (%)	OFF-score	Hb z-score	OFF z-score	T/E Ratio
8/19/08	USADA	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	not tested
10/8/08	USADA	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	not tested
10/16/08	UCI	Blood/Urine	Neg	14.3	39.3	0.99	83.3	n/a*	n/a*	0.4
11/13/08	USADA	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	not tested
11/22/08	USADA, requested by UCI	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	not tested
11/26/08	UCI	Blood	not tested	15	42.8	1.08	87.6	0.71	-0.26	not tested
12/3/08	UCI	Blood/Urine	Neg	14.4	41.9	0.83	89.3	-0.22	-0.07	0.5
12/11/08	UCI	Blood/Urine	Neg	14.3	39.4	1.29	74.9	-0.37	-1.69	0.6
12/15/08	USADA, requested by UCI	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	not tested
12/18/08	UCI	Blood/Urine	Neg	15.4	42.1	1.49	83.3	1.3	-0.75	0.4
1/16/09	UCI	Blood/Urine	Neg	14.1	41.1	1.03	80.1	-0.68	-1.1	1.1
1/28/09	USADA	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	not tested
2/4/09	UCI	Blood/Urine	Neg	15.2	43.1	1.1	89.1	1.01	-0.1	0.5
2/13/09	UCI	Blood/Urine	Neg	15	42.7	0.99	90.3	0.7	0.04	not tested
2/14/09	UCI	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.5
2/19/09	UCI	Urine	not tested	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.2
3/11/09	UCI	Blood/Urine	Neg	14.5	40.1	0.88	88.7	-0.07	-0.14	not tested
4/30/09	UCI	Blood/Urine	not tested	14.9	41.3	0.98	89.6	0.54	-0.04	not tested
5/7/09	UCI	Blood	not tested	14.8	43.5	1.3	78.8	0.39	-1.23	not tested
5/18/09	UCI	Blood	not tested	13.6	40	0.7	85.1	-1.42	-0.53	not tested
5/31/09	UCI	Blood	not tested	13	38.2	0.9	73.4	-2.32	-1.8	not tested
6/16/09	UCI	Blood/Urine	Neg	16	45.7	0.6	112	2.18	2.39	0.4
6/17/09	UCI	Blood/Urine	Neg	16	45	0.7	108.4	2.16	1.98	0.6
7/2/09	UCI	Blood	not tested	14.3	42.8	0.5	98.9	-0.36	0.95	0.2
7/7/09	UCI	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.7
7/8/09	UCI	Urine	not tested	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.5
7/10/09	UCI	Blood	not tested	14	41.3	0.5	95.9	-0.78	0.62	not tested
7/11/09	UCI	Blood/Urine	Neg	13.7	40.7	0.5	93.3	-1.19	0.35	0.5
7/14/09	UCI	Blood	not tested	14.4	43.1	0.7	95.3	-0.2	0.53	not tested
7/17/09	UCI	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.4
7/20/09	UCI	Blood	not tested	14	41.7	0.5	95.9	-0.7	0.56	not tested
7/23/09	UCI	Urine	Neg	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0.7
7/25/09	UCI	Blood/Urine	Neg	14.5	43	0.7	95.9	-0.05	0.48	not tested

*z-scores are a statistical model of an individual variation after two or more measurements. When only one (blood) measurement is present, a variation cannot be calculated

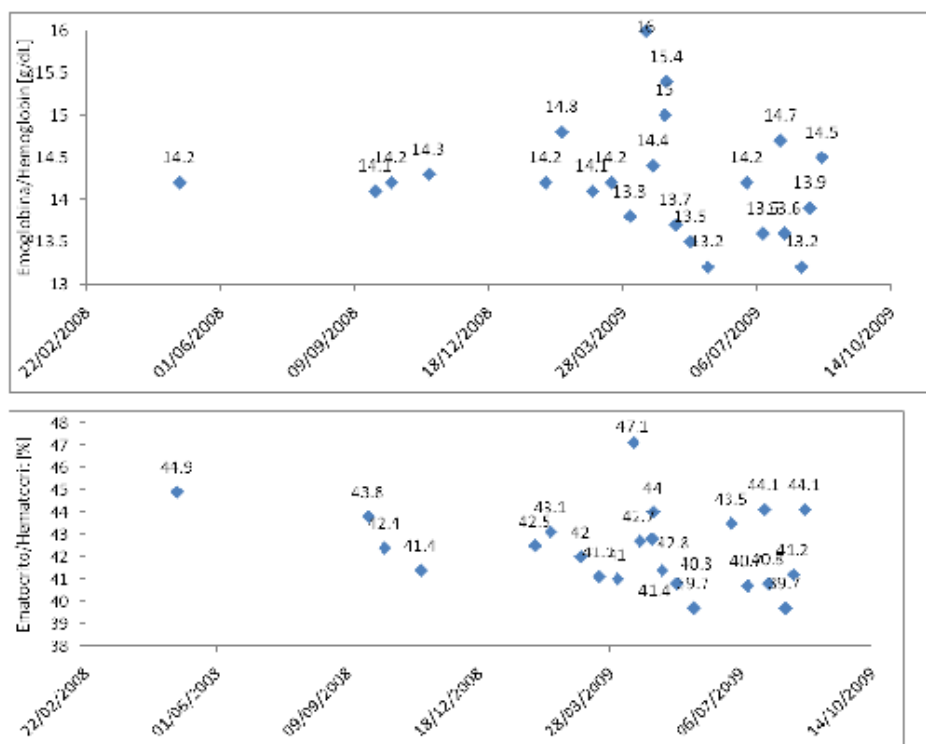
Priloga 3 - krvne vrednosti kolesarja C

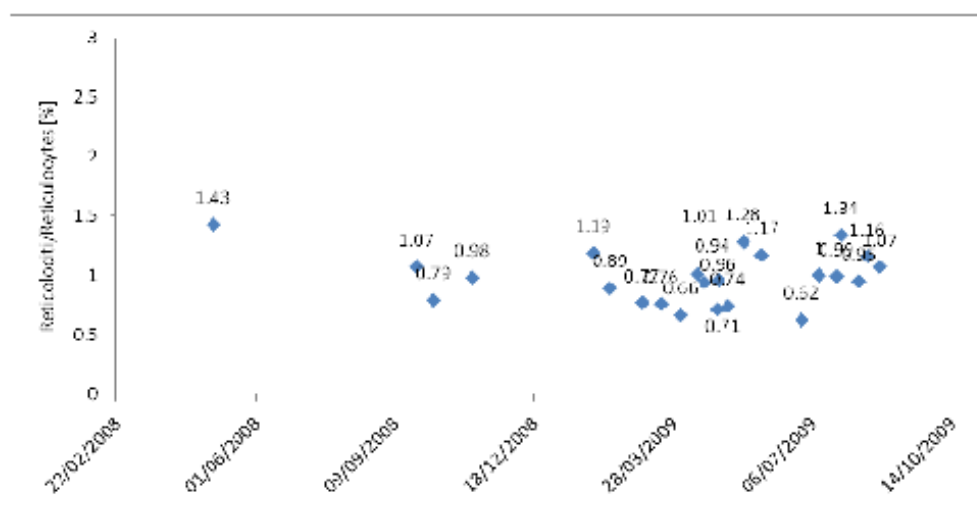
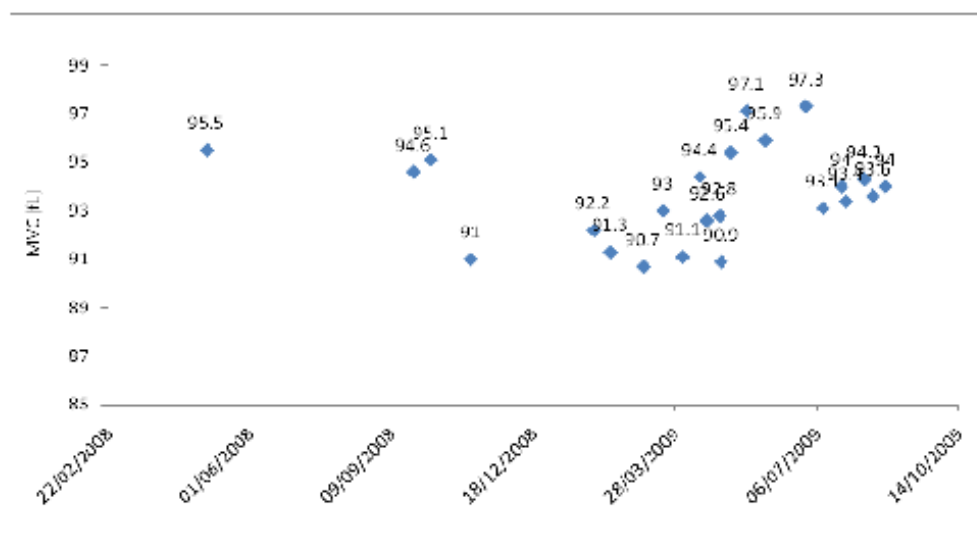
IVAN BASSO

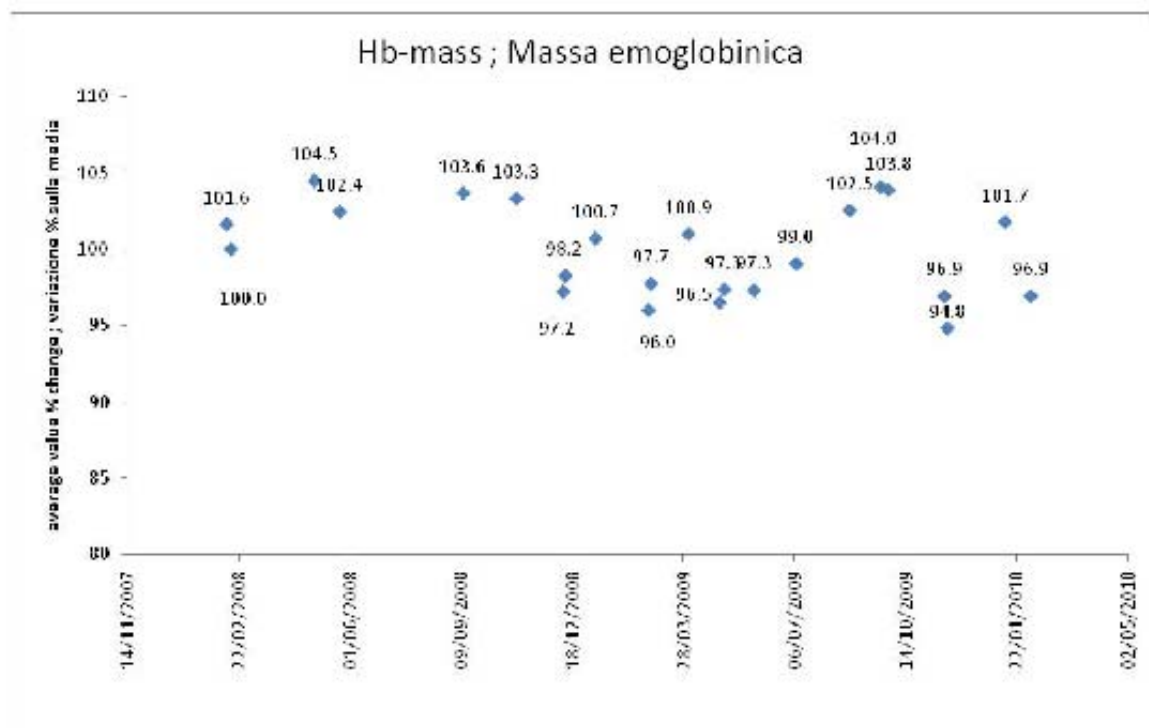
BLOOD PASSPORT DATA – DATI PASSAPORTO EMATICO

UPDATING 25.08.09

2/5/2008 UCI Blood Passport data; 25/9/2008 UCI Blood Passport data; 7/10/2008 UCI Blood Passport data; 4/11/2008 UCI Blood Passport data; 30/1/2009 CEDAL lab; 11/02/2009 UCI Blood Passport data; 6/3/2009 CEDAL lab; 20/3/2009 UCI Blood Passport; 3/4/2009 CEDAL lab; 15/4/2009 UCI Blood Passport (prelievo effettuato in altura, dopo 12 giorni di allenamento in quota /blood sample taken in altitude, after 12 days of altitude training); 20/4/2009 CEDAL lab; 29/4/2009 UCI Blood Passport; 30/4/2009 CEDAL lab (dopo allenamento/after training session); 7/5/2009 UCI Blood Passport (Prima/before Giro d'Italia); 18/5/2009 UCI Blood Passport (metà/middle Giro d'Italia); 31/5/2009 UCI Blood Passport; 29/06/2009 UCI Blood Passport; 11/7/2009 CEDAL Lab; 24/7/2009 UCI Blood Passport; 27/7/2009 CEDAL Lab.; 9/8/2009 UCI Blood Passport; 15/8/2009 UCI Blood Passport; 24/08/2009 CEDAL Lab.







Variazioni stagioni della massa emoglobinica di Ivan Basso. La determinazione della massa emoglobina è stata effettuata mediante metodo del rebreathing del CO, secondo il protocollo ottimizzato da Schmidt e Prommer (Eur J Appl Physiol 2005). Nel grafico ciascuna misura è espressa come percentuale rispetto al valore di riferimento rappresentato dalla media di tutte le misurazioni effettuate.

Seasonal variations of Ivan Basso's hemoglobin mass. Hemoglobin mass was determined by the CO-rebreathing method, optimized by Schmidt and Prommer (Eur J Appl Physiol 2005). In the figure each measurement value is expressed as percentage of the reference value, being the latest represented by the average of all measurements.

Priloga 4 - Protidopinški pravilnik Nacionalne antidopinške komisije.

Zaradi obsežnosti pravilnika podan del le tega. V celoti dostopen na internet naslovu pod [9].

7. člen

Doping je ena ali več kršitev določb 8. člena tega pravilnika.

8. člen

Kršitev predpisov proti dopingu predstavlja:

8.1 Prisotnost *prepovedanih snovi* ali njihovih *presnovkov (metabolitov)* ali *označevalcev (markerjev)* v vzorcih športnika.

8.1.1 Osebna dolžnost vsakega *športnika* je, da prepreči vnos *prepovedanih snovi* v svoje telo. *Športniki* so odgovorni za vsako odkritje prisotnosti *prepovedanih snovi* ali njihovih *presnovkov* ali *označevalcev* v njihovih vzorcih. V skladu s tem ni nujno, da je namen, krivda ali vednost *uporabe* s strani *športnika* jasno razvidna, da bi se s tem ugotovila kršitev predpisov proti dopingu v skladu s členom 8.1.

8.1.2 Kot zadosten dokaz, da so bili kršeni predpisi proti dopingu, na podlagi člena 8.1 tega pravilnika zadostuje eno od naslednjega: prisotnost *prepovedane snovi* ali njenega *metabolita* ali *označevalca* v A vzorcu *športnika*, kadar *športnik* odkloni analizo vzorca B in vzorec B ni analiziran; ali, kadar je vzorec B *športnika* analiziran in analiza vzorca B potrjuje prisotnost *prepovedane snovi* ali njenega *metabolita* ali *označevalca*, ki je bil odkrit v *športnikovem A vzorcu*.

8.1.3 Z izjemo tistih snovi, za katere *seznam prepovedanih snovi* predpisuje količinski prag poročanja, se odkrita prisotnost katerekoli količine *prepovedane snovi* ali njenih *presnovkov* ali *označevalcev* v *športnikovem vzorcu* šteje za kršitev predpisov proti dopingu.

- 8.1.4 Ne glede na splošno določbo člena 8.1 se lahko v *seznamu prepovedanih snovi* določijo posebna merila za vrednotenje *prepovedanih snovi*, ki se lahko proizvajajo endogeno.

8.2 Uporaba ali poskus uporabe prepovedane snovi ali prepovedanega postopka

- 8.2.1 Osebna dolžnost vsakega *športnika* je, da prepreči vnos *prepovedanih snovi* v svoje telo. Ni potrebno, da bi bil prisoten naklep, napaka, malomarnost ali poznavanje *uporabe* s strani *športnika*, da bi se ugotovila kršitev predpisov proti dopingu na podlagi *uporabe prepovedanih snovi* ali *prepovedanih postopkov*.
- 8.2.2 Ni pomembno dejstvo, da je bila *uporaba prepovedanih snovi* ali *prepovedanih postopkov* uspešna. Zadostuje, da je bila *prepovedana snov* ali *prepovedan postopek* uporabljen ali da je šlo za *poskus uporabe* v smislu kršitve predpisov proti dopingu.

8.3 Odklanjanje ali neuspešno dajanje vzorcev brez tehtne obrazložitve, po obvestilu, kakor določa ta pravilnik, ali drugo izogibanje dajanju vzorcev.

8.4 Kršitev veljavnih določb glede *športnikove* razpoložljivosti za *testiranje izven tekmovanja*, kot to opredeljujejo *Mednarodni standardi za testiranje*, vključno z neposredovanjem **točnega naslova bivališča v skladu s členom 11.3 *Mednarodnih standardov za testiranje* (»Neprijava bivališča«) in nerazpoložljivostjo za testiranje na prijavljenem naslovu v skladu s členom 11.4 *Mednarodnih standardov za testiranje* (»Neopravljeno testiranje«). Kombinacija treh neopravljenih testiranj in/ali neuspešnih prijav bivališča, zagrešena v obdobju 18 mesecev, po ugotovitvi NAK, predstavlja kršitev predpisov proti dopingu.**

8.5 Oviranje ali poskus oviranja kateregakoli dela postopka *kontrole dopinga*.

8.6 Posest *prepovedanih snovi* in uporaba *prepovedanih postopkov*.

8.6.1 *Športnikova posest prepovedane snovi ali prepovedanega postopka na tekmovanju ali posest prepovedane snovi ali sredstev za uporabo prepovedanega postopka izven tekmovanja, glede snovi ali postopka, prepovedanega izven tekmovanja, razen če športnik dokaže, da je posest posledica odobrene TI (terapevtska izjema) ali drugega opravičljivega razloga.*

8.6.2 *Posest prepovedane snovi ali sredstev za uporabo prepovedanega postopka na tekmovanju ali posest prepovedane snovi ali sredstev za uporabo prepovedanega postopka izven tekmovanja, glede snovi ali postopka, prepovedanega izven tekmovanja, s strani športnikovega spremljevalnega osebja v povezavi s športnikom ali tekmovanjem ali treningom, razen če je posest posledica odobrene TI ali drugega opravičljivega razloga.*

8.7 *Trgovanje ali poizkus trgovanja s katerokoli prepovedano snovjo ali prepovedanim postopkom.*

8.8 *Dajanje ali poskus dajanja prepovedane snovi ali omogočanje uporabe prepovedanega postopka kateremukoli športniku na tekmovanju ali dajanje ali poskus dajanja prepovedane snovi ali prepovedanega postopka športniku izven tekmovanja, glede snovi ali postopka, prepovedanega izven tekmovanja, ali pomoč, spodbujanje, lajšanje dostopa, nagovarjanje, prikrivanje ali katerokoli drugo dejanje, ki predstavlja kršitev ali poskus kršitve predpisov proti doppingu.*

Dokazovanje doppinga

9. člen

9.1 Dokazno breme, ali je prišlo do kršitve predpisov proti doppingu, nosi NAK. NAK mora ob upoštevanju resnosti predloženih obtožb v zadovoljivi meri ugotoviti kršitev predpisov proti doppingu. Kot dokazni standard se zahteva stopnja prepričanja (več od verjetnosti, manj od stopnje gotovosti).

9.2 Če pravilnik nalaga dokazno breme športniku ali drugi osebi, ki je osumljena kršitve predpisov

proti doping, z namenom, da se ovrže sum ali zberejo posebni dokazi ali ugotovijo posebne okoliščine, se zahteva dokaz s stopnjo verjetnosti, razen v primerih, kot to določata člena 38 in 39.7, kjer mora športnik zadostiti zahtevi po višjem dokaznem standardu.

9.3 Dejstva o kršitvi predpisov proti doping se ugotavljajo s pomočjo kateregakoli zanesljivega načina, vključno s priznanjem. V postopkih se uporabljajo naslednja pravila:

9.3.1 Laboratoriji, ki jih je akreditirala *WADA*, morajo *vzorke* analizirati in shranjevati v skladu z mednarodnimi standardi analize vzorcev. *Športnik* ali druga oseba lahko ovrže predhodno domnevo z dokazovanjem, da je prišlo do odstopanja od *mednarodnih standardov za laboratorije*. Če *športnik* predhodno domnevo izpodbija s trditvijo, da je prišlo do odstopa od *mednarodnih standardov za laboratorije*, mora *NAK* dokazati, da takšen odstop ni povzročil »pozitivnega rezultata« (nasprotne analitične ugotovitve).

9.3.2 Odstop od drugih mednarodnih standardov za laboratorije ali drugih protidopinških pravil ali smeri, ki ni imel za posledico »pozitivnega rezultata« (nasprotne analitične ugotovitve) ali druge kršitve predpisov proti doping, ne razveljavi rezultata *testiranja*. Če športnik ali druga oseba dokaže, da je prišlo do odstopa od morebitnih drugih *mednarodnih standardov*, mora *NAK* dokazati, da takšen odstop ni povzročil »pozitivnega rezultata« (nasprotne analitične ugotovitve) ali dejanske osnove za kršitev predpisov proti doping.

9.3.3 Dejansko stanje, ugotovljeno s pravnomočno odločbo sodišča ali odločbo drugega organa, ki je v skladu z relevantno zakonodajo izenačena s pravnomočno odločbo sodišča, je neovrgljiv dokaz proti *športniku* ali drugi osebi, na katere se odločba na podlagi teh dejstev nanaša, razen če *športnik* ali druga oseba dokaže, da odločba krši načela pravičnosti.

9.3.4 Če športnik ali druga oseba zavrne sodelovanje na zaslišanju, potem ko je bila v razumnem roku podana zahteva za takšno zaslišanje (bodisi osebno ali po telefonu v skladu s tem pravilnikom), ali pa v primeru, da ne odgovarja na vprašanja senata, lahko senat takšno ravnanje šteje športniku ali drugi osebi v škodo in ugotovi, da je kršitev predpisov proti doping izkazana.

Priloga 5 - Lista prepovedanih snovi in metod, ki je v veljavi od 1. januarja 2010.

LISTA PREPOVEDANIH SNOVI IN POSTOPKOV 2010

VELJAVNA OD 1. JANUARJA 2010

Uporaba kateregakoli zdravila mora biti omejena samo na medicinske indikacije.

Vse prepovedane snovi se obravnavajo kot "specificirane snovi", razen snovi v razredu S1, S2, S.4.4 in S6.a, in prepovedane metode M1, M2 in M3.

SNOVI IN POSTOPKI PREPOVEDANI VES ČAS (NA TEKMOVANJU IN IZVEN TEKMOVANJA)
--

PREPOVEDANE SNOVI

S1. ANABOLIČNI AGENSI

Anabolični agensi.

1. Anabolični Androgeni Steroidi (AAS)

a. Eksogeni* AAS, vključno z:

1-androstendiol (5 α -androst-1-en-3 β ,17 β -diol); **1-androstendion** (5 α -androst-1-en-3,17-dion); **bolandiol** (19-norandrostendiol); **bolasteron**; **boldenon**; **boldion** (androsta-1,4-dien-3,17-dion); **calusteron**; **clostebol**; **danazol** (17 α -etinil-17 β -hidroksiandrost-4-eno[2,3-d]isoksazol); **dehidroklormetiltestosteron** (4-kloro-17 β -hidroksi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-on); **desoksimetiltestosteron** (17 α -metil-5 α -androst-2-en-17 β -ol); **drostanolon**; **etilestrenol** (19-nor-17 α -pregn-4-en-17-ol); **fluoksimesteron**; **formebolon**; **furazabol** (17 β -hidroksi-17 α -metil-5 α -androstano[2,3-c]-furazan); **gestrinon**; **4-hidroksitestosteron** (4,17 β -dihidroksiandrost-4-en-3-on); **mestanolon**; **mesterolone**; **metenolon**; **methandienon** (17 β -

hidroksi-17 α -metilandrosta-1,4-dien-3-on); **metandriol**; **metasteron** (2 α , 17 α -dimetil-5 α -androstan-3-on-17 β -ol); **metildienolon** (17 β -hidroksi-17 α -metilestra-4,9-dien-3-on); **metil-1-testosteron** (17 β -hidroksi-17 α -metil-5 α -androst-1-en-3-on); **metilnortestosteron** (17 β -hidroksi-17 α -metilestr-4-en-3-on); **metiltrienolon** (17 β -hidroksi-17 α -metilestra-4,9,11-trien-3-on); **metilttestosteron**; **miboleron**; **nandrolon**; **19-norandrostenedion** (estr-4-ene-3,17-dion); **norboleton**; **norclostebol**; **noretandrolon**; **oksabolon**; **oksandrolon**; **oksimesteron**; **oksimetolon**; **prostanazol** (17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on-17 β -ol-3-on); **quinbolon**; **stanazolol**; **stenbolon**; **1-testosteron** (17 β -hidroksi-5 α -androst-1-en-3-on); **tetrahidrogestrinon** (18 α -homo-pregna-4,9,11-trien-17 β -ol-3-on); **trenbolon** in ostale snovi s podobno kemijsko zgradbo ali podobnim biološkim učinkom (i).

b. Endogeni** AAS kadar so uporabljeni eksogeno:

androstendiol (androst-5-en-3 β ,17 β -diol); **androstendione** (androst-4-en-3,17-dion); **dihidrotestosteron** (17 β -hidroksi-5 α -androstan-3-on); **prasteron** (dehidroepiandrosteron, DHEA); **testosteron**
in naslednji metaboliti in izomeri:

5 α -androstan-3 α ,17 α -diol; **5 α -androstan-3 α ,17 β -diol**; **5 α -androstan-3 β ,17 α -diol**; **5 α -androstan-3 β ,17 β -diol**; **androst-4-en-3 α ,17 α -diol**; **androst-4-en-3 α ,17 β -diol**; **androst-4-en-3 β ,17 α -diol**; **androst-5-en-3 α ,17 α -diol**; **androst-5-en-3 α ,17 β -diol**; **androst-5-en-3 β ,17 α -diol**; **4-androstendiol** (androst-4-en-3 β ,17 β -diol); **5-androstendione** (androst-5-en-3,17-dion); **epi-dihidrotestosteron**; **epitestosteron**; **3 α -hidroksi-5 α -androstan-17-on**; **3 β -hidroksi-5 α -androstan-17-on**; **19-norandrosteron**; **19-noretioholanolon**.

2. Ostali anabolični agensi, vključujejo tudi naslednje in ne samo te:

Klenbuterol, **selektivni modulatorji androgenih receptorjev (SARM)**, **tibolon**, **zeranol**, **zilpaterol**.

Za namen razlage tega segmenta:

* “eksogen” se nanaša na snov, ki običajno ne nastaja v organizmu.

** “endogen” se nanaša na snov, ki običajno v telesu nastaja.

S2. PEPTIDNI HORMONI, RASTNI DEJAVNIKI IN SORODNE SNOVI

Sledeče snovi, vključno snovi s podobno kemijsko zgradbo ali podobnim biološkim učinkom, in njihovi sproščajoči dejavniki, so prepovedane:

1. **Eritropoezo stimulirajoči agensi (n.pr. eritropoetin – EPO, darbepoetin (dEPO), metoksi polietilen glikol-epoetin beta (CERA), hematid);**
2. **Horionski gonadotropin (hCG) in luteinizirajoči hormon (LH) pri moških;**
3. **Inzulini;**
4. **Kortikotropini;**
5. **Rastni hormon (hGH), Inzulinu podobni rastni dejavniki (IGF-1), Mehano rastni dejavniki (MGF), trombocitni rastni dejavnik (PDGF), vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF) in hepatocitni rastni dejavnik (HGF) kot tudi ostali dejavniki, ki vplivajo na sintezo proteinov mišic in ligamentov, vaskularizacijo, porabo energije, regenerativno sposobnost ali na t.i. fibre type switching;**
6. **Trombocitni preparati (npr. S trombociti bogata plazma, “blood spinning”) aplicirani intramuskularno. Ostali načini aplikacije morajo imeti osnovo v Potrdilu o dovoljeni terapevtski uporabi.**

in ostale snovi s podobno kemično strukturo ali podobnim biološkim učinkom.

S3. BETA-2 AGONISTI

Vsi beta-2 agonisti vključujoč D- in L-izomere so prepovedani, razen salbutamola (maksimalna koncentracija tekom 24 ur je 1600 mikrogramov) in salmeterola z inhalacijo za katera je potrebno priložiti Potrdilo o dovoljeni terapevtski izjemi.

Prisotnost salbutamola v urinu v koncentraciji, ki je večja kot 1000 ng/ml se smatra kot neterapevtska in jo jemljemo kot »pozitivni rezultat«, razen če športnik dokaže (s kontrolirano farmakokinetično raziskavo), da je bila zvišana koncentracija posledica terapevtske uporabe (največ 1600 mikrogramov v 24 urah) inhaliranega salbutamola.

S4. ANTAGONISTI HORMONOV IN MODULATORJI

Naslednji razredi anti-estrogenih snovi so prepovedane:

- 1. Aromatazni inhibitorji vključno in ne samo: aminoglutetimid, anastrozol, androsta-1,4,6-trien-3,17-dion (androstendion), 4-androsten-3,16,17-trion (6-okso), eksemestan, formestan, letrozol, testolakton.**
- 2. Selektivni modulatorji estrogenskih receptorjev (SERMs) vključno in ne samo: raloksifen, tamoksifen, toremifen.**
- 3. Ostale anti-estrogenske snovi vključno in ne samo: klomifen, ciklofenil, fulvestrant.**
- 4. Agensi, ki modulirajo funkcijo miostatina vključno in ne samo: miostatinski inhibitorji.**

S5. DIURETIKI IN OSTALI MASKIRNI AGENSI

Maskirni agensi vključno in ne samo:

Diuretiki*, probenecid, plazma ekspanderji (glicerol, intravenozna aplikacija n.pr. albumina, dekstrana, hidroksietil škroba in manitola) in ostale snovi s sorodnim biološkim(i) učinkom(i).

Diuretiki vsebujejo:

acetazolamid, amilorid, bumetanid, canrenon, chlorthalidon, etakrisnka kislina, furosemid, indapamid, metolazon, spironolacton, tiazidi (n.pr. bendroflumetiazid, klorotiazid, hidroklorotiazid), triamteren, in ostale snovi s podobno kemijsko strukturo ali biološkim učinkom (razen za drosperinon in pamabrom ter topična aplikacija dorzolamina in brinzolamida, ki niso prepovedani).

* Terapevtska izjema ne velja, če športnikov urin vsebuje diuretik sočasno s povečano ali mejno koncentracijo katerikoli prepovedane snovi.

PREPOVEDANI POSTOPKI

M1. POVEČEVANJE PRENOSA KISIKA

Prepovedano je naslednje:

- a. Krvni doping, vključno z uporabo avtologne, homologne in heterologne krvi, ali eritrocitnih produktov kakršnegakoli porekla.
- b. Umetno povečevanje vnosa, transporta ali oskrbe s kisikom vključno in ne samo: perfluorokemikalije, efapoksiral (RSR13) in modificiranih hemoglobinskih produktov (n.pr. hemoglobinski nadomestki, mikroinkapsulirani hemoglobinski produkti), izključujoč nadomestni kisik.

M2. KEMIJSKA IN FIZIČNA MANIPULACIJA

- a. Ponarejanje ali poskus ponarejanja v smislu motenja integritete vzorca odvzetega za kontrolo dopinga je prepovedano. To vključuje in ne samo: kateORIZACIJO, zamenjavo urina in/ali druge postopke, ki spremenijo vzorec (npr. proteaze).
- b. Intravenske infuzije so prepovedane razen v primeru medicinskih indikacij.

M3. GENSKI DOPING

Prepovedano je:

- a. Transfer celic ali genetskih elementov (DNK, RNK);
- b. Uporaba farmakoloških ali bioloških agensov, ki vplivajo na ekspresijo genov.

Peroxisome Proliferator aktiviran Receptor δ (PPAR δ) agonisti (e.g. GW 1516) in PPAR δ -AMP-aktivirana protein kinaza (AMPK) pot agonisti (e.g. AICAR) so prepovedani.

SNOVI IN POSTOPKI PREPOVEDANI NA TEKMOVANJU
--

Kot dodatek skupinam od S1 do S5 in M1 do M3, so med tekmovanjem prepovedane še naslednje skupine snovi:

PREPOVEDANE SNOVI

S6. POŽIVILA

Prepovedana so naslednja poživila vključujoč obe izomeri (D- in L-) kjer je to relevantno. Dovoljeni so imidazolovi derivati za topično uporabo in poživila, ki so vključena v monitoring program 2010*:

Poživila so:

a: Nespecificirana poživila:

Adrafinil; amfepramon; amifenazol; amfetamin; amfetaminil; benfluoreks, benzfetamin; **benzilpiperazin**; bromantan; dimetilamfetamin; etilamfetamin; famprofazon; fencamin; fenetilin; fendimetrazin; fenfluramin; 4-fenilpiracetam (karfedon); fenmetrazin; fenproporeks; **fentermin**; furfenoreks; klobenzoreks; **kokaine**; kropropamid; krotetamid; mefenoreks;

mefentermin; mesocarb; metamfetamin(D-); metilenedioksiamfetamin; metilenedioksimetamfetamin; p-metilamfetamin; modafinil; norfenfluramin; prenilamin; prolantan.

Poživilo, ki ni eksplicitno navedeno v tem delu, je specificirana snov.

b: Specificirana poživila (primeri):

Adrenalin^{**}; katin^{***}; efedrin^{****}; etamivan; etilefrin; fenbutrazat; fencamfamin; fenprometamin; heptaminol; isometepten; levmetamfetamin; meklofenoksat; metilephedrine^{****}; methylfenidat; nikethamid; norfenefrin; oktopamin; oksilofrin; parahidroksiamfetamin; pemolin; pentetrazol; propilheksedrin; pseudoefedrin^{*****}; selegilin; sibutramin; strihnin; tuaminoheptan in ostale snovi s podobno kemijsko strukturo ali biološkim učinkom-(i).

* Naslednje snovi so v vključene v 2010 Monitoring Program (bupropion, kofein, fenilefrin, fenilpropanolamin, pipradol, sinefrin) in se ne tretirajo kot prepovedane.

**** Adrenalin v kombinaciji z lokalnimi anestetiki ali z lokalno aplikacijo (n.pr. nazalna, oftalmološka) ni prepovedan.**

***** Katin** je prepovedan kadar je njegova koncentracija v urinu večja kot 5 mikrogramov na mililiter.

****** Vsak posebej, efedrin in metilefedrin** je prepovedan, če je njegova koncentracija v urinu večja kot 10 mikrogramov na mililiter.

*******Pseudoefedrin** je prepovedan, kadar je koncentracija v urinu večja kot 150 mikrogramov na mililiter.

S7. NARKOTIKI

Naslednji narkotiki so prepovedani:

buprenorfin, dekstromoramid, diamorfin (heroin), fentanil in njegovi derivati, hidromorfon, metadon, morfin, oksikodon, oksimorfon, pentazocin, petidin.

S8. KANABINOIDI

Naravni ali sintetični Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) in THC podobni kanabinoidi (n.pr. hašiš, marihuana, HU-210) so prepovedani.

S9. GLUKOKORTIKOSTEROIDI

Vsi glukokortikosteroidi so prepovedani kadar so aplicirani oralno, rektalno, intravenozno ali intramuskularno.

Ostali načini aplikacije (intraartikularna, periartikularna, peritendinalna, epiduralna, intradermalna in inhalacije) zahtevajo izpolnitev obrazca za terapevtsko izjemo.

Preparati za lokalno aplikacijo pri dermatoloških, nazalnih, oftalmoloških, ustnih in očesnih obolenjih (vključno z iontoforezo/fonoforezo) niso prepovedani in za njih ni potrebno imeti odobritve terapevtske izjeme.

SNOVI, KI SO PREPOVEDANE SAMO V DOLOČENIH ŠPORTIH
--

P1. ALKOHOL

Alkohol (etanol) je prepovedan na tekmovanju v naslednjih športnih panogah. Detekcija se opravi s pomočjo analize v izdihanem zraku in/ali v krvi. Mejna koncentracija, ki pomeni sankcije je 0,1 g/L.

Aeronautic (FAI)

Archery (FITA, IPC)

Automobile (FIA)

Karate (WKF)

Modern Pentathlon (UIPM) za discipline, kjer je streljanje

Motorcycling (FIM)

Ninepin and Tenpin Bowling (FIQ)

Powerboating (UIM)

P2. BETA-BLOKATORJI

Če ni drugače določeno, so beta-blokatorji prepovedani samo na tekmovanju v naslednjih športnih panogah.

Aeronautic (FAI)	Gymnastics (FIG)
Archery (FITA, IPC) (prepovedani tudi izven tekmovanja)	Motorcycling (FIM)
Automobile (FIA)	Modern Pentathlon (UIPM) za discipline, kjer je strljanje
Billiards (WCBS)	Nine-pin and Ten-pin bowling (FIQ)
Bobsleigh (FIBT)	Powerboating (UIM)
Boules (CMSB, IPC bowls)	Sailing (ISAF)
Bridge (FMB)	Shooting (ISSF, IPC) (prepovedani tudi izven tekmovanja)
Curling (WCF)	Skiing/Snowboarding (FIS) pri smučarskih skokih, freestyle aerials/halfpipe in snowboard halfpipe/big air
Golf (IGF)	Wrestling (FILA)

Beta-blokatorji vsebujejo in ne samo te:

acebutolol, alprenolol, atenolol, betaksolol, bisoprolol, bunolol, karteolol, karvedilol, celiprolol, esmolol, labetalol, levobunolol, metipranolol, metoprolol, nadolol, oksprenolol, pindolol, propranolol, sotalol, timolol.

Št. dokumenta : 30308-13-1/9

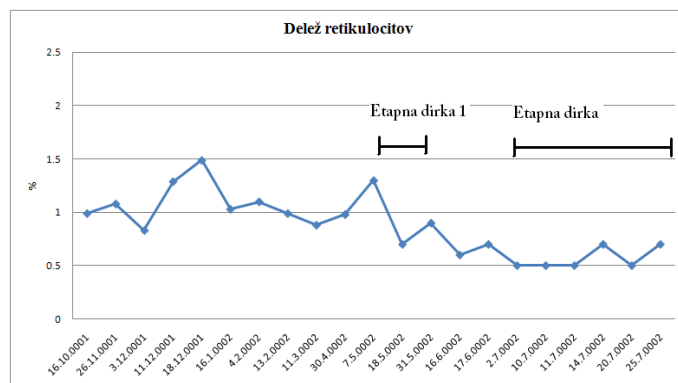
Priloga 6 - Primerjava sprememb % retikulocitov pri primerljivih vzdržljivostnih športnikih.

Športnik C*

Tabela 33:

Športnik C	% RET
POVP	0.87
VAR	0.08
MAX	1.49
MIN	0.50

*Športnik C je izvajal višinski trening v sezoni 0001/0002, natančen čas ni znan. Uporaba prepovedane avtologne krvne transfuzije ni izključena. Sum na uporabo le te med Etapno dirko leta 0002 (tudi zaradi izjemno nizkega % RET tik pred in med Etapno dirko v primerjavi z obdobjem izven tekmovalnega obdobja) je javno izrazil dr. Mørkeberg, sam trenutno eden najvidnejših strokovnjakov za dokazovanje avtologne krvne transfuzije [82].

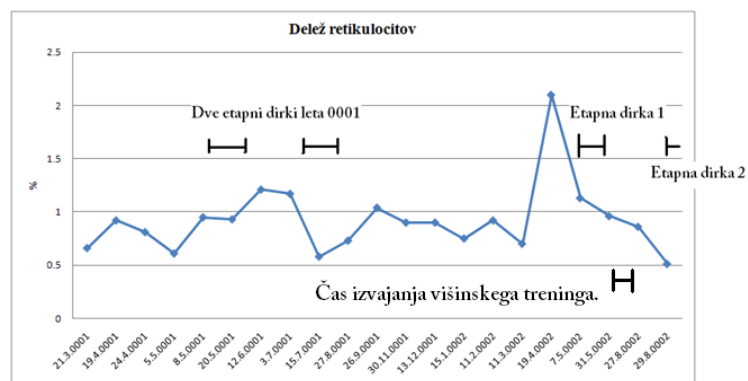


Športnik B**

**Športnik B je izvajal višinski trening od 5. – 26.7. in 13. – 24.8.0002. Najprej na 2800 m nato na 3200 m.n.v..

Tabela 34:

Športnik B	% RET
POVP	0.92
VAR	0.11
MAX	2.10
MIN	0.51



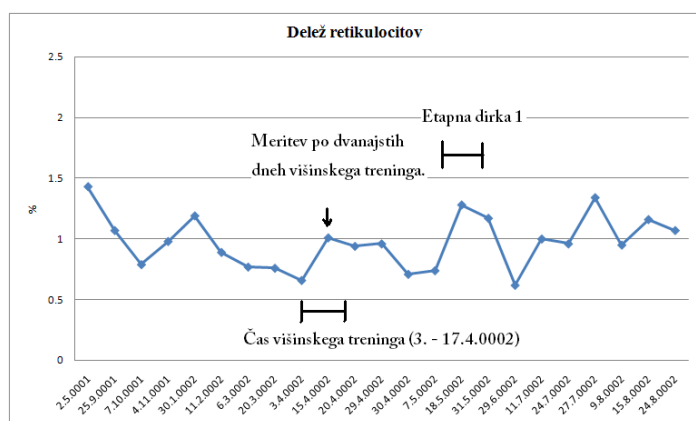
Najvišja varianca % RET od vseh treh športnikov. Najvišji maksimum % RET od vseh treh športnikov.

Športnik A***

***Športnik A je izvajal višinski trening na Tenerifih od 3.4. do 17.4.0002 [137]. Višina ni znana.

Tabela 35:

Športnik A	% Ret
POVP	0.98
VAR	0.05
MAX	1.43
MIN	0.62



Priloga 7 – Variance zaporedij [Hb] znotraj posameznika (ang. WS_VAR) slovenskih vrhunskih vzdržljivostnih športnic in športnikov (tekačice/-či na smučeh) spremljanih v dolžini 8. oz. 15. –ih tednov, vmes tritedensko bivanje na višini.

	Št. Osebe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Nadmorska višina (m)	Spol/Št. vz.	Ž	Ž	Ž	Ž	M	M	M	M	M	M	M	M	M
300	1	142	146	128	128	162	156	145	150	162	157	156	152	
1600	2	144	144	131	137	148	163	151	167		163	160	152	154
1600	3	147	148	141	138	153	162	147	161	158	159	152	156	145
1600	4	148	151	133	138	160	164	141	162	155	155	157	155	152
300	5	151	147	132	140	143	159	142	154	155	153	156	158	142
300	6	142	140	130	134	155		136	157	160	154	152	157	150
300	7		140	131	139	152	152	138	151	153	151	156	151	
300	8					157	154	138	159	157	145			
WS_VAR		13.1	16.8	17.2	16.9	38.8	22.0	26.2	33.7	9.8	29.1	8.0	7.6	24.8

Priloga 8 - individualni podatki poklicnih vrhunskih športnikov.

Športnik 1

Moški

Plavalec

"Domnevno dopingiran"

Datum	Hb (g/L)
1/20/2003	146
3/3/2003	180
4/7/2003	145
6/4/2003	144
7/7/2003	140
9/3/2003	136
10/10/2003	139
11/17/2003	141
1/19/2004	143
2/23/2004	149
Varianca	154.2

Športnik 4

Ženska

Tekačica na smučeh

"Domnevno dopingirana"

Datum	Hb (g/L)
12/2/2003	138
12/11/2003	134
1/19/2004	139
2/2/2004	135
7/7/2004	130
7/23/2004	128
8/23/2004	131
9/7/2004	139
10/12/2004	140
11/3/2004	129

Športnik 2

Moški

Plavalec

Datum	Hb (g/L)
2/24/2003	167
3/24/2003	167
4/30/2003	164
5/27/2003	161
7/9/2003	165
9/25/2003	166
10/20/2003	173
11/17/2003	173
1/5/2004	170
2/10/2004	171
4/13/2004	169
7/28/2004	168
10/5/2004	155
12/3/2004	165
Varianca	23.0

Športnik 5

Moški

Tekač na smučeh

"Domnevno dopingiran"

Datum	Hb (g/L)
7/22/2004	154
9/2/2004	153
10/4/2004	157
10/18/2004	161
11/30/2004	158
12/20/2004	156
1/11/2005	129

Športnik 3

Moški

Kolesar

Datum	Hb (g/L)
2/28/2005	155
3/21/2005	167
4/19/2005	164
5/17/2005	172
6/3/2005	158
7/1/2005	160
9/26/2005	166
10/17/2005	168
11/21/2005	167
12/6/2005	171
Varianca	30.8

Športnik 6

Moški

Tekač na smučeh

"Domnevno dopingiran"

Datum	Hb (g/L)
12/2/2003	158
12/23/2003	158
1/5/2004	159
1/19/2004	153
1/26/2004	155
6/4/2004	160
7/22/2004	150
9/2/2004	157
10/4/2004	158
10/18/2004	162

12/1/2004	138
12/27/2004	137
Varianca	18.7

Športnik 1

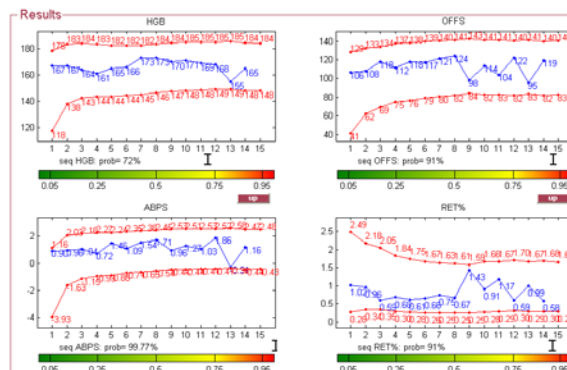
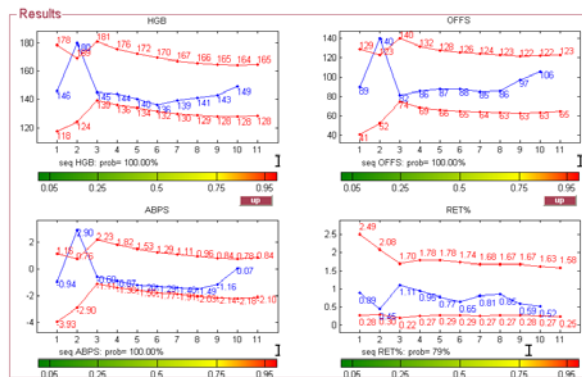
Moški, plavalec, domnevno dopingiran.

6/10/2005	154
9/6/2005	151
Varianca	86.8

Športnik 2

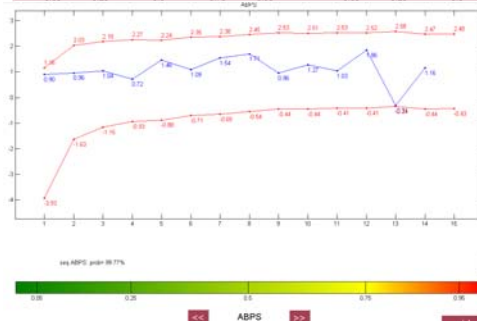
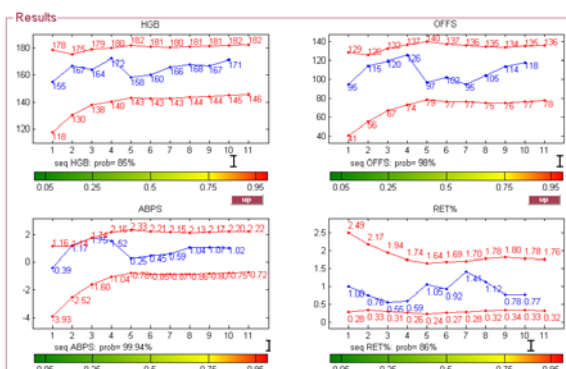
Moški, plavalec.

11/30/2004	154
12/20/2004	163
Varianca	14.0



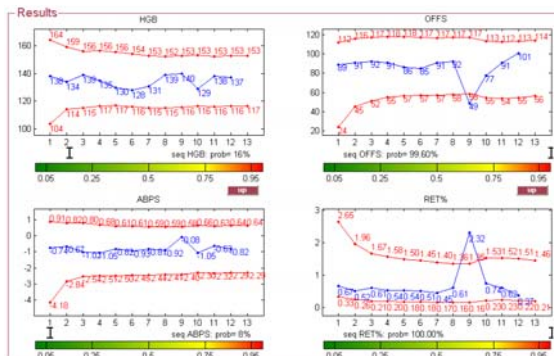
Športnik 3

Moški, kolesar.



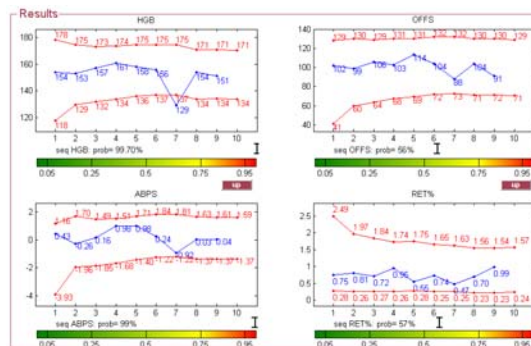
Športnik 4

Ženska, tekačica na smučeh, domnevno dopingirana.

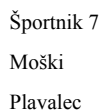


Športnik 5

Moški, tekač na smučeh, domnevno dopingiran.



Moški, tekač na smučeh, domnevno dopingiran.



Športnik 8
Moški
Kolesar

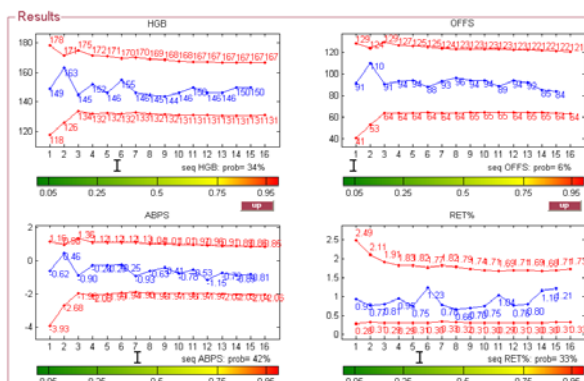
Športnik 9
Moški
Kolesar

Datum	Hb (g/L)
2/24/2003	155
3/24/2003	153
4/30/2003	155
5/27/2003	151
7/9/2003	151
9/22/2003	147
10/20/2003	148
11/17/2003	147
Varianca	11.0

Varianca	24.7
----------	------

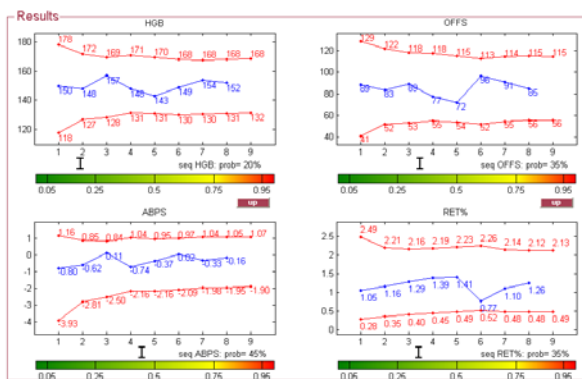
Športnik 7

Moški, plavalec.



Športnik 8

Moški, kolesar.



Športnik 9

Moški, kolesar.

