

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANOŠ VEBER

**OCENA INDEKSA STIMULACIJE KOSTNEGA MOZGA
PRI SUMU NA ZLORABO ERITROPOETINA V ŠPORTU**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANOŠ VEBER

**OCENA INDEKSA STIMULACIJE KOSTNEGA MOZGA
PRI SUMU NA ZLORABO ERITROPOETINA V ŠPORTU**

**STIMULATION INDEX EVALUATION IN THE
SUSPECTED ABUSE OF ERYTHROPOIETIN IN SPORTS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljal na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. Meritve so bile opravljene na Inštitutu za šport v Ljubljani in na Rogli.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Najlepša hvala tudi staršem za podporo in vzpodbudo v času študija.

Izjava

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

Janoš Veber

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, april 2011

VSEBINA

POVZETEK	i
ABSTRACT	ii
SEZNAM OKRAJŠAV	iii
1. UVOD	- 1 -
1.1. DEFINICIJA DOPINGA	- 1 -
1.2. ZGODOVINA DOPINGA.....	- 1 -
1.3. DOPING SNOVI IN NEKATERE ANALIZNE METODE DOKAZOVANJA	- 3 -
1.4. PREPOVEDANE SNOVI.....	- 5 -
1.4.1. Poživila ali stimulansi	- 5 -
1.4.2. Narkotiki.....	- 5 -
1.4.3. Anabolični agensi.....	- 5 -
1.4.4. Diuretiki.....	- 6 -
1.4.5. Kanabinoidi.....	- 6 -
1.4.6. Peptidni hormoni, mimetiki in analogi.....	- 6 -
1.4.7. Agensi z anti-estrogeno aktivnostjo.....	- 7 -
1.4.8. Maskirni agensi.....	- 7 -
1.5. SNOVI, KI SO PREPOVEDANE SAMO V NEKATERIH ŠPORTIH	- 7 -
1.5.1. Alkohol	- 7 -
1.5.2. Lokalni anestetiki.....	- 7 -
1.5.3. Glukokortikosteroidi	- 7 -
1.5.4. Betazaviralci	- 8 -
1.6. PREPOVEDANE METODE.....	- 8 -
1.6.1. Genski doping.....	- 8 -
1.6.2. Kemijska in fizična manipulacija	- 8 -
1.7. KRVNI DOPING.....	- 10 -
1.7.1. Transfuzija krvi.....	- 11 -
1.7.2. Eritropoetin	- 14 -
1.8. DIREKTNA METODA DOLOČANJA rHuEPO	- 16 -
1.9. INDIREKTNE METODE	- 19 -
1.9.1. Razvoj on in off modela.....	- 22 -
1.9.2. Prva generacija indirektnih testov za detekcijo rHuEPO.....	- 25 -

1.9.3.	Druga generacija indirektnih testov za detekcijo rHuEPO	- 27 -
1.9.4.	Vključitev indirektnih modelov/parametrov v biološki potni list	- 30 -
2.	NAMEN DELA	- 32 -
3.	EKSPERIMENTALNI DEL.....	- 33 -
3.1.	PREISKOVANCI.....	- 33 -
3.2.	METODE	- 34 -
3.2.1.	Hemoglobin in retikulociti.....	- 35 -
3.2.2.	Indeks stimulacije kostnega mozga – OFF-hr	- 35 -
3.2.3.	OFF-hr _z vrednost.....	- 36 -
3.2.4.	Statistična obdelava – prva skupina.....	- 38 -
3.2.5.	Statistična obdelava – druga skupina	- 38 -
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	- 39 -
4.1.	PRIMERJAVA VREDNOSTI KRVNIH PARAMETROV IN OFF-hr MODELA S FIS LIMITNIMI VREDNOSTMI IN POPULACIJSKIMI REFERENČNIMI VREDNOSTMI PRI PRVI SKUPINI ŠPORTNIKOV	- 39 -
4.1.1.	Moški.....	- 39 -
4.1.2.	Ženske	- 42 -
4.2.	PRIMERJAVA VREDNOSTI HEMOGLOBINA MED SPOLOMA PRI PRVI SKUPINI ŠPORTNIKOV.....	- 44 -
4.3.	PRIMERJAVA VREDNOSTI OFF-hr MODELA MED SPOLOMA PRI PRVI SKUPINI ŠPORTNIKOV.....	- 44 -
4.4.	PRIMERJAVA VREDNOSTI KRVNIH PARAMETROV PRED VIŠINO, NA VIŠINI IN PO VIŠINI S FIS LIMITNIMI VREDNOSTMI IN POPULACIJSKIMI REFERENČNIMI VREDNOSTMI PRI DRUGI SKUPINI ŠPORTNIKOV	- 46 -
4.4.1.	Moški.....	- 46 -
4.4.2.	Ženske	- 49 -
4.5.	PRIMERJAVA VREDNOSTI OFF-hr MODELA PRED VIŠINO, NA VIŠINI IN PO VIŠINI PRI DRUGI SKUPINI ŠPORTNIKOV	- 51 -
4.5.1.	Moški.....	- 51 -
4.5.2.	Ženske	- 53 -
4.6.	SPREMLJANJE INDIVIDUALNEGA KRVNEGA PROFILA.....	- 55 -
4.6.1.	Evalvacija Hb, Ret% in OFF-hr modela	- 55 -
4.6.2.	Izračun OFF-hr _z vrednosti	- 58 -
5.	SKLEP	- 60 -
6.	LITERATURA	- 61 -

POVZETEK

Konec osemdesetih let prejšnjega stoletja se je na tržišču pojavil rekombinantni humani eritropoetin. Ta glikoprotein poveča aerobno kapaciteto organizma in na ta način izboljša zmogljivost, zato se je začel uporabljati v športu za namene dopinga. Dolgo časa zanj ni bilo razvite analize metode, ki bi razlikovala med endogenim in eksogeno vnešenim eritropoetinom. Športne organizacije so skušale omejiti krvni doping tako, da so postavile določene mejne vrednosti za hematokrit in hemoglobin. Vendar so športniki prilagodili režim jemanja eritropoetina na tak način, da niso presegli omenjenih mej. Leta 2000 so iznašli direktno metodo določanja rekombinantnega humanega eritropoetina v urinu z izoelektričnim fokusiranjem. Sočasno so raziskovalci razvijali tudi indirektne metode, ki so občutljive na značilne spremembe hematoloških markerjev po zlorabi rekombinantnega humanega eritropoetina. Razvili so indirektno metodo, ki lahko zazna športnika, ki je pred kratkim nehal jemati eritropoetin. Poimenovali so jo indeks stimulacije kostnega mozga – OFF-hr indeks. Ta indirektna metoda je vključena tudi v biološki potni list in iz nje so izpeljali trenutno najbolj občutljivo indirektno metodo določevanja rekombinantnega humanega eritropoetina – OFF-hr_z indeks.

V diplomu smo preučevali dve skupini športnikov in ugotavljali ali je šlo pri katerem od športnikov za primer povišanega OFF-hr indeksa ali nadmorska višina 1517 metrov vpliva na OFF-hr in ali se OFF-hr značilno razlikuje med spoloma. Preverili smo tudi ali vrednosti hemoglobina in procenta retikulocitov, ki ju športne zveze kontrolirajo na tekmovanjih, ustrezajo kriterijem antidopinškega pravilnika mednarodne smučarske zveze. Pri dveh preiskovancih, ki sta kazala največja odstopanja v krvnem profilu, smo ugotavljali ali gre pri njiju za presežen prag OFF-hr_z indeksa, določen s strani mednarodne smučarske zveze.

Ugotovili smo, da nihče izmed športnikov ni presegel praga za OFF-hr in OFF-hr_z, nekaj posameznikov pa je preseglo prag za procent retikulocitov. Nadmorska višina 1517 metrov ni imela bistvenega vpliva na vrednosti indeksa stimulacije kostnega mozga. Rezultati so pokazali, da imajo moški statistično značilno višje vrednosti OFF-hr indeksa kot ženske.

ABSTRACT

At the end of the 1980s, recombinant human erythropoietin appeared on the market. This glycoprotein increases the aerobic capacity of the organism and improves the performance, therefore it began to be used in sport for doping purposes. For a long time there were no analytical methods to differentiate between endogenous and exogenous erythropoietin. Sports organizations tried to restrict blood doping by introducing limits for hematocrit and hemoglobin. However, athletes adapted their regime of taking erythropoietin in such way that did not exceed those limits. In 2000, a direct method of determining recombinant human erythropoietin in urine with isoelectric focusing was invented. At the same time, researchers were developing indirect methods sensitive to significant changes of hematologic markers following recombinant human erythropoietin treatment. An indirect model was developed that can detect athletes that had recently stopped taking erythropoietin. It was named stimulation index – OFF-hr index. It is included in the biological passport and from it an indirect method of determining recombinant human erythropoietin – OFF-hr_z index was developed that is the most sensitive at the present.

In our final thesis we were studying two groups of athletes. We observed if there was increased OFF-hr index in any of the athletes; if altitude 1517 m affects OFF-hr, and if there is a statistical difference in levels of OFF-hr index between sexes. We also checked whether hemoglobin and percent of reticulocytes, which are measured in competitions, meet the criteria for doping of the International Ski Federation. In two subjects who showed the greatest deviations in the blood profile, we checked if any of them exceeded the threshold for OFF-hr_z, determined by International Ski Federation. We found out that none of the athletes exceeded the threshold for OFF-hr and OFF-hr_z, but a few subjects exceeded the threshold for percentage of reticulocytes. Furthermore, we found that altitude 1517 m had no significant effect on the stimulation index, and results showed that men have significantly higher levels of OFF-hr index than women.

SEZNAM OKRAJŠAV

AAS	- Anabolični androgeni steroidi
CERA	- Rekombinantni eritropoetin tretje generacije
EPO	- Eritropoetin
EPOr	- Eritropoetinski receptor
FIS	- Mednarodna smučarska zveza
Hb	- Hemoglobin
Hct	- Hematokrit
IEF	- Izoelektrično fokusiranje
MOK	- Mednarodni olimpijski komite
NESP	- Novi eritropoezo stimulirajoči protein
OFF-hr	- Indeks stimulacije kostnega mozga
OFF-hr _z	- z-vrednost indeksa stimulacije kostnega mozga
OI	- Olimpijske igre
RetHct	- Retikulocitni hematokrit
rHuEPO	- Rekombinantni humani eritropoetin
sTfR	- serumski topni transferinski receptor
UCI	- Mednarodna kolesarska zveza (Union Cycliste Internationale)
WADA	- Svetovna protidopinška agencija (World Anti-Doping Agency)

1. UVOD

1.1. DEFINICIJA DOPINGA

Obstaja več definicij dopinga. Prvo uradno definicijo je leta 1963 sprejel Svet Evrope, ki definira doping, kot uporabo telesu tujih snovi z edinim namenom, da se umetno in na nepošten način izboljša sposobnost športnika na tekmovanju. Poleg tega pomeni doping tudi različne fiziološke ukrepe, ki izboljšajo dosežke športnika (1).

Uradna slovenska definicija pravi, da je doping uporaba snovi ali postopkov, ki so prepovedani s strani Mednarodnega olimpijskega komiteja (MOK) in Nacionalne antidopinške komisije. MOK opredeljuje doping kot uporabo, jemanje, vnašanje ali vbizgavanje katerekoli prepovedane snovi ali prepovedanega postopka s strani medicinske komisije MOK (2; 3). Najnovejšo definicijo dopinga je postavila Svetovna antidopinška agencija WADA (World Anti-Doping Agency), ki doping definira kot uporabo zvijače, bodisi snovi ali postopka, ki je potencialno nevarna za športnikovo zdravje, oziroma je zmožna izboljšati njegove sposobnosti; ali prisotnost prepovedane snovi v športnikovem telesu ali dokaz o uporabi le-te ali dokaz o uporabi prepovedanega postopka (2).

1.2. ZGODOVINA DOPINGA

Termin *doping* se je prvič pojavil leta 1889 v angleškem slovarju in je opisoval sredstvo, ki je vsebovalo opij in se je uporabljalo za nedovoljeno drogiranje konj na konjskih dirkah (1). Vendar pa so se poskusi dopinga oziroma umetnega izboljšanja sposobnosti pojavljali že mnogo prej. Izvor besede doping naj bi izhajal iz nizozemske besede »dop«, s katero so poimenovali alkoholno pijačo iz grozdja, ki so jo zulujski bojevniki uporabljali za povečanje hrabrosti v bitkah (4). Ljudje so različne snovi za poživiljanje ali izboljšanje sposobnosti sprva uporabljali pri obredih, kasneje pa tudi za premagovanje večjih naporov. Tako so južnoameriški Indijanci žvečili liste koke za večjo vzdržljivost, medtem ko so Arabci izkoriščali korenine rastline »kata edulis«, iz katere so delali čaj za preprečevanje utrujenosti in proti nespečnosti. Čez čas pa so se te snovi začele uporabljati za povečanje sposobnosti športnikov. 400-300 let pr. n. št. so grški olimpijci uporabljali poživiljajoče napoje iz izvlečkov gob in rastlinskih zrn, gladiatorji pa so pili različne zeliščne napoje, da

bi njihovi boji trajali čim dlje. V moderni dobi se je doping znova pojavil v 19. stoletju, ko se je ponovno začel razvijati šport. Na konjskih dirkah se je uporabljal heroin, v boksu pa morfij. Pri vzdržljivostnih športih, zlasti pri kolesarstvu, so se pogosto uporabljali strihnin, kofein, kokain in alkohol. V 20. stoletju se je uporaba dopinga močno povečala. Predvsem se je doping uporabljal na konjskih dirkah, kjer so s tem že vnaprej določali rezultate in tako mastno služili na stavah. Zato ne čudi, da je bila prva dopinška kontrola izvedena na konjskih dirkah, in sicer leta 1910 v Avstriji. Vendar pa to še zdaleč ni rešilo problema in postalo je jasno, da bo potrebno sprejeti omejitve glede dopinga v športu. Leta 1928 je prva reagirala Mednarodna atletska zveza (IAAF), ki je prepovedala uporabo stimulansov. Nato so ji sledile še mnoge druge zveze, vendar so bile te omejitve brez uspeha, saj se takrat niso izvajale še nobene dopinške kontrole. Tako so se na OI v Berlinu leta 1936 na veliko uporabljali amfetamini, v 50. letih pa so se pojavili še anabolični steroidi, ki so jih prvi začeli uporabljati bodybuilderji, nato pa se je njihova uporaba razširila na ostale športe. Prvo antidopinško komisijo so ustanovili leta 1959 v Franciji. Leto kasneje je na OI v Rimu umrl danski kolesar zaradi prevelikega odmerka amfetaminov, ki jih je dobil od svojega trenerja. Ta dogodek je spodbudil Svet Evrope, da je izdal Resolucijo proti uporabi dopinških snovi v športu. Leta 1963 so ustanovili Komisijo izvedencev za boj proti dopingu v športu. Tega leta so boksarja Edmunda Esperaa ujeli pri uporabi dopinga in ga obsodili na tri mesece zapora, kar je bil prvi primer zaporne kazni zaradi dopinga. Leta 1967 je Medicinska komisija pri MOK izdala svoj prvi seznam prepovedanih snovi in leto kasneje uvedla prvo formalno dopinško testiranje na zimskih olimpijskih igrah v Grenoblu in poletnih OI v Mexico Cityju. Do leta 1970 je večina mednarodnih športnih zvez že uvedla dopinška testiranja, vendar so se anabolični steroidi še vedno na veliko uporabljali, saj do takrat še niso poznali ustreznega analiznega postopka, ki bi jih odkril. Leta 1974 so le uvedli zanesljivo metodo za odkrivanje anaboličnih steroidov, zaradi česar se je povečalo število pozitivnih primerov pri bodybuilderjih in težkoatletih. Leta 1975 so dopinške kontrole začeli izvajati tudi v Jugoslaviji.

Velik uspeh v boju proti dopingu so dosegli z uvedbo metod plinske kromatografije in masne spektrometrije, saj so tako povečali natančnost in zanesljivost rezultatov. Na OI v Seulu leta 1988 so znanemu atletu Benu Johnsonu odvzeli zlato medaljo in razveljavili svetovni rekord, saj se je izkazalo, da je jemal anabolične steroide. Ta dogodek je močno odmeval v svetu in javnost je zahtevala, da je nujno potrebno nekaj storiti v boju proti dopingu. Svet Evrope je leta 1989 sprejel Antidopinško konvencijo, leto kasneje pa so

uvedli nenapovedano testiranje. To je sprva sprožilo buren odziv športnikov in športnih delavcev, saj so trdili, da je nenapovedano testiranje neetično in da pomeni vdor v njihovo zasebnost.

Sočasno so se razvijale tudi analizne metode in v 90-ih je bila opazna korelacija med učinkovitejšimi analiznimi testi in očitnim padcem vrhunskih rezultatov v športih, preplavljenih s stimulansi in steroidi. Vendar pa s tem vojna proti dopingju še zdaleč ni bila dobljena. V tistem času se je namreč razširil pojav krvnega dopinga. S to metodo so si športniki na nedovoljen način povečali aerobno kapaciteto krvi in s tem izboljšali svoje sposobnosti. Zato je MOK leta 1986 krvni doping uvrstil med prepovedane metode.

Eden od načinov krvnega dopinga je zloraba eritropoetina (EPO). Ta se je pojavil proti koncu osemdesetih let in MOK ga je leta 1990 vključil med prepovedane snovi, čeprav zanj do leta 2000 ni bilo uspešne metode odkrivanja.

Leta 1996 smo tudi Slovenci ustanovili antidopinško komisijo. Nato pa se je leta 1998 zgodil dogodek, ki je šokiral ves svet. Na ugledni kolesarki dirki po Franciji (Tour de France) je prišlo do velikega dopinškega škandala. Na carini so ujeli fizioterapevta ene od ekip, ki je tovoril velikansko zalogo prepovedanih snovi (med drugim tudi EPO). Francoska policija je nato izvedla racijo v hotelskih sobah kolesarjev in pri eni ekipi našla nedovoljena sredstva. Krivdo so takoj priznali nekateri znani kolesarji. Ti dogodki so osvetlili potrebo po skupnem, harmoniziranem boju proti dopingju. MOK je prevzel iniciativo in februarja 1999 v švicarskem mestu Lausanne sklical prvo svetovno konferenco o dopingju v športu. Na tej konferenci so sprejeli Lausansko deklaracijo, na podlagi katere so 10. novembra 1999 ustanovili Svetovno protidopinško agencijo (WADA). WADA je mednarodna neodvisna antidopinška agencija, ki promovira in koordinira globalni boj proti dopingju (1; 2; 4).

1.3. DOPING SNOVI IN NEKATERE ANALIZNE METODE DOKAZOVANJA

Doping snovi so vse snovi, ki so na seznamu prepovedanih snovi in postopkov. Ker pa se znanost hitro razvija prihajajo venomer nove substance, zato WADA vsako leto objavi obnovljeno in dopolnjeno listo prepovedanih snovi in postopkov. Za doping snovi pa se štejejo tudi sredstva, ki niso na tem seznamu (ker so jih razvili šele pred kratkim), a jih športniki uporabljajo kot doping. Doping snovi so pogosto sestavine različnih zdravil, lahko pa so tudi telesu lastne snovi (endogene), vendar je na slednje športnik pozitiven le,

če presegajo določeno mejo (2). WADA vključi snov ali postopek na listo, če zadostuje vsaj dvema od treh kriterijev (5):

- snov ali postopek izboljša rezultate
- snov ali postopek škoduje športnikovem zdravju
- snov ali postopek je v nasprotju s športnim kodeksom.

Nekoliko z zamikom pa je razvoju prepovedanih snovi sledil razvoj analiznih metod za detekcijo doping snovi. Leta 1972 na OI v Münchnu so priporočila za detekcijo prepovedanih snovi vključevala uporabo metod tankoplastne kromatografije (TLC) in plinske kromatografije (GC) (1). Danes se večina prepovedanih snovi (razen peptidnih hormonov, npr. EPO in hGH) analizira s sklopljeno metodo plinske ali tekočinske kromatografije z masnim spektrometrom kot detektorjem (GC-MS ali LC-MS) (5).

V začetku sedemdesetih let se androgeni anabolični steroidi (AAS) še niso dali analizirati z metodo GC-MS. To je vodilo v razvoj imunoencimskih presejalnih testov. Kljub nekaterim pomanjkljivostim te metode, so leta 1976 na Olimpijskih igrah v Montrealu uporabili ta test kot presejalni test za AAS. Vendar pa so šele nekaj tednov po OI potrdili rezultate imunoencimskih testov s tehnologijo GC-MS in odkrili 8 pozitivnih primerov jemanja AAS. Problem se je pojavil, ko so športniki posegli po steroidih, ki so po sestavi enaki telesnim. Na žalost analizne metode niso zmožne razlikovati med človeškim testosteronom in farmacevtskim (umetnim) testosteronom, zato so za dokaz uporabe nedovoljenih steroidov uvedli razmerje T/E (testosteron/epitestosteron), ki ne sme biti večje kot štiri.

Pri vseh zgoraj naštetih metodah lahko hitro pride do napak in nejasnih rezultatov. Bodisi zaradi analiznih napak bodisi zaradi inter-individualnih fizioloških razlik med športniki. Velikokrat se zgodi, da športniki izpodbijajo svojo krivdo prav s sklicevanjem na te napake. Ljudje smo si različni tako po zunanosti, kot tudi po fizioloških vrednostih. Tako imajo nekateri naravno povišane vrednosti hematokrita ali naravno povišano razmerje T/E, spet drugi pa zaradi genetskih dejavnikov ne presežejo dovoljenega razmerja T/E, kljub uporabi nedovoljenih steroidov. Temu se lahko izognemo tako, da od vsakega športnika skozi daljši čas hranimo rezultate krvnih in urinskih testov. Te rezultate nato najprej primerjamo s povprečnimi vrednostmi prebivalstva in prejšnjimi vrednostmi športnika. Če pride do velikih odstopanj glede na prejšnje vrednosti, je to lahko indirektni dokaz zlorabe dopinga. Na primer, v športnikovem urinu opazimo nenaden močan upad endogenih

fizioloških steroidov, kar nakazuje na zmanjšano telesno sintezo endogenih steroidov zaradi zlorabe močnih AAS. Ne glede na to, da s tem postopkom ne identificiramo dejanske prepovedane snovi, pa je očitna sprememba v krvnem ali urinskem profilu športnika, pri nekaterih športnih zvezah zadosten dokaz, da se lahko proti njemu začne disciplinski postopek. Pionirsko delo na tem področju so naredili pri mednarodni kolesarski zvezi (UCI), kjer so prvi uvedli biološki potni list za kolesarje. V tem dokumentu so zapisani vsi rezultati krvnih in urinskih testov posameznega kolesarja (5).

1.4. PREPOVEDANE SNOVI

1.4.1. Poživila ali stimulansi

Delujejo stimulirajoče na centralni živčni sistem (CŽS). Športniki jih uporabljajo za zmanjševanje utrujenosti, za povečanje zbranosti, tekmovalnosti in agresivnosti. Poživila imajo mnogo neželenih učinkov in lahko celo povzročijo smrt. So pogosta sestavina zdravil za zdravljenje kašlja in prehlada (efedrin), zato morajo biti športniki pozorni, kaj jemljejo v primeru bolezni. Najpogostejši stimulansi v športu so: amfetamin, kokain in efedrin.

1.4.2. Narkotiki

Delujejo na CŽS in tako zmanjšujejo občutek za bolečino. Športniki jih uporabljajo za prikrivanje bolečin po poškodbi. Narkotiki imajo tudi kratkotrajen, a močan poživilni učinek, lahko povzročijo evforijo in občutek nepremagljivosti. Uporaba narkotikov lahko povzroči hude zdravstvene probleme in pri dolgotrajni uporabi se lahko razvije telesna odvisnost.

1.4.3. Anabolični agensi

Androgeni anabolični steroidi (AAS): so derivati testosterona, ki pospešijo sintezo proteinov (anabolno delovanje) v spolnih organih, koži, okostju in skeletnih mišicah. Imajo pa tudi androgeno delovanje (razvoj sekundarnih moških spolnih znakov), ki pa je pri uporabnikih nezaželeno. Športniki, največkrat dvigovalci uteži in bodybuilderji, jih uporabljajo za hitrejšo rast mišic in posledično večjo moč. V športih, kjer je potrebna vzdržljivost, hitrost in gibljivost, je AAS manj. Neželeni učinki androgenih anaboličnih

steroidov so zelo resni, saj lahko prizadenejo kardiovaskularni sistem, jetra, ledvica, reprodukcijski sistem in pa imunski sistem. Lahko pa povzročijo tudi smrt.

Ostali anabolični agensi: sem spadajo učinkovine, ki niso androgeni anaboliki, vendar imajo podobno delovanje, če se jih jemlje v velikih količinah. Tak primer je učinkovina klenbuterol, ki je β -2 agonist in se v medicini uporablja za zdravljenje astme. Klenbuterol v velikih količinah povzroča znižanje maščob in povečanje mišičnega tkiva. Stranski učinki so vznemirjenost, drhtenje, razbijanje srca, glavoboli in vrtoglavica.

1.4.4. Diuretiki

So učinkovine, ki povečujejo tvorbo seča in posledično izločanje le tega. Športniki jih uporabljajo, kadar hočejo hitro izgubiti odvečno težo (pogosti pri športih, ki so kategorizirani po teži, npr. borilni športi). Drug razlog uporabe diuretikov pa je, da z njimi poskušajo znižati koncentracijo prepovedane snovi v telesu, da bi bila manjša možnost pozitivne doping kontrole. Uporaba diuretikov je lahko zelo nevarna v primeru zdravega organizma, saj lahko pride do dehidracije.

1.4.5. Kanabinoidi

Predstavljajo psihoaktivne kemikalije v rastlini kanabis, katere najaktivnejša je 11-nor-delta-9-tetrahidrokanabinol-9-karboksilna kislina (THC). Športniki te snovi uporabljajo zaradi sproščujočih učinkov, predvsem hašiš in marihuana pa povzročata tudi evforijo. Kanabinoide je dokaj enostavno odkrivati, saj se THC zelo počasi izloča iz telesa.

1.4.6. Peptidni hormoni, mimetiki in analogi

So endogene spojine, ki prenašajo sporočila po organizmu in imajo podobne učinke kot anabolični steroidi. Peptidni hormoni delujejo kot prenašalci med posameznimi organi in spodbujajo različne funkcije, mimetiki posnemajo delovanje ostalih prepovedanih snovi, analogi pa so umetno narejene snovi, ki imajo podobno zgradbo, kot ostale prepovedane snovi. Peptidne hormone, mimetike in analoge je zelo težko odkrivati.

1.4.7. Agensi z anti-estrogeno aktivnostjo

So snovi, ki nimajo bioloških lastnosti ženskih spolnih hormonov, ampak spodbujajo nastajanje testosterona. Prepovedani so le pri moških.

1.4.8. Maskirni agensi

So produkti s pomočjo katerih športniki skušajo prikriti prisotnost prepovedanih snovi v svojem telesu. Poznamo razširjevalce plazme, ki znižajo raven hematokrita in hemoglobina. Te snovi torej redčijo kri in se zaradi tega uporabljajo za preprečevanje odkrivanja eritropoetina (EPO). Pri uporabi lahko pride do alergičnih reakcij in anafilaktičnega šoka.

1.5. SNOVI, KI SO PREPOVEDANE SAMO V NEKATERIH ŠPORTIH

1.5.1. Alkohol

Je po učinku depresor centralnega živčnega sistema. Športniki ga zaužijejo, da se znebijo treme in da se sprostijo. V športu alkohol prej poslabša rezultat kot pa izboljša. Zlasti se mu je potrebno izogibati v vzdržljivostnih športih, saj pospešuje dehidracijo. Prepovedan je recimo v bencinskih športih, biljardu, karateju...

1.5.2. Lokalni anestetiki

So učinkovine, ki preprečujejo porajanje in prevajanje živčnih impulzov. Športniki jih uporabljajo za prikrivanje bolečine brez vpliva na centralni živčni sistem. Lokalni anestetiki niso prepovedani. Športnik, ki jih uporablja, mora poslati medicinski komisiji MOK potrebne dokumente: diagnozo, dozo in način aplikacije.

1.5.3. Glukokortikosteroidi

So snovi, ki se uporabljajo za zdravljenje vnetnih procesov in zmanjšanje bolečin. Imajo številne stranske učinke. Športniki jih zlorabljajo z namenom zmanjšanja bolečine in omejitve vnetnih procesov in pa tudi zaradi evforičnih učinkov.

1.5.4. Betazaviralci

So učinkovine, ki povzročijo padec krvnega tlaka in upočasnijo srčni utrip. To zmanjšuje tresenje rok oziroma celega telesa, s tem pa se poveča natančnost, zaradi česar jih uporabljajo predvsem v streljanju, lokostrelstvu, kegljanju, smučarskih skokih (2).

1.6. PREPOVEDANE METODE

Med prepovedane metode štejemo genski doping, kemijsko in fizično manipulacijo ter krvni doping.

1.6.1. Genski doping

Po definiciji WADA-e je genski doping neterapevtska uporaba celic, genov, genskih elementov ali manipulacija izražanja genov, s ciljem izboljšati športnikovo zmogljivost (4). Genska terapija se v medicini uporablja pri odpravljanju nekaterih genetskih nepravilnosti. Pri tem lahko vstavijo nov gen, ki bo nadomestil okvarjenega ali pa vplivajo na izražanje določenega gena. Genska terapija ima potencial, da bi se lahko uporabljala v športu za namene izboljšanja posameznikove zmogljivosti. Z vpletanjem v gene, ki igrajo vlogo pri rasti mišic, dostavi kisika do tkiv, nevro-mišični koordinaciji in celo pri kontroli bolečine, bi si lahko športnik pridobil neupravičeno prednost pred konkurenco. Tarče za genski doping so geni, ki vplivajo na sintezo eritropoetina (EPO), inzulinu podobnega rastnega dejavnika-1 (IGF-1), rastnega hormona (hGh), miostatina in mnogih drugih. Tako bi pri vstavitvi gena za EPO opazili povečano dostavo kisika do mišic, medtem ko bi se supresija gena za miostatin kazala v povečanem mišičnem razvoju. Oboje bi športniku prineslo korist.

Odkrivanje genskega dopinga zaenkrat še ni mogoče, saj še ne obstaja analizna metoda, ki bi lahko zaznala transgene proteine, kateri so praktično identični endogenim. Zato tudi še ne vemo ali se genski doping dejansko že uporablja. Je pa vsekakor velika grožnja za prihodnost. Genski doping ima potencial, da ustvari »super športnika« na račun njegovega zdravja in športne etike (6).

1.6.2. Kemijska in fizična manipulacija

Sem spadajo tiste substance in tehnike, ki vplivajo na vzorec za doping kontrolo. Te snovi in metode zakrijejo oziroma zmanjšajo prisotnost prepovedanih substanc v urinu športnika.

Kemijska manipulacija vključuje diuretike, probenecid, epitestosteron, inhibitorje 5α -reduktaze in razširjevalce plazme. Tako športniki uporabljajo učinkovino probenecid, ki je kompetitivni inhibitor aktivnega transporta organskih kislin v ledvični tubul. Posledica tega je, da se kisle spojine v zmanjšanem obsegu izločajo v urin, hkrati pa se poveča njihova koncentracija v plazmi. Endogeni kot tudi sintezni androgeni steroidi se metabolizirajo in izločajo v urin v obliki konjugatov z glukuronsko kislino. Ker probenecid inhibira aktivni transport organskih kislin v tubul, se manj steroidov izloča v urin in rezultat urinskega testa na steroide je zato negativen. Poleg tega pa probenecid tudi inhibira tubulno reabsorbcijo sečne kisline, zato pospešuje izločanje seča.

Diuretike športniki uporabljajo za hitro izgubo teže pri športih, ki so povezani s tehtanjem (borilni športi) ali pa da zamaskirajo jemanje prepovedanih snovi. Diuretiki namreč povečajo volumen urina in s tem zmanjšajo koncentracijo prepovedane snovi v urinu. Nekateri izmed njih (inhibitorji karbonske anhidraze) pa zvišajo pH urina in na ta način zmanjšajo izločanje bazičnih doping snovi (npr. etilamfetamin, amfetamin) v urin.

Določanje testosterona v urinu temelji na razmerju testosteron/epitestosteron (T/E), ki ne sme biti večji kot štiri. Sekrecija epitestosterona v urin ostane nespremenjena ne glede na to ali športnik jemlje testosteron ali ne. Iz tega sledi, da se bo razmerje T/E zvišalo nad dovoljeno mejo v primeru zlorabe testosterona. Da se to ne zgodi, so športniki začeli uporabljati epitestosteron, ki zniža razmerje T/E in s tem prikrije zlorabo testosterona.

Inhibitorji 5α -reduktaze (finasterid, dutasterid) se v klinične namene uporabljajo za zdravljenje raka prostate in benigne hiperplazije prostate ter zdravljenje androgene alopecije (7). Encim 5α -reduktaza reducira testosteron v dihidrotestosteron. V športu se ti inhibitorji uporabljajo kot maskirni agensi, ker zmanjšajo pretvorbo 5α steroidov v reducirane 5α metabolite (androsteron, dihidrotestosteron) in zato je njihova koncentracija v urinu nižja. Nobenega vpliva pa nimajo na izločanje 5β steroidov v urin, zato se zmanjša razmerje $5\alpha/5\beta$ steroidov. To razmerje je eno izmed pomembnejših kvocientov, ki se uporablja pri preučevanju steroidnega profila športnikov. Inhibitor 5α -reduktaze zavre sintezo 19-norandrosteron presnovka, ki je marker pri dokazovanju zlorabe nandrolona in norandrostendiona. Posledica tega je, da je urinski test na omenjena steroida lažno negativen.

Razširjevalce plazme (plazma ekspanderji) v medicini uporabljamo v nujnih primerih hipovolemije ali šoka, ki se razvije zaradi velike izgube tekočine ali krvi. Kot že samo ime pove, razširjevalci plazme povečajo volumen plazme. Ti razširjevalci so koloidne

raztopine, ki lahko vsebujejo protein albumin, polipeptid želatino, polisaharid dekstran ali hidroksietilni škrob. Te snovi so prevelike, da bi se lahko prefiltrirale skozi žilno steno, zato ostanejo znotraj žile. Na ta način se poveča onkotski tlak, ki povzroči, da se ekstracelularna tekočina resorbira in poveča volumen plazme. V športu se te snovi zlorabljujejo za namen prikriti sledi uporabe EPO ali krvne transfuzije. Ti dve metodi spadata med krvni doping in posledica njune uporabe je povišan hematokrit in hemoglobin. Nekateri športne organizacije športnikom prepoveje nastop na tekmovanju, če so njihove vrednosti Hct in Hb nad dovoljeno mejo. Zato si športniki pomagajo z razširjevalci plazme, ki začasno povečajo volumen plazme in s tem zmanjšajo Hct ter koncentracijo Hb. Pri tem tvegajo ne samo morebitno kazen antidopinških organizacij, ampak tudi alergične reakcije in celo anafilaktični šok, ki se lahko razvije pri uporabi teh produktov.

Ker prihaja na trg vedno več novih snovi, ki jih športniki zlorabljujejo, je tudi vedno več možnih snovi ali metod, s katerimi lahko zakrijejo sledi uporabe le-teh (8).

1.7. KRVNI DOPING

Krvni doping je metoda s katero si športniki na nedovoljen način povišajo število rdečih krvnih celic. Več eritrocitov lahko prenese več kisika iz pljuč do mišic, kar pomeni, da si športnik s to metodo poveča aerobno kapaciteto (9). To se odraža v večji vzdržljivosti in boljši zmogljivosti organizma, zato lahko športniki dosegajo boljše rezultate kot sicer. Krvni doping vključuje vse prepovedane načine izboljšanja aerobne kapacitete, kot so: transfuzija krvi, uporaba eritropoezo-stimulirajočih snovi, uporaba krvnih nadomestkov in genska terapija (10).

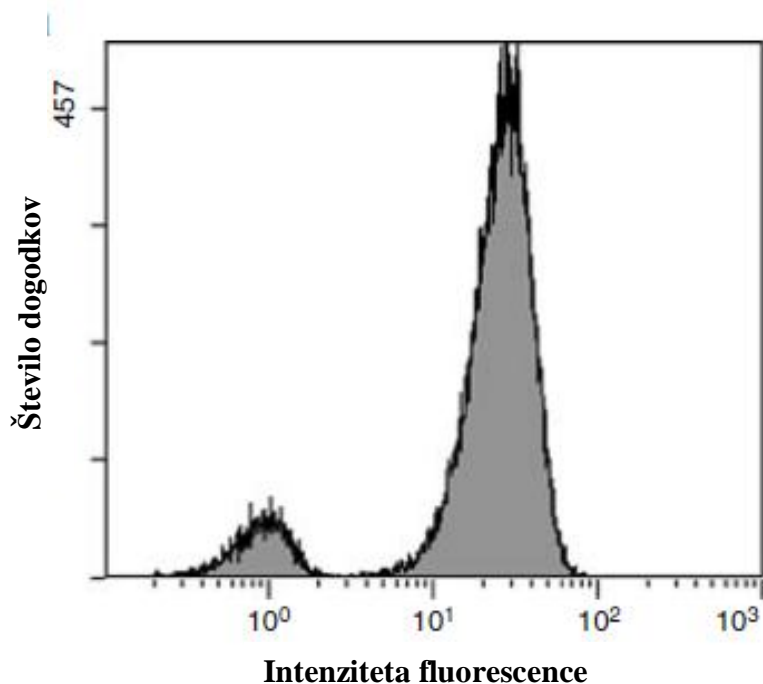
V sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so ugotovili, da transfuzija krvi vpliva na izboljšanje fizične sposobnosti preko povečanja mase eritrocitov. Kmalu po tej ugotovitvi so športniki začeli uporabljati transfuzijo krvi kot doping. Še posebej aktualna je bila v vzdržljivostnih športih na OI 1980 in 1984. MOK je uvrstil transfuzijo krvi na listo prepovedanih snovi in metod leta 1988, kar sovpada s pojavom rekombinantnega humanega eritropoetina (rHuEPO) na tržišču. Ker v tistem času še ni bilo analize metode za detekcijo rHuEPO, je ta rekombinantni protein postal metoda izbora za krvni doping. Prednost rHuEPO pred transfuzijo krvi je tudi v enostavni uporabi. Pri transfuziji krvi si moral najprej vzeti kri, jo zamrzniti in shraniti, nato spet odmrzniti ter infuzirati v telo športnika. Pri tem so se soočali z logističnimi težavami, hkrati pa je obstajala velika

nevarnost infekcij, zaradi nepravilno shranjene krvi (11). Iznajdba rHuEPO pa je krvni doping naredila preprost in relativno bolj varen. Športnik je intravensko ali subkutano nekaj tednov prejemal injekcije rHuEPO in učinek na dvig Hb je bil primerljiv uporabi transfuzije krvi. Po letu 2000, ko je bila uvedena zanesljiva metoda za direktno detekcijo rHuEPO, se je transfuzija krvi spet pojavila v športnih krogih. Antidopinške organizacije so ukrepale in razvile metodo za direktno detekcijo homologne transfuzije, medtem ko za avtologno transfuzijo do danes še ni zanesljive direktne metode. Pri odkrivanju slednje se športne organizacije opirajo na indirektno določevanje preko krvnih markerjev, ki nakazujejo nepravilnosti v krvnem profilu športnika (10).

1.7.1. Transfuzija krvi

Transfuzija krvi je prenos krvi ali produkta na osnovi krvi v krvni obtok osebe. Poznamo dva načina transfuzije. Pri homologni transfuziji sta darovalec krvi in prejemnik krvi dve različni osebi, ki imata med seboj homologno kri. Pri avtologni transfuziji pa je darovalec in prejemnik ista oseba (9).

Na površini eritrocitov so antigeni, preko katerih v seroloških testih določajo krvno skupino osebe. Dve osebi imata homologno kri, kadar se ujemata v krvni skupini (AB0 sistem) in resus faktorju (Rh). Vseeno pa se njuna kri razlikuje v manjšem delu antigenov. Eritrociti posamezne osebe imajo unikatni in specifičen nabor antigenov (10; 12). Na tem tudi temelji metoda detekcije. Ker običajni hemoaglutinacijski testi niso učinkoviti pri detekciji homologne krvi, so leta 2004 uvedli direktno metodo (11). Dve različni generaciji krvi zaznamo s tehniko imenovano pretočna citometrija. Prisotnost specifičnih antigenov na površini eritrocitov določimo tako, da za želeni antigen uporabimo specifična protitelesa, ki so označena z barvilom (fluorokrom). Fluorescenčni detektor izmeri signal, ki ga oddaja določeno barvilo, in ga pretvori v električni signal. Izmerjene vrednosti signalov po računalniški obdelavi prikažemo matematično in grafično v obliki histogramov (13). Histogram s samo enim vrhom kaže na to, da je prisotna samo ena generacija krvi in torej ni sledu o homologni transfuziji krvi. Test zajema 12 protiteles, ki se vežejo na ustrezne antigene in prisotnost dveh pikov v samo enem od možnih dvanajstih histogramov že kaže na to, da so v vzorcu različne generacije eritrocitov (slika 1).



Slika 1: Primer vzorca z dvema generacijama eritrocitov

Vendar pa po določilih WADA-e za pozitiven dokaz homologne transfuzije krvi šteje ustrezen signal protiteles v več kot enem histogramu (11). Možnost, da naletimo na dva krvna vzorca, ki se ujemata v setu 12 antigenov, je 1:500 (14). Za razliko od direktnega testa za detekcijo rHuEPO, kjer je okno detekcije ena glavnih pomanjkljivosti, lahko s pretočno citometrijo zaznamo različne populacije krvi še kar nekaj časa po (zadnji) transfuziji. Ta čas je omejen z življenjsko dobo transfuziranih eritrocitov, ki je pri športnikih od 60 do 90 dni. Kljub temu pa ta tehnika ni brez pomanjkljivosti. Tako lahko dobimo lažno pozitivne rezultate pri ljudeh, ki imajo dva genetska zapisa in jih imenujemo himera. Pri teh ljudeh dobimo podobne rezultate, kot pri športnikih, ki zlorabljajo homologno transfuzijo krvi. Vendar pa lahko z dolgoročnim testiranjem to dilemo rešimo. Športniki, ki so se poslužili transfuzije krvi bodo imeli namreč samo začasno prisotne različne generacije eritrocitov, medtem ko je to stanje pri ljudeh s himero doživetno. Torej bo na histogramih pik, ki pripada darovalčevi krvi sčasoma izginil, pri himerah pa bo antigeni vzorec krvi ostal enak (10). V teoriji je možno, da športnik poišče darovalca s katerim se ujemata v setu 12 antigenov, zato bi v tem primeru lahko pretental dopiňsko kontrolo. Vendar z razširitvijo nabora testiranih antigenov, lahko tudi tem kršiteljem dokažemo zlorabo homologne krvne transfuzije (10; 12).

S pretočno citometrijo pa ne moremo odkriti avtologne transfuzije krvi. Do danes še nimamo direktne metode za odkrivanje te vrste krvnega dopinga. Ker pri avtologni transfuziji nastopa le ena generacija krvi, so se raziskovalci usmerili v določanje morebitnih eksogenih substanc v krvi. Te substance lahko pridejo v kri med odvzemom, shrambo ali reinfuzijo krvi. Tako lahko zaznamo metabolite plastične vrečke v kateri je bila shranjena kri ali pa prisotnost ostankov topil, ki so bila uporabljena pri postopku shranjevanja krvi. Vendar pa se je ta metoda izkazala za neučinkovito, saj so lahko športniki na primer uporabili vrečko, ki ne odpušča delcev in se tako izognili pozitivnemu rezultatu (11). Zato so se raziskovalci osredotočili na razvoj indirektnih metod določanja avtologne transfuzije krvi. Ideja je v tem, da se odkrije in validira določene hematološke markerje, ki se značilno spremenijo v primeru zlorabe avtologne transfuzije krvi. Ko športniku vzamemo kri za namene avtologne transfuzije, se v njegovem telesu zgodijo nekatere hematološke spremembe. Po odvzemu 20% krvi se serumski EPO v enem dnevu poveča za 4-krat, nato eksponentno pada. Število retikulocitov se po sedmih dneh hitro zviša za 2.4-krat in ostane zvišano še nadaljnjih sedem dni. Vrednosti Hb se v povprečju znižajo za 15% in ostanejo znižane dva tedna. Topni transferinski receptor (sTfR) se v dveh tednih zviša za 60% in ostane zvišan še tri dni po reinfuziji.

Po reinfuziji 0,8 L koncentriranih eritrocitov opazimo obraten pojav. Koncentracija Hb se akutno poveča za 8% in se po dveh dneh vrne na začetno vrednost. EPO ostane nespremenjen, medtem ko se število retikulocitov zmanjša. Opazimo tudi postopen padec sTfR po reinfuziji (15). Iz teh rezultatov je razvidno, da avtologna transfuzija krvi pospeši eritropoezo v anemični fazi (tj. po odvzemu krvi). Hematološki markerji se značilno spremenijo, vendar zaradi velikih individualnih razlik med športniki, ne moremo postaviti nekih absolutnih referenčnih vrednosti. Veliko je znanega o varianci hematoloških parametrov pri navadnih ljudeh, manj pa pri športnikih. Med tema dvema skupinama pa je velika razlika, saj so določeni hematološki markerji pod velikim vplivom življenjskega stila. Raziskovalci so za detekcijo avtologne transfuzije krvi poskušali vpeljati indirektno metodo, ki je v uporabi za določevanje rHuEPO, vendar so bili neuspešni (10).

Kot je že iz same definicije razvidno, je homologna transfuzija krvi nevarnejša. Pri tej obliki transfuzije športniki tvegajo infekcijske bolezni, ki se prenašajo s krvjo. Tako se lahko okužijo s hepatitisom, aidsem, malarijo, Creutzfeldt-Jakob-ovo boleznijo in z različnimi bakterijami. Tveganje je še toliko večje, ker večinoma te prakse ne izvajajo v bolnicah oziroma primernem medicinskem okolju. Pri avtologni transfuziji krvi je

zdravstveno tveganje manjše, vendar pa se pri tem procesu športniki soočajo z logističnimi težavami in veliko višjo ceno (10). Življenjska doba shranjenih eritrocitov pri 4°C je od 35 do 42 dni. To pomeni, da mora športnik največ 42 dni pred tekmovanjem oddati kri. Po oddaji krvi je športnik anemičen, dokler kostni mozeg ne nadoknadi izgubljenih eritrocitov. V obdobju anemije je njegova aerobna kapaciteta zmanjšana in posledično tudi njegova zmogljivost. Iz vidika športne fiziologije, takšna priprava na tekmovanje ni ravno idealna (16).

Dokazano je, da zvišanje Hb za več kot 5% že izboljša zmogljivost. Večja kot je količina transfuzirane krvi (avtologne ali homologne), večji je pričakovan učinek na izboljšanje zmogljivosti. Pri veliki količini nove krvi pa lahko pride do hiperviskoznega sindroma, ki se kaže v povišani viskoznosti krvi, zmanjšanem minutnem volumnu srca in zmanjšanem pretoku krvi.

Zaradi uvedbe direktnega testa za rHuEPO, so se športniki spet zatekli k starim praksam krvnega dopinga, in sicer transfuziji krvi. Kmalu po testu za rHuEPO so strokovnjaki razvili metodo za detekcijo homologne transfuzije krvi. V izogib pozitivnemu dopinškemu testu, so začeli športniki uporabljati kombinacijo avtologne transfuzije krvi (za katero do danes še nimamo direktnega testa) in rHuEPO. V mrtvi sezoni, ko ni tekmovanj (za kolesarje je to zima, za smučarske športe je to poletje), jemljejo eritropoetin v majhnih »subterapevtskih« dozah, ki poleg fiziološkega odziva, pomaga stimulirati kostni mozeg pri dopolnitvi eritrocitov po odvzemu krvi za namene avtologne transfuzije. To omogoča odvzem 3-5 enot krvi na mesec z minimalnimi spremembami v koncentraciji Hb. Po reinfuziji krvi v tekmovalnem delu sezone, se športniki pojavijo z zvišano koncentracijo Hb in praktično nedetektljivim rHuEPO v urinu (10; 11).

1.7.2. Eritropoetin

Eritropoetin (EPO) nastaja v glavnem v ledvicah, v manjši meri pa nastaja tudi v jetrih (2). Je najpomembnejši hematopoetski rastni dejavnik in ga hkrati uvrščamo med citokine in hormone. Po svoji sestavi je glikoprotein. EPO je relativno kisel (izoelektrična točka okrog 4.4), saj je na sladkorne skupine vezanih najmanj 10 molekul sialne kisline. Sladkorne komponente služijo za podaljšano delovanje eritropoetina in zmanjšujejo njegovo eliminacijo (17). V analitiki so te komponente pomembne pri detekciji. Razpolovni čas endogenega eritropoetina je 1,5 do 2,9 ur (18), razpolovni čas rekombinantnega eritropoetina in njegovih analogov pa je odvisen od vrste in načina aplikacije. Tako je

razpolovni čas epoetina alfa po intravenski aplikaciji nekje od 4 do 11 ur, po subkutani injekciji pa je razpolovni čas bistveno podaljšan (19-25 h). Podobne razpolovne čase opazimo tudi pri epoetinu beta, medtem ko ima darbepoetin alfa občutno daljšo razpolovno dobo (2 dni pri subkutani aplikaciji) (19). EPO stimulira delitev (proliferacijo) in dozorevanje (diferenciacijo) izvornih eritroidnih celic z vezavo na eritropoetinski receptor (EPOr), ki se nahaja na površju eritroidnih celic (20). Po vezavi EPO na receptor se sprožijo številne signalne poti v jedru. Posledica je indukcija fosforilacije proteinov. EPO po vezavi na EPOr poveča možnost preživetja celice in s tem omogoči njeno nadaljnjo diferenciacijo v zrel eritrocit. Zorenje rdeče krvne vrste poteka po naslednjih stopnjah: zarodna celica, proeritroblast, bazofilni eritroblast, polikromatski eritroblast, ortokromatski eritroblast, retikulocit in eritrocit (17). EPO povzroči, da je dozorevanje eritroblastov v kostnem mozgu skrajšano in na ta način se poveča sinteza eritrocitov, hkrati pa se poveča izplavljanje retikulocitov (nezreli eritrociti) v kri (2).

V ledvičnih celicah je »kisikov senzor«, ki zazna količino kisika v krvi in v stanjih pomanjkanja kisika (hipoksija), se hipoksija inducibilni faktor-1 (HIF-1) veže na EPO gen in ga aktivira. Posledica je povečana EPO sinteza in večje izplavljanje EPO iz ledvic v kri (19). V takšnih razmerah se vrednosti EPO v plazmi povečajo za 100-1000-krat (17).

V klinični uporabi je več vrst rHuEPO, ki se med seboj razlikujejo po zgradbi sladkornih verig in farmakokinetičnih lastnostih. Na tržišču imamo epoetine alfa, beta, omega in delta ter hematopoetski rastni dejavnik druge generacije, darbepoetin alfa (NESP-novi eritropoezo stimulirajoči protein), ki ima zaradi dodatnih dveh sladkornih verig trikrat daljšo biološko uporabnost kot EPO prve generacije. Zato se NESP injicira samo 1-krat tedensko, medtem ko se morajo ostali epoetini injicirati 3-krat tedensko (17). Na tržišču pa je tudi že EPO tretje generacije imenovan CERA (angl. Continuous Erythropoietin Receptor Activator), ki je po kemizmu metoksipolietilenglikol epoetin beta. CERA ima spremenjeno afiniteto do EPOr in podaljšan razpolovni čas, kar omogoča nenehno stimulacijo eritropoeze in je zato doziranje le enkrat mesečno (19; 21). EPO se v klinične namene uporablja za zdravljenje anemije, ki je posledica nizkega nivoja endogenega EPO (npr. anemija pri ledvični okvari), ima pa tudi imunostimulatorne in protivnetne učinke (17). EPO spodbudi nastajanje eritrocitov in hkrati zniža volumen plazme (22), zato se zviša vrednost Hct in koncentracija Hb. Na ta način se poveča oksiformna kapaciteta krvi. To pomeni, da lahko več kisika prispe do mišic, kar pripomore k večji zmogljivosti, predvsem vzdržljivosti. Ta učinek je viden približno 2-3 tedne po terapiji z rHuEPO (19). Zaradi tega

se je rHuEPO začel zlorabljati v športu, saj pripomore k boljšim rezultatom. Zloraba EPO je bolj pogosta pri vzdržljivostnih športih (tek, smučarski tek, kolesarstvo). Tako je na svetovnem prvenstvu v nordijskih disciplinah v Lahtiju leta 2001 imela polovica dobitnikov medalj nenormalno visoko koncentracijo Hb, kar je bila najbrž posledica krvnega dopinga. Finsko štafeto, ki je osvojila zlato kolajno pa so kasneje diskvalificirali, saj so jih ujeli na dopinški kontroli (23).

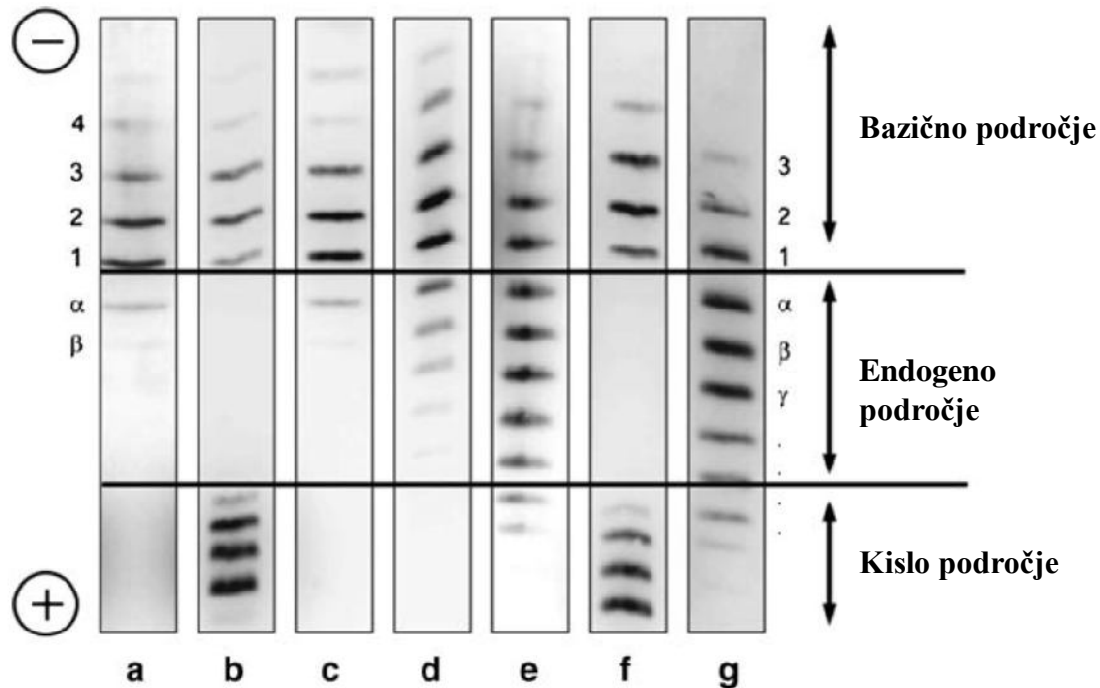
Po nekaterih podatkih naj bi si športniki z EPO pridobili neupravičeno prednost v športnih disciplinah, ki trajajo vsaj 45 sekund. Poleg tega pa je zaradi povečane aerobne kapacitete tudi hitrejša regeneracija športnika (16). Zaradi zvišanega Hct in obenem manjšega volumna plazme postane kri bolj viskozna in tako bolj podvržena kardiovaskularnim zapletom. Znani so smrtni primeri športnikov zaradi srčnega napada, ki naj bi bili povezani z nedovoljenim jemanjem EPO (24).

Problem detekcije rHuEPO je njegova kompleksnost in velika strukturna podobnost naravnemu endogenemu EPO. Poleg tega je njegova koncentracija v krvi in urinu zelo nizka. Sekrecija rHuEPO v urin je manjša od 1% danega odmerka (25). Raziskovalci so razvili direktno metodo določanja rHuEPO v urinu z izoelektričnim fokusiranjem (IEF) in indirektno metodo, ki se osredotoča na hematološke spremembe po administraciji rHuEPO.

1.8. DIREKTNA METODA DOLOČANJA rHuEPO

Leta 2000 so na OI v Sydneyu prvič uporabili test za detekcijo rHuEPO. Testiranje je bilo sestavljeno iz kombinacije direktnega določanja rHuEPO v urinu z IEF in indirektno metodo določanja markerjev spremenjene eritropoeze.

Razlike med endogenim EPO in rHuEPO so v sami strukturi molekule, kjer lahko opazimo različne vzorce glikozilacije, ki pripomorejo k različnim nabojem rekombinantnih eritropoetinov (26; 27). To lastnost izkorišča IEF, ki ločuje izoforme EPO molekul s pomočjo električnega toka na gelu s pH gradientom. Izoforme epoetina so podrazred molekule epoetina, ki imajo različen nivo glikolizacije (število sialnih kislin) in s tem različen naboj ter različno izoelektrično točko (pI je tisti pH, pri katerem je vrednost neto naboja molekule enak nič). Izoforme so vidne na gelu kot signal v obliki pasu (slika 2).



Slika 2: Gel po izoelektričnem fokusiranju, dvojnem prenosu in kemiluminiscenci.
a) vzorec športnika, b) stabilnostni test, c) Epoetin delta, d) pozitivna kontrola,
e) negativna kontrola, f) BRP/NESP standard, g) uHuEPO (endogeni EPO v urinu)

Profil izoform je sestavljen iz pasov, njihovega števila, pozicije v pH gradientu in jakosti signala. Vse te karakteristike se razlikujejo med različnimi vrstami molekul z različnimi strukturnimi lastnostmi. Bolj kot je signal gost oziroma močan za določeno izoformo, več te izoforme je prisotne v našem vzorcu. Ločevanje EPO molekul poteka pri gradientu pH med 2 in 8. Manj glikozilirane molekule imajo pI v bolj bazičnem območju (rHuEPO), bolj glikozilirane pa v kislem območju (NESP). Endogeni EPO ima bolj heterogeno porazdelitev izoform in je bolj kisel v primerjavi z ostalimi rHuEPO. Izoforme endogenega EPO se nahajajo v endogenem in bazičnem območju (28). Metoda izoelektričnega fokusiranja temelji na 4 glavnih korakih: koncentriranje urina, ločevanje na gelu s pH gradientom, dvojni prenos in analiza s kemiluminiscenco (26). Urin pred nanosom na gel skoncentriramo in dodamo inhibitorje proteaz, da preprečimo razgradnjo EPO. Koncentriranje dosežemo z uporabo dveh različnih kolon z zamreženostjo 30 kDa. S tem urin skoncentriramo iz 20 mililitrov na nekaj mikrolitrov ter odstranimo večino proteinov z molekulsko maso pod 30 kDa. Predhodno lahko uporabimo tudi ultrafiltracijo, da se znebimo potencialno prisotnih celic in bakterij. Ko imamo urin skoncentriran, izmerimo

celokupno koncentracijo EPO s testom ELISA. S tem preprečimo prekomeren nanos na gel za IEF. Vzorce po potrebi razredčimo in naneseemo na gel za IEF, ki je bil predhodno izpostavljen električnemu toku v namen vzpostavitve pH gradienta. Na gel poleg vzorcev naneseemo pozitivno in negativno kontrolo ter referenco (mešanico NESP in Epo standarda BRP – erythropoeitin biological reference preparation), ki nam kasneje služijo za določevanje kislega, endogenega in bazičnega območja elektroferograma. Po končanem fokusiranju sledi prenos proteinov na primarno PVDF (polivinilidín fluorid) membrano. Proteini potujejo proti anodi, saj so negativno nabiti. Po končanem primarnem prenosu, membrani dodamo primarna EPO protitelesa (monoklonska mišja protitelesa). Da bi dosegli večjo specifičnost detekcije in boljšo ločljivost, sledi drugi prenos pri katerem prenesemo primarna protitelesa na sekundarno PVDF membrano. Protitelesa so pozitivno nabita in potujejo proti katodi. Sekundarni membrani dodamo sekundarna protitelesa, ki so encimsko označena (biotinsko označena anti-mišja IgG) in nam služijo za streptavidin-peroksidazno detekcijo (29). Ko razvijemo elektroferogram, sledi analiza le tega s pomočjo denzitometrije. S tem določimo relativno moč signala posameznih EPO izoform. Denzitometrija je eden izmed pomembnih korakov pri določevanju pozitivnih in negativnih vzorcev pri dopinških testih. Sprva se je za pozitiven dokaz štelo, če je vzorec vseboval vsaj 80% bazičnih izoform, vendar pa so kasneje ta kriterij opustili zaradi prenizke občutljivosti in robustnosti (26). Danes je potrebno za pozitiven dokaz dopinga upoštevati WADA-in tehnični dokument, ki opisuje kako je potrebno ovrednotiti IEF profil in opraviti test stabilnosti, ki dokazuje, da v urinu ne potekajo encimske aktivnosti. Še vedno pa ima ta metoda nekaj pomanjkljivosti, saj lahko pokaže lažno pozitivne in lažno negativne rezultate. Lahko namreč pride do premikov bazičnih izoform v IEF profilu. Poleg tega ima kratko okno detekcije in je zelo draga analizna metoda (30). Trenutno je IEF edina direktna metoda za določanje rHuEPO odobrena s strani WADA-e (31).

1.9. INDIREKTNE METODE

Razvoj medicine in farmacije je pripeljal do tega, da imamo danes na voljo spojine, ki so strukturno zelo podobne oziroma skoraj identične spojinam, ki jih proizvaja človeško telo (endogene). Iz medicinskega vidika je to seveda dobrodošlo, saj te snovi pozdravijo bolezen ali izboljšajo kvaliteto življenja mnogim pacientom. Po drugi strani pa je ta proces zelo otežil delo antidopinškim organizacijam, saj so se te snovi začele uporabljati tudi v neklinične namene, in sicer kot doping. Prav zaradi izredne podobnosti, z današnjimi analiznimi metodami težko ločimo med endogenimi in eksogenimi substancami, včasih pa je to celo nemogoče (16). Kot alternativo direktnim testom so raziskovalci razvili indirektne metode. Te se ne osredotočajo na identifikacijo same prepovedane snovi, ampak sledijo spremembam biokemičnih markerjev v telesu, ki jih povzročijo te snovi. Markerji, občutljivi na abnormalnosti v eritropoezi, se spremenijo v primeru patoloških stanj (npr. anemija), transfuzije krvi ali uporabe rekombinantnega eritropoetina. Klasična markerja za krvni doping sta hematokrit in hemoglobin (32). Kljub začetnim pomanjkljivostim zaradi premajhne specifičnosti in občutljivosti markerjev, pa so kasneje to popravili z vključitvijo faktorjev, ki vplivajo na variabilnost rezultatov. Danes se indirektne metode uporabljajo pri načrtnem testiranju (angl. target testing) sumljivih športnikov, nekatere športne zveze pa na podlagi rezultatov indirektnih metod lahko športnika izključijo iz tekmovanja. Te metode so tudi vključene v koncept biološkega potnega lista (31).

Leta 1989 je medicinska komisija MOK-a uvedla nov razred dopinških snovi. Na listo so bili uvrščeni peptidni hormoni in analogi, kot so rHuEPO, humani horionski gonadotropin, adrenokortikotropni hormon, rastni hormon in podobni (33). V tistem času še ni bilo zanesljive metode, ki bi razlikovala med endogenim in eksogenim EPO, zato so pri mednarodni kolesarski (UCI) in smučarski zvezi (FIS) leta 1997 uvedli ti. zdravstvene kontrole. Te kontrole so bile namenjene varovanju zdravja športnikov, a v resnici so bile obupan poskus antidopinških organizacij, da bi preprečile zlorabo rHuEPO (34). UCI je omejila zgornjo mejo na 170 g/L za Hb in 50% za Hct (vse vrednosti veljajo za moške) (33), FIS pa je limite za Hb postavila na 185 g/L za moške in 165 g/L za ženske (35). Ta metoda ima veliko pomanjkljivosti, saj je med ljudmi velika inter-individualna razlika v vrednostih omenjenih markerjev, kar lahko privede do lažno pozitivnega rezultata. Po drugi strani pa lahko športniki, ki imajo naravno nizko vrednost Hb in/ali Hct, manipulirajo z rHuEPO, da dosežejo zgornjo dovoljeno mejo in si s tem posledično izboljšajo zmogljivost. Takšen športnik bo uspešno preстал zdravstveno kontrolo, kljub zlorabi

prepovedanih snovi. Dodatna težava te metode je v tem, da si športnik lahko prevelike vrednosti markerjev enostavno prikrije s hemodilucijo. Težko je tudi razumeti tako visoko mejo za Hb pri FIS (185 g/L), če v obzir vzamemo dejstvo, da v študiji, ki so jo opravili na profesionalnih italijanskih nogometaših, nobeden ni presejal vrednosti niti 170 g/L, kaj šele 185 g/L (33). Prav zaradi vseh omenjenih pomanjkljivosti te metode pa se prekoračitev teh mej ni smatrala za kršitev protidopinškega kodeksa. Športnik, ki je imel vrednosti Hb in/ali Hct nad dovoljeno mejo, je imel prepoved tekmovanja, dokler se njegove vrednosti niso normalizirale (34). Takšen pristop je v veljavi še danes, s tem, da so se mejne vrednosti skozi čas spreminjale (pri FIS so Hb znižali na 160 g/L za ženske in 170 g/L za moške (36)), uvedli pa so tudi dodatne parametre. V preglednici I so prikazani testirani parametri, njihove mejne vrednosti za oba spola in leto njihove uvedbe pri UCI.

Preglednica I: Merjeni parametri, njihove mejne vrednosti in leto uvedbe pri UCI

Krvni parametri	Leto uvedbe	Mejne vrednosti za moške	Mejne vrednosti za ženske
Hematokrit	1997	0,50	0,47
Hemoglobin (g/L)	2000	170	160
Prosti plazemski hemoglobin (mg/dL)	2003	300	300
Indeks stimulacije kostnega mozga (OFF-hr)	2004	133	123
Retikulociti (%)	2005	< 0.2 in > 2.4	< 0.2 in > 2.4

Športnike testirajo na prizorišču tekmovanja na dan tekme. Vzorce ponavadi analizirajo v bližnjem hotelu, kjer postavijo hematološki analizator. Športniki so o rezultatih analize obveščeni v eni uri od odvzema krvi. V primeru, da katerikoli parameter presega vrednosti, opisane v preglednici I, je tak športnik po pravilih UCI izključen iz tekmovanja za 15 dni (37).

Kot smo že zgoraj omenili, je bil eden izmed ciljev uvedbe zdravniških kontrol obvarovati zdravje športnikov, ki so jih ogrožale ekstremno visoke koncentracije Hb. V določeni meri jim je po uvedbi Hb pravila to tudi uspelo, saj je bil padec najvišjih vrednosti Hb med moškimi 15 g/L med ženskami pa celo 42 g/L (35). Mnogo raziskav se je osredotočalo na spremljanje krvnih profilov športnikov skozi čas in rezultati so pokazali, da so se

povprečne vrednosti Hb in Hct po uvedbi prvih krvnih testov leta 1997 začele postopno zniževati. Tak trend je bil opazen vse do leta 2003, ko so vrednosti omenjenih parametrov spet začele naraščati (37). Tudi retrospektivna raziskava na tekačih na smučeh od leta 2001 do 2007 je pokazala podobne rezultate. Povprečje Hb v teh sezonah je bilo značilno nižje, kot v letih 1997-99 (38).

Analiza rezultatov od leta 2001 do 2004 je pokazala, da se je tudi povprečna vrednost procenta retikulocitov zniževala. Ugotovili so, da se je število vzorcev z zelo visokim procentom retikulocitov (retikulocitoza) značilno zmanjšalo od sezone 2001/2002 do sezone 2003/2004. Nasprotno pa se je v istem obdobju značilno povečalo število vzorcev z zelo nizkim procentom retikulocitov (retikulocitopenija). Preglednica II prikazuje rezultate za vrednost retikulocitov med leti 2001-2004.

Preglednica II: Število analiziranih vzorcev in absolutne ter relativne vrednosti vzorcev z visokim in nizkim procentom retikulocitov med leti 2001 in 2004

	2001	2002	2003	2004
Vzorci	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%)	38 (1.9%)

Te spremembe v krvnem profilu športnikov nakazujejo na zlorabo krvnega dopinga. Retikulocitoza je namreč posledica stimulacije kostnega mozga, ki sledi po administraciji rHuEPO in njemu podobnih snovi. Po drugi strani pa, ko je v organizmu veliko število eritrocitov, kot posledica transfuzije ali zlorabe rHuEPO, pride do fiziološkega odziva v smislu negativne povratne zanke. Posledica tega je zavrta eritropoeza in izjemno nizek procent retikulocitov, koncentracija Hb pa je še vedno visoka. Iz primerjave krvnih profilov v sezoni 2001/2002 in sezoni 2003/2004 ugotovimo, da so športniki spremenili prakso krvnega dopinga. V sezoni 2001/2002 so najbrž zlorabljali NESP, ki je bolj potenten kot EPO in bolj zviša procent retikulocitov (v nekaterih primerih tudi do 4%). NESP ima daljšo razpolovno dobo in se dalj časa zadržuje v telesu, kar pomeni, da ga je lažje detektirati, po drugi strani pa je težje optimizirati režim jemanja. Zaradi vseh teh razlogov so športniki opustili jemanje NESP in se vrnili k rHuEPO, le da so zaradi bojazni pred pozitivnim testom prilagodili način jemanja. Začeli so jemati manjše doze rHuEPO

več tednov pred tekmovanjem, da je bilo okno detekcije eritropoetina v urinu čim krajše. Na tekmovanju so pri teh športnikih opazili visoko koncentracijo Hb in nizek procent retikulocitov (37).

1.9.1. Razvoj on in off modela

Čeprav indirektne metode določanja rHuEPO na začetku niso obetale veliko, pa so se raziskovalci še naprej ukvarjali z vlogo markerjev pri spremenjeni eritropoezi. Poleg klasičnih so vključili še dodatne markerje, ki opisujejo število ali fizikalne lastnosti eritrocitov in retikulocitov ter koncentracijo topnega transferinskega receptorja. Prejšnje študije so se osredotočale le na en parameter, kar je imelo za posledico nizko specifičnost in občutljivost. Z analizo kombinacije parametrov pa dosežemo večjo moč razlikovanja med endogenim in eksogenim eritropoetinom. Avstralski raziskovalci so razvili dva modela za detekcijo rHuEPO, in sicer ON ter OFF model. Prvi model zazna športnika, ki je v fazi jemanja eritropoetina, drugi model pa zazna športnika, ki je pred kratkim končal terapijo z rHuEPO.

Izvedli so dvojno slepo študijo na amaterskih športnikih, razdelili so jih na dve skupini. Prvi skupini so subkutano injicirali rHuEPO (50 IU/kg telesne teže) in dodali železo (oralno ali intramuskularno), druga skupina pa je bila kontrolna placebo skupina. Študija je potekala tako, da so preiskovanci najprej pet tednov trenirali, nato je sledila 25-dnevna terapija z rHuEPO (ali placebo) in na koncu še 4-tedenska faza izpiranja (angl. wash out). Raziskovalci so merili naslednje parametre: število eritrocitov (RBC), povprečni volumen eritrocita (MCV), povprečno koncentracijo hemoglobina v eritrocitu (CHCM), koncentracijo hemoglobina, procent makrocitov (eritrociti z MCV večjim od 120 fL), procent hipokromnih eritrocitov (CHCM manjša od 28 gdl), procent retikulocitov, povprečni volumen retikulocita (MCV_r) in povprečno koncentracijo hemoglobina v retikulocitu (CHCM_r). Iz teh podatkov so nato izračunali še dodatne markerje: hematokrit ($RBC \times MCV$), število retikulocitov ($\#ret = RBC \times \% ret$), vsebnost hemoglobina na retikulocit ($CHr = MCV_r \times CHCM$), MCV razmerje (MCV_r/MCV), celokupno vsebnost hemoglobina v retikulocitih ($RetHb = CHr \times \#ret$) in retikulocitni hematokrit ($RetHct = \#ret \times MCV_r$). V serumu so spremljali še koncentracijo EPO, sTfr, feritina in celokupnih proteinov.

Rezultati so pokazali, da je bil pri rHuEPO skupini Hct povišan v primerjavi s placebo skupino in je ostal povišan še tri tedne po zadnji injekciji rHuEPO. Podobne rezultate so

dobili tudi za Hb. Število retikulocitov se je v fazi terapije z eritropoetinom skoraj podvojilo glede na začetno vrednost, med fazo izpiranja pa je padlo pod začetno mejo. Prav tako se je med terapijo občutno povečal MCVr in se nato v fazi izpiranja vrnil na začetno vrednost. Zaradi zvišanja teh dveh parametrov, se je občutno zvišal njun produkt RetHct, ki se je nato med fazo izpiranja spustil pod začetni nivo. Ugotovitve pri RetHb so bile podobne, vendar manj izrazite. Med terapijo so opazili tudi povišan procent makrocitov, ki se je prav tako vrnil na začetno vrednost proti koncu faze izpiranja. Koncentracija eritropoetina v serumu se je med terapijo občutno povečala, med fazo izpiranja pa je padla pod mejo koncentracije EPO v placebo skupini. Z zamikom se je povečala tudi koncentracija sTfr, ki je ostala povišana še dva tedna po prenehanju jemanja EPO. Nasprotno pa se je serumska koncentracija feritina zmanjšala med terapijo nato pa vrnila na začetno vrednost po dveh tednih po zadnji injekciji. Markerje, ki označujejo eritropoezo ob pomanjkanju železa (CHCMr, CHr in procent hipokromnih eritrocitov) niso upoštevali, saj so predpostavili, da športniki poskrbijo, da imajo dovolj železa. V nasprotnem primeru jemanje rHuEPO ne bi imelo smisla, saj je pri pomanjkanju železa eritropoeza motena in posledično je manj učinkovita dostava kisika do mišic. Ostali merjeni parametri niso pokazali signifikantne razlike med skupino, ki je jemala EPO in placebo skupino.

S statistično analizo so prišli do ugotovitve, da s kombinacijo petih parametrov, ki so najbolj odstopali, lahko ločijo športnike, ki trenutno jemljejo rHuEPO od športnikov, ki ne jemljejo tega glikoproteina. Ta model so poimenovali ON model in je občutljiv na pospešeno eritropoezo. Vključuje RetHct, EPO, sTfr, Hct in procent makrocitov. Uporaben je samo med fazo apliciranja rHuEPO, medtem ko hitro izgubi občutljivost po prenehanju terapije. Formula ON modela je:

$$\bullet \text{ ON-score} = 3.721 \text{ Hct} + 30.45 \text{ RetHct} + 0.1871 \log_e(\text{EPO}) + 0.1267 \log_e(\text{sTfr}) + 0.115 \log_e(\% \text{ makro} + 0.1)$$

Enačba 1

Model, ki je občutljiv na športnike, ki so pred kratkim prenehali s terapijo, so poimenovali OFF model. Občutljiv je na upočasnjeno eritropoezo (nenormalno nizka vrednost RetHct in EPO), ki jo spremlja visoka vrednost Hct. Ta model vključuje tri parametre, in sicer Hct, RetHct ter EPO. Uporaben je v primeru, ko je športnik v ti. pozni fazi izpiranja (12-21 dni po zadnji injekciji).

Formula OFF modela je:

- $\text{OFF-score} = 6.149 \text{ Hct} - 92.87 \text{ RetHct} - 0.1463 \log_e(\text{EPO})$ Enačba 2

V tej študiji so tudi opazili, da se po terapiji z rHuEPO poveča celokupna masa Hb in $\text{VO}_{2\text{max}}$, kar potrjuje trditev, da eritropoetin poveča dostavo kisika. Ti dve vrednosti se vrnete na prejšnji nivo v enem mesecu (39), po nekaterih podatkih pa naj bi se $\text{VO}_{2\text{max}}$ normaliziral celo v dveh tednih (40). To pomeni, da mora športnik jemati eritropoetin skoraj do tekmovanja, če hoče izkoristiti učinek te snovi. Zato bi ON model 2-6 tednov pred tekmovanjem uspešno zaznal športnike, ki zlorabljajo rHuEPO. V primeru, da bi športnik prenehal z EPO 2-3 tedne pred tekmovanjem, pa bi na tekmovanju z OFF modelom zaznali približno dve tretjini kršiteljev.

Z uporabo kombinacije več parametrov dosežemo manjši vpliv posamezne komponente na rezultat. To pomeni, da modela nista občutljiva na dvig posameznega parametra, ampak se mora občutno povešati več parametrov. Se pravi, da v primeru določenega patološkega ali fiziološkega stanja, ki bi vplival na eno spremenljivko, modela ne bi bila občutljiva. S tem zmanjšamo možnost lažno pozitivnega rezultata in hkrati zmanjšamo možnost maskiranja EPO. Tako je imela na primer oseba s hemoglobinopatijo (heterozigot za hemoglobin C) v placebo skupini povišano #ret, sTfr in EPO, kar bi lahko ON model zaznal kot uporabo rHuEPO. Vendar pa je ta oseba imela majhne retikulocite (nizek MCVr), kar je imelo za posledico normalen RetHct, poleg tega pa so bile njene vrednosti Hct in procenta makrocitov nizke oziroma normalne. Tako so se visoke vrednosti prej omenjenih treh markerjev zakrile (kompenzirale) z nizkimi oziroma normalnimi vrednostmi RetHct, Hct ter EPO in mejna vrednost ON modela ni bila presežena. Drug primer je bil športnik, ki je trpel za kroničnim pomanjkanjem železa. Ta preiskovanec je imel povišan sTfr, vendar sta ga pred pozitivnim ON modelom obvarovala nizek Hct in majhen procent makrocitov. Nizek Hct v povezavi z normalnim EPO pa je preprečil lažno pozitiven rezultat pri OFF modelu (39). Tudi nekatera patološka stanja (npr. anemije) zavirajo eritropoezo, vendar pa je v tem primeru močno znižan tudi Hct. Pri nedavno končani terapiji z rHuEPO pa je ob upočasneni eritropoezi (nizek procent retikulocitov) neznačilno povišan Hct. Zato lahko OFF model razlikuje med tema dvema stanjema. V medicinski literaturi ne obstaja takšno stanje, kjer bi ob zavrti eritropoezi opazili povišan Hct. Zato je v tem primeru edina možna razlaga nedavna zloraba rHuEPO (41).

Kljub temu pa imata ta dva modela nekaj pomanjkljivosti. Tekom študije so z ON modelom zaznali en lažno pozitiven rezultat pri preiskovancu, ki je utrpel poškodbo. Prav tako so dobili pozitiven rezultat za ON model pri preiskovancu, ki je bil v hipoksičnem okolju. Nadalje sta modela občutljiva na spremembo volumna krvi (dehidracija) in nista primerna za testiranje takoj po vadbi. Šibka točka teh dveh modelov je tudi nizka občutljivost v začetnem obdobju faze izpiranja, saj ON modelu drastično pade občutljivost po zadnji injekciji rHuEPO, medtem ko OFF modelu v tej fazi počasi raste občutljivost (na 7. dan faze izpiranja je občutljivost ON modela 11%, občutljivost OFF modela pa 6 %) (39).

1.9.2. Prva generacija indirektnih testov za detekcijo rHuEPO

V zgoraj opisani pilotni študiji so raziskovalci utemeljili pet parametrov, ki se spremenijo pri terapiji z rHuEPO in tri parametre, ki se spremenijo v obdobju po prenehanju terapije. Da bi lahko to indirektno metodo uporabljali v antidopinške namene, so isti raziskovalci izvedli še eno študijo z večjim številom preiskovancev, da so potrdili, da rHuEPO povzroči predvidljiv in ponovljiv hematološki odziv. V tej študiji so tudi preučevali vpliv rase in spola na ta dva modela. Sam potek študije je bil podoben zgoraj omenjeni, s to razliko, da so bili preiskovanci pripadniki različnih etničnih skupin in da so parametre merili z analiznimi metodami, ki so v skladu s smernicami MOK. V eni skupini so vzorce jemali 48 ur po injekciji rHuEPO (v drugih skupinah in prejšnji študiji so vzorce jemali 24 ur po injekciji), da so ugotovili, če interval med injekcijo rHuEPO in odvzemom vzorca vpliva na rezultate modelov. Pri tej skupini so bile koncentracije EPO v serumu nižje, kot pri ostalih skupinah, vendar razlika ni bila tako velika, da bi vplivala na rezultat ON modela. Vsi ostali rezultati so bili primerljivi s pilotno študijo in tako so dokazali ponovljivost te metode (41). Ta indirektni test je bil prvič uporabljen leta 2000 na OI v Sydneyu in je služil kot podpora direktnemu urinskemu testu (42).

Eden izmed ciljev te študije je bil tudi preveriti, kako rHuEPO vpliva na ljudi različnih ras. Izkazalo se je, da je odziv na rHuEPO pri različnih etničnih skupinah praktično enak. To je tudi pričakovano, saj je molekula EPO zelo specifična za matične celice v kostnem mozgu, kar ima za posledico proliferacijo in diferenciacijo ter izboljšanje preživetja izvornih celic. EPO tudi skrajša čas dozorevanja celic, poveša stopnjo sinteze Hb in spodbuja sproščanje nezrelih retikulocitov v krvni obtok. Vendar pa na te procese ne vplivajo morebitne

spremembe v genomu, kar je potrdila tudi ta študija, saj so bili rezultati med različnimi etničnimi skupinami podobni. To ne pomeni, da bo pri vseh ljudeh rHuEPO v enaki meri vplival na te parametre, ampak pomeni, da bo pri vseh ljudeh na enak način vplival na parametre. Se pravi, da bo pri vseh rasah povišal vrednosti Hct, RetHct, % makrocitov, serumskega EPO in sTfr. Je pa potrebno poudariti, da imajo različne rase različne vrednosti določenih markerjev. Tako so ugotovili, da imajo črnci nižjo vrednost Hb kot belci (43), medtem ko imajo, skupaj z Azijci, višjo koncentracijo sTfr (42). Vendar pa so te razlike majhne in ne vplivajo na ON in OFF model v takšni meri, da bi ju morali prilagajati glede na raso (41). Ima pa velik vpliv na rezultate modelov bivanja ali treniranja na višini. Na višji nadmorski višini so namreč hipoksični pogoji, ki povzročijo, da se povišajo vrednosti Hct, RetHct, EPO in sTfr. Ti parametri pa nastopajo v ON modelu, zato imajo športniki, ki živijo ali trenirajo na višini, višjo vrednost tega modela. To je potrebno upoštevati pri testiranju, v izogib napačnim interpretacijam rezultatov. Majhen vpliv na vrednost parametrov ima tudi tip športa, s katerim se športnik ukvarja. Tako imajo vzdržljivostni športniki rahlo višje vrednosti ON in OFF modela. Nadalje opazimo razliko med spoloma, saj imajo ženske nižje vrednosti Hct kot moški. Zato imamo za ženske določene nižje mejne vrednosti modelov. Referenčne meje so določili glede na rezultate, ki so jih dobili pri testiranju več kot 1000 športnikov iz različnih držav. Za moške so določili zgornjo mejo za ON model 2.62, za OFF model pa 2.24. Pri ženskah so te meje nižje, in sicer za ON model 2.47 ter OFF model 2.08. Vse vrednosti veljajo za športnike, ki živijo ali trenirajo pod 610 m nadmorske višine. Izkazalo se je, da je nekaj športnikov, ki niso zlorabljali rHuEPO preseglo dovoljeno vrednost ON modela, medtem ko nihče ni presegel zgornje meje za OFF model. Zaradi tega ne smemo takoj sklepati na zlorabo rHuEPO na podlagi ene presežene vrednosti ON modela, saj lahko gre za lažno pozitiven rezultat. Potrebno je pozitiven rezultat potrditi še z direktno metodo določanja rHuEPO v urinu. Po drugi strani pa pri OFF modelu niso zaznali lažno pozitivnih vrednosti, zato je ta model zelo uporaben pri detekciji športnikov, ki so pred kratkim jemali rHuEPO.

Pomembno je, da se zavedamo, da se hematološki markerji lahko spremenijo v odvisnosti od fizioloških dejavnikov (treniranje), bioloških dejavnikov (bolezen) in predvsem dejavnikov okolja (bivanje ali treniranje na višini). Poleg tega pa njihova vrednost ni konstantna, ampak naravno niha skozi čas. Zato je potrebno razlikovati med športniki, ki imajo abnormalen krvni profil zaradi teh dejavnikov in med športniki, ki imajo abnormalen krvni profil zaradi zlorabe rHuEPO (42).

1.9.3. Druga generacija indirektnih testov za detekcijo rHuEPO

Ker so se skozi čas spreminjale prakse krvnega dopinga, so se morale na te spremembe prilagoditi tudi antidopinške agencije. Z drugo generacijo krvnih testov so dosegli boljšo občutljivost, še posebej pri nizkih dozah rHuEPO in po prenehanju terapije z eritropoetinom, večjo robustnost in lažjo ter hitrejšo analizo rezultatov (26;44). Predpostavili so, da športniki dolgoročno jemljejo nizke doze rHuEPO, da bi se izognili pozitivnim rezultatom na dopinških kontrolah. Hkrati pa manjše doze pomenijo tudi manjše tveganje za razvoj tromboemboličnih zapletov. Potreba po novih testih je bila očitna, saj prejšnji niso bili tako občutljivi na nizke doze rHuEPO.

Razvili so štiri nove modele:

- $ON-he = Hb + \ln(EPO)$; enačba 3
- $ON-hes = Hb + 6.62\ln(EPO) + 19.4\ln(sTfr)$; enačba 4
- $OFF-hr = Hb - 60\sqrt{(Ret)}$; enačba 5
- $OFF-hre = Hb - 50\sqrt{(Ret)} - 7\ln(EPO)$. enačba 6

Novi modeli omogočajo presejanje (angl. screening) vzorcev. S temi modeli lahko zaznamo sumljive športnike, katerih urinske vzorce potem analiziramo z direktno metodo. Nekateri športne organizacije so testirale urinske vzorce športnikom, ki so imeli povišane vrednosti Hb v kombinaciji s povišanimi retikulociti, saj je to značilno pri zlorabi rHuEPO. Te vrednosti so preverjali pri zdravstvenih kontrolah na dan tekmovanja in so služile za nadaljnje načrtno testiranje. Preglednica III prikazuje protokol testiranja, po katerem bi se naj ravnali v primeru abnormalnih vrednosti določenih krvnih parametrov.

Preglednica III: Protokol testiranja pri abnormalnih vrednostih krvnih parametrov

(37)

Abnormalni krvni parameter	rHuEPO/NESP	Homologna krvna transfuzija	Sintetični Hb
Visok % retikulocitov	X		
Nizek % retikulocitov	X*	X	
Povišan Hb/Hct	X	X	
Povišan OFF-hr	X*	X	
Visok prosti plazemski Hb			X

* *sumljiv športnik: izvedi direktno testiranje v prihodnosti (na tekmovanju ali izven tekmovanja), saj je trenutno v fazi izpiranja in urinski test ne bi zaznal rHuEPO.*

Vendar pa je ta strategija preprečevanja uspešna le takrat, ko športnik jemlje rHuEPO v takšnih dozah, da si zviša nivo eritrocitov. Ko pa enkrat doseže začrtano vrednost Hb in Hct (vrednosti ne smeta presegati arbitrarno določene meje), začne svoj odmerek zmanjševati do te mere, da vzdržuje konstanten nivo teh dveh parametrov (44). Torej mora samo nadomeščati odmrle eritrocite z novimi, za kar pa so potrebne mikrodoze rHuEPO. V tej tako imenovani vzdrževalni fazi (angl. maintenance phase) se nivo retikulocitov vrne na začetno vrednost, koncentracija rHuEPO v urinu 24 ur po mikrodozni injekciji pa je prenizka za točno detekcijo z izoelektričnim fokusiranjem (45). Zato v tem primeru zgoraj omenjeni ukrepi za preprečevanje rHuEPO niso dovolj učinkoviti. Prav tako na takšen režim jemanja rHuEPO ni občutljiv ON model prve generacije. Nova modela (ON-he in ON-hes) pa imata boljšo občutljivost pri nizkih dozah rHuEPO in zaznata približno 40% športnikov, ki so v vzdrževalni fazi. Zato lahko ta dva modela uporabimo kot presejalna testa za kasnejšo urinsko analizo. Na ta način lahko zmanjšamo stroške, saj so stroški krvne analize nižji, kot stroški urinske analize. Čeprav je raziskava pokazala, da imata ON-hes in OFF-hre malenkost večjo občutljivost, kot ON-he in OFF-hr (44), pa sta slednja ustrežnejša za vpeljavo v boj proti dopingu. Razlog je v tem, da je potrebno pri ON-hes in OFF-hre v serumu določiti koncentracijo sTfr oziroma EPO, kar naredi analizo dražjo, daljšo in zahtevnejšo. Poleg tega imunološke metode za določanje omenjenih markerjev niso tako dobro standardizirane (npr. spremembe med različnimi serijami protiteles), kar je bistvenega pomena v svetu dopinga, kjer se pričakuje, da imajo akreditirani laboratoriji med seboj primerljive rezultate (26).

Z drugo generacijo indirektnih krvnih testov so skušali tudi zmanjšati vpliv volumna krvi na rezultate modelov. Prejšnji modeli so vključevali Hct, RetHct in procent makrocitov. Ti parametri se spremenijo v odvisnosti od volumna krvi. V nove modele so vključili parametre, na katere ima sprememba volumna plazme manjši vpliv. Hct so nadomestili s Hb, ki je bolj precizen, natančen, direkten in bolj standardiziran krvni parameter. Pri določitvi Hct lahko pride do napak, medtem ko je metoda za določanje Hb dobro standardizirana. Oba parametra sta sicer občutljiva na spremembe volumna plazme, vendar pa je Hct občutljiv tudi na spremembe na MCV. Eritrociti lahko namreč nabreknejo med shranjevanjem vzorca. Novi hematološki parametri, ki so vključeni v te modele, so bolj stabilni in omogočajo daljše shranjevanje vzorcev ter manjše težave pri transportu (44). Vpliv vadbe na te indirektno krvne teste je majhen, saj ne vpliva bistveno na rezultate modelov. Vadba povzroči povečanje volumna plazme, zato se vrednosti Hb in Hct malo znižata. Po drugi strani pa vadba spodbudi eritropoetični sistem in zato opazimo rahlo povišanje EPO. Vendar pa modeli na tako majhne spremembe krvnih parametrov niso občutljivi v takšni meri, da bi lahko delali probleme pri določevanju športnikov, ki zlorabljajo rHuEPO (46; 47).

Še vedno pa ima velik vpliv na te modele treniranje ali bivanje na višini. Mnogo športnikov se pred tekmovanjem pripravlja na višji nadmorski višini ali v hišah, ki simulirajo višjo nadmorsko višino. S tem dosežejo višje vrednosti Hb, saj so v teh razmerah hipoksični pogoji, ki izzovejo hemokoncentracijo. Raziskave so pokazale, da se takoj po prihodu na višjo nadmorsko višino (nad 2000 m) povišajo vrednosti vseh modelov. Po začetnem hitrem dvigu pa vrednosti ON modela postopno padejo, medtem ko se vrednosti OFF modela še kar zvišujejo. Te ugotovitve so v skladu s fiziološko adaptacijo organizma na višini, saj po začetnem hitrem dvigu EPO pride do padca le-tega. Prav tako se na začetku zviša procent retikulocitov, nato pa občutno pade. V nasprotju s prejšnjima parametroma pa Hb ostane zvišan še nekaj časa po prihodu nazaj na normalno nadmorsko višino. Čeprav EPO po vrnitvi na normalno nadmorsko višino pade pod začetno vrednost, je ON model še kar zvišan, kar pomeni, da je vrednost Hb tako visoka, da ta parameter sam vzdržuje višje vrednosti modela. Vrednosti OFF-hr modela po začetnem hitrem dvigu še naprej rastejo in ostanejo povišane še nekaj časa po vrnitvi na normalno nadmorsko višino, zaradi povišanega Hb in nizkega procenta retikulocitov. Raziskava je tudi pokazala, da simulirana višja nadmorska višina ni imela bistvenega vpliva na modele (48).

1.9.4. Vključitev indirektnih modelov/parametrov v biološki potni list

Kot smo že omenili, so nekatere športne zveze izključile športnike iz tekmovanj, če so ti presegali določene limite za Hb in/ali Hct. Ena od slabosti tega pravila je, da približno 1-5% moške populacije presega te meje brez, da bi zlorabljali kakršnekoli prepovedane snovi ali metode. Ideja o hematološkem potnem listu, kjer se vrednosti športnika primerjajo s povprečjem njegovih prejšnjih vrednosti in ne s povprečnimi vrednostmi populacije, se zato zdi na mestu. Mednarodna kolesarska zveza (UCI) je z vpeljavo biološkega potnega lista orala ledino na tem področju in naredila velik korak naprej v boju proti dopingu. V tem elektronskem dokumentu so zbrani hematološki parametri posameznega kolesarja skozi daljši čas. Na ta način dobimo specifičen individualni hematološki profil, ki nam omogoča postavitev referenčnih mej za posameznega kolesarja. V primeru, da pri posameznem kolesarju pride do nenormalnih krvnih vrednosti, le-te pregleda posebna komisija strokovnjakov, določena s strani UCI. Ti potem rezultate ovrednotijo in se odločijo ali so odstopanja v profilu posledica fizioloških (trening, bivanje na višini itd.) oziroma patoloških vzrokov (prisotnost določene bolezni) ali posledica uporabe prepovedanih snovi oz. metod. Le v primeru suma uporabe dopinga sledi nadaljnji postopek. Dokler postopek ni zaključen se kolesar smatra za nedolžnega, vendar kljub temu do konca postopka ne sme tekmovati. Zato je potrebno poudariti, da vsako odstopanje v biološkem potnem listu še ne pomeni dopinga. Po drugi strani pa je nemogoče, da ima športnik, ki uporablja krvni doping, konstanten hematološki profil. Že rezultati šestih testiranj pokažejo morebitno manipulacijo s krvjo (49). Na ta način se znebimo problema inter-individualnih razlik med posamezniki, ki se kažejo v največji meri pri koncentraciji Hb in posledično pri OFF-hr modelu. Ostale variance, ki se tičejo posameznika, so že vključene v biološki potni list v obliki univerzalne vrednosti, ki vključuje intra-individualno varianco, varianco testiranj ob različnih dnevih in varianco aparatur. S tem je omogočeno, da lahko na podlagi odstopanja vrednosti pri zadnji meritvi od njegovih povprečnih vrednosti, športnika označimo za sumljivega ali pa ga, če je odstopanje dovolj veliko, izključimo iz tekmovanja. Za te namene so raziskovalci razvili OFF-hr_z in Hb_z. Ta nov indirektni pristop za detekcijo rHuEPO je vključen v biološki potni list (50). Uvedba biološkega potnega lista pomeni napredek v boju proti dopingu, saj je OFF-hr_z bolj učinkovit pokazatelj zlorabe rHuEPO, kot katerikoli prejšnji predlagan model ali parameter. S kombinacijo modelov in parametrov pa dosežemo še višjo občutljivost in učinkovitost, saj so ti modeli/parametri različno občutljivi pri različnih fazah jemanja

rHuEPO. Tako je procent retikulocitov zelo uporaben v fazi poviševanja Hct (angl. boosting), medtem ko v vzdrževalni fazi in fazi izpiranja izgubi svojo sposobnost detekcije, saj se v tem času nivo retikulocitov vrne na začetno vrednost oziroma pod njo. OFF-hr_z in Hb_z sta najbolj učinkovita med vzdrževalno fazo, v fazi izpiranja pa se najboljše odrezeta koncentracija Hb in spet OFF-hr_z. Uspeh indirektnih metod in s tem biološkega potnega lista je odvisen od režima jemanja rHuEPO. Največjo učinkovitost teh metod opazimo pri takšnem režimu, ki vključuje dolgo fazo poviševanja Hct in dolgo vzdrževalno fazo (30).

Najverjetnejši scenarij za goljufive športnike na tekmovanju je, da je športnik pred kratkim nehal jemati rHuEPO zaradi bojazni, da bi bil pozitiven na urinskem testu. Takega športnika lahko zaznamo s pomočjo biološkega potnega lista, saj bosta OFF-hr in Hb višja v primerjavi z njegovimi povprečnimi vrednostmi in bo OFF-hr_z vrednost zagotovo presegala sumljivo mejo, mogoče pa tudi mejo, ki določa izključitev iz tekmovanja. Drug primer je športnik, ki jemlje rHuEPO v času testiranja izven tekmovanj. Ta športnik bo imel v tem času povišane vrednosti Hb in zelo visok procent retikulocitov, kar bo pomenilo nižjo vrednost OFF-hr modela glede na njegove povprečne vrednosti. V primeru, da je športnik jemal rHuEPO v obdobju zbiranja vzorcev za določitev povprečne vrednosti, vendar ni jemal rHuEPO v obdobju zadnjega vzete vzorca, se bo njegova vrednost Hb znižala v primerjavi z njegovo povprečno vrednostjo. Torej se razlike gledajo tako v pozitivnem, kot tudi v negativnem smislu. Zato so postavljene meje za OFF-hr_z vrednost tudi na negativni strani. Vsak športnik, ki presega prag OFF-hr_z vrednosti je potencialen kandidat za nadaljnjo načrtno testiranje in/ali za direktno urinsko testiranje (50).

FIS in UCI sta do zdaj edini športni zvezi, ki sta v svoja antidopinška pravila vključili sistem biološkega potnega lista. V FIS antidopinškemu pravilniku piše, da je športnik, ki ima z-vrednost (Hb_z ali OFF-hr_z) ≥ 3.09 izključen iz tekmovanja za 14 dni, če pa presega dovoljeno mejo za OFF-hr model (pri moških ≥ 125.6 in pri ženskah ≥ 113.5) pa je izključen za 5 dni (36).

Potrebno je poudariti, da je dejanska učinkovitost indirektnih metod v realni situaciji manjša, kot je bila v raziskavah. V realnem svetu namreč ni toliko zaporednih testiranj v tako kratkem časovnem intervalu, saj je to logistično in finančno neizvedljivo. Poleg tega je možno, da si športniki injicirajo zelo majhne količine rHuEPO, kar še dodatno zniža občutljivost teh metod. Zaradi tega se poraja vprašanje, koliko vzorcev je potrebno vzeti pri posamezniku med sezono, da je takšen način testiranja sploh smiseln (30).

2. NAMEN DELA

V diplomskem delu bomo analizirali krvne profile dvema skupinama slovenskih profesionalnih športnikov. Preverili bomo, če gre pri katerem od športnikov za primer povišanega indeksa stimulacije kostnega mozga in torej za sum na zlorabo rHuEPO. Pri prvi skupini športnikov bomo najprej primerjali njihove vrednosti hemoglobina, retikulocitov in indeksa stimulacije kostnega mozga s populacijskimi referenčnimi vrednostmi ter s FIS limitnimi vrednostmi, ki so določene v najnovejšem FIS antidopinškem pravilniku. Nato bomo ugotavljali ali se vrednosti Hb in OFF-hr statistično značilno razlikujejo med spoloma. Pri drugi skupini športnikov pa bomo preverili ločeno za oba spola, če višinske priprave na nadmorski višini 1517 metrov vplivajo na vrednosti parametrov. Preverili bomo, če se vrednosti krvnih markerjev na Rogli in po prihodu iz Rogle statistično značilno razlikujejo od parametrov izmerjenih pred odhodom na Roglo. Na koncu bomo enemu športniku in eni športnici analizirali krvni profil tekom celotne študije in ovrednotili nihanja v OFF-hr vrednosti ter rezultate podali kot OFF-hr_z vrednost. To vrednost bomo primerjali z vrednostmi zapisanimi v FIS antidopinškem pravilniku.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1. PREISKOVANCI

Naši podatki so zajemali vzorce krvi dveh skupin slovenskih profesionalnih športnikov. Vzorci krvi v prvi skupini športnikov so bili odvzeti kot del rednega zdravniškega pregleda, vzorci krvi v drugi skupini športnikov pa so bili odvzeti z namenom spremljanja višinskih priprav. Vsi vzorci pri prvi skupini športnikov so bili odvzeti na Inštitutu za šport na Fakulteti za šport v Ljubljani, pri drugi skupini pa so vzorce krvi jemali tudi na Rogli.

Prva skupina športnikov

Pri prvi skupini športnikov, kjer smo preverjali kako se vrednosti Hb in OFF-hr modela razlikujejo glede na spol, so športnikom vzeli samo en vzorec krvi. Skupina je bila sestavljena iz 34 preiskovancev, od tega jih je bilo 17 moškega spola in 17 ženskega spola. Pri analizi podatkov smo ugotovili, da so pri enem osebk moškega spola manjkale vrednosti za procent retikulocitov, zato smo tega preiskovanca izločili iz naše raziskave. Vzorci krvi za prvo skupino so bili odvzeti v prvih treh mesecih leta 2009. Skupina je bila sestavljena iz športnikov različnih disciplin.

Druga skupina športnikov

Druga skupina športnikov je zajemala 15 oseb, in sicer 5 žensk ter 10 moških. Iz naše raziskave smo izključili eno osebo ženskega spola, ki je imela diagnosticirano retikulocitopatijo in so bili njene vrednosti retikulocitov nenormalno visoke, kar bi imelo za posledico tudi neobičajne vrednosti za OFF-hr. Poleg nje smo izpustili še eno osebo moškega spola in eno osebo ženskega spola. Razlog za izključitev pri teh dveh je bil v premajhnem številu meritev za natančno analizo. Tako smo analizirali vzorce krvi 12 športnikom. Vsem športnikom v tej skupini so vzeli sedem vzorcev krvi, razen trem športnikom moškega spola, ki so manjkali pri enem oziroma dveh odvzemih. Prvi vzorec je bil odvzet na Inštitutu za šport na ljubljanski Fakulteti za šport (v nadaljevanju Inštitut), naslednji štirje vzorci so bili odvzeti na Rogli, zadnja dva vzorca pa sta bila odvzeta po prihodu iz Rogle spet na Inštitutu. Preglednica IV prikazuje časovni protokol zbiranja vzorcev.

Preglednica IV: Časovni protokol odvzema vzorcev pri drugi skupini športnikov

Preiskovanec	pred višino	na višini				po višini	
	1. odvzem	2. odvzem	3. odvzem	4. odvzem	5. odvzem	6. odvzem	7. odvzem
1 Ž	9.6.2010	21.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	13.7.2010	26.7.2010	6.8.2010
2 Ž	8.6.2010	21.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	12.7.2010	26.7.2010	6.8.2010
3 Ž	15.6.2010	21.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	12.7.2010	26.7.2010	6.8.2010
4 M	8.6.2010	22.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	13.7.2010	27.7.2010	6.8.2010
5 M	8.6.2010	22.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	13.7.2010	/	6.8.2010
6 M	9.6.2010	22.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	14.7.2010	27.7.2010	6.8.2010
7 M	8.6.2010	22.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	13.7.2010	27.7.2010	6.8.2010
8 M	9.6.2010	/	28.6.2010	5.7.2010	12.7.2010	27.7.2010	6.8.2010
9 M	9.6.2010	22.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	14.7.2010	26.7.2010	6.8.2010
10 M	8.6.2010	22.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	14.7.2010	27.7.2010	6.8.2010
11 M	10.6.2010	21.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	14.7.2010	26.7.2010	6.8.2010
12 M	/	21.6.2010	28.6.2010	5.7.2010	12.7.2010	26.7.2010	/

* črka Ž označuje preiskovanko ženskega spola, črka M označuje preiskovanca moškega spola. Polja z oznako / pomenijo, da preiskovanec ni oddal krvi

Vsi športniki v tej skupini so bili profesionalni tekači na smučeh in so preživeli štiri tedne višinskih priprav na Rogli.

3.2. METODE

Iz vseh podatkov v krvnem profilu smo uporabili koncentracijo hemoglobina in procent retikulocitov. Iz teh dveh vrednosti smo izračunali indeks stimulacije kostnega mozga – OFF-hr indeks. Vrednosti hemoglobina in procenta retikulocitov ter OFF-hr indeksa smo primerjali z limitnimi vrednostmi zapisanimi v FIS antidopinškem pravilniku. Vsi vzorci so bili analizirani s hematološkim analizatorjem Siemens ADVIA 120.

3.2.1. Hemoglobin in retikulociti

Nekatere športne zveze so že leta 1997 sprejele mejne vrednosti za hemoglobin in retikulocite, da bi tako preprečili zlorabo rHuEPO v športu, saj takrat še niso poznali ustrezne analizne metode za detekcijo. Te teste so izvajali na tekmovanjih kot zdravstvene kontrole in vsak športnik, ki je presegal te meje, je bil kaznovan z izključitvijo iz tekmovanja, dokler njegove vrednosti niso bile spet normalne.

Tekom časa so se te meje spreminjale in mi smo naše rezultate primerjali z mejnimi vrednostmi najnovejšega FIS antidopinškega pravilnika (36). V tem pravilniku piše, da mora športnik, ki presega vrednosti navedene v Preglednici V, zagotoviti še urinski vzorec za nadaljnje preiskave.

Preglednica V: Mejne vrednosti za hemoglobin in retikulocite po FIS antidopinškem pravilniku (36)

Parameter	Moški	Ženske
Hb (g/L)	170 ali višje	160 ali višje
Procent retikulocitov	$\leq 0.2\%$ in $\geq 2.0\%$	$< 0.2\%$ in $> 2.0\%$

Športniki, ki presegajo vrednosti za hemoglobin pri dveh zaporednih meritvah, so izključeni iz tekmovanja pet zaporednih dni. Nato ponovno oddajo krvni vzorec in če se krvni parametri normalizirajo, lahko spet tekmujejo.

Vrednosti Hb in procenta retikulocitov smo primerjali tudi s populacijskimi referenčnimi vrednostmi.

3.2.2. Indeks stimulacije kostnega mozga – OFF-hr

Indeks stimulacije kostnega mozga je bil prvič uporabljen v antidopinške namene leta 2000. Takrat so na OI v Sidneyu prvič športnike testirali na rHuEPO. Uporabili so direktni test v urinu z izoelektričnim fokusiranjem v kombinaciji z indirektnim testom.

Mi smo v naši raziskavi uporabili indirektni model druge generacije OFF-hr, ki so ga utemeljili avstralski raziskovalci. Ta model, imenovan tudi indeks stimulacije kostnega mozga, v boju proti dopingu zaenkrat uporabljata mednarodna kolesarska zveza (UCI) in mednarodna smučarska zveza (FIS). Indeks stimulacije kostnega mozga je zmožen zaznati

športnike, kateri so pred kratkim prenehali s terapijo z rHuEPO. Formulo sestavljata dva parametra, in sicer koncentracija hemoglobina ter procent retikulocitov.

Kljub temu, da se je v raziskavah OFF-hre, ki vključuje še dodaten parameter – serumsko koncentracijo eritropoetina, izkazal za bolj učinkovitega, kot OFF-hr, se v antidopinške namene uporablja slednji. Za dopinška testiranja, kjer je potrebno hitro analizirati vzorce in predložiti rezultate, je namreč OFF-hr bolj primeren, saj ni potrebno meriti serumske koncentracije eritropoetina. Rezultati za OFF-hr model so tako lahko analizirani že na samem kraju tekmovanja z uporabo »premičnih laboratorijev«, ki imajo analizatorje za določitev Hb in procenta retikulocitov. Poleg tega pa za OFF-hr govori tudi cena analize, ki je cenejša od analize OFF-hre.

Iz formule indeksa je razvidno, da bo športnik dosegel najvišjo vrednost OFF-hr modela takrat, ko bo imel visoko koncentracijo Hb in hkrati nizek procent retikulocitov. Prav te hematološke spremembe pa so značilne za športnike, ki so nedavno zlorabljali rHuEPO. Podobne hematološke spremembe pa se dogajajo v telesu tudi v hipoksičnih pogojih, zato moramo biti pazljivi, kadar se vzorci krvi analizirajo osebam, ki so bile na visoki nadmorski višini. FIS je na podlagi prejšnjih raziskav in priporočil postavila meje za OFF-hr. Za moške so postavili prag OFF-hr 125.6 točke, za ženske pa 113.5 točke. Tisti, ki preseže te meje, je izključen iz tekmovanja za 5 dni. Po preteku petih dni se mu znova odvzame kri in, če se OFF-hr vrednost spusti pod predpisano mejo lahko športnik spet tekmuje.

3.2.3. OFF-hr_z vrednost

Pri drugi skupini športnikov smo izbrali pri obeh spolih posameznika, pri katerem je bila amplituda nihanja OFF-hr modela tekom teh sedmih meritev največja. Nato smo pri vsakem odvzemu izračunali OFF-hr in ga primerjali s prejšnjo vrednostjo ter tako določili OFF-hr_z vrednost. Tak pristop se poleg ostalih indirektnih metod uporablja v biološkem potnem listu, ki ga uporabljata UCI in FIS. Dobljene z-vrednosti smo primerjali z limitnimi vrednostmi, ki so določene v FIS antidopinškem pravilniku. Preglednica VI prikazuje ukrepe pri posameznih mejah z-vrednosti.

Preglednica VI: Pragi z-vrednosti in ukrepi, ki sledijo po FIS antidopinškem pravilniku

z-vrednost	≥ 3.09	≥ 2.33 (vendar < 3.09) ali ≤ -2.33
ukrepi	14-dnevna prepoved tekmovanja	»sumljiv«, načrtno testiranje

Ti pragi z-vrednosti izvirajo iz statistike in nam povejo stopnjo tveganja, ki jo sprejmemo za morebiten lažno pozitiven rezultat. Tako prag za z-vrednost ≥ 3.09 ustreza tveganju, da bomo v populaciji 1000 »nedopingiranih« športnikov zaznali en lažno pozitiven rezultat. Prag z-vrednosti, ki določa *sumljive* športnike je nižji, kar pomeni, da je stopnja tveganja višja. Ta prag bo presegel en športnik v populaciji 100 »nedopingiranih« športnikov.

Za določitev OFF-hr_z smo uporabili naslednjo enačbo:

- $OFF-hr_z = (OFF-hr_{trenutni} - OFF-hr_{povprečni}) / \sqrt{(\sigma^2 (1 + 1/n))}$, enačba 7

kjer je σ^2 univerzalna varianca (za OFF-hr_z je 75.90) in n število prejšnjih analiziranih vzorcev za pridobitev povprečne vrednosti. Univerzalna varianca v bistvu predstavlja variabilnost med različnimi odčitki vzorcev pri posamezniku. Določili so jo tako, da so primerjali variance med različnimi skupinami športnikov in tisto najvišjo uporabili kot univerzalno. Zaradi tega so meje višje in je občutljivost manjša. Zato se lahko zgodi, da nekaj športnikov, ki zlorabljajo rHuEPO ne bo preseglo dovoljene meje. Po drugi strani pa je zelo majhna verjetnost (1 na 1000), da bi »čist« športnik zaradi naravnega nihanja krvnih parametrov presegel dovoljeno mejo in bil tako neupravičeno izključen iz tekmovanja. Še vedno je namreč bolje kakšnega krivega spustiti, kot nedolžnega okriviti. Marsikateri »čist« športnik pa bo presegal meje, ki so določene kot prag za *sumljive* športnike. Vendar pa to še ne pomeni uporabe dopinga, ampak športne organizacije te meje uporabljajo za načrtno testiranje in medicinsko spremljanje sumljivih športnikov. Vsak športnik, ki bo presegel te sumljive meje bo na seznamu za testiranje izven tekmovanja (angl. out-of-competition testing) in na ta način bodo športne organizacije zmanjšale stroške za testiranja, saj ne bodo po nepotrebnem izvajale testov na športnikih, za katere obstaja minimalna oziroma skoraj nična možnost, da uporabljajo rHuEPO (športniki, ki ne presegajo sumljive meje). Bojazen, da bi s tem pristopom spregledali veliko športnikov, ki dejansko zlorabljajo rHuEPO pa je odveč, saj praktično vsi jemalci (tudi tisti, ki jemljejo mikrodoze) presegajo te meje.

Ta enačba nam omogoča spremljanje individualnega gibanja OFF-hr vrednosti pri posameznem športniku in je trenutno najbolj občutljiva indirektna metoda, ki kaže na zlorabo rHuEPO in njemu podobnih snovi.

3.2.4. Statistična obdelava – prva skupina

Pri prvi skupini športnikov smo primerjali vrednosti hemoglobina in OFF-hr modela med spoloma. Nato smo s primerjalno statistiko analizirali naše rezultate. S statističnim programom SPSS 19 smo izvedli t-test za dva neodvisna vzorca, da smo ugotovili, če se vrednosti omenjenih parametrov statistično značilno razlikujeta glede na spol.

3.2.5. Statistična obdelava – druga skupina

Pri drugi skupini športnikov smo najprej razdelili vse vrednosti Hb na vrednosti izmerjene pred odhodom na Roglo, vrednosti izmerjene na Rogli ter vrednosti, ki so bile izmerjene po prihodu iz Rogle. To smo storili tako, da smo z računalniškim programom Microsoft Excel 2007 izračunali povprečne vrednosti hemoglobina pri prvi meritvi, da smo dobili povprečno koncentracijo hemoglobina na nadmorski višini < 610 m (v nadaljevanju normalna nadmorska višina). Povprečne vrednosti naslednjih štirih meritev so nam služile za povprečno koncentracijo hemoglobina na višji nadmorski višini (Rogla), povprečne vrednosti šestega in sedmega vzorca pa smo uporabili za izračun povprečne koncentracije hemoglobina po prihodu iz višje nadmorske višine nazaj na normalno nadmorsko višino. Na enak način smo določili tudi povprečne vrednosti za OFF-hr model. Nato smo te povprečne vrednosti primerjali med seboj. Spet smo uporabili statistični program SPSS 19, vendar smo tokrat rezultate analizirali s parnim t-testom, pri čemer smo ugotavljali morebitne signifikantne razlike med vrednostmi hemoglobina ter OFF-hr modela pred odhodom na Roglo z vrednostmi na Rogli ter z vrednostmi po prihodu iz Rogle. To analizo smo naredili ločeno za moški in ženski spol.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. PRIMERJAVA VREDNOSTI KRVNIH PARAMETROV IN OFF-hr MODELA S FIS LIMITNIMI VREDNOSTMI IN POPULACIJSKIMI REFERENČNIMI VREDNOSTMI PRI PRVI SKUPINI ŠPORTNIKOV

4.1.1. Moški

V Preglednici VII so navedene vrednosti za hemoglobin, retikulocite in OFF-hr model za moški spol.

Preglednica VII: Vrednosti hemoglobina, procenta retikulocitov in OFF-hr indeksa za moški spol

Preiskovanec	Datum sprejema	konc. Hb (g/l)	ret (%)	OFF-hr (točke)
1.	09.01.2009	145.0	0.5	102.6
2.	12.01.2009	156.0	1.1	93.1
3.	19.01.2009	141.0	1.2	75.3
4.	19.01.2009	164.0	0.9	107.1
5.	19.01.2009	144.0	0.7	93.8
6.	18.02.2009	156.0	1.1	93.1
7.	25.02.2009	147.0	1.0	87.0
8.	25.02.2009	166.0	0.8	112.3
9.	26.02.2009	164.0	0.9	107.1
10.	26.02.2009	150.0	1.1	87.1
11.	26.02.2009	155.0	1.0	95.0
12.	16.03.2009	155.0	1.4	84.0
13.	16.03.2009	169.0	1.0	109.0
14.	16.03.2009	159.0	0.9	102.1
15.	16.03.2009	161.0	1.0	101.0
16.	18.03.2009	149.0	0.9	92.1

Iz teh rezultatov je razvidno, da noben osebek moškega spola ni presegel mejnih vrednosti za hemoglobin, določenih s strani FIS. Osebek z zaporedno številko 13 je imel najvišjo

vrednost hemoglobina med vsemi, in sicer 169 g/l, kar je še na zgornji dovoljeni meji po pravilniku FIS. Po drugi strani so najnižjo vrednost izmerili osebku z zaporedno številko 3, ki je imel koncentracijo hemoglobina 141 g/l. Povprečna koncentracija hemoglobina v prvi skupini športnikov za moški spol je bila 155.1 g/l, kar spada v referenčni interval, ki je za moške 140-175 g/l.

Vrednosti za procent retikulocitov so se prav tako gibale znotraj dovoljenega intervala, ki ga je določila FIS. Najvišji procent retikulocitov smo opazili pri osebku z zaporedno številko 12, in sicer 1.4%, najnižji procent retikulocitov pa smo opazili pri osebku z zaporedno številko 1 z 0.5%.

Tudi vrednosti indeksa stimulacije kostnega mozga niso pri nobenem osebku moškega spola presegale limitnih vrednosti FIS. Najvišjo vrednost OFF-hr modela smo izračunali za osebek z zaporedno številko 8, ki je dosegel 112.3 točke, najnižjo pa smo izračunali za osebek z zaporedno številko 3, ki je dosegel 75.3 točke.

Če bolj podrobno pogledamo rezultate v Preglednici VII opazimo, da preiskovanec z največjo koncentracijo Hb ni imel tudi največje vrednosti OFF-hr modela. Na drugi strani pa opazimo, da je preiskovanec, ki je imel tretjo najmanjšo koncentracijo Hb v skupini, dosegel zelo visoko vrednost OFF-hr modela (peto največjo). To pomeni, da ima na rezultat OFF-hr modela zelo pomemben vpliv tudi procent retikulocitov. Zaradi tega je v antidopinškem smislu izjemnega pomena, da se te krvne analize izvajajo po ustaljenem protokolu, s standardiziranimi postopki in aparaturami, saj že najmanjša analizna napaka vpliva na končni rezultat. V prvem primeru je preiskovanca, katerega koncentracija Hb je že skoraj presegla dovoljeno mejo, pred previsokim indeksom stimulacije kostnega mozga obvaroval prav procent retikulocitov, ki je »nasprotoval« učinku Hb na OFF-hr model. V drugem primeru pa je prav nizek procent retikulocitov pripomogel k dokaj visokemu OFF-hr modelu, upoštevajoč relativno nizko koncentracijo Hb. Da bi osebek z zaporedno številko 13 presegel FIS dovoljeni prag za OFF-hr model, bi moral imeti največ 0.5% retikulocitov, s čimer bi dosegel 126.6 točke. Iz tega vidika je OFF-hr model mnogo bolj varna metoda dokazovanja suma zlorabe rHuEPO v smislu lažno pozitivnih rezultatov, kot pa zgolj omejitve vrednosti Hb oziroma Ret%, ki lahko pri nekaterih posameznikih že naravno presegajo omenjene limite. Pri vseh treh metodah pa je še vedno problem detektirati tiste športnike, ki jemljejo rHuEPO po takem režimu, da vzdržujejo vrednosti omenjenih parametrov in modelov tik pod zgornjo dovoljeno mejo.

Na podlagi rezultatov iz Preglednice VII lahko sklepamo, da nihče v tej skupini ni v bližnji preteklosti zlorabljal rHuEPO, saj nobeden preiskovanec ni presegel zgornjega dovoljenega praga za koncentracijo Hb, praga za procent retikulocitov in praga za vrednost OFF-hr modela. Vendar pa ta indirektni pristop ni stoodstotna metoda, saj je recimo občutljivost OFF-hr modela v fazi izpiranja po nekaterih prejšnjih raziskavah 20-80% (odvisno od časa od zadnje injekcije rHuEPO) (44), po lanski raziskavi pa zgolj 5.6%. Avtorji slednje so celo predlagali, da se indeks stimulacije kostnega mozga umakne iz dopinških testiranj, saj naj bi bil prav zaradi nizke občutljivosti neučinkovit pri zaznavanju športnikov, ki so pred kratkim nehali jemati rHuEPO (30). Je pa OFF-hr uporaben pri spremljanju sumljivih športnikov za ti. načrtno testiranje, saj se na ta način racionalizirajo stroški testiranj in se hkrati poveča učinkovitost boja proti krvnemu dopingu. V naši skupini športnikov bi bilo smiselno še naprej spremljati tiste športnike, ki so imeli najvišje indekse in jih občasno testirati tudi z direktno metodo izoelektričnega fokusiranja. FIS je za načrtno testiranje določila prag OFF-hr modela 104.6 točke za moške in 92.2 točke za ženske. Te vrednosti ustrezajo enemu lažno pozitivnemu vzorcu na deset vzorcev. Statistično gledano to pomeni, da bi v skupini desetih športnikov, ki se ne poslužujejo dopinga, eden presegel omenjene vrednosti. V preglednici VII vidimo, da prag za načrtno testiranje presegajo štirje moški športniki (športniki z zaporednimi številkami 4, 8, 9 in 13). Iz dopinškega vidika lahko rečemo, da je v naši skupini najbolj »sumljiv« preiskovanec z zaporedno številko 8, katerega krvni profil kaže značilnosti pred kratkim končane terapije z rHuEPO, saj ima ob visoki koncentraciji Hb tudi relativno nizek procent retikulocitov v primerjavi z ostalimi preiskovanci, kar ima za posledico tudi najvišjo vrednost OFF-hr modela v skupini. Značilnost športnikov, ki so pred kratkim končali s terapijo z rHuEPO pa je ravno ta, da imajo še vedno povišane vrednosti Hb, hkrati pa se njihov procent retikulocitov spusti pod vrednost, ki so jo imeli pred začetkom jemanja rHuEPO. Vendar pa so vse vrednosti omenjenega športnika znotraj dovoljenih mej. Zaradi tega bi bilo potrebno narediti še več testov, da bi videli kako se gibljejo njegove vrednosti krvnih parametrov tekom časa. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da preiskovanec ni presegel nobene meje zapisane v FIS antidopinškem pravilniku, kar pomeni, da lahko tekmuje na vseh tekmovanjih, ki so pod okriljem te organizacije.

4.1.2. Ženske

Enako analizo, kot je opisana zgoraj, smo naredili za ženski del prve skupine športnikov. Pričakovano so vrednosti za hemoglobin in OFF-hr model dosti nižje, kot pri moškem spolu. V Preglednici VIII so zbrani rezultati za ženski spol.

Preglednica VIII: Vrednosti hemoglobina, procenta retikulocitov in OFF-hr indeksa za ženski spol

Preiskovanka	Datum sprejema	konc. Hb (g/l)	ret (%)	OFF-hr (točke)
1.	19.01.2009	133.0	1.7	54.8
2.	19.01.2009	134.0	1.2	68.3
3.	19.01.2009	141.0	1.7	62.8
4.	19.01.2009	144.0	1.4	73.0
5.	09.02.2009	140.0	1.0	80.0
6.	25.02.2009	130.0	0.7	79.8
7.	25.02.2009	125.0	1.9	42.3
8.	25.02.2009	135.0	0.8	81.3
9.	25.02.2009	142.0	0.9	85.1
10.	26.02.2009	142.0	0.8	88.3
11.	26.02.2009	149.0	1.2	83.3
12.	26.02.2009	159.0	1.3	90.6
13.	16.03.2009	149.0	0.6	102.5
14.	16.03.2009	139.0	0.8	85.3
15.	18.03.2009	139.0	0.7	88.8
16.	18.03.2009	137.0	0.8	83.3
17.	18.03.2009	147.0	0.9	90.1

Tudi pri ženskah nobena preiskovanka ni presegla zgornje dovoljene meje za hemoglobin in OFF-hr model, določene v FIS antidopinškem pravilniku. Še najbližje tej meji je bila preiskovanka z zaporedno številko številka 12, ki so ji izmerili koncentracijo Hb 159.0 g/l, kar je nekoliko višje, kot so populacijske referenčne vrednosti Hb za ženske. Najnižjo koncentracijo Hb pa so izmerili preiskovanki z zaporedno številko 7, in sicer 125.0 g/l. Povprečna koncentracija Hb pri ženskem spolu je bila 140.3 g/l, kar je v skladu z referenčnimi vrednostmi Hb za ženske, ki so 123-153 g/l.

Rezultati za procent retikulocitov so bili znotraj referenčnih mej, ki so enake, kot v FIS antidopinškem pravilniku. Najvišji procent retikulocitov smo opazili pri preiskovanki z zaporedno številko 7, katere krvna analiza je pokazala 1.9% retikulocitov v krvi. Najnižji procent pa so določili preiskovanki z zaporedno številko 13 z 0.6% retikulocitov v krvi.

Vrednosti OFF-hr modela niso pri nobeni preiskovanki presegle limitnih vrednosti FIS. Najvišji indeks smo izračunali za preiskovanko z zaporedno številko 13, ki je dosegla 102.5 točke, najnižji indeks pa smo izračunali za preiskovanko z zaporedno številko 7, ki je dosegla 42.3 točke.

Tudi tukaj se je izkazalo, da preiskovanka z najvišjim Hb nima tudi najvišjega OFF-hr modela, zaradi nasprotnega vpliva retikulocitov na indeks. Po drugi strani pa ima preiskovanka z najmanjšo koncentracijo Hb tudi najnižjo vrednost OFF-hr modela, saj ima obenem tudi najvišji procent retikulocitov, ki pripomore k znižanju indeksa. Visok procent retikulocitov pri tej osebi bi nas lahko napeljal na idejo, da ta oseba trenutno uporablja rHuEPO, vendar pa bi v tem primeru poleg visokega procenta retikulocitov opazili tudi visoko koncentracijo Hb. Pri tej osebi pa opazimo nizko koncentracijo Hb, ki nakazuje na krvavitev ali odvzem večje količine krvi za kasnejšo avtologno transfuzijo. Seveda pa je tudi možno, da gre pri tej osebi za kakšno patologijo (anemija) ali pa, kar se zdi najverjetneje, da ima ta oseba že naravno nizke vrednosti Hb in visok procent retikulocitov.

Preiskovanka z zaporedno številko 13 je kandidatka za nadaljnje načrtno testiranje, saj je njena vrednost Hb dokaj visoka, hkrati pa je njen delež retikulocitov najnižji v skupini. To dvoje skupaj pa vodi v največjo vrednost OFF-hr modela v skupini. Njen indeks presega 92.2 točke, ki je v FIS antidopinškem pravilniku mejna vrednost za načrtno testiranje. To pomeni, da bodo v prihodnosti na njej izvajali več testiranj krvi, vmes pa bo podvržena tudi kakšnemu urinskemu direktnemu testu.

Pri preiskovanki z najvišjo vrednostjo Hb, ki je tudi nekoliko nad populacijskim referenčnim intervalom, bi iz dopinškega vidika pomislili na transfuzijo krvi ali zlorabo rHuEPO, vendar pa je ta scenarij malo verjeten, saj je njen procent retikulocitov relativno normalen. Iz rezultatov prejšnjih raziskav pa vemo, da ima oseba po transfuziji krvi ali nekaj tednov po zadnji injekciji rHuEPO, visok Hb in hkrati zelo nizek procent retikulocitov zaradi fiziološkega odziva telesa, ki zavre izplavljanje nezrelih eritrocitov v krvni obtok (38; 51). Vsekakor pa na podlagi ene same meritve ne moremo interpretirati teh rezultatov, kot kakršenkoli dokaz uporabe prepovedanih snovi ali metod.

4.2. PRIMERJAVA VREDNOSTI HEMOGLOBINA MED SPOLOMA PRI PRVI SKUPINI ŠPORTNIKOV

Povprečna vrednost Hb pri moških je bila za 14.8 g/l večja, kot pri ženskah. Največja razlika je bila med moškim preiskovancem z zaporedno številko 13 in žensko preiskovanko z zaporedno številko 7 in je znašala 44 g/l. T-test za dva neodvisna vzorca v programu SPSS 19 je pokazal, da obstaja statistično značilna razlika ($p < 0.05$) v koncentraciji hemoglobina med spoloma. Moški del prve skupine športnikov je imel statistično značilno višjo koncentracijo Hb kot ženski del. Do enakih ugotovitev so prišli tudi raziskovalci, ki so štiri zaporedne sezone spremljali vrednosti Hb in retikulocitov pri vrhunskih smučarjih (52).

Preglednica IX prikazuje rezultate t-testne statistike za dva neodvisna vzorca.

Preglednica IX: Izpisek programa SPSS 19 za t-test za vrednost hemoglobina pri obeh spolih

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
Hb Equal variances assumed	,242	,626	5,131	31	,00001	14,7684	2,8780
Equal variances not assumed			5,124	30,626	,00002	14,7684	2,8824

4.3. PRIMERJAVA VREDNOSTI OFF-hr MODELA MED SPOLOMA PRI PRVI SKUPINI ŠPORTNIKOV

Povprečna vrednost OFF-hr modela je bila za 17.5 točke večja pri moških kot pri ženskah. Največja razlika je bila 70 točk med preiskovancem z zaporedno številko 8 in preiskovanko z zaporedno številko 7. Ponovno smo izvedli t-test za dva neodvisna vzorca, ki je pokazal, da imajo moški statistično značilno ($p < 0.05$) višje vrednosti indeksa stimulacije kostnega mozga. Rezultati t-testa so podani v Preglednici X.

Preglednica X: Izpisek programa SPSS 19 za t-test za vrednost OFF-hr modela pri obeh spolih

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
OFF Equal variances assumed	,907	,348	3,963	31	,0004	17,5563	4,4296
Equal variances not assumed			4,007	28,555	,0004	17,5563	4,3812

Višja vrednost OFF-hr modela pri moških je izključno posledica višjih vrednosti Hb pri moških, saj je procent retikulocitov ponavadi pri obeh spolih približno enako razporejen. Banfi in sodelavci so sicer odkrili statistično značilno razliko v vrednostih retikulocitov med spoloma, vendar je bilo število testiranih športnikov tako majhno (n=18), da vzorec ni bil reprezentativen (52). V našem primeru je bil povprečen procent retikulocitov pri moških 1.0%, pri ženskah pa 1.1%. Pri naši raziskavi torej nismo našli signifikantnih sprememb v vrednostih retikulocitov med spoloma. Tudi populacijske referenčne meje so za procent retikulocitov enake za oba spola, medtem ko so za Hb in OFF-hr pri moških višje. Zato je logično, da, če obstaja statistično značilna razlika med spoloma v Hb, da posledično obstaja tudi statistično značilna razlika v vrednosti OFF-hr modela med spoloma in to smo z zgornjim testom tudi dokazali.

4.4. PRIMERJAVA VREDNOSTI KRVNIH PARAMETROV PRED VIŠINO, NA VIŠINI IN PO VIŠINI S FIS LIMITNIMI VREDNOSTMI IN POPULACIJSKIMI REFERENČNIMI VREDNOSTMI PRI DRUGI SKUPINI ŠPORTNIKOV

Koncentracijo hemoglobina in procent retikulocitov smo opazovali preden so športniki odšli na priprave na Roglo, med pripravami na Rogli in potem, ko so prišli iz Rogle. Prvi vzorec je štel za meritev pred pripravami, povprečje naslednjih štirih vzorcev je predstavljalo vrednost parametrov na Rogli, povprečje zadnjih dveh meritev pa je predstavljalo vrednost parametrov po prihodu iz Rogle.

4.4.1. Moški

Rezultati so pokazali, da ni bistvene razlike v vrednostih omenjenih parametrov glede na to ali so športniki na normalni nadmorski višini ali pa na višini 1517 metrov nadmorske višine. Program SPSS 19 med meritvami na različnih nadmorskih višinah ni zaznal statistično značilnih razlik. Preglednica XI prikazuje rezultate parnega t-testa.

Preglednica XI : Parni t-test za računanje statistično značilnih razlik v vrednostih Hb pred Roglo in na Rogli ter vrednostih pred Roglo in po Rogli za moški spol

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Pred Roglo - Na Rogli	-,5500	6,7918	2,4013	-6,2281	5,1281	-,229	7	,825
Pair 2 Pred Roglo - Po Rogli	3,3125	4,4556	1,5753	-,4125	7,0375	2,103	7	,074

Pri prvi meritvi na Rogli se je sicer Hb malenkost zvišal, vendar je pri drugi meritvi tudi za približno enak delež padel ter se nato pri tretji meritvi gibal okoli začetne vrednosti. Zadnji, četrti teden višinskih priprav na Rogli pa je Hb padel pod začetno vrednost. Vendar pa je bila povprečna koncentracija Hb na višini praktično enaka tisti pred odhodom na

Roglo, in sicer je bila 154.8 g/l. Po prihodu iz Rogle je povprečna koncentracija Hb padla na 151.6 g/l, kar je v nasprotju z našimi pričakovanji. Glede na rezultate preteklih študij, smo sklepali, da se bo na višini pod vplivom hipoksičnih pogojev zvišala koncentracija Hb in bo ostala povišana še vsaj dva tedna po prihodu iz priprav. V našem primeru pa se na višini koncentracija Hb ni zvišala, po prihodu iz Rogle pa je celo padla nižje od začetnih vrednosti.

Preglednica XII prikazuje zbrane rezultate iz teh testiranj za moški spol.

Preglednica XII: Povprečne vrednosti Hb in Ret pred odhodom na Roglo, na Rogli in po prihodu iz Rogle za moški spol

	Pred viš.	Na viš. 1	Na viš. 2	Na viš. 3	Na viš. 4	Po viš. 1	Po viš. 2
Moški (n=9)							
Hb (g/l)	155,0	157,3	154,8	155,7	151,3	152,6	150,5
Ret (%)	1,2	1,4	1,3	1,4	1,1	1,2	1,1

Najvišjo koncentracijo Hb pri moških športnikih so zabeležili pri enem preiskovancu pri drugem odvzemu krvi, torej naslednje jutro po prihodu na Roglo in je znašala 167.0 g/l. Pri njemu se je koncentracija Hb v primerjavi s prvo meritvijo povišala kar za 17.0 g/l. Takšen drastičen skok koncentracije Hb bi težko pripisali izključno vplivu višine. V literaturi je sicer moč zaznati, da ponavljajoče tri- do štiritedenske višinske priprave na nadmorski višini 2000 metrov in več, lahko privedejo do zvišanja koncentracije Hb pri vrhunskih športnikih za 10-15 g/L (35). Vendar pa so v našem primeru priprave potekale na nižji nadmorski višini, poleg tega pa je bil preiskovanec v času odvzema krvi šele en dan na Rogli in v tako kratkem času tudi teoretično še ne more priti do takšnih velikih hematoloških sprememb. Temu sklepu govori v prid tudi dejstvo, da se pri ostalih preiskovancih koncentracija Hb pri prvi meritvi na Rogli ni povišala v takšni meri, kot pri njemu (enemu preiskovancu se pri prvi meritvi na Rogli celo zmanjša koncentracija Hb), zato lahko vpliv višine, kot edini vzrok tako velikega porasta koncentracije Hb izključimo. Na višini sicer pride do stimulacije kostnega mozga zaradi hipoksičnih pogojev, kar poviša vrednosti Hct in Hb, poleg tega pa tudi vzdržljivostni trening povzroči porast mase eritrocitov. Vendar ima vzdržljivostna vadba še večji vpliv na volumen plazme, in sicer poveča njen volumen (35;47;53). Posledica vsega tega je, da imajo športniki normalno ali rahlo nižjo koncentracijo Hb, kot normalna populacija. Njihova masa totalnega Hb pa je seveda višja. Poleg treninga ima na vrednosti krvnih parametrov vpliv tudi prehrana,

prehranska dopolnila in vnos tekočine, a ti vplivi so minimalni. Glede na to, da smo pri nadaljnjih meritvah pri tem preiskovancu opazili tudi velika nihanja v procentu retikulocitov, je možno, da se je preiskovanec poslužil kakšne oblike krvnega dopinga. Ali gre za transfuzijo, rHuEPO ali kakšno drugo podobno snov, pa je iz teh rezultatov nemogoče predvideti. Potrebni bi bili še nadaljnji testi, saj v primeru, da športnik trenutno zlorablja rHuEPO, nam vrednosti indeksa stimulacije kostnega mozga nič ne povedo, saj ima ta indeks občutljivost samo v fazi izpiranja tj. po končani terapiji z rHuEPO. Vsekakor pa je potrebno na tem mestu poudariti, da so kljub neobičajnemu krvnemu profilu, preiskovančeve vrednosti še vedno znotraj dovoljenih mej, ki jih je postavila FIS in dokler se takemu športniku z direktnimi ali indirektnimi metodami ne dokaže krivda, velja za nedolžnega in ima povsem legitimno pravico nastopati na tekmovanjih.

Najnižjo vrednost Hb so enemu moškemu preiskovancu izmerili po prihodu iz Rogle pri šestem odvzemu krvi in je znašala 136.0 g/l. Ta vrednost je nižja od populacijskega referenčnega intervala. Ta preiskovanec je imel tekom celotne študije med vsemi najnižjo koncentracijo Hb in najmanjši procent retikulocitov. Razlog za takšen krvni profil bi lahko bil patološki, npr. blaga anemija. Možnost, da bi v tem primeru šlo za manipulacijo s krvjo, na primer za oddajo krvi za kasnejšo avtologno transfuzijo, lahko izločimo zaradi vztrajanja nizkega procenta retikulocitov tekom celotne študije. Po oddaji večje količine krvi, je namreč poleg nizke koncentracije Hg značilen tudi velik porast retikulocitov, ki se po sedmih dneh povišajo skoraj za 2.5-krat ter ostanejo povišani še nadaljnjih sedem dni (15).

Povprečne vrednosti procenta retikulocitov se le malo spreminjajo, vendar v grobem sledijo prejšnjim ugotovitvam, ki pravijo, da se procent retikulocitov na višini najprej zviša, nato pa po prihodu iz višine pade pod začetno mejo (48). Pri analizi podatkov smo ugotovili, da trije osebki presegajo FIS limitno vrednost za retikulocite. Vsem trem so izmerili 2.0% retikulocitov tekom priprav na Rogli, enemu pri drugem odvzemu krvi, ostalima dvema pa pri četrtem odvzemu. Vsi trije bi po pravilih FIS morali dati še urinski vzorec, poleg tega pa bi bili še izključeni iz tekmovanja za pet dni. Glede na to, da so vsi preiskovanci imeli največji procent retikulocitov na Rogli, bi lahko sklepali, da je za ta dvig odgovorna višja nadmorska višina. Poleg tega pa je dejstvo, da se po akutni vadbi število retikulocitov zviša, med dolgotrajnim treningom pa se njihova vrednost lahko tudi

zniža. V primeru, da so tem športnikom vzeli kri takoj po treningu, se je ta vpliv lahko poznal pri rezultatih.

4.4.2. Ženske

Pri ženskah se je povprečna vrednost Hb na višini postopoma zviševala, po drugem tednu bivanja na Rogli pa je začela padati. Po prihodu iz Rogle je bila povprečna vrednost Hb še vedno višja od prve meritve pred odhodom na Roglo. Razlika med povprečnimi vrednostmi izmerjenimi na Rogli in vrednostmi izmerjenimi pred odhodom na Roglo je bila 6 g/l. Razlika v povprečnih vrednostih po prihodu iz Rogle in vrednostih pred odhodom na Roglo je bila minimalna, okrog 1.5 g/l.

Preglednica XIII prikazuje zbrane rezultate testiranja za ženski spol.

Preglednica XIII: Povprečne vrednosti Hb in Ret pred odhodom na Roglo, na Rogli in po prihodu iz Rogle za ženski spol

	Pred viš.	Na viš. 1	Na viš. 2	Na viš. 3	Na viš. 4	Po viš. 1	Po viš. 2
Ženske (n=3)							
Hb (g/l)	134,0	137,3	142,3	140,7	139,7	134,7	136,7
Ret (%)	1,7	1,8	1,5	1,1	1,4	1,2	1,2

Kljub temu, da pri rezultatih opazimo trend večanja koncentracije Hb na višini, pa nam statistični program SPSS ne pokaže signifikantne razlike v vrednostih pred Roglo in vrednostih na Rogli ter po Rogli. To pomeni, da se vrednosti Hb na Rogli niso povišale v taki meri, da bi bile statistično značilno drugačne od vrednosti izmerjenih na Inštitutu. Vendar pa je tu potrebno dodati, da je naš statistični vzorec tako majhen (n=3), da rezultati statistike niso najbolj zanesljivi. Rezultate parnega t-testa prikazuje Preglednica XIV.

Preglednica XIV: Parni t-test za računanje statistično značilnih razlik v vrednostih Hb pred Roglo in na Rogli ter vrednostih pred Roglo in po Rogli za ženski spol

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Pred Roglo - Na Rogli	-6,0333	4,4061	2,5438	-16,9786	4,9119	-2,372	2	,141
Pair 2 Pred Roglo - Po Rogli	-1,6667	7,2858	4,2065	-19,7657	16,4323	-,396	2	,730

Najvišjo koncentracijo Hb smo pri ženskah izmerili eni preiskovanki po dveh tednih višinskih priprav na Rogli in je znašala 151.0 g/l, kar je daleč od zgornje dovoljene meje, ki jo določa FIS. Njene vrednosti Hb so se tekom priprav le malo razlikovale.

Najnižjo koncentracijo Hb pa smo zabeležili pri dveh preiskovankah pri prvem odvzemu krvi. Obema so izmerili 128.0 g/l. To pomeni, da so imele vse tri preiskovanke tekom študije koncentracijo Hb znotraj populacijskega referenčnega intervala.

Iz preglednice XIII je razvidno, da je pri ženskah povprečen procent retikulocitov pri začetnih meritvah zelo visok. Tak rezultat je predvsem posledica ene ženske preiskovanke, katere vrednosti retikulocitov so kar pri dveh meritvah presegle FIS limitne vrednosti. Pri prvem odvzemu krvi so ji namerili 2.1%, pri drugem pa celo 2.3%. To pomeni, da bi bila ta preiskovanka izključena iz tekmovanja in bi morala zagotoviti urinski vzorec za nadaljnja testiranja. Vzroka za njen neobičajen krvni profil najbrž ne gre iskati v zlorabi rHuEPO, saj je njena koncentracija Hg dokaj nizka, oziroma v pretekli zlorabi rHuEPO, saj je njen OFF-hr indeks zelo nizek. Pri njej bi lahko sklepali podobno, kot pri eni preiskovanki v prvi skupini, namreč, da je možno, da je shranila večjo količino krvi za kasnejšo avtologno transfuzijo. Vsekakor bi bilo potrebno njene vrednosti spremljati še naprej, še posebej tik pred tekmovanjem, ko si športniki navadno infuzirajo avtologno kri. Če bi takrat zaznali v njenem krvnem profilu visoko koncentracijo Hb in nizko vrednost retikulocitov, bi se naš sum o zlorabi avtologne transfuzije potrdil. Po vsej verjetnosti pa pri tej preiskovanki ne gre za doping, ampak prej za kakšno patološko stanje. Tudi preiskovanka z najvišjo koncentracijo Hb je imela pri prvem odvzemu visok procent retikulocitov v krvi, in sicer

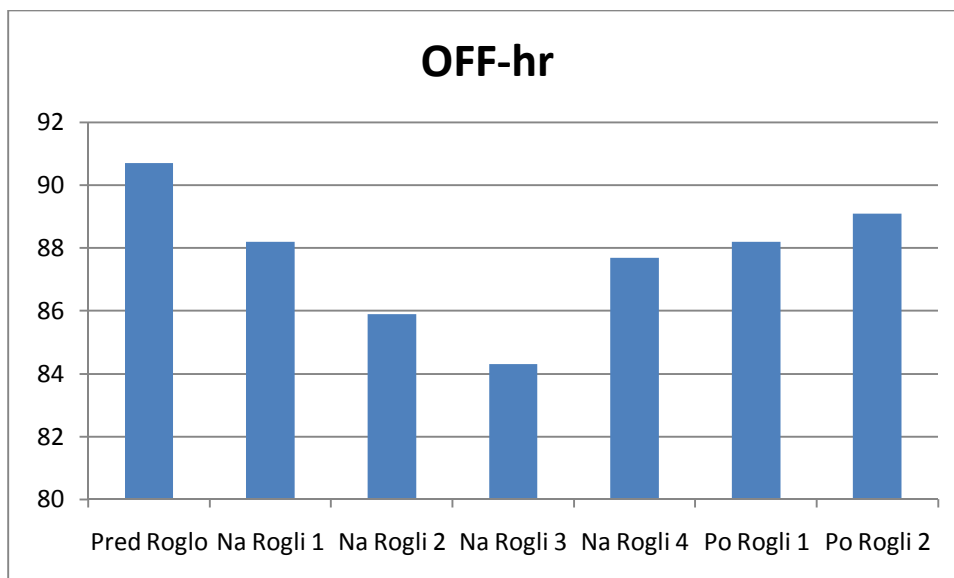
1.9%. Nato se je njen procent retikulocitov začel zniževati in dosegel najnižji nivo pri četrtem odvzemu. Nasprotno pa se je njena koncentracija Hb postopoma zviševala in dosegla najvišji nivo ravno takrat, ko je bil njen procent retikulocitov najnižji (četrty odvzem). Potem se je koncentracija Hb začela zmanjševati, procent retikulocitov pa se je nekoliko ustalil. Zaradi takšnega nihanja v krvnem profilu, ki kaže značilnosti pretekle zlorabe rHuEPO, smo za to preiskovanko določili tudi OFF-z vrednosti, ki so prikazane kasneje v diplomu.

4.5. PRIMERJAVA VREDNOSTI OFF-hr MODELA PRED VIŠINO, NA VIŠINI IN PO VIŠINI PRI DRUGI SKUPINI ŠPORTNIKOV

Za vsakega športnika smo iz podatkov o koncentraciji Hb in procentu retikulocitov izračunali indeks stimulacije kostnega mozga – OFF-hr indeks. Za vsak spol posebej smo izračunali povprečne vrednosti OFF-hr modela iz meritev, ki so bile izvedene pred odhodom na višino, iz meritev na višini in meritev po prihodu iz višine.

4.5.1. Moški

Pri moških je bila povprečna vrednost OFF-hr modela pred odhodom na Roglo 90.7 točke, povprečna vrednost na Rogli 86.5 točk in povprečna vrednost po prihodu iz Rogle 89 točk. Največjo vrednost OFF-hr modela smo izračunali pri enem osebk tako po prihodu iz Rogle in je znašala 103.3 točke (Hb=157 g/l; Ret=0.8%). Najnižjo vrednost OFF-hr modela pa smo dobili pri enem osebk pri petem odvzemu (na Rogli) in je znašala 59.3 točke (Hb=142 g/l; Ret=1.9%). Torej nihče od športnikov ni presejal niti meje za OFF-hr model, ki označuje sumljive športnike. Slika 2 prikazuje povprečne vrednosti OFF-hr modela pri posameznem odvzemu krvi za moški spol.



Slika 3: Vrednosti OFF-hr indeksa pri posameznem odvzemu krvi za moški spol

Na sliki 3 opazimo, da je OFF-hr po prihodu na višino začel padati in dosegel najnižjo vrednost tretji teden višinskih priprav na Rogli. Potem se je ponovno začel zviševati, vendar tudi pri zadnji meritvi po prihodu iz Rogle ni presegel vrednosti pri prvem odvzemu. Ti rezultati niso skladni z rezultati raziskave Ashendena in sodelavcev (48), ki je preučevala vpliv višine na indirektno metode določevanja rHuEPO. Tam so raziskovalci pokazali, da se OFF-hr na višini takoj zviša nad začetno vrednost in nato raste do največje vrednosti, ki jo doseže po prihodu iz višine. V našem primeru pa se indeks na višini zniža. Iz preglednice XII je razvidno, da se indeks zniža predvsem zaradi dviga retikulocitov, saj se vrednosti Hb na višini gibljejo okoli vrednosti pri prvi meritvi. Verjeten razlog zakaj se naši rezultati razhajajo z rezultati omenjene raziskave bi lahko bil v tem, da naša študija ni bila izvedena na dovolj visoki nadmorski višini. Ashenden in sodelavci so namreč analizirali rezultate športnikov, ki so trenirali na nadmorski višini 2690 m. Na tej višini je hipoksični dražljaj na stimulacijo kostnega mozga bistveno večji. Poleg tega je vprašanje tudi, če so bili odvzemi krvi pravilno načrtovani in izvedeni. Krvni parametri so namreč zelo občutljivi na spremembe in pri antidopinških odvzemih krvi je protokol natančno definiran. Kljub temu, da je že na prvi pogled vidno, da se vrednosti niso konkretno razlikovale glede na višino, smo vseeno morebitne significantne razlike preverili s statističnim programom SPSS 19. Preglednica XV prikazuje rezultate parnega t-testa za moški spol.

Preglednica XV: Parni t-test za vrednosti OFF-hr modela (pred Roglo, na Rogli, po Rogli) za moški spol

Paired Samples Test

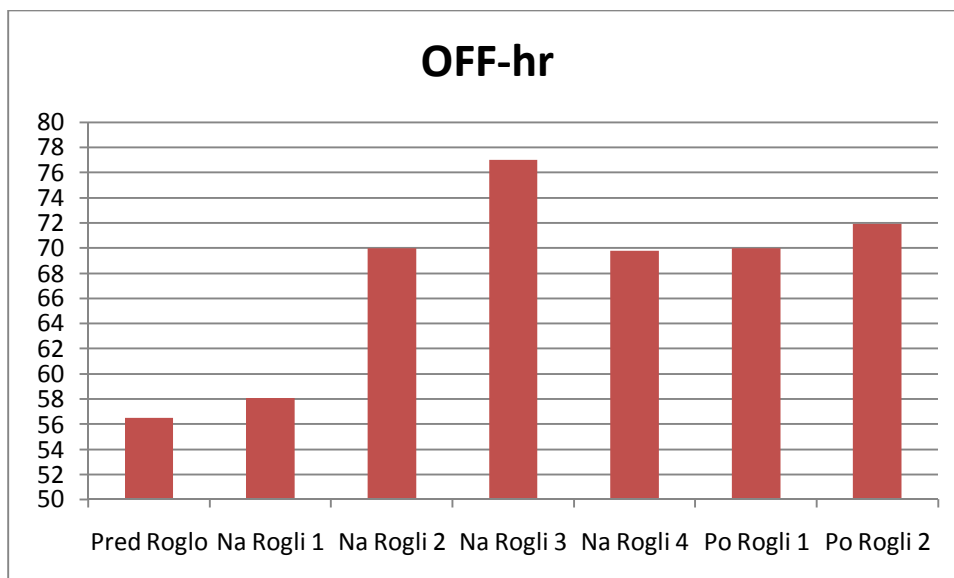
	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Pred Roglo - Na Rogli	4,1889	7,2185	2,4062	-1,3597	9,7375	1,741	8	,120
Pair 2 Pred Roglo - Po Rogli	1,7556	7,8271	2,6090	-4,2609	7,7720	,673	8	,520

Po pričakovanjih je parni t-test potrdil naša predvidevanja in pokazal, da med vrednostmi pred Roglo in vrednostmi na Rogli ter po Rogli ni statistično značilnih razlik.

4.5.2. Ženske

Pri ženskah smo največjo povprečno vrednost OFF-hr modela izračunali iz meritev po prihodu iz Rogle (71 točk). Meritve na Rogli so dale povprečno vrednost 68.7 točke, najmanjše vrednosti OFF-hr modela pa so imele športnice pred odhodom na Roglo (56.5 točke). Največjo posamezno vrednost OFF-hr modela smo določili eni preiskovanki pri četrtem odvzemu in je znašala 91 točk (Hb=151 g/l; Ret=1.0%), najmanjšo posamezno vrednost pa smo določili eni preiskovanki pri prvem odvzemu in je znašala 41.1 točke (Hb=128 g/l; Ret=2.1%). Torej tudi tu ni nobena športnica presegla praga, ki določa sumljive športnike.

Slika 3 prikazuje povprečne vrednosti OFF-hr modela pri posameznem odvzemu krvi za ženski spol.



Slika 4: Vrednosti OFF-hr indeksa pri posameznem odvzemu krvi za ženski spol

Iz slike 4 vidimo, da je pri ženskah gibanje vrednosti OFF-hr modela tekom višinskih priprav drugačno, kot pri moških. Takoj po prihodu na Roglo je njihov OFF-hr malenkost višji v primerjavi s prvo meritvijo, nato pa po prvem tednu višinskih priprav strmo naraste in doseže najvišjo vrednost v tretjem tednu priprav. Potem nekoliko upade, vendar je po prihodu iz Rogle še vedno nad nivojem prvega odvzema krvi pred prihodom na Roglo. Pri ženskah so razlike v OFF-hr med odvzemi večje, kot pri moških. Tudi tukaj smo razlike preverili s parnim t-testom. Rezultati so prikazani v Preglednici XVI.

Preglednica XVI: Parni t-test za vrednosti OFF-hr modela (pred Roglo, na Rogli, po Rogli) za ženski spol

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 Pred Roglo - Na Rogli	12,2333	6,9974	4,0399	-29,6158	5,1491	-3,028	2	,094
Pair 2 Pred Roglo - Po Rogli	14,4667	6,6199	3,8220	-30,9115	1,9781	-3,785	2	,063

Čeprav je povprečna vrednost OFF-hr modela po Rogli za kar 14.5 točke višja, kot vrednost pred odhodom na Roglo, pa rezultati statistike pravijo, da med njima ni statistično

značilne razlike. Vendar pa, kot smo že prej omenili, je vzorec pri ženskah tako majhen (n=3), da je statistična analiza nezanesljiva in ji ne moremo zaupati.

Zanimivo je, da se rezultati med spoloma tako zelo razlikujejo, glede na to, da so bili oboji podvrženi enakim pogojem. Pri vseh treh ženskih preiskovankah so se vrednosti OFF-hr modela na višini povečale, medtem ko pri moških temu ni bilo tako. Pri slednjih se je v nekaterih primerih indeks stimulacije kostnega mozga na višini celo znižal. Kot že rečeno, je zaradi majhnega vzorca pri ženskah težko komentirati rezultate, saj že sprememba parametra pri eni osebi močno vpliva na povprečno vrednost parametra cele skupine. Ampak vseeno so vse tri preiskovanke kazale podoben trend gibanja OFF-hr modela.

Razlike v rezultatih med spoloma bi lahko iskali v drugačnem režimu treninga, saj je vse ostalo bilo identično (okolje, prehrana). Rezultati statistike so nam povedali, da višinske priprave na Rogli niso bistveno zvišale posameznikovih vrednosti Hb in OFF-hr modela. Ob tem je potrebno dodati, da bi bilo potrebno za natančno analizo razlik izvesti več meritev pred odhodom na Roglo, da bi dobili zanesljive povprečne vrednosti parametrov na normalni nadmorski višini. V naši raziskavi smo določili začetne vrednosti parametrov samo na podlagi ene meritve.

4.6. SPREMLJANJE INDIVIDUALNEGA KRVNEGA PROFILA

Krvni profil smo spremljali pri enem moškemu preiskovancu in eni ženski preiskovanki, pri katerima smo opazili največja odstopanja med posameznimi OFF-hr vrednostmi tekom naše raziskave. Na koncu smo omenjena osebka testirali tudi s trenutno najbolj občutljivo indirektno metodo - OFF-hr_z. Uporabili smo enak pristop, kot je v biološkem potnem listu.

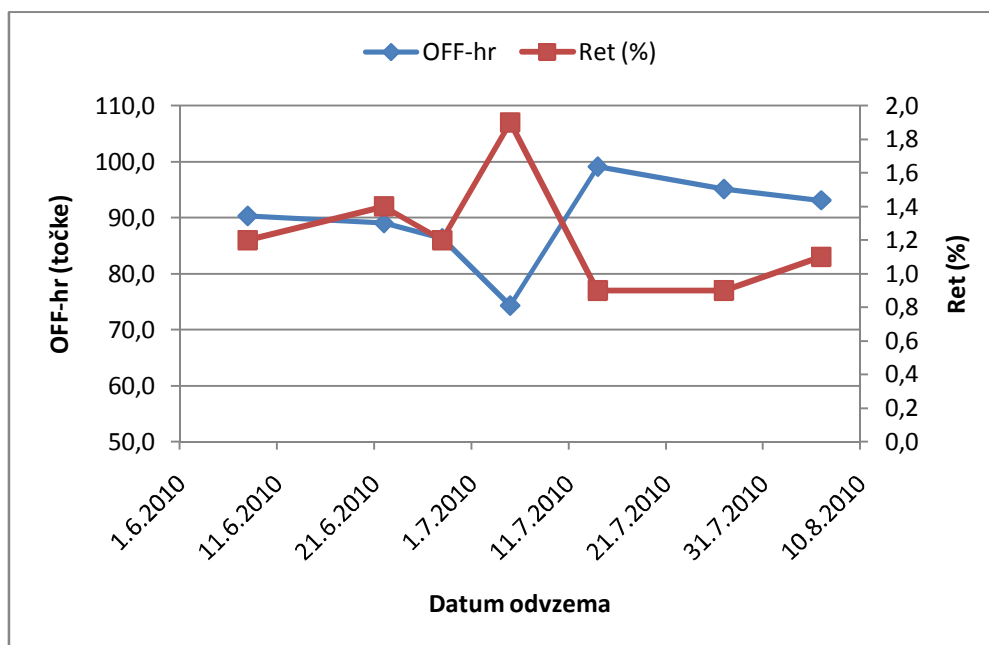
4.6.1. Evalvacija Hb, Ret% in OFF-hr modela

V preglednici XVII so navedeni rezultati meritev Hb in procenta retikulocitov za moškega preiskovanca, slika 5 pa prikazuje gibanje OFF-hr modela in procenta retikulocitov pri tem preiskovancu.

Preglednica XVII: Izmerjene vrednosti Hb in Ret pri posameznem odvzemu krvi pri moškem športniku

Moški	8.6.10	22.6.10	28.6.10	5.7.10	14.7.10	27.7.10	6.8.10
Hb (g/l)	156	160	152	157	156	152	156
Ret (%)	1.2	1.4	1.2	1.9	0.9	0.9	1.1

Na sliki 5 opazimo, da so vrednosti OFF-hr modela pri prvih treh meritvah dokaj konstantne, nato pa pride do velikega nihanja. Najprej se pri četrti meritvi indeks zniža, že pri naslednji meritvi pa skoči na najvišjo vrednost, ki smo jo izračunali pri tem preiskovancu.



Slika 5: Vrednosti OFF-hr modela in procenta retikulocitov pri posameznem odvzemu pri moškem športniku

Glede na to, da se tekom teh dveh meritev njegova koncentracija Hb praktično ne spreminja, je za taka odstopanja indeksa odgovoren procent retikulocitov. V preglednici XVII vidimo, da ima preiskovanec pri četrtem odvzemu zelo visok procent retikulocitov, kar povzroči znižanje indeksa glede na prejšnjo meritve. Pri naslednjem odvzemu pa nastopi obratna situacija, in sicer pride do velikega znižanja retikulocitov, kar privede do najvišjega indeksa. Na sliki 5 se lepo vidi, da procent retikulocitov sledi OFF-hr modelu, vendar v nasprotnem smislu. Ko se OFF-hr zviša se procent retikulocitov zniža in obratno.

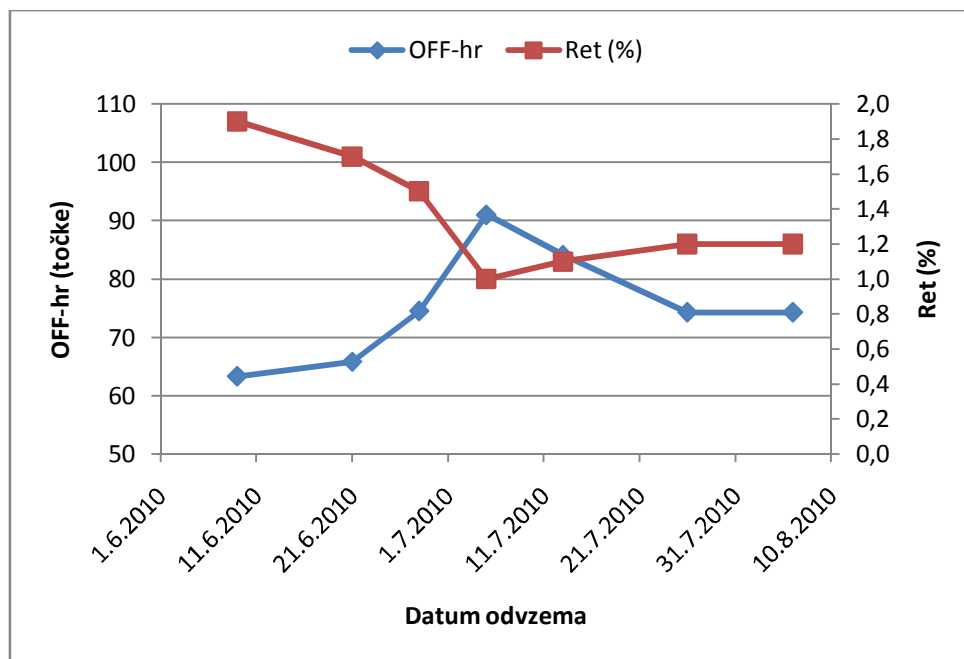
Rezultati prejšnjih raziskav na višini kažejo, da se na višini OFF-hr zviša zaradi povišanja Hb in hkrati znižanja procenta retikulocitov, ki sledi po nekaj dneh bivanja/treniranja na višini. V našem primeru se krvni profil preiskovanca ne ujema s temi ugotovitvami. Njegova koncentracija Hb se na višini ne poviša (izjema je prvi vzorec na Rogli, vendar tu ne moremo zaslug zapisati vplivu višine, saj je bil prvi vzorec vzet že naslednji dan po prihodu na višino in v tako kratkem času se Hb najbrž ne more povišati v taki meri). Po enem tednu višinskih priprav (vzorec 3) se OFF-hr celo zniža v primerjavi z vrednostjo, ki je bila izračunana iz meritev pred odhodom športnikov na Roglo.

Pri ženski preiskovanki prav tako ne opazimo značilnega vpliva višje nadmorske višine na njen krvni profil. Ta oseba je imela najvišji procent retikulocitov pri prvem odvzemu krvi, nato pa ji je postopoma padal. Koncentracijo Hb je v povprečju resda imela višjo tekom priprav na Rogli, kot pri prvem merjenju na Inštitutu, vendar so njene vrednosti Hb po prihodu iz Rogle padle pod začetni nivo. To pa ni v skladu z rezultati prejšnjih študij, ki so pokazale, da povišan Hb vztraja še nekaj časa (približno dva tedna) po prihodu iz višje nadmorske višine. V preglednici XVIII so zbrani podatki testiranj iz Rogle.

Preglednica XVIII: Izmerjene vrednosti Hb in Ret pri posameznem odvzemu krvi pri ženski športnici

Ženska	9.6.10	21.6.10	28.6.10	5.7.10	13.7.10	26.7.10	6.8.10
Hb (g/l)	146	144	148	151	147	140	140
Ret (%)	1.9	1.7	1.5	1.0	1.1	1.2	1.2

Na sliki 6 vidimo, da se njen OFF-hr model postopoma zvišuje in doseže maksimum pri četrtem odvzemu, nato pa začne padati in je pri zadnji meritvi še vedno nad vrednostjo določeno pri prvem odvzemu.



Slika 6: Vrednosti OFF-hr modela in procenta retikulocitov pri posameznem odvzemu pri ženski športnici

4.6.2. Izračun $OFF-hr_z$ vrednosti

Čeprav so bili vsi parametri moškega preiskovanca znotraj dovoljenih mej, smo ga vseeno testirali še z $OFF-hr_z$ vrednostjo, saj se nam je zdel skok $OFF-hr$ vrednosti iz četrte na peto meritve nekoliko neobičajen. Tudi pri ženski preiskovanki so bili vsi parametri znotraj dovoljenih mej, vendar pa je imela ta oseba občutno višjo koncentracijo Hb od ostalih dveh preiskovank v skupini. Poleg tega je imela pri začetnih meritvah sumljivo visok procent retikulocitov, zato smo tudi pri njej izračunali vrednosti $OFF-hr_z$.

Zanimalo nas je ali so nihanja v vrednostih $OFF-hr$ pri katerem od omenjenih dveh športnikov dovolj velika, da bo vrednost $OFF-hr_z$ presegla FIS limitno vrednost, ki je 3.09.

Da smo lahko ovrednotili ta nihanja med posameznimi meritvami, smo po vsakem odvzemu krvi (razen po prvem) izračunali $OFF-hr_z$ vrednost. To vrednost smo izračunali po enačbi 7. Za lažje razumevanje smo spodaj navedli primer računanja za moškega preiskovanca po drugem ter po tretjem odvzemu krvi:

- Primer izračuna $OFF-hr_z$ za moškega preiskovanca po drugem odvzemu krvi:

$$OFF-hr_z = (89.0 - 90.3) / \sqrt{(75.9 (1 + 1/1))} = - 0.11$$

- Primer izračuna OFF-hr_z za moškega preiskovanca po tretjem odvzemu krvi:

$$\text{OFF-hr}_z = (86.3 - 89.7) / \sqrt{(75.9 (1 + 1/2))} = - 0.32$$

Po tej formuli smo izračunali še OFF-hr_z vrednosti pri preostalih odvzemih krvi. Na enak način smo izračunali rezultate tudi pri ženski preiskovanki. Rezultati za moškega so prikazani v preglednici XIX in za žensko v preglednici XX.

Preglednica XIX: Izračunane vrednosti OFF-hr in OFF-hr_z pri posameznem odvzemu krvi pri moškem preiskovancu

Odvzem krvi	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
OFF-hr	90.3	89.0	86.3	74.3	99.1	95.1	93.1
OFF-hr _z	/	- 0.11	- 0.31	- 1.41	1.45	0.76	0.43

Preglednica XX: Izračunane vrednosti OFF-hr in OFF-hr_z pri posameznem odvzemu krvi pri ženski preiskovanki

Odvzem krvi	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
OFF-hr	63.3	65.8	74.5	91.0	84.1	74.3	74.3
OFF-hr _z	/	0.20	0.93	2.30	1.07	- 0.15	- 0.13

Rezultati tega testa so moškega športnika oprali vsakršnega suma o jemanju prepovedanih snovi. Omenjenemu športniku smo namreč izračunali največjo z-vrednost po petem odvzemu, in sicer 1.45. Ta vrednost ne dosega niti praga, ki določa *sumljive* športnike ($z \geq 2.33$).

Prav tako se je za nedolžno izkazala tudi ženska preiskovanka. Pri njej smo največjo z-vrednost dobili po četrtem odvzemu, in sicer 2.30. To pomeni, da so bila nihanja OFF-hr modela pri tej preiskovanki malenkost premajhna, da bi presegla *sumljivo* mejo z-vrednosti.

Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da nobeden od testiranih preiskovancev ni zlorabljal rHuEPO ali njemu podobnih substanc.

5. SKLEP

- Nihče od preiskovancev iz prve skupine ni presegel praga za hemoglobin, retikulocite in OFF-hr indeks, ki ga določa FIS antidopinški pravilnik. To pomeni, da najbrž nihče ni nedavno zlorabljal rHuEPO. Da bi lahko to z gotovostjo trdili, bi morali izvesti več meritev.
- Štirje moški preiskovanci in ena ženska preiskovanka v prvi skupini so presegli prag OFF-hr indeksa za načrtno testiranje. Te športnike je potrebno spremljati in jih testirati z indirektnimi ter direktnimi metodami.
- Med spoloma obstaja statistično značilna razlika v koncentraciji hemoglobina in vrednosti OFF-hr modela. Pri moških so te vrednosti višje.
- Nihče od športnikov druge skupine ni presegel praga za Hb in OFF-hr. Trije moški in ena ženska so presegli prag za Ret%. Ti bi bili po FIS pravilih izključeni iz tekmovanja.
- Štiritedenske višinske priprave na Rogli niso bistveno vplivale na vrednosti hemoglobina, retikulocitov in OFF-hr modela. Hipoksičen dražljaj na tej višini je najbrž premajhen, da bi izzval večje hematološke spremembe. Za natančnejšo analizo bi potrebovali več vzorcev od športnikov preden so odšli na Roglo, podroben opis treningov, prehrane, prehranskih dopolnil in vnosa tekočine.
- Moški in ženska z največjim nihanjem v krvnem profilu nista presegla praga za OFF-hr_z vrednost, ki določa izključitev iz tekmovanja, niti praga, ki narekuje nadaljnje načrtno testiranje.

6. LITERATURA

- 1) Müller RK. History of Doping and Doping Control. V: D. Thieme and P. Hemmersbach (ur.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 1-23.
- 2) Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Ljubljana, 2008: 123-180.
- 3) Olimpijski komite Slovenije. URL: <http://www.olympic.si/> (dostop: november 2010).
- 4) World Anti-Doping Agency. URL: <http://www.wada-ama.org/> (dostop: november 2010).
- 5) Catlin DH, Fitch KD and Ljungqvist A: Medicine and science in the fight against doping in sport. J Int Med 2008; 264: 99-114.
- 6) Azzazy HME. Gene Doping. V: D. Thieme and P. Hemmersbach (ur.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 485-512.
- 7) Baza podatkov o zdravilih. URL: <http://www.zdravila.net/> (dostop: december 2010).
- 8) Ventura R, Segura J. Masking and Manipulation. V: D. Thieme and P. Hemmersbach (ur.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 327-354.
- 9) http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_doping (dostop: december 2010).
- 10) G. Lippi, G. Banfi: Blood transfusions in athletes. Old dogmas, new tricks. Clin Chem Lab Med 2006; 44(12): 1395-1402.
- 11) Giraud S, Sottas PE, Robinson N, Saugy M. Blood Transfusion in Sports. V: D. Thieme and P. Hemmersbach (ur.), Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology 195, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 295-304.

- 12) Nelson M, Popp H, Sharpe K, Ashenden M: Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica* 2003; 88:1284-1295.
- 13) Biomedicinska analitika: uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov citotoksičnosti. Vaje iz Biomedicinske analitike: gradivo za interno uporabo. Fakulteta za farmacijo.
- 14) Nelson M, Ashenden M, Langshaw M, Popp H: Detection of homologous blood transfusion by flow cytometry: a deterrent against blood doping. *Haematologica* 2002; 87:881-882.
- 15) Rasmus Damsgaard R, Munch T, Mørkeberg J, Mortensen SP, Alonso JG: Effects of blood withdrawal and reinfusion on biomarkers of erythropoiesis in humans: Implications for anti-doping strategies. *Haematologica* 2006; 91:1006-1008.
- 16) Ashenden M: A strategy to deter blood doping. *Haematologica* 2002; 87: 225-234.
- 17) Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, Ljubljana, 2007: 284-307.
- 18) Embury SH, Garcia JF, Mohandas N: Effects of Oxygen Inhalation on Endogenous Erythropoietin Kinetics, Erythropoiesis, and Properties of Blood Cells in Sickle-Cell Anemia. *N Engl J Med* 1984; 311: 291-295.
- 19) Deicher R, Horl WH: Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: a guide to selection for anaemia of chronic kidney disease. *Drugs* 2004; 64(5): 499–509.
- 20) Bauer C, Koch KM, Scigalla P, Wiczorek L: *Erythropoietin: molecular physiology and clinical applications*, Marcel Dekker, New York, 1993: 231-240.
- 21) http://www.mircera.com/portal/mircera/mircera?_requestid=555383 (dostop: december 2010)

- 22) Lundby C, Thomsen JJ, Boushel R, Koskolou M, Warberg J, Calbet JAL, Robach P: Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. *J Physiol* 2007; 578: 309-314.
- 23) Stray-Gundersen J, Videman T, Penttilä I, Lereim I: Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or? *Clin J Sport Med* 2003; 13: 132–137
- 24) <http://www.guardian.co.uk/sport/2004/feb/16/cycling.cycling1> (dostop: november 2010).
- 25) Španinger K in Debeljak N: Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 279-285.
- 26) Segura J, Pascual JA, Gutiérrez-Gallego R: Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Anal Bioanal Chem* 2007; 388:1521–1529.
- 27) Lasne F, de Ceaurriz J: Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 2000; 405: 635.
- 28) Lasne F, Thioulouse J, Martin L, de Ceaurriz J: Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis. *Electrophoresis* 2007; 28: 1875-81.
- 29) Lasne F: Double-blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedure. *J Immunol Methods* 2001; 253: 125-131.
- 30) Bornø A, Aachmann-Andersen NJ, Munch-Andersen T, Hulston CJ, Lundby C: Screening for recombinant human erythropoietin using [Hb], reticulocytes, the OFFhr score, OFFz score and Hbz score: status of the Blood Passport. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109: 537–543.
- 31) Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and Analogs. V: D. Thieme and P. Hemmersbach (ur.), *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology* 195, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 251-294.

- 32) Robinson N, Schattenberg L, Zorzoli M, Mangin P, Saugy M: Haematological analysis conducted at the departure of the Tour de France 2001. *Int J Sports Med* 2005; 26: 200–207.
- 33) Cazzola M: A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica* 2000; 85: 561-563.
- 34) Sottas PE, Robinson N, Saugy M. The Athlete's Biological Passport and Indirect Markers of Blood Doping. V: D. Thieme and P. Hemmersbach (ur.), *Doping in Sports, Handbook of Experimental Pharmacology* 195, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010: 305-326.
- 35) Videman T, Lereim I, Hemmingsson P, Turner MS, Rousseau-Bianchi MP, Jenoure P, Raas E, Schönhuber H, Rusko H, Stray-Gundersen J: Changes in hemoglobin values in elite cross-country skiers from 1987 to 1999. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10: 98–102.
- 36) FIS Anti-Doping Rules 2011. URL: <http://www.fis-ski.com/data/document/fis-anti-doping-rules-2011-clean-version1.pdf> (dostop: februar 2011).
- 37) Zorzoli M: Blood monitoring in antidoping setting, Recent advances in doping analysis: Sport und Buch Strauss, Edition Sport 2005: 255–264.
- 38) Morkeberg J, Saltin B, Belhage B, Damsgaard R: Blood profiles in elite cross-country skiers: a 6-year follow-up. *Scand J Med Sci Sports* 2009; 19: 198–205.
- 39) Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden M, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG: A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2000; 85: 564-72.
- 40) Ekblom B, Berglund B: Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. *Scand J Med Sci Sports* 1991; 1: 88-93.
- 41) Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden M, Howe C, Trout GJ, Hahn AG, Wu M, Kazlauskas R, Sharpe K, Xie M: Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 2001; 86: 128-137.

- 42) Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Ashenden M, Gore CJ, Parisotto R, Hahn AG: Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* 2002; 87: 1248-1257.
- 43) Perry GS, Byers T, Yip R, Margen S: Iron nutrition does not account for the hemoglobin differences between blacks and whites. *J Nutr* 1992; 122: 1417-24.
- 44) Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Ashenden M, Gore CJ, Parisotto R, Hahn AG, Stray-Gundersen J: Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003; 88: 333-344.
- 45) Ashenden M, Lasne F, Varlet-Marie E, Audran M: The effects of microdose recombinant human erythropoietin regimens in athletes. *Haematologica* 2006; 91: 1143-1144.
- 46) Schumacher YO, Temme J, Bueltermann D, Schmid A, Berg A: The influence of exercise on serum markers of altered erythropoiesis and the indirect detection models of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2003; 88: 712-714.
- 47) Schmidt W, Biermann B, Winchenbach P, Lison S, Böning D: How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations? *Int J Sports Med* 2000; 21: 133–138.
- 48) Ashenden M, Gore CJ, Parisotto R, Sharpe K, Hopkins W, Hahn AG: Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* 2003; 88: 1053-1062.
- 49) Mednarodna kolesarska zveza.
URL: <http://www.uci.ch/Templates/UCI/UCI5/layout.asp?MenuID=MTYxNw&LangId=1>
(dostop: januar 2011).
- 50) Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO: A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2006; 91: 356-363.
- 51) Audran M, Gareau R, Matecki S, Durand F, Chenard C, Sicart MT, Marion B, Bressolle F: Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 639–645.

- 52) Banfi G, Tavana R, Freschi M, Lundby C: Reticulocyte profile in top-level alpine skiers during four consecutive competitive seasons. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109: 561–568.
- 53) Sawka MN, Convertino VA, Eichner ER, Schnieder SM, Young AJ: Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma and sickness. *Med Sci Sport Exerc* 2000; 32: 332–348.