

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANŽE DIMEC

**VPLIV VIŠINSKIH PRIPRAV IN BIVANJA V
VIŠINSKI SOBI NA KONCENTRACIJO
ERITROPOETINA IN RDEČO KRVNO SLIKO
PROFESIONALNIH ŠPORTNIKOV**

**THE INFLUENCE OF ALTITUDE TRAINING AND
STAYING IN ALTITUDE ROOM ON
ERYTHROPOIETIN CONCENTRATION AND RED
BLOOD CELL COUNT OF PROFESSIONAL
ATHLETES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

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

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Velika zahvala gre družini za vzpodbudo in podporo v času študija. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani.

Izjava

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

Anže Dimec

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

Ljubljana, maj 2012

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD	1
1.1 ERITROPOETIN.....	1
1.2 RDEČA KRVNA SLIKA.....	3
1.2.1 Eritrociti.....	4
1.2.2 Hemoglobin	4
1.2.3 Hematokrit.....	7
1.2.4 Retikulociti	7
1.2.5 Eritrocitni indeksi	8
1.2.6 RDW (red blood cell distribution width).....	9
1.3 VOLUMEN KRVI.....	9
1.4 ERITROPOEZA	10
1.4.1 Stopnje eritropoeze.....	10
1.4.2 Snovi in postopki, ki povečajo transport kisika in eritropoezo	11
1.4.3 HIF (Hypoxia-inducible factor).....	12
1.5 VIŠJA NADMORSKA VIŠINA	15
1.5.1 Prilagoditev.....	16
1.5.2 Problemi pri prilagajanju na hipoksijo	21
1.5.3 Delitev višjih nadmorskih višin.....	21
1.6 VIŠINSKI TRENINGI	22
1.6.1 Umetno višinsko okolje.....	22
1.6.2 Načini treniranja pri višinskih treningih.....	23

1.6.3	Odziv na višinske treninge	25
1.6.4	Višinski treningi pri vrhunskih športnikih.....	26
2.	NAMEN DELA.....	28
3.	EKSPERIMENTALNO DELO	29
3.1	PREISKOVANCI	29
3.2	METODE.....	30
3.2.1	Merjenje koncentracije hemoglobina	30
3.2.2	Analiza eritrocitov	30
3.2.3	Analiza retikulocitov	31
3.2.4	Merjenje koncentracije EPO.....	31
3.2.5	Statistična obdelava:	31
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1	ERITROPOETIN.....	33
4.1.1	Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino	35
4.1.2	Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama.....	36
4.2	ERITROCITI, HEMOGLOBIN IN HEMATOKRIT.....	37
4.2.1	Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino	41
4.2.2	Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama.....	43
4.3	RETIKULOCITI.....	45
4.3.1	Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino	48
4.3.2	Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama.....	49
4.4	ERITROCITNI INDEKSI	51
4.4.1	Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino	54
4.4.2	Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama.....	56

4.5	KOEFICIENT VARIACIJE VOLUMNA RDEČIH KRVNIH CELIC (RDW)..	58
4.5.1	Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino	60
4.5.2	Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama.....	60
5.	SKLEP.....	62
6.	LITERATURA	65

POVZETEK

Športniki si na tekmovanjih vedno želijo doseči svoj cilj, naj bo to zmaga, osebni rekord, norma ali pa le sodelovanje na športnih dogodkih po svojih najboljših močeh. Od profesionalnih športnikov se zahteva vrhunska priprava, zato jim v zadnjem času nadzirajo tudi kri. Predvsem vztrajnostnim športnikom in tistim, ki potrebujejo dobro aerobno zmogljivost, je pomembno število rdečih krvničk v krvi. Z večjim številom omogočajo boljšo oksigenacijo telesa. Čeprav na število eritrocitov vpliva veliko dejavnikov, spremembe najenostavneje razlagamo s koncentracijo eritropoetina in z določanjem parametrov rdeče krvne slike. Pogosto so za športnike del vsakodnevnih treningov in priprav tudi višinske priprave, ki naj bi zaradi hipoksije spodbudile eritropoezo, in tako izboljšale formo športnikov. Poznamo več načinov višinskih priprav. Potekajo lahko na višji nadmorski višini, vedno bolj pa se uporabljajo umetna višinska okolja, ki v prostoru ustvarijo hipoksijo.

V diplomskem delu smo analizirali koncentracijo eritropoetina in rdečo krvno sliko desetih profesionalnih tekačev na smučeh. Njihove vsakodnevne treninge smo spremljali 68 dni v poletnih mesecih. Med raziskavo je bil del priprav opravljen na Rogli. Višinske priprave, kjer smo športnike razdelili v dve skupini, so trajale štiri tedne. Prva skupina je trenirala in bivala na 1600 metrih nadmorske višine, druga skupina pa je bivala v višinski sobi z vsebnostjo kisika, kot je na 2400 metrih nadmorske višine, trenirala pa skupaj s prvo skupino. Zanimal nas je vpliv višinskih priprav in vpliv bivanja v višinski sobi na krvne parametre športnikov. Vrednosti sedmih odvzemov krvi smo statistično analizirali in opazovali spremembe v času priprav.

Po naših podatkih se je po višinskih pripravah v obeh skupinah znižala koncentracija eritropoetina in zmanjšal povprečni volumen eritrocitov. V prvi skupini se je po višinskih pripravah povečala povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih, v drugi skupini pa se je znižalo število eritrocitov, retikulocitov in hematokrit. V tej raziskavi je višinska soba imela vpliv na koncentracijo eritropoetina in na število retikulocitov. Med bivanjem v višinski sobi smo opazili nižji padec koncentracije eritropoetina in višji padec števila retikulocitov. Na ostale vrednosti višinska soba ni imela bistvenega vpliva. Dobili smo zaključke, da imajo višinske priprave in bivanje v višinski sobi določen vpliv na profesionalne športnike, vendar pa je ob tem težko izključiti nekatere ostale dejavnike, ki bi lahko med pripravami prav tako močno vplivali na naše rezultate.

ABSTRACT

Sportsmen are always trying to do their best in order to achieve a certain goal: a victory, a personal record, a qualifying time or a mere participation in sport events. Since a top form is a must for the professional athletes, they have been controlling their blood. The number of red blood cells is very important for those who need a good aerobic capacity, especially for endurance athletes, as they increase body oxygenation. Although the number of erythrocytes depends on many factors, the easiest way of explaining the changes is by erythropoietin concentration and establishing red blood cell parameters. Altitude training is often an important part of everyday training, as hypoxia increases erythropoiesis which leads to a better shape. Even though there are different forms of altitude training, simulated altitude environments that create hypoxia are more and more in use.

In our final thesis, we have analysed the concentration of erythropoietin and red blood cell count of ten professional cross-country skiers. We were observing their daily trainings for 68 days in the summer. During the research, a part of their training took place in Rogla. The altitude training lasted four weeks and the athletes were divided in two groups. While the first group was training and staying at the altitude of 1600 metres, the second was staying in the altitude room with the oxygen level same as on the 2400 metres, but was training with the first group. We were trying to detect altitude training and altitude room influence on blood cell parameters of the athletes. Seven blood samples were statistically analysed and observed during the period of the training.

According to our results, there was a decrease of the erythropoietin concentration and of the mean corpuscular volume in both groups. After the altitude training, in the first group there was an increase of the mean corpuscular hemoglobin concentration, and in the second group, there was a decrease of the red blood cells, reticulocytes and hematocrit. In the present research, the altitude room influenced erythropoietin concentration as well as the reticulocyte number. While staying in the altitude room, we detected a lower fall of erythropoietin concentration and a higher fall of reticulocyte number. There were no other significant influences of altitude room. Our research does show a certain influence of altitude training and staying in the altitude room on professional athletes, it is however difficult to exclude other factors that could have influenced our results during the training.

SEZNAM OKRAJŠAV

BPG – 2,3-bifosfoglicerat

DFO – desferioksamin

EPO – eritropoetin

Hb – hemoglobin

HIF – hipoksija-inducibilni faktor (hypoxia-inducible factor)

Ht – hematokrit

IRE – železo-odzivni elementi (iron-responsive elements)

IRP – železo-regulirajoči proteini (iron-regulatory proteins)

MCH – povprečna količina hemoglobina v eritrocitu (mean corpuscular hemoglobin)

MCHC – povprečna koncentracija hemoglobina v eritrocitih (mean corpuscular hemoglobin concentration)

MCV – povprečni volumen eritrocitov (mean corpuscular volume)

PHD – prolil-hidroksilaza-domena encimi (prolyl hydroxylase domain enzymes)

PIT – količina železa v krvi, ki se porabi za sintezo eritocitov (plasma iron turnover)

RDW – koeficient variacije volumna eritrocitov (red blood cell distribution width)

rHuEPO – rekombinantni humani eritropoetin

RSD – relativna standardna deviacija

VHL – von Hippel-Lindau tumor-supresorski protein

1. UVOD

Šport je dejavnost, s katero se ukvarjajo ljudje zaradi boljšega počutja, lepšega izgleda, zdravstvenih razlogov, tekmovalnosti, nekaterim pa je to način življenja, lahko tudi poklic. Športniki, tako rekreativni kot vrhunski, si želijo kar najhitreje doseči svoj cilj. Pomagajo si z različnimi načini treninga (višinske priprave), nekateri pa posežejo tudi po nedovoljenih sredstvih (doping). Izboljšanje forme lahko nadziramo tudi s pregledom krvi, predvsem nam veliko o pripravljenosti posameznika pove koncentracija eritropoetina (EPO) in rdeča krvna slika. V zadnjih letih je EPO prejel veliko pozornosti, saj so športniki pod velikimi pritiski in si želijo vedno boljše rezultate. Ti rezultati so lažje dosegljivi z uporabo dopinga kot pa z dovoljenimi postopki, kot so višinski treningi in višinska soba. Povečanje števila rdečih krvničk (eritrocitov) je za njih zelo pomembno, saj lahko z večjim številom eritrocitov po krvi prenašajo več O_2 . Za optimalne rezultate zato stremijo k povečanju hematokrita (Ht), tako po zakoniti kot po nezakoniti poti. Več hemoglobina (Hb) pomeni večjo možnost dostave O_2 , povečano porabo maščobnih kislin in glikogena v mišicah ter zmanjšano kopičenje laktata.

1.1 ERITROPOETIN

EPO je hormon, ki je odgovoren za nastajanje eritrocitov. mRNA za EPO nastaja v ledvicah (peritubularne intersticijske celice korteksa in zgornjega dela medule), v manjši meri tudi v jetrih, pljučih, vranici in možganih, od tam pa se izloča v krvni obtok. Hitrost nastajanja in sproščanja EPO je odvisna od količine O_2 v krvi in ledvičnem tkivu. EPO deluje tako, da se veže na specifične membranske receptorje. Aminokislina od 111 do 118 se vežejo na receptorski protein, takoj po vezavi pa se protein razgradi. Na receptorju nastane kompleks, ki povzroči prehod določenega signala v jedro. Humani EPO gen je lociran na kromosomu 7 na sredini dolge verige v regiji q11-q22. Vsebuje promotor, pet eksonov, štiri introne in pospeševalec pod vplivom hipoksije. Kodira enojno polipeptidno verigo iz 193 aminokislinskih ostankov, po odcepu pa je cirkulirajoča oblika hormona polipeptid s 165 aminokislinami. V polipeptidu sta dva disulfidna mostova med cisteini 7 in 161 ter 29 in 33. EPO je glikoprotein. Približno polovica molekule je zgrajena iz dveh antiparalelnih alfa-vijačnic, preostali del pa je nepredvidena globularna oblika. Molekulska

masa polipeptidnega dela je 18 kDa, celokupne glikoproteinske molekule pa okrog 30 kDa. Molekula ima tri N-vezane in eno O-vezano kislo oligosaharidno stransko verigo.

Rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO) je kot zdravilo sorazmerno varen, kljub temu pa lahko pride med zdravljenjem do stranskih učinkov (hipertenzija, povečana viskoznost krvi, povečano število trombocitov za 10 do 20 % in tromboza). Motnje nastanejo predvsem zaradi prevelikih začetnih odmerkov, ko se hematokritne vrednosti povečajo za več kot 0,2 % na dan, kar povzroči porast perifernega žilnega upora. Za nastanek rHuEPO je bilo najprej potrebno določiti aminokislinsko zaporedje, nato napraviti 'screening' genomske knjižice celic fetalnih jeter in izolirani gen vstaviti v vektor, ki ga je bilo potrebno vnesti v gostiteljsko celico. Teh celic je več vrst (CHO – chinese hamster ovary, BHK – baby hamster kidney), zato poznamo tudi več vrst rHuEPO (alfa, beta, delta, darbepoetin alfa...). Umetni EPO (rHuEPO) javnost ponavadi povezuje z dopingom, njegova uporaba pa je namenjena predvsem za zdravljenje bolezni, pri katerih je koncentracija hemoglobina (Hb) zmanjšana (anemija). Te bolezni so lahko posledica odpovedi ledvic, kemoterapije, AIDS-a, revmatoidnega artritisa, prezgodnjega poroda, terapije z zidovudinom, akutne in kronične krvavitve, slabe prehrane, pomanjkanja železa oz. slabe absorpcije, slabe aktivnosti kostnega mozga... Od prihoda rHuEPO se je stopnja preživetja teh bolnikov povečala, hkrati pa se je zmanjšala potreba po transfuzijah krvi. Z rHuEPO je zdravljenje bolnikov, ki imajo zavrto eritropoezo, doseglo odlične rezultate, kar pa izkoristijo tudi športniki. (1)

Z redno vadbo se poveča maksimalna aerobna kapaciteta (VO_2max). To je maksimalna količina O_2 , ki jo lahko porabi organizem v eni minuti. Izboljša se tudi sposobnost pri VO_2max , poveča pa se še maksimalna aerobna moč. Z uporabo rHuEPO pa so svojo priložnost dobili tudi športniki, saj se z dopingom napreduje še hitreje in lažje kot z rednim treningom. Največ koristi od tega imajo vztrajnostni športniki, vendar nezakonit postopek zlorablajo tudi ostali. Za razumevanje, odkrivanje in analizo uporabe tega proteina v športu je potrebno poznati biokemijo in fiziologijo, ki se nanaša na zdravje športnika. Večina pozna le osnovo povišanja Ht, ki pomeni več O_2 v tkivu za nadaljnjo proizvodnjo adenozin trifosfata (ATP). Raziskave so pokazale, da rHuEPO ne poviša samo Ht in transporta O_2 , ampak pomaga tudi pri odstranjevanju laktatov in vodikovih ionov pri delovanju mišice. Dokazano je, da je rHuEPO odgovoren za smrti športnikov v začetku 1990. Glavni razlog za to je visoka vrednost Ht (0,60) in dehidracija med vadbo, kar

privede do visoke viskoznosti in trombemboličnih zapletov. Hematokrit nad 0,51 v kombinaciji s hipertenzijo poveča tveganje srčne kapi za devetkrat. Relativno nizko tveganje za srčno kap v mirovanju se znatno poveča med vadbo. Tveganje zdravja pa ni edino, kar lahko športniku škodi pri jemanju rHuEPO. Tisti, ki so pozitivni na doping testu, jih lahko doleti huda denarna kazen, prepoved tekmovanja, depresija, socialna kriza... (2)

Farmacevtska podjetja so zaskrbljena ob uporabi dopinga z zdravili zaradi škodljivih učinkov, ki so posledica neracionalne presoje varnosti in neustrezne uporabe. Večkrat se zdravila uporabljajo, preden so zaključeni vsi potrebni testi, zato športniki tvegajo svoje zdravje, saj odgovori o varnosti niso popolnoma znani. Tisti, ki zlorabi zdravilo, razmišlja le o njegovi koristi in ne upošteva morebitnih kratkoročnih in dolgoročnih problemov.

Bolniki in športniki, ki uporabljajo rHuEPO, pa tudi ostali, ki dosegajo dobre rezultate na dovoljen način, velikokrat posežejo tudi po dodatkih z železom, da bi preprečili neustrezno eritropoezo in nastanek nenormalnih rdečih krvničk. Zaradi prevelikih odmerkov železovih dodatkov lahko pride do resnih zapletov.

EPO je naravni peptid z relativno kratko razpolovno dobo, zato je odkrivanje nezakonite uporabe dosti težje. Življenjska doba rdečih krvničk je približno tri do štiri mesece, kar pomeni, da lahko športnik nedovoljena sredstva uporabi precej časa pred tekmovanjem. Med samim tekmovanjem jih je zelo težko odkriti v njegovem vzorcu, zato se je za odkrivanje dopinga zamenjalo že veliko strategij. Odkrivanje biomarkerjev, kot so zvišana serumska koncentracija EPO, Hb, retikulocitov, transferinskih receptorjev ali večji in novo oblikovani eritrociti, kaže nekaj novih načinov pri odkrivanju prepovedanih sredstev v prihodnosti. (3)

1.2 RDEČA KRVNA SLIKA

Po preiskavi celic v periferni krvi dobimo podatke o krvi posameznika, kar imenujemo krvna slika. Za nas je najpomembnejša rdeča (eritrocitna) krvna slika, poleg te pa poznamo tudi belo (levkocitno) in trombocitno krvno sliko. V rdečo krvno sliko spadajo naslednji parametri:

- število eritrocitov,
- koncentracija Hb,
- volumen stisnjenih eritrocitov ali Ht,

- število retikulocitov,
- eritrocitni indeksi,
- koeficient variacije volumna eritrocitov (RDW),
- opis kvalitativnih sprememb eritrocitov v krvnem razmazu. (4)

1.2.1 Eritrociti

Eritrociti (rdeče krvničke) so rdeča krvna telesa, ki vsebujejo krvno barvilo Hb. So najštevilčnejše celice v krvi. Običajna vrednost teh celic je 4,2 do 6,3 x 10¹²/L. Eritrociti predstavljajo 40 do 45 % volumna krvi in kar 99 % vseh krvnih celic. Citoplazma je bogata s Hb, ki je odgovoren za vezavo O₂. Povečanje koncentracije eritrocitov se pozna na posameznikovi vzdržljivosti. Stranski učinek je zgoščevanje krvi, kar lahko povzroči krvne strdke in poveča tveganje srčnih napadov in kapi. Zmanjšano vrednost imenujemo anemija ali slabokrvnost. Eritrociti nastajajo v rdečem kostnem mozgu, dokončno pa se razvijejo v krvi. Življenjska doba je približno 100 do 120 dni. Zreli eritrociti nimajo več jedra, DNA in RNA, prav tako pa so brez mitohondrijev, endoplazmatskega retikuluma in Golgijevega aparata. Imajo bikonkavno obliko. Od začetka eritropoeze (nastajanje eritrocitov) do zrelega eritrocita traja približno sedem dni. Stare eritrocite prepoznajo makrofagi, ki jih fagocitirajo v retikuloendotelijskem sistemu (vranica, jetra in kostni mozeg). Ta proces ponavadi poteka enako hitro kot eritropoeza, pri nekaterih boleznih pa je proces tudi pospešen (sepsa, malarija, beta talasemija, Wilsonova bolezen, pomanjkanje železa...). Proces lahko inducirajo tudi oksidativni stres, osmotski šok, pomanjkanje energije, nekateri endogeni mediatorji in ksenobiotiki, upočasnijo pa ga EPO, dušikov oksid, kateholamini in visoke koncentracije sečnine. Po razgradnji eritrocita se veliko nastalih produktov reciklira po telesu in ponovno uporabi. (5)

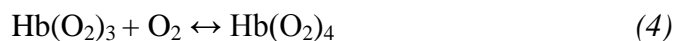
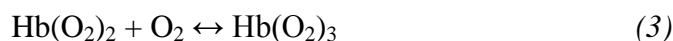
1.2.2 Hemoglobin (6,7,8,9)

Hb je tisti protein v eritrocitu, na katerega se veže O₂. Sestavljen je iz štirih podenot. Vsaka ima proteinski del (globin) in prostetično skupino – neproteinski del (hem). Hem sestavlja porfirinski obroč, sredi katerega je vgrajen železov ion, na katerega se veže O₂. Železov ion se nahaja v različnih stanjih, vendar pa je za vezavo O₂ potreben 2+ ion. V celici se hem sintetizira v mitohondrijih in citosolu, globin pa v ribosomih. Sinteza se prične v pronormoblastu in poteka, dokler retikulocit ne izgubi RNA. Poznamo več tipov Hb,

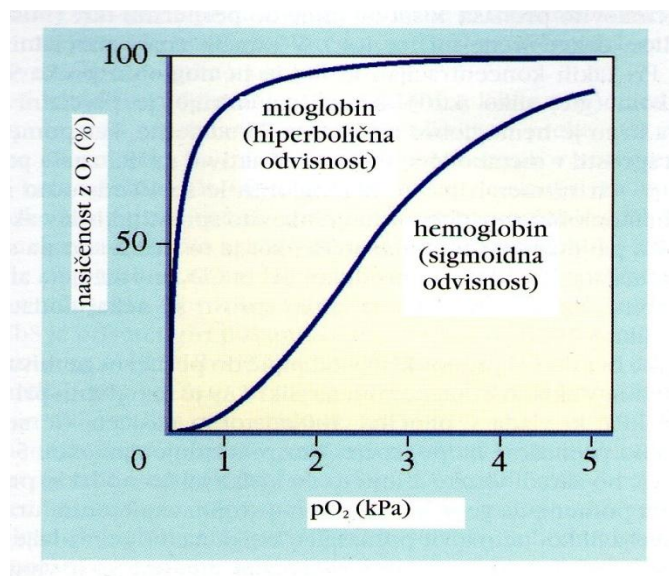
najbolj pogost pa je tip A, ki je sestavljen iz dveh α -podenot in dveh β -podenot. Koncentracija Hb nam pove količino na liter krvi. Te vrednosti so lahko znižane zaradi anemije, pri športnikih pa so ponavadi višje, lahko pa so zaradi napora ali povečanega volumna krvi celo znižane. Referenčna vrednost je od 120 do 160 g/L za ženske in od 140 do 180 g/L za moške. En gram veže 1,34 mL O₂. Koncentracija Hb je višja pri prebivalcih višje ležečih krajev. Pri teh se vrednost dvigne za približno 10 g/L, ko se saturacija O₂ v arterijski krvi zniža za vsake 3 do 4 %. Hb lahko veže poleg O₂ tudi CO₂, CO, CN⁻, SO, NO...

Na eno molekulo Hb se vežejo štiri molekule O₂. Ko je Hb brez molekule O₂ (deoksihemoglobin), je njegova afiniteta do O₂ zelo šibka. Ko se veže prva molekula O₂, pride do konformacijske spremembe v strukturi Hb in se afiniteta poveča. Konformacijska sprememba se prenese do ostalih treh molekul hema s pomočjo drobnih premikov v polipeptidnih verigah. Tako vezava druge, tretje in četrte molekule poteka z naraščajočo afiniteto, zato ima disociacijska krivulja O₂ sigmoidno obliko (slika 1). Pri spremembi pride do porušanja nekaterih ionskih povezav med proteinskimi podenotami. Temu pravimo kooperativni efekt vezave kisikovih molekul. Tudi sproščanje O₂ z molekule Hb je povezano s kooperativnim efektom. Prva kisikova molekula najtežje zapusti Hb, ostale tri pa se lažje odstranijo.

Reakcije vezave O₂ na Hb:



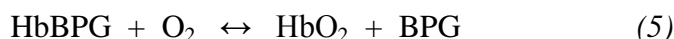
Mioglobin je mišični protein, sestavljen iz polipeptidne verige in hema, ki hrani in prevzema O₂ v mišicah. Ima večjo afiniteto do O₂ kot Hb, zato je disociacijska krivulja levo od krivulje Hb. Za razliko od Hb mioglobin ne izraža kooperativnosti pri vezavi O₂. Vezava pri mioglobinu je odvisna od parcialnega tlaka O₂ le pri izjemno nizkih vrednostih, tako da je oblika krivulje hiperbolična (slika 1).



Slika 1: Prikaz vezave kisika na mioglobin in Hb

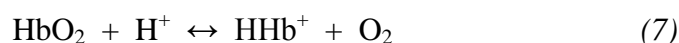
Na afiniteto Hb do O₂ vplivajo tudi CO₂, BPG (2,3-bifosfoglicerat), H⁺ (vodikov ion) in temperatura (slika 2):

- BPG je negativni heterotropični alosterični modulator vezave O₂ na Hb. Veže se v centralni žep v β-podenoti, ko je Hb v obliki T, ki je neaktivna, ter jo stabilizira in pri tem zniža afiniteto do vezave O₂. Vezavni žep za BPG izgine, ko molekula preide iz T oblike v R obliko (aktivna oblika).



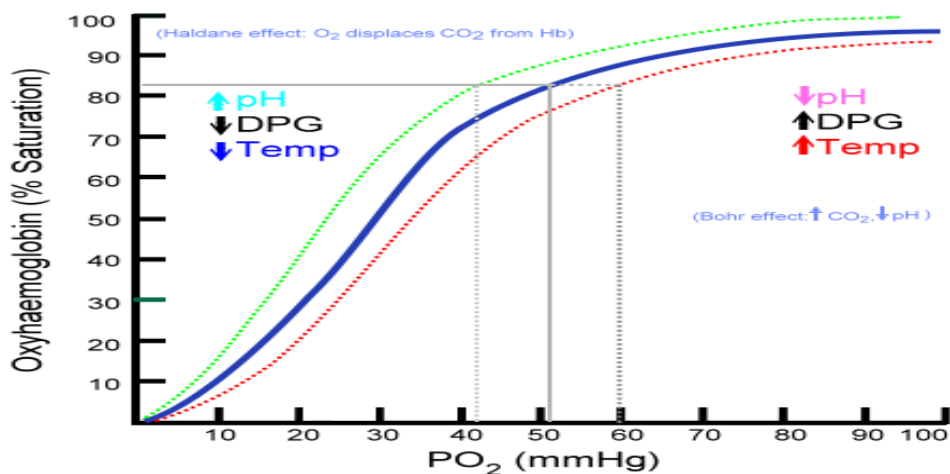
T oblika R oblika

- Ko se CO₂ veže na Hb, nastanejo v kvartarni strukturi spremembe, ki stabilizirajo deoksigenirano in destabilizirajo oksigenirano obliko molekule. Vezava CO₂ torej zmanjša afiniteto Hb do O₂ in tako olajša njegovo sproščanje.
- H⁺ vpliva na vezavo O₂ in je, tako kot BPG in CO₂, negativni heterotropični alosterični modulator. Če je H⁺ vezan na Hb, je afiniteta do O₂ manjša. V pljučih se na Hb veže O₂ in pri tem se sprost H⁺, medtem ko se v tkivih s Hb sprosti O₂ in pri tem se veže H⁺.



tkiva pljuča

- Afiniteta Hb do O₂ je večja pri nizkih temperaturah, pri visokih pa je sproščanje O₂ olajšano.



Slika 2: Saturacijska krivulja Hb v odvisnosti od parcialnega tlaka O₂

1.2.3 Hematokrit

Volumen stisnjenih eritrocitov ali Ht nam pove razmerje med volumnom eritrocitov in volumnom celotne krvi. Referenčna vrednost je od 0,37 do 0,47 za ženske in od 0,40 do 0,54 za moške. Izračunamo ga iz števila eritrocitov v krvi in njihovega povprečnega volumna (MCV). Ht dobimo tudi iz razmerja med stisnjenimi eritrociti in celotno krvjo po centrifugiranju. (4)

1.2.4 Retikulociti

Število retikulocitov v krvi nam kaže tvorbo eritrocitov v kostnem mozgu, saj so njihova predstopnja pri nastajanju. Vrednost retikulocitov lahko podamo kot absolutno (referenčna vrednost je od 20 do 100 x 10⁹/L) in kot relativno število (referenčna vrednost je od 0,2 do 2 %). Relativno število je delež retikulocitov glede na eritrocite v krvi. Nižje vrednosti pomenijo zmanjšano produkcijo eritrocitov (pomanjkanje železa, vitamina B₁₂, folne kisline...), višje vrednosti pa nam kažejo povečano aktivnost kostnega mozga in potrebo organizma po povečanju števila eritrocitov. Tako kot zrela rdeča krvnička tudi retikulocit nima jedra, vsebuje pa še ostanke RNA. Retikulociti so v krvi 18 do 36 ur, nato pa se ob izgubi RNA preobrazijo v eritrocite. Ker so v krvi prisotni relativno kratek čas, so zelo dober pokazatelj trenutne eritropoeze v telesu. Ta čas se ob močni stimulaciji EPO lahko podaljša, saj se pri povečani eritropoezi retikulociti hitreje izplavljajo iz mozga v kri. Takšni

retikulociti so manj zreli in potrebujejo v krvi več časa, da se preobrazijo v zrele eritrocite. (4, 10)

1.2.5 Eritrocitni indeksi

Za izračun eritrocitnih indeksov potrebujemo število eritrocitov, koncentracijo Hb in Ht, nekateri analizatorji pa nam jih izmerijo ali izračunajo tudi sami. Eritrocitni indeksi so :

- povprečni volumen eritrocitov (MCV), izražen v fL (referenčna vrednost je od 81 do 94 fL),
- povprečna količina Hb v eritrocitu (MCH), izražena v pg (referenčna vrednost je od 26 do 32 pg),
- povprečna koncentracija Hb v eritrocitih (MCHC), izražena v g/L (referenčna vrednost je od 310 do 350 g/L). (4)

Kadar je vrednost MCV v mejah normale, pravimo eritrocitom normociti, ko je znižana, jim pravimo mikrociti, in makrociti, ko je MCV povišan. Težave pri sintezi Hb se pokažejo kot zmanjšan volumen normalnega eritrocita. Tak problem se pojavlja pri pomanjkanju železa, talasemiji (dedna bolezen s slabšo proizvodnjo verige globina), anemijah povezanih s kronično okužbo ali boleznijo... Makrociti se pojavijo, ko je motena delitev celic pri eritropoezi v kostnem mozgu. Najpogostejši vzroki makrocitnih anemij so pomanjkanje folata, vitamina B₁₂ in boleznij jeter.

Nizek MCH pomeni nizko količino Hb v celici, ponavadi zaradi prenizke sinteze in pomanjkanja železa. Takim celicam pravimo hipokromne, boleznim pa hipokromna anemija. Hiperkromne celice (visok MCH) so ponavadi prisotne pri makrocitnih anemijah zaradi pomanjkanja folatov in vitamina B₁₂.

Celice s premalo Hb imajo nizek MCHC in so svetlejše barve. MCHC je nizek pri mikrocitnih in hipokromnih anemijah, ponavadi je tudi povezan s pomanjkanjem železa, medtem ko je pri makrocitnih anemijah MCHC normalen. Povišan je pri dedni sferocitozi, pri kateri je zmanjšano preživetje eritrocitov zaradi strukturne napake proteina v membrani. (10, 11)

1.2.6 RDW (red blood cell distribution width)

RDW je koeficient variacije volumna eritrocitov. Pove nam razpršenost volumna eritrocitov v % (referenčne vrednosti so od 11,5 do 14,5 %). Pomembni so, kadar je MCV v mejah normale, RDW pa je povišan. Taki bolezniki z različno velikimi eritrociti pravimo anizocitoza. (10)

1.3 VOLUMEN KRVI

Količina krvi v telesu je zelo pomembna, saj se po njej prenašajo krvne celice, mikro- in makrohranila, encimi, elektroliti, hormoni... Ob večjem volumnu in normalnih koncentracijah snovi v krvi imamo tako hitrejše in močnejše mehanizme v telesu (imunski sistem, strjevanje krvi, oksigenacija telesa, regeneracija mišičnih tkiv...). Volumen krvi osebe, ki tehta 70 kg, je približno pet litrov, vzdržljivostna vadba pa ta volumen poveča. Vrhunski športniki v vzdržljivostnih panogah imajo tudi do 30 % več krvi od normalne vrednosti. Pri redni vadbi se najprej poveča volumen plazme, kasneje pa se poveča tudi količina eritrocitov. To povečanje pripomore k vedno večji aerobni zmogljivosti. V krvi se večja količina elektrolitov in proteinov. Že takoj po vadbi pride do premika proteinov in vode v kri, kar povzroči hipervolemijo. Kronična hipervolemija je torej poleg bolezenskih stanj (edemi) tudi posledica rednih treningov. V telesu se tako poveča količina vode in topil, saj zaužijemo več tekočine kot jo izločimo. Zaradi večje količine telesne tekočine je olajšano oddajanje toplote, boljša je termoregulacija, večji je krvni volumen in s tem tudi utripni volumen, kar pomeni nižji srčni utrip v mirovanju in med vadbo. Zaradi tega povečanja imajo športniki lahko normalno ali celo rahlo nižjo koncentracijo Hb, kot normalna populacija. Njihova masa totalnega Hb je seveda višja. Če med vadbo ne pijemo, pride do dehidracije in se zmanjša volumen plazme, povečata se osmotska in viskozna krvni. To vpliva na zmogljivost športnikov, pri hujših oblikah pride tudi do mišičnih krčev, pregrevanja telesa in možganske kapi. (12, 13)

Za merjenje volumna krvi obstaja več načinov. Pri rutinskih pregledih se volumen preprosto izračuna s pomočjo Ht, telesne teže, višine, spola, koncentracije krvnih celic, toplencev v krvi... Ti izračuni nam dajejo približno vrednost. Za natančne izvide pa so potrebni bolj zapleteni in daljši postopki, ki so bolj invazivni in tudi dražji. Za tak postopek se uporabljajo sledljive snovi, kot so barvila (indocianin zeleno, fluorescein), izotopi (I^{125} , I^{131} , Cr^{51}), sintetični koloidi (dekstran-70)... Predpisano količino te snovi vbrizgamo v

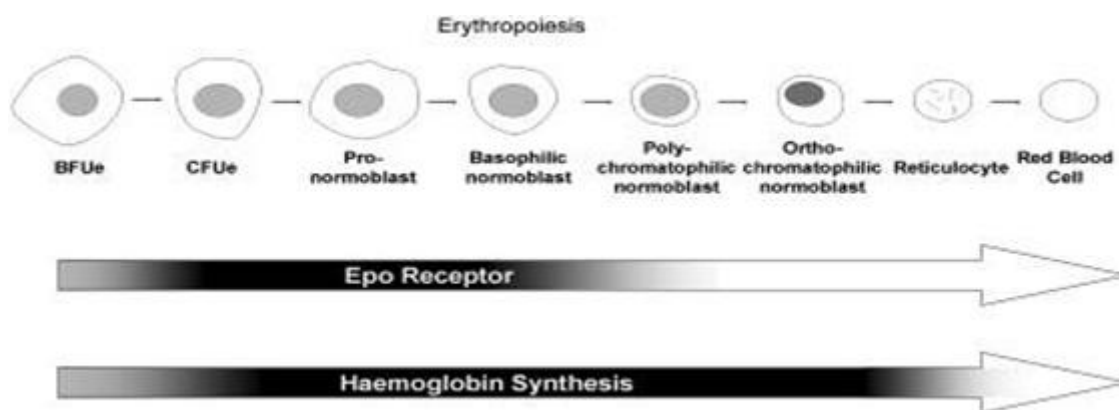
krvni obtok. Te se vežejo na beljakovine v krvi, krvne celice ali pa prosto ostanejo v krvi toliko časa, da lahko izmerimo njihovo koncentracijo v krvi. Iz teh podatkov dobimo zelo natančen izračun volumna krvi. V zadnjem času se pojavljajo tudi novejši aparati za merjenje volumna krvi, ki pa še niso namenjeni rutinski uporabi. (14, 15)

1.4 ERITROPOEZA

Nastajanje rdečih krvnih celic ali eritropoezo v kostnem mozgu natančno uravnava naravni hormon EPO. Sintezo zavirajo aktinomycin D, puromicin in cikloheksamid. Znižanje ravni O₂ v krvi (hipoksemija) in zaradi tega v tkivu (hipoksija) je dražljaj za povečano nastajanje EPO. Takšen pojav zasledimo, ko je v krvi ali okolju prenizka koncentracija O₂ za naše potrebe (anemija, izguba krvi, intenzivna vadba, višja nadmorska višina, hipoksični prostori...). Merljiva sprememba koncentracije plazemskega EPO nastopi v uri ali dveh po nastopu hipoksije. Maksimalne vrednosti se lahko pojavijo v šestih urah, najkasneje pa v treh dneh. Eritropoetinski odgovor je na začetku zelo velik, pozneje pa zmeren. Največji porast števila eritrocitov v krvi se navadno pojavi po padcu koncentracije EPO. Novi eritrociti se v krvi pojavijo najhitreje v štirih do petih dneh. Z zvišanjem ravni O₂ v krvi se dražljaj za povečano nastajanje EPO zmanjša. (4, 10)

1.4.1 Stopnje eritropoeze

Eritropoeza poteka v posebnih celicah v rdečem kostnem mozgu, kjer potekata sočasno dva procesa: delitev (proliferacija) in dozorevanje (diferenciacija). EPO vzpodbuja proizvodnjo rdečih krvničk, hkrati pa skrajša čas dozorevanja eritroblastov. Pluripotentna matična celica je osnovna matična celica, ki se v kostnem mozgu diferencira v katerokoli krvno celico. Pri eritropoezi iz nje nastane multipotentna mieloična celica, ta pa se nato razvije v usmerjeno matično eritroidno celico, ki je že odzivna na EPO. Koncentracija endogenega EPO se pri močni stimulaciji (visoka nadmorska višina, povečana potreba po O₂) poviša tudi do 1000-krat. Ob induciranju z EPO nastane Hb, in tako eritroidne celice diferencirajo v prvo stopnjo eritroblastov, in sicer v pronormoblast. Naslednja stopnja celice je bazofilni normoblast, iz katerega se kasneje razvije polikromatični normoblast. Ta se razvije v ortokromatični normoblast, ki nima več sposobnosti sinteze DNA in delitve. Retikulocit nastane, ko ortokromatični normoblast dozori in izloči jedro. Retikulocit vstopi v kri, kjer v enem dnevu dozori v eritrocit, ki ne vsebuje RNA (slika 3). (3)



Slika 3: Potek eritropoeze

1.4.2 Snovi in postopki, ki povečajo transport kisika in eritropoezo

Uspešno kloniranje človeškega EPO gena je privedlo do rHuEPO, zdravila za zdravljenje slabokrvnosti. Klinična uporaba prvega rHuEPO (epoetin alfa) se je začela v Evropi leta 1988. Pokazalo se je izboljšanje krvi pacientov in od takrat te vrste zdravil zlorablajo tudi športniki.

Transfuzije krvi se običajno uporabljajo za zdravljenje anemij ali pri izgubi večjega števila eritrocitov. Poznamo homologne (infuzija krvi drugih oseb) in avtologne (infuzija lastne krvi) transfuzije. Le-ta je varna pred imunskimi reakcijami in raznimi infekcijami, pri obeh pa lahko pride do resnih zapletov zaradi poškodovanih eritrocitov. Transfuzije so se pri športnikih začele že okoli leta 1970. Običajne priprave, kot so višinski treningi, niso dale tako uspešnih rezultatov pri povečanju števila rdečih krvničk kot transfuzija. To metodo ravno zato športniki izkoriščajo, čeprav je ta poseg zaradi tveganja pri uporabi prav tako na doping listi. Zlorablja se predvsem postopek avtologne transfuzije. Infuzija športnikove krvi, ki so mu jo odvzeli pred časom, se težko razlikuje od krvi v njem, zato je ta poseg težko dokazati.

Desferioksamin (DFO) je kelator železa, ki šibko zavira PHD (prolil-hidroksilaza-domena encimi). Zaradi zaviranja delovanja PHD je upočasnjena razgradnja HIF (Hypoxia-inducible factor), kar pomeni povečano aktivacijo genov za EPO. Klinično se DFO uporablja za zdravljenje toksičnosti aluminija in prenasičenosti z železom. Z intravenskim infuzijami se poveča koncentracija serumskega EPO v odvisnosti od odmerka, vendar ni bistvenega vpliva na dihanje v roku 24-ih ur od začetka infuzije. Zaradi poročil o slabovidnosti in smrti pri uporabi je tudi DFO doping sredstvo. Učinek na dihanje naj se ne

bi pokazal prej, kot v dveh do treh dneh. Med infuzijo DFO se pokaže podobno povišanje pljučnega arterijskega pritiska kot pri hipoksiji.

Tudi kobalt je inhibitor PHD, zato njegova uporaba spodbuja proizvodnjo endogenega EPO. Je eden od bistvenih elementov v sledovih, vendar pa pri prekomernem vnosu povzroči toksične učinke, kot je oslabiljeno delovanje ščitnice, zato podatke o njegovi zlorabi težko najdemo.

Dovoljen način za uspešen dvig koncentracije eritrocitov in povečanje zmogljivosti je poleg primernih hranil ustrezen trening ali trening v hipoksičnem okolju. Poleg koristi lahko pri intenzivnih treningih pride tudi do zapletov. Če intenzivna vadba poteka v hipoksičnem okolju, pride do zapletov zaradi težjih pogojev še prej. Nekateri posamezniki se namreč ne prilagajajo tako dobro na manjšo vsebnost O₂ v okolju, zato so bolj dovzetni za višinske bolezni. Da ne pride do tega, je potreben skrben in pazljiv pristop k takemu načinu treningov. (3)

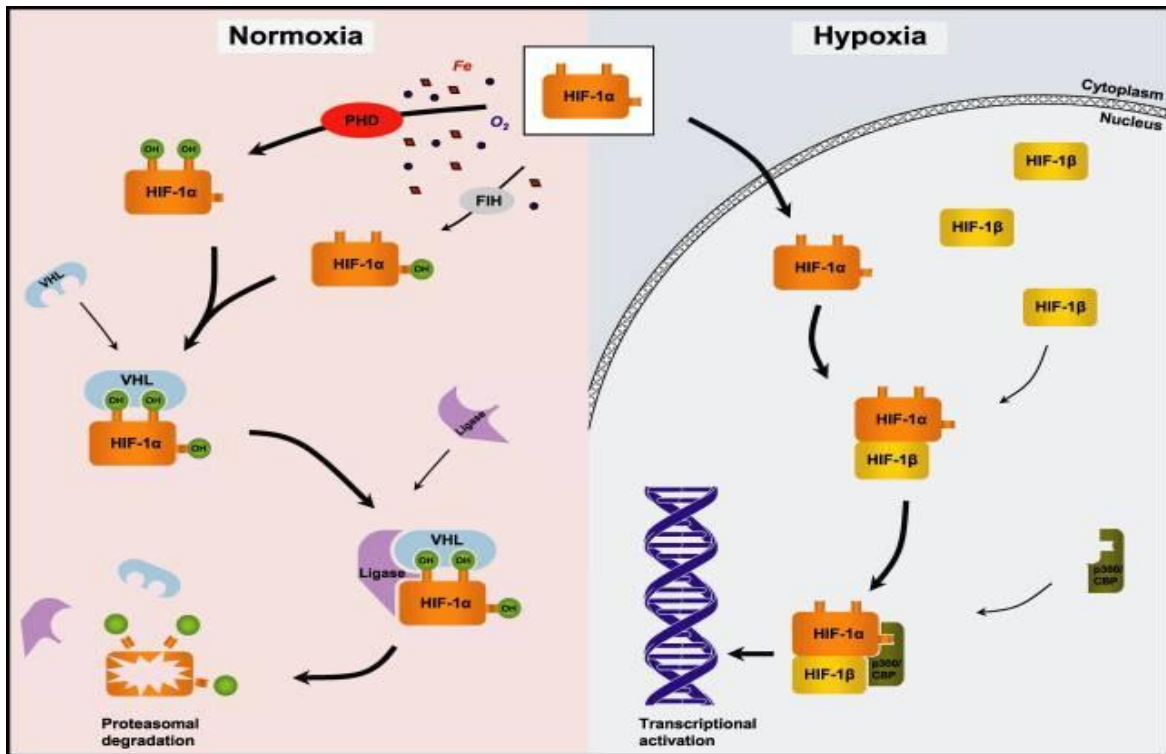
1.4.3 HIF (Hypoxia-inducible factor)

Ko so ljudje izpostavljeni hipoksiji, delujejo sistemske in celične spremembe tako, da skušajo zmanjšati njen vpliv in zagotoviti ustrezno oksigenacijo. Pri tem ima glavno vlogo HIF, ki je bil odkrit kot transkripcijski aktivator EPO in kot odziv na znotrajcelično hipoksijo po telesu. HIF je reguliran s posebnimi PHD-ji in VHL-om (von Hippel-Lindau tumor-supresorski protein). Aktivnost PHD je odvisna od prisotnosti železa in O₂. Povezava PHD-VHL-HIF (slika 4) je poleg urejanja eritropoeze pomembna tudi pri kardiopulmonalnem sistemu.

Za odziv na hipoksijo so značilne sistemske spremembe v fiziologiji dihal, srčnožilnem sistemu in v krvotvornih organih. Transport O₂ se najprej poveča zaradi povečane ventilacije in povečanja minutnega volumna srca, nato pa s pospeševanjem eritropoeze. Razlog za te sistemske spremembe je celični odziv, ki je pod nadzorom HIF-a. Študije kažejo, da HIF neposredno ali posredno ureja več sto genov, ki sodelujejo v različnih procesih (angiogeneza, rast celic, apoptoza, energetski metabolizem, vazomotorična regulacija...).

Zgodnje študije so pokazale od O₂ odvisno vezavo HIF-a in transkripcijsko aktiviranje DNA kot odgovor na hipoksijo v različnih celičnih linijah in za različne gene. Nadaljnji poskusi so potrdili, da je HIF-1 β vedno izražen, prisoten je v presežku, odvisen pa je od

drugih transkripcijskih dejavnikov, in ne od hipoksije. Prisotnost HIF-1 α pa je odvisna od hipoksije in je glavni dejavnik za vezavo HIF-1 in transkripcijsko aktivacijo DNA. Seznam s HIF-om reguliranih genov še naprej počasi raste. V normoksiji je HIF-1 α sintetiziran stalno, ampak se hitro razgradi z ubikvitin ligazo. Poleg HIF-1 α dimerizirata s HIF-1 β še HIF-2 α in HIF-3 α . Izražanje HIF-2 α je bolj redko kot HIF-1 α , vendar ima veliko podobnih funkcionalnih lastnosti, o HIF-3 α pa je znanega zelo malo. HIF-1 α ima eno najkrajših razpolovnih dob vseh znanih beljakovin. Hipoksično stanje vodi v kopičenje HIF- α podenot. Ciljni geni HIF- α so regulirani z VHL, ki se veže na podenoto HIF- α . Na ta kompleks se nato veže še ubikvitin ligaza in nastane multiprotein ubikvitin ligaza kompleks, ki se nato razgradi. Razgradnja je odvisna od hidroksilacije prolinskih ostankov v HIF- α . Ob prisotnosti O₂ to hidroksilacijo katalizirajo izoencimi PHD (PHD1, PHD2 in PHD3). Delovanje teh encimov je odvisno od O₂ in železa kot kosubstrata, ter od askorbata in oksoglutarata kot obveznih kofaktorjev. V normoksiji je tako HIF- α nenehno izražen in se hitro razgradi, v hipoksičnih pogojih pa sta protil hidroksilacija in proteasomalna razgradnja upočasnjeni, kar povzroči stabilizacijo in kopičenje HIF- α . Ta v jedru dimerizira s HIF- β , kar aktivira transkripcijo genov, odgovornih za hipoksijo. HIF- α je podvržen dodatnim posttranslacijskim spremembam, ki ne vplivajo na njegovo stabilnost, vplivajo pa na njegovo transkripcijsko aktivnost. Hidroksilacija asparaginskih ostankov HIF- α v C-terminalni transaktivacijski domeni zmanjšuje transkripcijsko aktivnost z zaviranjem vezave transkripcijskega koaktivatorskega kompleksa p300/CBP. To asparaginil hidroksilazo imenujemo FIH (factor inhibiting HIF), ki prav tako sodi med dioksigenazno odvisne od 2-oksoglutarata, železa in seveda O₂. V normalnih celicah sesalcev že majhne spremembe v količini O₂ povzročijo velike spremembe v kinetiki občutljivega encima PHD. FIH se zdi, kot da izvaja dodatno raven negativne kontrole na HIF- α , ki uide degradaciji. Čeprav tudi druge signalne poti reagirajo s HIF in vplivajo na končni transkripcijski odziv na hipoksijo, je PHD-VHL-HIF os trdno uveljavljena kot osrednja regulacija celične homeostaze O₂.

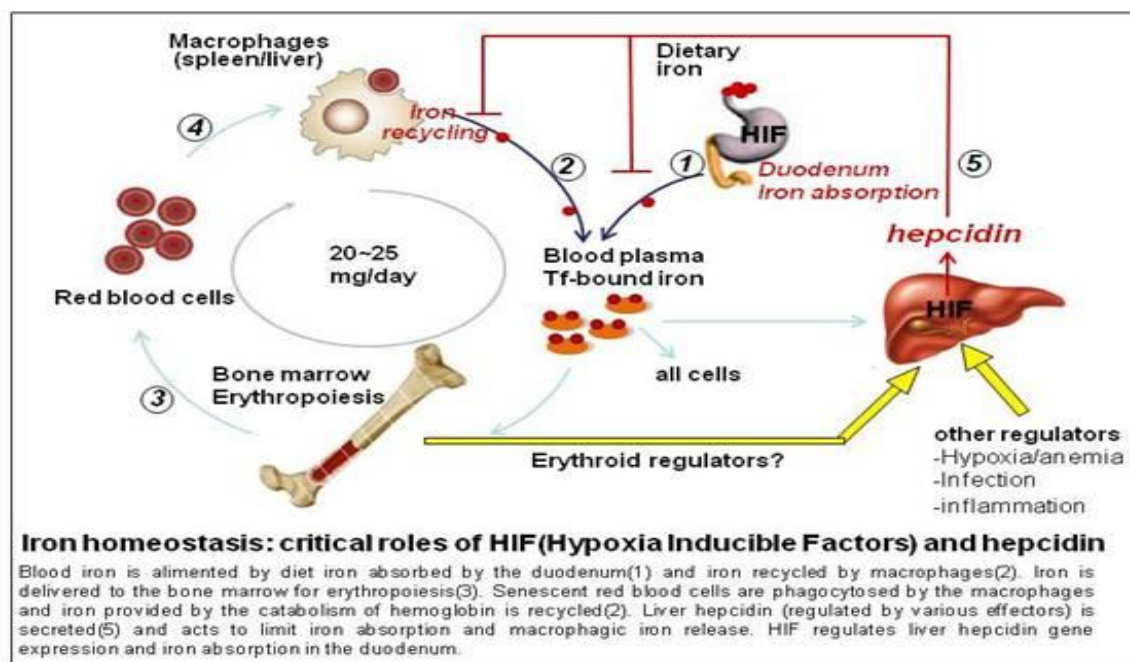


Slika 4: Shematski prikaz PHD-VHL-HIF osi

Študije redkih genskih bolezni potrjujejo pomembnost povezave PHD-VHL-HIF pri nadzoru EPO in s tem izražanje rdečih krvničk. Odgovor na stimulacijo EPO pa je odvisen tudi od količine substrata v kostnem mozgu. Čeprav se Hb poveča v enem tednu od vzpona na visoko nadmorsko višino, pa je mogoč tudi njegov upad v enem do dveh tednih, saj se lahko koncentracija feritina močno zniža, kar je posledica pomanjkanja železa. Pri hipoksiji se poveča črevesna absorpcija železa, HIF pa spodbuja nastajanje transferina in transferinskega receptorja. (16)

HIF pa poleg induciranja tudi zavira določene gene, kot je gen za regulacijo hepcidina (slika 5), ki je ključni hormonski regulator homeostaze železa. Sintetizira se v jetrih in blokira ferroportin ter tako inhibira aktivni transport železa iz enterocitov in makrofagov. Z zaviranjem gena za hepcidin omogočimo delovanje ferroportina in povečamo črevesno absorpcijo in recikliranje železa. Pomanjkanje hepcidina je osnova za bolezni z dedno hemokromatozo. Železo in HIF sta povezana tudi pri delovanju IRP1 in IRP2 (iron regulatory proteins – železo-regulirajoči proteini). IRP-ji uravnavajo izražanje proteinov za presnovo železa z vezavo na svoje IRE (iron-responsive elements – železo-odzivni elementi) v mRNA. Ko železa primanjkuje, povezava IRP-IRE spodbuja celični privzem železa in preprečuje njegovo shranjevanje s spodbujanjem mRNA transferinskega

receptorja in z inhibiranjem translacije mRNA feritina. V celici, nasičeni z železom, je IRP1 biokemično neaktiviran, IRP2 pa je podvržen razgradnji, odvisni od železa. Tako je zmanjšana vezava na IRE. Možno je, da je pri razgradnji IRP2 udeležena neznana od 2-oksoglutarata odvisna dioksidgenaza, ki je iz iste družine kot HIF hidroksilaza, čeprav VHL tu ni pomemben. Vezava IRP-IRE regulira posttranslacijo HIF-2 α , ki je pomembna izoformna oblika pri urejanju EPO. Tako je urejena negativna povratna zveza, ki omejuje eritropoezo, dokler ni železa dovolj, da bi nastale normalne rdeče krvničke. (17)

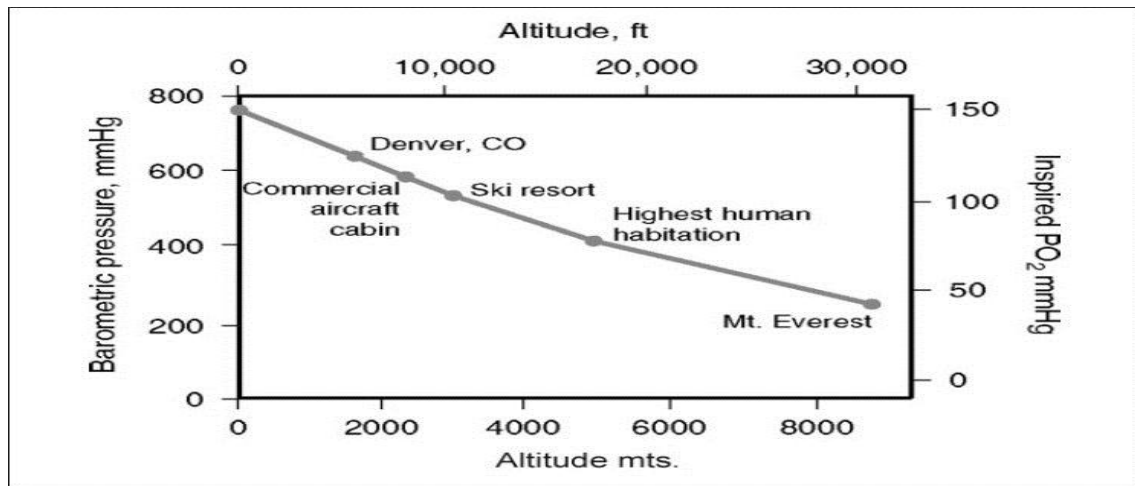


Slika 5: Vpliv HIF-a na hepcidin in železo

Te študije posredno podpirajo dokaze, da je HIF pomemben v človeški kardiopulmonalni fiziologiji. Še posebej pokažejo možnost, da HIF regulira izražanje genov za fiziološke odzive na stalno hipoksijo, in da bazalna aktivnost HIF-a lahko kalibrira določeno točko in občutljivost odziva na akutno hipoksijo. (16)

1.5 VIŠJA NADMORSKA VIŠINA

Zračni tlak z naraščanjem nadmorske višine eksponentno pada, zato se tudi delež O₂, ki je ob morju 21 % (parcialni tlak O₂ je 160 mm Hg), na višjih krajih zniža. Na višini 5800 m je zračni pritisk že za polovico zmanjšan, na Mount Everestu pa je zračni pritisk le še 253 mm Hg. Alveolarni parcialni tlak O₂ znaša na Mount Everestu 35 mm Hg, ob morju pa 104 mm Hg (slika 6).



Slika 6: Odvisnost zračnega pritiska in vdihanega parcialnega tlaka O₂ od nadmorske višine

Razmerje med zračnim pritiskom in nadmorsko višino se spreminja tudi z oddaljenostjo od ekvatorja. Tako pride na polarnih območjih do hipoksije na nižjih nadmorskih višinah. Zračni pritisk je nižji pozimi kot poleti, zato nas poleg izredno nizkih temperatur na višinah ogrožata tudi nižji zračni pritisk in nižji parcialni tlak O₂. (18)

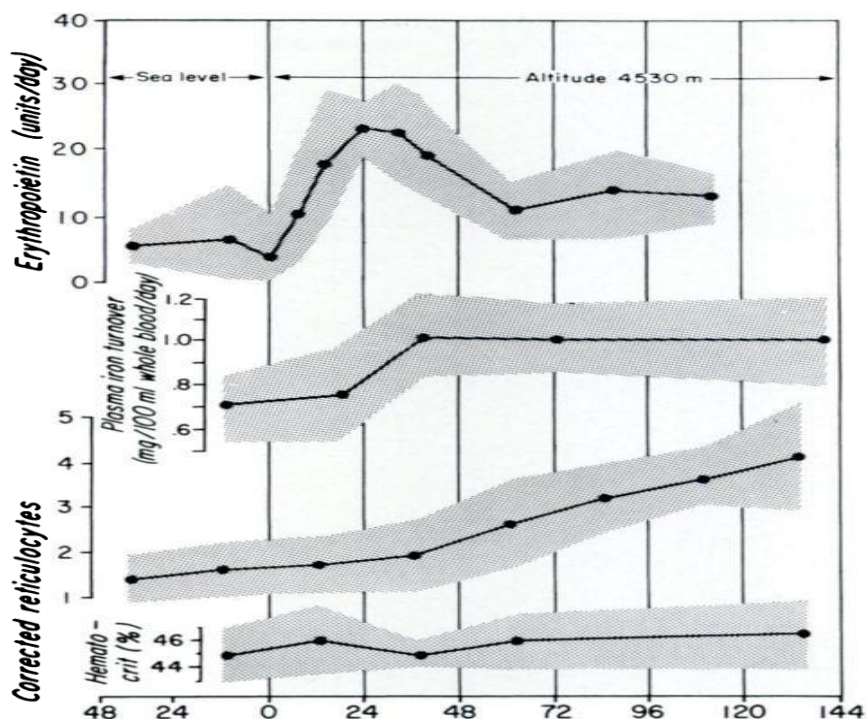
1.5.1 Prilagoditev

Ko pridemo na višje nadmorske višine (okoli 1500 m), se naše telo odzove z različnimi prilagoditvami na hipoksijo, in sicer se povečata dostava in izkoristek O₂. Ti procesi se začnejo takoj, trajajo pa nekaj tednov, odvisno od posameznika. Začetne spremembe so povečana frekvenca dihanja, povečan srčni utrip in premik telesnih tekočin. Povečana frekvenca dihanja pomeni večjo dostavo O₂, hkrati pa tudi izgubo CO₂ in zaradi tega se dvigne pH telesnih tekočin. Ta dvig kompenzirajo ledvice v 48-ih urah s povečanim izločanjem bikarbonatnega iona z urinom. Ko se poveča srčni utrip, je večji tudi minutni volumen srca, saj telo potrebuje večji pretok krvi. Do premikov telesnih tekočin pride zaradi konstrikcije kapilar v možganih in pljučih, saj se poveča potreba po O₂. Pri nevarno povišanem arterijskem pritisku v možganih in pljučih lahko pride do edemov.

Kasnejše spremembe v našem telesu so povečana eritropoeza, povečanje koncentracije BFG in večje število kapilar. Intenzivna eritropoeza poteka v telesu zaradi manjše vsebnosti O₂ v krvi, zato se poveča sproščanje EPO, ki stimulira nastajanje eritrocitov. Organizem, ki se je popolnoma prilagodil na nadmorsko višino, naj bi pridobil tudi do 50 % eritrocitov. Povečana koncentracija BFG v eritrocitih zmanjša afiniteto Hb do O₂,

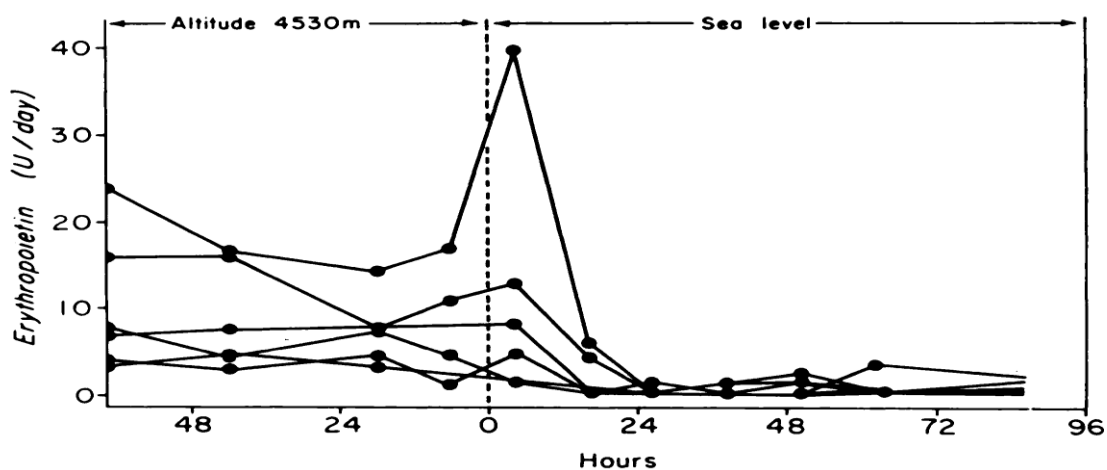
hkrati pa se poveča koncentracija mioglobina v mišicah, zato je prevzem O₂ v mišice večji. Telo se prilagodi tudi s povečanim številom kapilar, kar omogoča boljšo prekrvavitev tkiva. (18)

V študiji so Fuara in sodelavci analizirali dve skupini (19). V prvi skupini je bilo 7 moških prebivalcev nižin, ki so jih preselili za teden dni na višino 4530 m nad morjem, v drugi pa so 6 prebivalcev te višine (4530 m) preselili v dolino. Sproti so jemali vzorce njihove krvi in analizirali količino EPO, retikulocitov, Ht in železa. V prvi skupini so opazili dvig EPO. Ta se v prvih šestih urah ni bistveno spremenil. EPO je začel naraščati in maksimum dosegel po približno 24-ih urah, za tem pa padel do skoraj normalne ravni. Razlog za tako sunkovit dvig in nato padec še ni znan. Povišal se je PIT (plasma iron turnover), ki nam pove količino železa v krvi, ki se porabi za sintezo rdečih krvničk. Železo se je začelo v kostnem mozgu pospešeno porabljati za sintezo Hb. PIT je začel naraščati po 12-ih urah in dosegel maksimalno raven v 36-ih urah, nato pa rahlo padel do povratka v dolino. Takoj je začelo naraščati tudi število retikulocitov, Ht pa se v sedmih dneh ni spremenil. Izmerili so tudi čas privzema železa v kostni mozeg (marrow transit time). To je časovni interval od injiciranja označenega železa pa do nastanka rdečih krvničk, ki vsebujejo injicirano železo. Zmanjšal se je približno za polovico, in sicer iz 90 na 45 ur (slika 7).



Slika 7: Spremembe v krvi v urah po vzponu na 4530 m

V skupini, kjer so prebivalce z višine (4530 m) preselili v dolino, sta imela dva posameznika Ht kar 0,72 in 0,73. Ostali so imeli to vrednost med 0,54 in 0,64. Ht se je vsem na koncu znižal, verjetno tudi zaradi odvzema velike količine krvi. Pri nekaterih se je vrednost EPO takoj po padcu nadmorske višine za kratek čas močno dvignila, vzrok še ni potrjen. Zaradi večje količine O₂ v zraku bi lahko prišlo do pretirano zmanjšane pretoka krvi po tkivih, kar bi bil tudi dražljaj za izločanje EPO. Po enem dnevu od spusta so bile vrednosti EPO pri vseh nezaznavne, saj potrebe po novih eritrocitih ni bilo. Pri tistih, kjer se je na začetku povečala količina EPO, se je dvignil tudi PIT, kar kaže vpliv EPO na potrebo po železu. Tudi vrednost PIT je nato sledila padcu EPO, zmanjšalo pa se je tudi število retikulocitov (slika 8). (19)

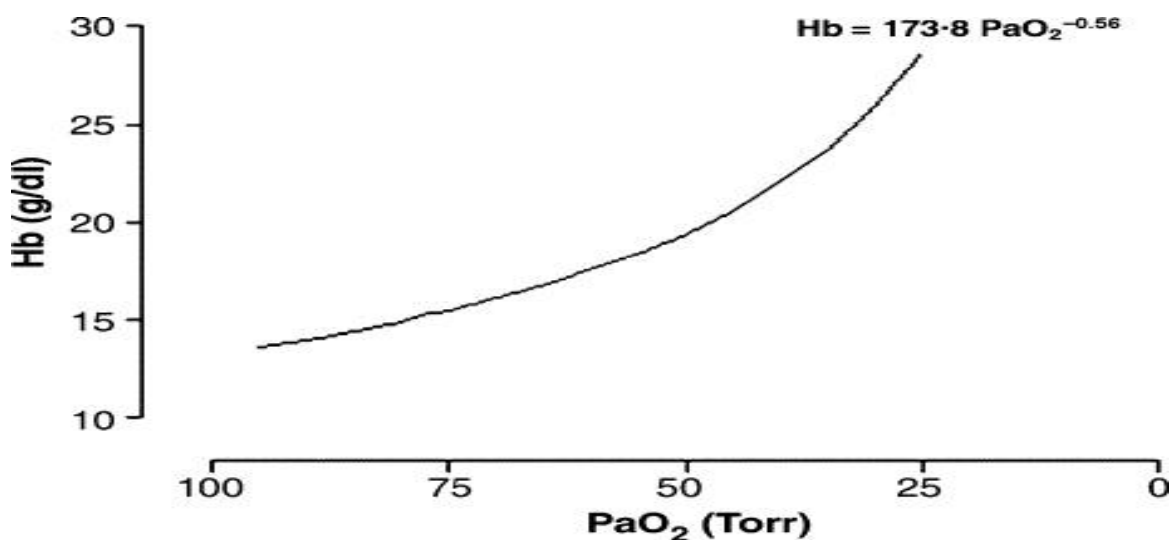


Slika 8: Količina eritropoetina po spustu v nižino

Policitemija je najbolj znana lastnost aklimatizacije. Eckardt in sodelavci (20) so v študiji na šestih posameznikih ugotovili, da hipoksija ustvari opazno povečanje EPO v serumu v roku 90-ih minut. Richalet s sodelavci (21) je v študiji na desetih posameznikih ugotovil, da po vzponu na visoko nadmorsko višino EPO vrh doseže v dveh dneh, na vrednosti skoraj enake tistim v dolini pa pade v približno desetih dneh, čeprav je še vedno prisotna hipoksija. Vrednosti Hb in Ht se kljub temu povišata v nekaj dneh po vzponu. Povzetki več študij (16, 22) so dali zanimive rezultate. V prvem mesecu se poviša Ht za slabih 10 %, volumen plazme pa se rahlo zmanjša, tako da celotni volumen krvi ostane skoraj nespremenjen. Masa rdečih krvničk in krvi nato narašča osem mesecev, ob nadmorski višini 4500 m pa je možen porast eritrocitov za 50 %. Policitemija se v veliki meri razvija in vzdržuje pri relativno normalni koncentraciji EPO. Te študije so pripeljale do zanimivih zaključkov (16, 22):

- dolgo bivanje na zelo visoki nadmorski višini močno spodbudi eritropoezo,
- zaradi nizkega porasta eritrocitov v prvem mesecu je možno, da je učinek kratkotrajnega bivanja na višini slabši,
- število rdečih krvničk se je večalo osem mesecev, čeprav se je koncentracija EPO že po nekaj tednih vrnila skoraj na normalno raven, kar pomeni, da je bila eritropoeza pospešena kljub padcu EPO po nekaj tednih,
- volumen plazme po prihodu v dolino začne naraščati, količina krvi in eritrocitov pa ostane povišana še vsaj štiri tedne,
- v dveh mesecih po povratku z višine se količine in volumni vrnejo na stopnjo pred bivanjem na višini.

Najvišja vrednost Hb posameznikov v ekstremnih višinah presega 210 g/l in Ht 0,60, vrednosti pa so povezane s parcialnim arterijskim tlakom O₂ (slika 9). (16, 20, 21, 22)



Slika 9: Povezava med koncentracijo Hb in parcialnim arterijskim tlakom O₂ pri moških prebivalcih Andov

Dihanje je tesno povezano s porabo energije, saj zagotavlja O₂ in odstranjuje CO₂. Spremembi arterijskih parcialnih tlakov O₂ in CO₂ vplivata na frekvenco dihanja. V nekaj let trajajočih študijah so West in sodelavci (23) pokazali, da je zaradi hiperventilacije na visoki nadmorski višini povišan arterijski parcialni tlak O₂, medtem ko je CO₂ znižan. Hipoksija je razlog za takojšnjo hiperventilacijo, do najvišje frekvence dihanja pa pride v nekaj minutah. Frekvenca nato upada do začetne vrednosti, ki jo doseže najkasneje v eni

uri. Če traja hipoksija daljši čas, frekvenca ponovno začne naraščati po uri ali dveh, in tako narašča do najvišje vrednosti nekaj dni, nato pa začne padati, vendar nikoli ne pade na vrednost frekvence v dolini. Dihanje pri akutni hipoksiji je regulirano s kemoreceptorji. Mehanizem zaznavanja O₂ še ni natančno znan, je pa gotovo, da hipoksija povzroči inhibicijo kalijevih kanalčkov, kar vodi do depolarizacije membrane in vdora kalcijevih ionov. Sprostijo se nevrotransmiterji in pride do stimulacije senzoričnih živcev, ki aktivirajo dihalni center v možganih. Parcialni tlak CO₂ v arterijski krvi, ki vzpodbudi povečanje pljučne ventilacije, je pri posameznikih s Chuvash policitemijo nižji. Ti imajo patološko povečano aktivacijo HIF-ovih ciljnih genov. Tudi odziv dihanja, spodbujen s hipoksijo, je pri njih dosti večji in bolj občutljiv, kar pomeni, da imajo podobne lastnosti, kot hipoksije vajeni posamezniki. Ti rezultati kažejo, da je HIF močno povezan z aklimatizacijo na hipoksijo in z nadzorom dihanja pri posameznikih, ki hipoksičnega okolja niso vajeni. HIF vpliva tudi na aktivacijo genov tirozin-hidroksilaze, ki urejajo sintezo kateholaminskih nevrotransmiterjev v karotidnem telesu in v dihalnem centru možganskega debla. (16, 23)

Akutna hipoksija spodbudi povečanje minutnega volumna srca. Ta ob hipoksiji narašča več dni na račun povišane srčne frekvence. Ko se posameznik aklimatizira, se minutni volumen normalizira, pri tem pa lahko ob nižjem utripnem volumnu srčni utrip ostaja visok. Višja nadmorska višina povzroči v prvih urah zmanjšanje volumna plazme. Število eritrocitov se poveča v približno tednu dni, tudi volumen krvi se kasneje poveča, vendar ni glavni faktor prilagajanja na hipoksijo. Občutno manjša gravitacija (astronavti) zmanjša volumen plazme in število eritrocitov. (24)

V nasprotju z ostalim ožiljem pride pri hipoksiji do konstrikcije pljučnega in tudi možganskega ožilja. Arterijski tlak se zviša, plato pa je dosežen v petih minutah. Ponovno začne naraščati po približno 45-ih minutah in narašča vsaj dve uri. Poleg zvišanja arterijskega tlaka je pri hipoksiji značilna tudi povečana občutljivost odziva pljuč in ožilja na katerekoli dodatne akutne spremembe hipoksije. Pljučna vazokonstrikcija ima velik pomen pri življenju ploda, saj je v maternici perfuzija potrebna le za presnovo pljučnega tkiva, ranžiranje oksigenirane krvi po obtoku ploda pa je olajšano. Pri hipoksiji je ponavadi vazokonstrikcija celotnih pljuč nezaželena. Sčasoma vodi do preoblikovanja žil in pljučne hipertenzije, kar pogosto poslabša stanje pljučnih bolnikov in oteži preživetje bolnikov s kronično obstruktivno pljučno boleznijo. S hipoksijo povzročena hipertenzija je tudi glavni

vzrok obolevnosti prebivalcev na visokih nadmorskih višinah. Napreduje lahko v kronično in subakutno gorsko bolezen, medtem ko lahko pri ostalih osebah pride do pljučnega ali možganskega edema, ki je najpogostejši vzrok smrti povezane z visoko nadmorsko višino. (16)

Čeprav mehanizma pljučne vazokonstrikcije v hipoksiji ne poznamo dobro, je jasno, da imajo gladke mišične celice pljučnih arteriol te lastnosti prirojene in se prilagodijo različnim endotelijskim vazoaktivnim mediatorjem. Hipoksija zavre pretok kalija iz celice, kar povzroči depolarizacijo, vdor kalcija in krčenje. Študije so pokazale, da imajo ljudje s povišanim HIF (Chuvash policitemija) pljučno hipertenzijo, prav tako pa je njihovo pljučno žilje 5 – 10-krat bolj občutljivo in hitreje reagira na hipoksijo. Veliko genov, reguliranih s HIF, je pomembnih pri odgovoru pljučnega žilja na hipoksijo. Najbolj znan je vazokonstriktor endotelin-1 (EDN1), ki je prav tako povišan pri bolnikih s pljučno hipertenzijo. (25)

1.5.2 Problemi pri prilagajanju na hipoksijo

Če se naše telo slabo prilagodi na višino, se pojavijo simptomi akutne višinske bolezni. Začnejo se od 6 do 72 ur po prihodu na višino in po navadi izginejo v dveh do šestih dneh. Simptomi so najhujši zjutraj, verjetno zaradi nižjega srčnega utripa in globine dihanja ponoči. Glavobol je glavni simptom. Slabost, bruhanje, dispnea (zasoplost), izguba apetita, cianoza in nespečnost so drugi pogosti simptomi. Pri akutni višinski bolezni moramo omejiti aktivnost, piti veliko tekočine, če pa simptomi ne ponehajo, lahko pride do edemov. Pri pljučnem edemu so poleg ostalih simptomov prisotni suh kašelj, zvoki tekočine v pljučih, povečan srčni utrip in frekvenca dihanja, plitko dihanje in ataksija, pri možganskem edemu pa se pojavijo še spremembe v stanju zavesti, motnje vida, paraliza, halucinacije in cianoza. V tem primeru se spustimo v dolino, če je možno pa dodajamo bolniku tudi O_2 . (26)

1.5.3 Delitev višjih nadmorskih višin

Visoka nadmorska višina (1500 do 3500 m):

- fiziološki učinki zaradi zmanjšane parcialnega tlaka O_2 pomenijo slabšo vadbena sposobnost in povečano ventilacijo,

- saturacija O₂ v arterijski krvi je višja od 90 %, parcialni tlak O₂ pa se signifikantno zniža,
- zaradi hitrega dviga na visoko nadmorsko višino (2500 do 3500 m) pride pogosto do višinske bolezni.

Zelo visoka nadmorska višina (3500 do 5500 m):

- maksimalna saturacija O₂ v arterijski krvi pade pod 90 %, parcialni tlak O₂ pa pod 60 mm Hg,
- med vadbo, spanjem ali ob prisotnosti pljučnih zapletov (edem) lahko pride do hujše hipoksije,
- na tej višini se pojavljajo hujše oblike višinske bolezni.

Ekstremna nadmorska višina (nad 5500 m):

- značilne za ekstremno nadmorsko višino so hipoksemija, hipokapnija in alkalozna,
- na to nadmorsko višino se človek ne more aklimatizirati, zato nad 5500 m ne najdemo stalnih človeških bivališč. (18)

1.6 VIŠINSKI TRENINGI

Višinski trening pri nizkem parcialnem tlaku O₂ je zelo priljubljena metoda, ki jo uporabljajo športniki z namenom povišanja Ht, saj se v hipoksičnem okolju spodbuja nastajanje rdečih krvničk. Višinski trening je dovoljen in ga ni mogoče prepovedati zaradi naravnih razlogov, saj nekateri športniki tudi običajno živijo v višjih predelih. Umetne pripomočke, ki posnemajo naravne višinske bivanjske razmere (znižan parcialni tlak O₂), bi teoretično lahko prepovedali, ker niso naravni, vendar jih niso, saj jih je mogoče nadzirati. V primerjavi z naravnimi višinskimi razmerami pa umetnih pripomočkov (umetnih višinskih okolij) ne omejujejo naravni pogoji, značilni za določeno nadmorsko višino, zato je njihov parcialni pritisk O₂ ob nenaravnih pogojih lahko zelo nevaren. (27)

1.6.1 Umetno višinsko okolje

Poleg višinskih treningov se za zmanjšanje stroškov in hitrejšega dostopa uporabljajo umetna višinska okolja, ki na nižji nadmorski višini simulirajo hipoksično okolje. Ko smo v hipoksičnem okolju, teče skozi ledvice manj oksigenirana kri, kar je dražljaj za

proizvodnjo EPO, ta pa v kostnem mozgu povzroči tvorbo rdečih krvničk. Če smo v hipoksičnem okolju daljši čas (v njem bivamo, spimo), se poveča viskoznost naše krvi, podobno kot če bi živeli na visoki nadmorski višini. S tem se izboljšajo tudi naši športni rezultati. Dušikove hiše so se razvile v državah, kjer nimajo ugodnih razmer za bivanje na višini (Finska). V njih ni znižan pritisk kot je na višinah, ampak je nižja vsebnost O₂ na račun N₂. Simuliramo lahko nadmorsko višino okoli 2500 m. Lahko so zgrajene povsod, ponavadi pa je to na nižji nadmorski višini. Obstajajo tudi prenosljive, trening v normoksiji pa se lahko začne takoj, ko športniki stopijo iz hiše. Šibka točka je, da so športniki v tem času zdoma. Prav zato se veliko uporabljajo hipoksični šotori, ki so prenosni, torej ga lahko uporabljamo doma. Športniki ga uporabljajo predvsem med spanjem in počivanjem. V šotoru se s patentiranim sistemom ustvari znižan pritisk, in s tem napravi hipoksično okolje, hkrati pa izsesa nastali CO₂. Simulira lahko višine do 4000 m nad morjem. Obstajajo tudi hiše s hipoksično spalnico, ki omogočajo več udobja kot šotor, so pa tudi dosti dražje. V športnih centrih je poleg hipoksičnih (višinskih) sob možna tudi uporaba hipoksičnih telovadnic, kjer imajo poleg nižje koncentracije O₂ še športne rekvizite, trenažerje, sobna kolesa... Poleg dušikovih hiš, hipoksičnih šotorov, sob, telovadnic je na trgu vedno več metod, ki ustvarijo umetno višinsko okolje. (28)

1.6.2 Načini treniranja pri višinskih treningih

Športniki imajo različne programe treniranja za povečanje koncentracije rdečih krvničk. Osnovni programi so poimenovani kot 'živeti visoko – trenirati visoko', 'živeti nizko – trenirati visoko' in 'živeti visoko – trenirati nizko'. 'Visoko' naj bi v tem primeru pomenilo nadmorsko višino med 2000 in 2500 m, 'nizko' pa med 0 in 1250 m nadmorske višine. Višina ne sme biti previsoka, saj lahko pride do akutne višinske bolezni, ki se nato razvije do hujših oblik, kot je pljučni ali možganski edem. Dolina ne pomeni nujno višine morske gladine, važna pa je signifikantna razlika v koncentraciji O₂ med 'visoko' in 'nizko'. 'Živeti visoko – trenirati visoko' pomeni največjo izpostavljenost višini, vendar pa študije niso najbolj naklonjene temu programu, vse manj pa so mu naklonjeni tudi strokovnjaki. 'Živeti nizko – trenirati visoko' pomeni bivanje v dolini, medtem ko se trenira na višjih predelih. Nekaj preizkusov je pokazalo, da bi ta program vadbe lahko deloval, vendar večina študij ne kaže signifikantne razlike v primerjavi s treniranjem in življenjem v dolini. Razlog neuspešnosti teh dveh programov je, da na višji nadmorski višini ne moremo izvajati tako intenzivnih treningov kot v dolini. Zaradi slabe prilagoditve na hipoksično okolje so

treningi manj intenzivni, lahko pa pride tudi do višinske bolezni. Tudi če hipoksijo prenašamo dobro, naši treningi zaradi pomanjkanja O_2 ne bodo tako intenzivni kot na nižji nadmorski višini. Posledično se izgubi mišična masa, telo pa se lahko pretrenira. 'Živeti visoko – trenirati nizko' je program, ki so mu strokovnjaki in športniki najbolj naklonjeni. V številnih študijah se je ta način pokazal kot najuspešnejši od treh programov treniranja. O optimalni dolžini bivanja na višji nadmorski višini je še veliko negotovosti. Učinki višinskih treningov rekreativcev naj bi trajali tako dolgo, kolikor je življenjska doba eritrocitov, in sicer tri do štiri mesece, pri usposabljanju vrhunskih športnikov pa le dva do tri. Torej naj bi se število rdečih krvničk začelo zmanjševati po dveh mesecih, popolnoma pa naj bi učinki izginili v treh do štirih mesecih. (29)

Poleg klasičnega treniranja in bivanja na višini in v dolini poznamo več načinov bivanja in treningov med višinskimi pripravami:

- uporaba gore in doline (bivanje na visoki nadmorski višini in opravljanje težjih treningov v dolini 3 – 4-krat tedensko pomeni za športnike visoke stroške, dolga potovanja do primerne lokacije, lahko pa imajo tudi probleme z zunanjo temperaturo),
- ostati na višini in težje treninge opravljati z O_2 (kadar se ni možno spustiti v dolino za opravljanje težjih treningov, se uporabi ergometer in obrazna maska, ki dovaja zrak obogaten z O_2 , vendar pa to ni možno pri vseh športih),
- bivanje v dušikovi hiši (stroškovno zelo učinkovit način za ekipe),
- počitek in spanje v dušikovem šotoru (je zmerno drag, vendar primerljiv s stroški nastanitve in prevozom v višine),
- dihanje skozi masko z N_2 (dihanje razredčenega zraka z N_2 za uro ali dve večkrat dnevno naj bi stimuliralo povečanje koncentracije EPO v krvi),
- bivanje v veliki barometrični komori (velike jeklene komore, ki so bile narejene za simuliranje letenja na višjih nadmorskih višinah, se v športu ne uporabljajo pogosto, saj so visoki stroški uporabe, so težko dostopne, športniki pa morajo biti zdoma),

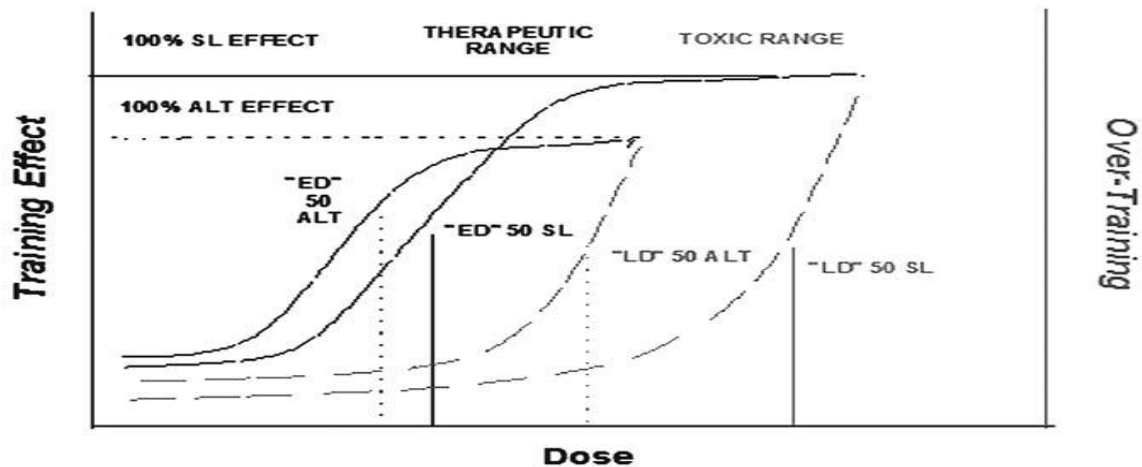
- počitek in spanje v osebni barometrični komori (naprava iz togega valja z okni in vakuumskimi črpalkami se tako kot šotor uporablja doma, vendar je bolj utesnjena, neprenosljiva, manj udobna in dražja).

Tako kot je vedno več umetnih hipoksičnih prostorov, se večja tudi število metod za bivanje in treninge med višinskimi pripravami. (30)

1.6.3 Odziv na višinske treninge

Pri količini in intenzivnosti treningov moramo biti zelo pazljivi, predvsem pri vrhunskih športnikih, ki se pripravljajo na pomembna tekmovanja. Nujna je vrhunska pripravljenost, vendar pa je včasih treba vadbo tudi olajšati, saj je pri pretiravanju možnost poškodb še večja. Na to moramo biti zelo pozorni tudi pri pripravah v hipoksiji. Začetka sigmoidnih krivulj (slika 10) nam kažeta, da zelo nizka stopnja telesne vadbe (počasna hoja) ne da večjega napredka. Ko dosežemo določen prag 'količine' (pogostost, trajanje, intenzivnost), se telo prilagaja, s tem pa dosežemo napredek (maksimalna aerobna moč, vzdržljivost in anaerobna kapaciteta) in boljše rezultate. 'ED' 50 (effective dose 50) je 'količina' treninga, pri kateri dosežemo 50 % maksimalnega učinka treninga. Pri 'količini', kjer učinkovitost treninga doseže plato, pride do vedno bolj pogostih neželenih ali toksičnih učinkov, za kar je razlog pretreniranost. Iz te krivulje je razvidno, da več treninga ne pomeni nujno večje učinkovitosti, ampak lahko tudi škodi. To nam pove druga krivulja, ki kaže naraščanje neželenih učinkov pri povečevanju 'količine' treningov. 'LD' 50 (lethal dose 50) pomeni 'količino' treninga, pri kateri je doseženih 50 % neželenih učinkov. 'Terapevtsko območje' je razpon, v katerem naj bi trenirali. To je interval med 'ED' 50 in platojem. Grafa sta podana za visoko nadmorsko višino (ALT) in dolino (SL). Zaradi hipoksije so maksimalni učinek treninga (plato), 'ED' 50 in 'LD' 50 doseženi na višini pri nižji 'količini' vadbe kot v dolini, zato je sigmoidna krivulja premaknjena v levo in navzdol. Na višini je manjše tudi 'terapevtsko območje', zato je potrebno za učinkovito vadbo brez neželenih učinkov biti bolj pazljiv kot v dolini. (22)

“DOSE-RESPONSE” CONCEPT OF EXERCISE TRAINING & HIGH ALTITUDE



Slika 10: Učinkovitost treninga v odvisnosti od njegove 'količine'

1.6.4 Višinski treningi pri vrhunskih športnikih

Športniki po svetu višinske treninge še vedno uporabljajo kot pomemben del priprav do dobrih rezultatov. V zadnjih petnajstih letih se je nabralo mnogo raziskav z rezultatom, da je način vadbe 'živeti visoko – trenirati nizko' najuspešnejši pri doseganju boljših rezultatov. Pri tem sta najbolj pomembni dve lastnosti tega načina:

- da bivamo dovolj visoko (2000 do 2500 m), dnevno dovolj časa in dovolj dolgo časovno obdobje, da se začnejo in ohranjajo učinki EPO,
- da treniramo dovolj nizko (pod 1250 m), da omogočimo maksimalno izvedeno vadbo visoke intenzivnosti, ki zahteva visoko porabo O₂ pri športniku.

Za vadbo po načinu 'živeti visoko – trenirati nizko' moramo imeti dostop do takega okolja, ustrezen transport, hkrati pa ta način predstavlja velik strošek za profesionalne športnike. Za večji napredek športniki in trenerji iščejo načine, kako bi trenirali in bivali v umetni hipoksiji v dolini. Kot podoben način vadbe so preizkušali tudi vadbo 'spati visoko – trenirati nizko' s pomočjo dušikovih hiš in šotorov. Pri uporabi le-teh je dobro vedeti, kako dolgo, koliko časa dnevno in pri kateri koncentraciji O₂ jih lahko uporabljamo. (30)

Študij, ki poročajo o povečanju števila eritrocitov, retikulocitov, količine Hb, Ht in koncentracije EPO med izpostavljenostjo v hipoksiji, je zelo veliko. Te študije se opravljajo tudi na športnikih. So zelo zahtevne, saj je potrebna ustrezna kontrola, trening pa mora biti tako za kontrolno skupino kot za skupino v hipoksiji enak. Obstaja veliko

razlik med študijami. Dosti je napisanega o napredku tistih športnikov, ki trenirajo v višinah. Pri teh študijah vsi ne uporabijo kontrolne skupine, oziroma je ta sestavljena iz skupine posameznikov, ki sploh niso športniki, ali pa ne ustrezajo pogojem. Tako ne vemo, ali je napredek povezan z nadmorsko višino oz. hipoksijo ali je le posledica težkih treningov. Od pojava višinskih sob je teh študij vedno več, saj je lažje nadzorovati obe skupini, hkrati pa so na voljo tudi ustrezni analizatorji. Nekateri rezultati raziskav poročajo o napredku športnikov in ustreznosti hipoksije med pripravami, spet drugi kažejo neustreznost takih priprav, najdemo pa tudi take, ki govorijo o negativnem vplivu. Pri nekaterih raziskavah pride do povečanega sproščanja EPO, zaznано je tudi povečano število retikulocitov v krvi, rezultatov o povečanju števila eritrocitov, koncentracije Hb in Ht na račun hipoksije pa je pri vrhunskih športnikih zelo malo. Izvedene so bile tudi študije, pri katerih pride do povišanja krvnih parametrov športnikov, vendar pa do izboljšanja njihovih rezultatov ne pride. Možen razlog za to je mišična oslabeledost ali utrujenost, do katerih pride pri vadbi in bivanju v hipoksičnem okolju pogosto. Včasih je možno tudi izboljšanje športnih rezultatov kljub enakim krvnim parametrom, saj študije ne upoštevajo vpliva volumna krvi, ki se med pripravami lahko poveča in močno vpliva na rezultate. Koncentracija rdečih krvnih celic lahko ostane enaka ali pa se ob večjem volumnu krvi zmanjša, seveda pa je celokupna količina eritrocitov povečana, kar omogoča boljšo dostavo O₂. Težko je govoriti tudi o ustrezni dolžini takih priprav. Nekatere raziskave govorijo o uspešnosti že v enem tednu, nekatere pa pozitivnih rezultatov ne dajo tudi po mesecu priprav. Mnenja so deljena tudi o višini bivanja med pripravami: ali mora biti nadmorska višina zelo visoka (5000 m) ali je dovolj že 1500 m. V študijah se uporabljajo tudi različni načini treniranja. Če so priprave uspešne, oziroma je dosežen napredek, jih moramo pred pomembnim nastopom tudi pravilno tempirati. Pred ključnim nastopom moramo zagotoviti dovolj časa za regeneracijo, forma pa mora biti še vedno na vrhuncu, zato je eno od vprašanj tudi, kdaj na višinske priprave oz. koliko časa pred nastopom se je potrebno vrniti s priprav. (31)

2. NAMEN DELA

Z rezultati diplomskega dela bi radi pomagali športnikom do boljših rezultatov na Olimpijskih igrah 2014. Analizirali bomo spremembo rdeče krvne slike in koncentracije EPO pri profesionalnih športnikih. Spremljali bomo vrednosti EPO, Hb, eritrocitov, Ht, retikulocitov, RDW in eritrocitnih indeksov športnikov, ki jih bomo razdelili v dve skupini. Prva skupina (v nadaljevanju skupina 1600) bo trenirala po načinu `živeti nizko (srednje) – trenirati nizko (srednje)`, in sicer bo bivala in trenirala na 1600 m nadmorske višine. Druga skupina (v nadaljevanju skupina 2400) bo trenirala po načinu `živeti visoko – trenirati nizko (srednje)`, in sicer bo bivala v višinski sobi z enako koncentracijo O₂, kot je na nadmorski višini 2400 m, trenirala pa bo skupaj s skupino 1600 na 1600 m nadmorske višine. Krvne vrednosti bomo statistično ovrednotili in preverili, če se pri kateri skupini vrednosti krvnih parametrov pred pripravami in po pripravah statistično značilno razlikujejo. Tako bomo videli vpliv višinskih priprav. Preverili bomo tudi, če se razliki vrednosti krvnih parametrov med skupinama pred in po pripravah statistično značilno razlikujeta, kar nam bo pokazalo vpliv višinske sobe. Z rezultati si bodo športniki lahko pomagali pri načrtovanju priprav.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 PREISKOVANCI

Naši preiskovanci so bili profesionalni slovenski tekači na smučeh, stari od 18 do 27 let. Preiskave na športnikih so potekale v času priprav od 31.5. 2010 do 6.8. 2010. Med preiskavami se je večala intenzivnost in količina treninga. Od 15-ih tekačev, ki so bili na preiskavah, smo pri diplomskem delu uporabili vzorce desetih, saj je ena od preiskovank imela retikulocitopatijo, štirje pa niso oddali vzorca v določenem času oz. njihovi krvni vzorci niso bili ustrezni. Preiskovancem smo vsak dan beležili telesno maso, srčni utrip v mirovanju in trening. Po prihodu vseh športnikov na Roglo 20.6. in 21.6. smo jih 22.6. naključno razdelili v dve skupini glede na bivanje (skupina 1600 in skupina 2400). Višinske priprave na Rogli so trajale do 18.7., nato pa so se preiskovanci vrnil v dolino. Med preiskavami smo športnikom sedemkrat odvzeli vzorce krvi, razen pri dveh, ki sta bila po enkrat odsotna (preglednica I).

Preglednica I: Preiskovanci, nadmorska višina bivanja in datumi odvzemov krvi

Preiskovanec/ spol	skupina	1. odvzem	2. odvzem	3. odvzem	4. odvzem	5. odvzem	6. odvzem	7. odvzem
1/M	1600	9.6. 2010	22.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	14.7. 2010	27.7. 2010	6.8. 2010
2/Ž	1600	15.6. 2010	21.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	12.7. 2010	26.7. 2010	6.8. 2010
3/M	1600	8.6. 2010	22.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	13.7. 2010	27.7. 2010	6.8. 2010
4/M	1600	9.6. 2010	22.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	14.7. 2010	26.7. 2010	6.8. 2010
5/M	1600	8.6. 2010	22.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	14.7. 2010	27.7. 2010	6.8. 2010
6/Ž	2400	9.6. 2010	21.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	13.7. 2010	26.7. 2010	6.8. 2010
7/Ž	2400	8.6. 2010	21.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	12.7. 2010	26.7. 2010	6.8. 2010
8/M	2400	8.6. 2010	22.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	13.7. 2010	X	6.8. 2010
9/M	2400	9.6. 2010	X	28.6. 2010	5.7. 2010	12.7. 2010	27.7. 2010	6.8. 2010
10/M	2400	10.6. 2010	21.6. 2010	28.6. 2010	5.7. 2010	14.7. 2010	26.7. 2010	6.8. 2010

X – športnik je bil odsoten na dan odvzema

višinske priprave

3.2 METODE

Preiskovancem smo odvezemali vzorce na Rogli in v Ljubljani. Rdečo krvno sliko smo analizirali s hematološkim analizatorjem Siemens ADVIA 120 (slika 11). Uporabljamo ga za analizo polne krvi in dobimo rezultate osnovnih hematoloških parametrov. Podajamo nam tudi absolutno in relativno številčno koncentracijo retikulocitov, količino Hb v retikulocitu, trenutno stopnjo dozorelosti retikulocitov, vrednosti eritrocitnih indeksov in RDW. Poleg tega nas opozori na morfološke značilnosti oziroma nepravilnosti. Serumski EPO smo določali s pomočjo analizatorja Personal LAB z metodo ELISA. (32)



Slika 11: Siemens ADVIA 120

3.2.1 Merjenje koncentracije hemoglobina

Analizator določi koncentracijo Hb fotometrično s hemoglobincianidno metodo. Najprej hemolizira eritrocite z Darbkinovim reagentom, da se sprosti Hb. V Darbkinovem reagentu sta KCN in $K_3Fe(CN)_6$, ki nato reagirata s Hb (hemoglobincianidna metoda). Železo najprej oksidira iz fero v feri obliko, nato pa reagira s cianidnimi ioni. Analizator nam fotometrično izmeri koncentracijo rdeče obarvanega produkta pri valovni dolžini 546 nm. Na ta način dobimo koncentracijo Hb v vzorcu.

3.2.2 Analiza eritrocitov

Analizator doda vzorcu reagent, ki vsebuje natrijev dodecilsulfat in glutaraldehid. Pri tem dobijo rdeče krvne celice v vzorcu kroglasto obliko. Konstanten volumen suspenzije celic gre v pretočno celico skozi polje zaznave, v katerega je usmerjen laserski žarek ali žarek vidne svetlobe. Žarek se na površini celic lomi in razprši, prehaja skozi celico ali pa se razprši znotraj celice. Fotodetektor nato meri sipanje laserske svetlobe pri 670 nm. Sipanje pod večjim kotom (5° do 15°) nam pove koncentracijo Hb v eritrocitu, sipanje pod manjšim kotom (2° do 3°) pa nam pove volumen eritrocitov. Eritrociti so vse celice z

volumnom nad 60 fL. Tako dobimo število eritrocitov na liter krvi (št.erc) in MCV. S pomočjo histograma volumnov rdečih krvnih celic aparat določi RDW. Iz teh podatkov dobimo tudi Ht, MCH in MCHC.

$$Ht = \text{št.erc} \times \text{MCV} \quad (8)$$

$$\text{MCH} = (\text{Hb} / \text{št.erc}) \times 10 \quad (9)$$

$$\text{MCHC} = (\text{Hb} / [\text{št.erc} \times \text{MCV}]) \times 1000 \quad (10)$$

3.2.3 Analiza retikulocitov

Analizator doda vzorcu oksazin 750, ki obarva retikulocite zaradi prisotnosti RNA, medtem ko se eritrociti ne obarvajo. Vsaka celica se analizira pod dvema različnima kotoma z lasersko svetlobo. Manjši kot (2^0 - 3^0) določi velikost celice, pri večjem kotu (5^0 - 15^0) pa je absorpcija žarkov odvisna od vsebnosti RNA. Glede na absorbanco aparat poleg ločitve med eritrociti in retikulociti poda tudi zrelost retikulocitov. Zreli retikulociti vsebujejo manj RNA kot nezreli, zato se absorbanca med njimi razlikuje. Aparat določi relativno vrednost retikulocitov glede na eritrocite in absolutno število retikulocitov na liter krvi. (4, 33, 34)

3.2.4 Merjenje koncentracije EPO

Na mikrotitersko ploščico, prevlečeno z EPO protitelesi, naneseemo vzorce. Poleg vzorca analiziramo tudi standarde in kontrole. Po inkubaciji speremo ploščico in tako odstranimo nevezane proteine. Nato dodamo sekundarna protitelesa s peroksidazo, ki se vežejo na konjugat primarno protitelo-EPO. Po ponovnem izpiranju dodamo substrat, ki ob prisotnosti preoksidaze povzroči barvno reakcijo. Koncentracija EPO v vzorcu je sorazmerna količini nastalega obarvanega produkta, ki jo določimo z merjenjem absorbanke pri 450 nm. (35)

3.2.5 Statistična obdelava:

- **graf povprečnih vrednosti odvzemov**

Za boljši pregled smo s programom Microsoft Excel izrisali grafe za obe skupini za vsak parameter krvi, kar kaže spreminjanje vrednosti med preiskavo.

- **sprememba vrednosti parametrov pred in po pripravah za vsako skupino**

V prvem delu smo primerjali krvne parametre vsake skupine športnikov posebej, in sicer vrednosti pred pripravami in po pripravah. Z uporabo programa Microsoft Excel smo izvedli parni t-test pri tveganju 5 % ($\alpha=0,05$). Tako smo ugotovili, ali se vrednosti pred in po pripravah statistično značilno razlikujejo.

- **primerjava sprememb vrednosti parametrov pred in po pripravah med obema skupinama**

V drugem delu smo primerjali skupini 1600 in 2400 med sabo, in sicer smo ugotavljali ali se spremembe vrednosti parametrov pred in po pripravah statistično značilno razlikujejo pri tveganju 5 % ($\alpha=0,05$). Z Microsoft Excel-om smo najprej izvedli F-test in ugotovili enakost varianc. Na podlagi tega smo izvedli še t-test enakih oziroma različnih varianc, ki je pokazal vpliv višinske sobe na krvne parametre.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz naših meritev smo dobili podatke o krvi preiskovancev, s katerimi smo si pomagali do končnih rezultatov in ugotovitev. Meritve so bile opravljene na Inštitutu za šport v Ljubljani in na Rogli. Izračunali smo povprečno vrednost in relativno standardno deviacijo (RSD) vsakega odvzema ter razliko med sedmim in prvim odvzemom vsakega preiskovanca. Povprečne vrednosti odvzemov skrijejo vrednosti posameznikov, ki se ponekod močno razlikujejo od povprečja, kar nam kaže tudi visok RSD. Najvišje vrednosti RSD so v preglednicah EPO in retikulocitov (preglednice II, III, XVIII, XIX, XX, XXI). Pri teh dveh krvnih parametrih je interval normalnih vrednosti zelo širok, zato pride med posamezniki do večjih odstopanj. Odstopanja so pri vseh parametrih posledica različnih dejavnikov (spol, pripravljenost, počutje, utrujenost...). Zmanjšali bi jih lahko s pogostejšimi odvzemi in večjim številom preiskovancev.

4.1 ERITROPOETIN

V preglednicah II in III so vrednosti EPO v krvi naših preiskovancev.

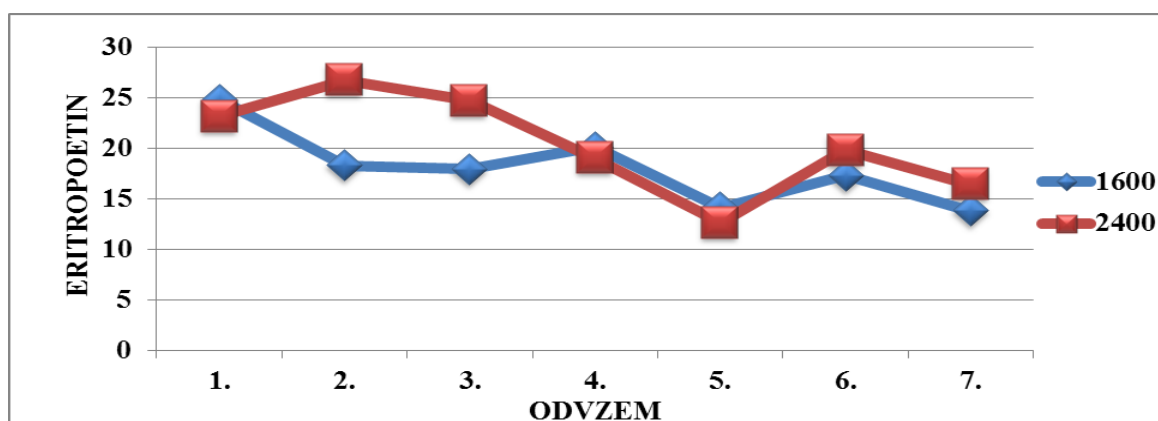
Preglednica II: Vrednosti EPO (I.U./mL) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							Δ (7.-1.)
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
1/M	23,8	15,2	14,5	20,5	17,7	13,3	12,2	-11,6
2/Ž	25,4	19,8	14,2	16,3	9,2	20,1	13,5	-11,9
3/M	18,3	14,5	17,9	14,1	11,4	15,9	11,8	-6,5
4/M	26,4	17,7	20,5	20,9	14,4	15,0	16,3	-10,1
5/M	30,2	24,5	22,3	28,6	17,6	22,3	15,4	-14,8
povprečje	24,8	18,3	17,9	20,1	14,1	17,3	13,8	-11,0
RSD (%)	17,5	22,0	20,0	27,6	26,7	21,6	14,2	/

Preglednica III: Vrednosti EPO (I.U./mL) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	22,7	34,3	23,3	16,0	9,7	17,1	15,0	-7,7
2/Ž	34,0	35,3	26,3	27,1	13,7	27,8	24,6	-9,4
3/M	18,3	11,4	32,6	12,9	4,8	/	11,3	-7,0
4/M	16,2	/	17,7	9,5	4,4	10,6	12,8	-3,4
5/M	24,1	25,7	23,4	29,3	30,4	23,7	18,2	-5,9
povprečje	23,1	26,7	24,7	19,0	12,6	19,8	16,4	-6,7
RSD (%)	29,9	41,4	22,0	46,2	84,6	38,1	32,2	/

Graf 1 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic II in III.



Graf 1: Povprečne koncentracije EPO (I.U./mL) športnikov med preizkusom

V času priprav je koncentracija EPO pri skupini 1600 padala. Izstopa visoka vrednost pri 1. odvzemu, ko so športniki trenirali še v dolini. Zanimivo bi bilo imeti podatke o treningih pred odvzemom. Opazimo tudi manjši dvig pri 4. in 6. odvzemu, sicer pa v času višinskih priprav ni bilo videti povečane potrebe po eritropoezi, kar pomeni, da športniki niso občutili hujše hipoksije na 1600 m. Pri skupini 2400 je pri 2. odvzemu viden dvig koncentracije EPO, kar pomeni, da je bila eritropoeza na višini pospešena. Podobno kot pri skupini 1600, je tudi tu opazen dvig po prihodu z višinskih priprav (6. odvzem). Možen vzrok za dvig je lahko zmanjšanje pretoka krvi zaradi višje vsebnosti O₂ v zraku. Če je to zmanjšanje pretirano, pride do pomanjkanja O₂ v tkivih, kar je vzrok za povečano sproščanje EPO. Morda bi graf še boljše razumeli, če bi vedeli totalno vrednost EPO in volumen krvi. Zaradi intenzivne vadbe namreč predvidevamo, da se je volumen krvi med pripravami povečal. To bi lahko bil eden od razlogov za nizke vrednosti EPO na koncu

priprav. Če primerjamo obe krivulji, se te vrednosti najbolj razlikujejo pri 2. in 3. odvzemu, kar smo tudi pričakovali (graf 1).

4.1.1 Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino

Preglednica IV: Razlika v koncentraciji EPO (I.U./mL) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>		<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	24,82	13,84	Mean	23,06	16,38
Variance	18,832	3,863	Variance	47,653	27,852
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	8,10912		t Stat	6,69542	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Pri obeh skupinah je prišlo do statistično značilne razlike v koncentraciji EPO pred in po pripravah ($\alpha=0,05$). EPO v krvi je močno padel pod raven začetne koncentracije, kar je glede na pretekle študije presenetljivo. V skupini 1600 je koncentracija EPO (I.U./mL) padla s 24,8 na 13,8, v skupini 2400 pa s 23,1 na 16,4. Naši rezultati kažejo signifikantno zmanjšanje koncentracije EPO po višinskih pripravah (preglednica IV). Razlog za to zmanjšanje je verjetno visoka vrednost na začetku priprav v dolini. Če bi odvzem krvi naredili še pred začetkom priprav, bi bila vrednost verjetno zelo podobna tisti na koncu. Pričakovali smo večji dvig na začetku višinskih priprav, predvsem v skupini 2400, nato pa padec do približno začetne vrednosti. Glede na večanje intenzivnosti in količino treninga med pripravami težko zaključimo, da bi bile priprave premalo zahtevne, čeprav ne vemo, kakšen režim treninga so imeli športniki pred preiskavami. Velika možnost je, da so športniki začeli s težkimi treningi tik pred 1. odvzemom na začetku preiskave, na katere niso bili vrhunsko pripravljene. To bi pojasnilo visoko vrednost pri 1. odvzemu. Zanimiv je predvsem padec EPO na koncu, ki pomeni, da športniki kljub vse težjim pripravam niso več občutili potrebe po povečanju eritropoeze, za kar so verjetno vzrok težki treningi že na začetku raziskave. EPO vrednosti pred in po pripravah ne vplivajo dosti na pripravljenost športnika. Pomembni so dvigi teh vrednosti na začetku višinskih priprav (2. in 3. odvzem), kjer najbolj naraste tudi število retikulocitov. Ponavadi posledično naraste tudi število

eritrocitov, Hb in Ht, kar je bistveno za izboljšanje rezultatov. Vrednosti teh parametrov so najvišje približno teden dni po padcu EPO, ko eritropoeza ni več stimulirana.

4.1.2 Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama

Ko primerjamo vrednosti skupin med sabo, povečanje volumna krvi zaradi vadbe ne bi smelo imeti velikega pomena na rezultate, saj sta skupini trenirali skupaj, torej sklepamo na enak dvig volumna krvi pri obeh skupinah. Možen pa je vpliv, kadar je ena od skupin slabše pripravljena na napore. Takrat je pri slabše pripravljene skupini povečanje volumna bolj izrazito, učinki eritropoeze pa so vidni kasneje.

Preglednica V: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi koncentracije eritropoetina (I.U./mL) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	10,98	6,68
Variance	9,167	4,977
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	1,84187	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	7,072	
df	8	
t Stat	2,55663	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Vrednost EPO (I.U./mL) se je pri skupini 1600 zmanjšala za povprečno 11,0 pri skupini 2400 pa za povprečno 6,7. V času priprav je prišlo do statistično značilne razlike v sproščanju EPO med skupinama ($\alpha=0,05$), torej je bivanje v višinski sobi med pripravami vplivalo na koncentracijo EPO v krvi profesionalnih športnikov (preglednica V). Naši rezultati kažejo predvsem manjši padec EPO skupine v višinski sobi, kar pomeni bolj stimulirano eritropoezo tudi ob koncu priprav. Kot smo omenili že v prvem delu pri EPO, so tudi pri primerjavi med skupinama bolj pomembne vrednosti takoj po začetku višinskih priprav, kjer naj bi bila eritropoeza najbolj izrazita. Ko so preiskovanci začeli z višinskimi

pripravami, je bilo v skupini 2400 nastajanje eritrocitov bolj stimulirano, zato bi po prihodu s priprav pričakovali večji padec v tej skupini. Sklepamo lahko slabšo pripravljenost skupine 2400, saj je vrednost EPO višja tudi na koncu preiskave, ko sta imeli obe skupini enake pogoje. Zanimiva je tudi zelo stimulirana eritropoeza še pred višinskimi pripravami (1. odvzem), vrednost Epo pa je pri skupini 1600 malenkost višja (graf 1). To bi lahko bil razlog za nižje vrednosti po prihodu z višine. Tudi ta vrednost je lahko višja zaradi slabše pripravljenosti skupine 2400. Možno je, da se je volumen v tej skupini bolj izrazito povečal.

4.2 ERITROCITI, HEMOGLOBIN IN HEMATOKRIT

V preglednicah VI in VII so vrednosti eritrocitov v krvi naših preiskovancev.

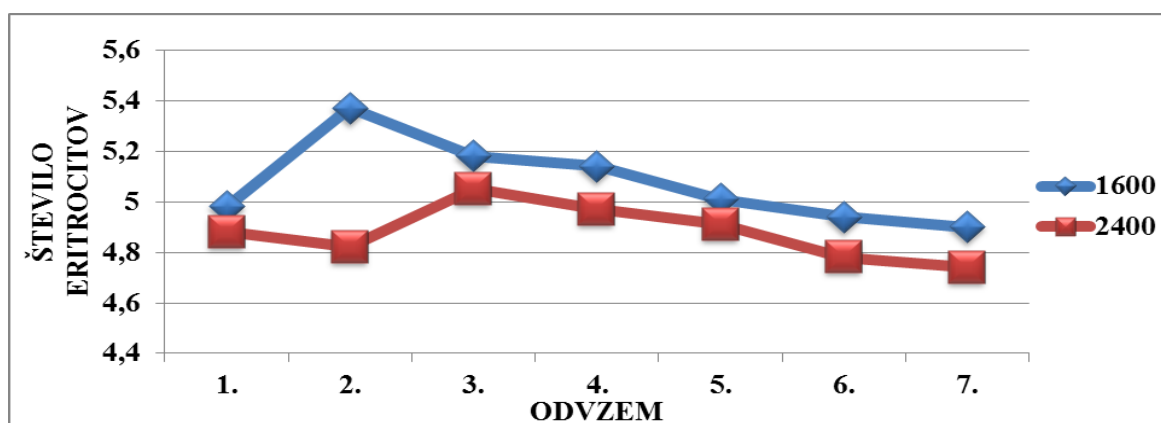
Preglednica VI: Število eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/M	5,04	5,37	5,21	5,01	4,79	4,75	4,70	-0,34
2/Ž	4,26	4,64	4,62	4,65	4,62	4,57	4,49	0,23
3/M	5,04	5,76	5,52	5,54	5,28	5,27	5,12	0,08
4/M	5,36	5,71	5,54	5,31	5,21	5,16	5,14	-0,22
5/M	5,19	5,39	5,03	5,18	5,13	4,95	5,07	-0,12
povprečje	4,98	5,37	5,18	5,14	5,01	4,94	4,90	-0,07
RSD (%)	8,5	8,3	7,4	6,5	5,7	5,8	6,0	/

Preglednica VII: Število eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	4,71	4,68	4,81	5,04	4,93	4,48	4,59	-0,12
2/Ž	4,18	4,33	4,57	4,30	4,15	4,25	4,15	-0,03
3/M	5,03	5,24	5,26	5,15	5,18	/	4,87	-0,16
4/M	5,54	/	5,47	5,36	5,26	5,35	5,24	-0,30
5/M	4,96	5,01	5,13	5,02	5,03	5,03	4,85	-0,11
povprečje	4,88	4,82	5,05	4,97	4,91	4,78	4,74	-0,14
RSD (%)	10,2	8,2	7,1	8,1	9,0	10,5	8,5	/

Graf 2 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic VI in VII.



Graf 2: Povprečno število eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) v krvi športnikov med preizkusom

V preglednicah VIII in IX so vrednosti Hb v krvi naših preiskovancev.

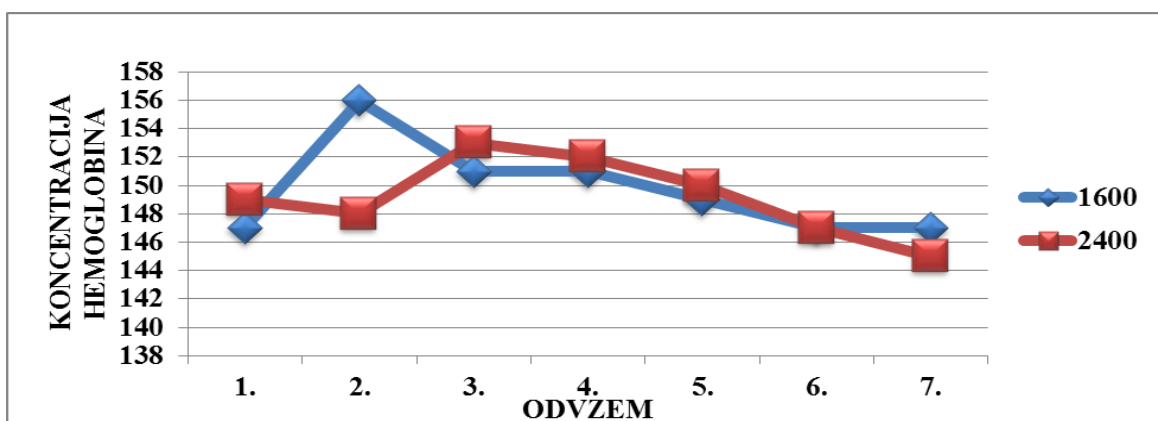
Preglednica VIII: Koncentracija Hb (g/L) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							$\Delta (7.-1.)$
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
1/M	145	151	147	141	142	136	138	-7
2/Ž	128	137	138	138	140	134	139	11
3/M	150	167	161	162	154	157	151	1
4/M	157	163	159	155	153	154	151	-6
5/M	156	160	152	157	156	152	156	0
povprečje	147	156	151	151	149	147	147	0
RSD (%)	8,0	7,7	6,2	7,0	5,0	7,3	5,5	/

Preglednica IX: Koncentracija Hb (g/L) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							$\Delta (7.-1.)$
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
1/Ž	146	144	148	151	147	140	140	-6
2/Ž	128	131	141	133	132	130	131	3
3/M	156	163	162	164	159	/	152	-4
4/M	162	/	158	155	155	160	153	-9
5/M	152	152	156	155	158	157	151	-1
povprečje	149	148	153	152	150	147	145	-3
RSD (%)	8,7	9,1	5,5	7,5	7,5	9,7	6,6	/

Graf 3 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic VIII in IX.



Graf 3: Povprečna koncentracija Hb (g/L) v krvi športnikov med preizkusom

V preglednicah X in XI so vrednosti Ht v krvi naših preiskovancev.

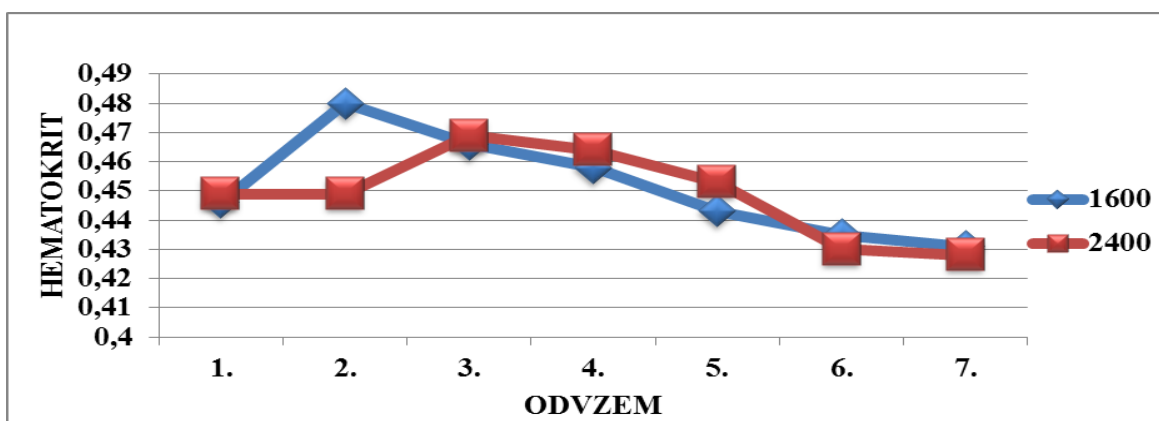
Preglednica X: Ht v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/M	0,448	0,475	0,459	0,448	0,414	0,417	0,412	-0,036
2/Ž	0,378	0,416	0,417	0,419	0,414	0,401	0,394	0,016
3/M	0,455	0,514	0,493	0,491	0,476	0,457	0,450	-0,005
4/M	0,478	0,506	0,497	0,467	0,452	0,454	0,448	-0,030
5/M	0,471	0,488	0,464	0,467	0,457	0,444	0,452	-0,019
povprečje	0,446	0,480	0,466	0,458	0,443	0,435	0,431	-0,015
RSD (%)	8,9	8,1	6,9	5,9	6,2	5,6	6,2	/

Preglednica XI: Ht v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	0,426	0,427	0,441	0,463	0,451	0,405	0,402	-0,024
2/Ž	0,401	0,411	0,432	0,414	0,398	0,398	0,385	-0,016
3/M	0,480	0,503	0,504	0,490	0,494	/	0,453	-0,027
4/M	0,485	/	0,493	0,485	0,471	0,466	0,461	-0,024
5/M	0,453	0,454	0,477	0,466	0,452	0,451	0,437	-0,016
povprečje	0,449	0,449	0,469	0,464	0,453	0,430	0,428	-0,021
RSD (%)	8,0	9,0	6,8	6,5	7,8	7,8	7,7	/

Graf 4 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic X in XI.



Graf 4: Ht v krvi športnikov med preizkusom

Grafi (2, 3 in 4) za število eritrocitov, koncentracijo Hb in Ht so zelo podobni. Pri skupini 1600 so bile najvišje vrednosti že na začetku višinskih priprav (2. odvzem), pri skupini 2400 pa malo kasneje (3. odvzem), kar lahko povežemo z visokimi vrednostmi EPO pri 1. oziroma 2. odvzemu (graf 1). Na začetku vzponov sicer lahko pride do zmanjšanja volumna krvi, vendar ne v taki meri, da bi to bil glavni vzrok za porast pri 2. odvzemu. Poleg tega se volumen krvi z redno vadbo povečuje. V tem času smo že opazili vpliv eritropoeze zaradi priprav. Ta je bila pri skupini 1600 najbolj intenzivna že pred višinskimi pripravami, saj dvig pri 2. odvzemu še ni bil posledica hipoksije, ampak verjetno težkih treningov. V skupini 2400 so bile najvišje vrednosti pri 3. odvzemu, kjer smo opazili vpliv višinskih priprav. V tej skupini so bile presenetljivo nizke vrednosti pri 2. odvzemu, kar lahko pomeni povečanje volumna krvi zaradi vadbe. Ta porast je bolj viden pri slabše pripravljenih športnikih, pri katerih šele kasneje pride do vidnega povečanja koncentracije rdečih krvničk. Iz grafa lahko sklepamo, da je skupina 2400 bila slabše pripravljena. Vrednosti so po začetnem dvigu do konca raziskav močno padale. Dodaten vzrok za visok padec teh vrednosti na koncu je lahko tudi sekundarno povečanje volumna po vrnitvi v dolino, saj se poleg povišanja števila rdečih krvnih celic ponavadi poveča tudi volumen plazme (grafi 2, 3, 4).

4.2.1 Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino

Preglednica XII: Razlika v številu eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	4,978	4,904	Mean	4,884	4,74
Variance	0,17852	0,08573	Variance	0,24583	0,1624
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		Df	4	
t Stat	0,72162		t Stat	3,24766	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Preglednica XIII: Razlika v koncentraciji Hb (g/L) pred in po priprava (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	147,2	147	Mean	148,8	145,4
Variance	138,7	64,5	Variance	169,2	92,3
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	0,0622		t Stat	1,64731	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Preglednica XIV: Razlika v Ht pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	0,446	0,4312	Mean	0,449	0,4276
Variance	0,00159	0,00071	Variance	0,00128	0,00108
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	1,58545		t Stat	9,42082	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Število eritrocitov in vrednost Ht sta se v skupini 2400 signifikantno zmanjšali ($\alpha=0,05$). Število eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) se je znižalo s 4,88 na 4,74, Ht pa je padel z vrednosti 0,449 na 0,428. Pri ostalih vrednostih do statistično značilnih razlik ni prišlo (preglednice XII,

XIII, XIV). Če opazujemo krivuljo EPO (graf 1), bi sklepali na dvig teh vrednosti, kar se je zgodilo le na začetku višinskih priprav, a kot kaže, eritropoeza kasneje ni bila dovolj stimulirana. Pri preteklih študijah se je večkrat kljub nizki vrednosti EPO število rdečih krvničk večalo ali ostalo enako. Pri profesionalnih športnikih bi bil signifikanten dvig težko dosegljiv, zanimivo pa je, da so se po naših podatkih znižale vrednosti tistih, ki so imeli težje pogoje (nižji delež O_2 v okolju), za kar je pravi razlog težko odkriti. Lahko sklepamo, da se je pri športnikih povečal volumen krvi, zaradi česar se koncentracije kljub povečanju števila lahko zmanjšajo. Ker to še ni razlog, da je koncentracija padla samo pri eni skupini, lahko tudi v tem primeru za skupino 2400 sklepamo, da je bila slabše pripravljena. V tem primeru se je pri tej skupini najprej močno povečal volumen krvi, kar je razlog za upad števila eritrocitov in Ht. Po prihodu z višine je možno povečanje volumna krvi v nižini, vendar ne v taki meri. Razlika pred in po pripravah bi vseeno ostala opazna, tudi če se volumen zaradi nadmorske višine ni spremenil. Težko je govoriti tudi o pretreniranosti, za kar bi potrebovali tudi podatke o njihovem napredku na treningih. Volumen se je verjetno povečeval že skozi celotno raziskavo, saj je vpliv vadbe na volumen krvi v splošnem večji kot vpliv spremembe nadmorske višine. Tako bi s pomočjo volumna krvi lahko dobili celokupno količino eritrocitov in Hb, ki sta se morda povišali kljub manjši koncentraciji. Rezultati kažejo, da so višinske priprave pri eni od obeh skupin statistično značilno zmanjšale število eritrocitov in vrednost Ht. Tudi pri teh parametrih bi bilo dobro videti krvne vrednosti še pred začetkom preiskave oz. pred začetkom rednih treningov.

4.2.2 Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama

Preglednica XV: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi števila eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0,074	0,144
Variance	0,05258	0,00983
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	5,34893	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	0,03121	
df	8	
t Stat	0,62655	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Število eritrocitov ($10^{12} \times L^{-1}$) se je v času priprav v skupini 1600 zmanjšalo za povprečno 0,07, v skupini 2400 pa za povprečno 0,14. Do statistično značilnih razlik v spremembi števila eritrocitov med skupinama v času priprav ni prišlo (preglednica XV), torej bivanje v višinski sobi ni vplivalo na število eritrocitov ($\alpha=0,05$). Število se je zmanjšalo pri obeh skupinah verjetno zaradi povečanja volumna krvi med pripravami, tako da je kljub zmanjšanju števila eritrocitov možno povečanje celokupne količine, kar pa na razliko med skupinama ne vpliva. Pričakovali smo, da se bo število eritrocitov v skupini 2400 bolj povečalo oziroma manj zmanjšalo v primerjavi s skupino 1600. Seveda je signifikanten dvig pri tako urjenih športnikih težko dosegljiv, vseeno pa so rezultati presenetljivi. Če gledamo krivuljo eritrocitov (graf 2), vidimo po začetnem dvigu strmo padanje, za kar je pri vedno težjih treningih pogost razlog pretreniranost. Da bi to potrdili, bi potrebovali več podatkov o treningih. Padec je viden pri obeh skupinah, vendar je pri skupini 2400 bolj izrazit. Ponovno lahko sumimo slabšo pripravljenost te skupine že na začetku priprav, kar pa lahko sklepamo tudi po začetnem padcu števila eritrocitov. To pomeni, da se je verjetno na začetku priprav močno povečal volumen plazme pri tej skupini, kar je značilno v

začetnem obdobju priprav, ko športniki na napore niso pripravljene in se učinki eritropoeze še ne poznajo. V skupini 1600 je število eritrocitov na začetku višinskih priprav močno narastlo, to pa pomeni, da se volumen plazme verjetno ni močno povečal, za kar je lahko vzrok boljša pripravljenost te skupine na napore. Tako se pri tej skupini dobro vidi pospešena eritropoeza na začetku višinskih priprav.

Preglednica XVI: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi koncentracije Hb (g/L) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0,2	3,4
Variance	51,7	21,3
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	2,42723	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	36,5	
df	8	
t Stat	0,83748	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Povprečna vrednost Hb (g/L) je v skupini 1600 ostala enaka, v skupini 2400 pa je padla za 3. Kljub temu razliki v spremembi vrednosti nista statistično signifikantni (preglednica XVI), torej višinska soba ni vplivala na koncentracijo Hb v krvi ($\alpha=0,05$). Kot pri eritrocitih, lahko tudi pri Hb sklepamo na večji porast volumna krvi pri skupini 2400, verjetno zaradi slabše pripravljenosti. Kljub večjemu padcu koncentracije Hb je zato možen večji porast celokupnega Hb v primerjavi s skupino 1600, kar bi pomenilo tak rezultat kot smo pričakovali.

Preglednica XVII: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi vrednosti Ht med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0,0148	0,0214
Variance	0,00044	2,6 x 10 ⁻⁵
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	16,8876	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
df	4	
t Stat	0,68698	
t Critical two-tail	2,77645	

Varianci sta statistično značilno različni.

Povprečna vrednost Ht v skupini 1600 se je zmanjšala za 0,015, v skupini 2400 pa za 0,021. Razlika ni signifikantna (preglednica XVII), tako da višinska soba ni vplivala na Ht ($\alpha=0,05$). Razlogi so lahko enaki, kot pri številu eritrocitov in koncentraciji Hb, torej slabša pripravljenost skupine 2400 na začetku, posledično pa večji porast volumna krvi. Kot smo že prej omenili, bi statistično značilno razliko pri takšnih športnikih težko pričakovali.

4.3 RETIKULOCITI

V preglednicah XVIII in XIX so števila retikulocitov v krvi naših preiskovancev.

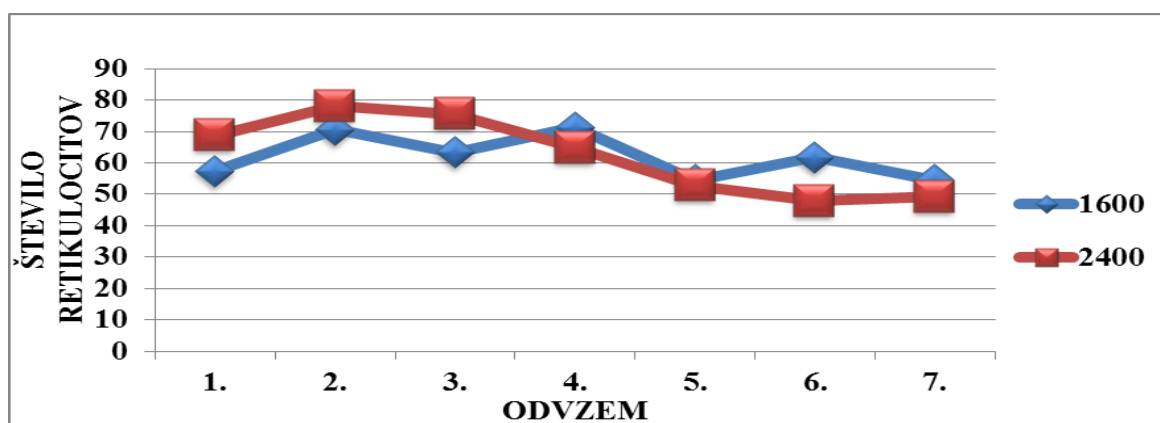
Preglednica XVIII: Število retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/M	35,3	38,3	41,5	41,9	37,2	49,6	37,3	2,0
2/Ž	87,2	105,7	83,9	66,1	76,7	58,8	74,6	-12,6
3/M	42,7	71,9	55,2	76,5	54,3	96,9	46,8	4,1
4/M	61,6	60,8	74,4	75,6	56,4	56,6	57,7	-3,9
5/M	59,8	76,1	61,5	96,3	47,5	46,6	55,8	-4,0
povprečje	57,3	70,6	63,3	71,3	54,4	61,7	54,4	-2,9
RSD (%)	35,1	34,7	26,1	27,7	26,7	32,9	25,5	/

Preglednica XIX: Število retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	$\Delta (7.-1.)$
1/Ž	90,8	80,3	73,1	52,0	52,6	51,4	53,7	-37,1
2/Ž	47,4	57,5	49,8	44,8	54,2	41,4	30,7	-16,7
3/M	77,0	75,2	95,2	103,5	52,1	/	46,4	-30,6
4/M	72,5	/	84,4	73,0	56,4	58,5	61,5	-11,0
5/M	55,7	98,9	74,8	51,1	48,9	39,9	53,8	-1,9
povprečje	68,7	78,0	75,5	64,9	52,8	47,8	49,2	-19,5
RSD (%)	25,2	21,8	22,3	37,1	5,2	18,4	23,7	/

Graf 5 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic XVIII in XIX.



Graf 5: Število retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) v krvi športnikov med preizkusom

V preglednicah XX in XXI so relativna števila retikulocitov v krvi naših preiskovancev.

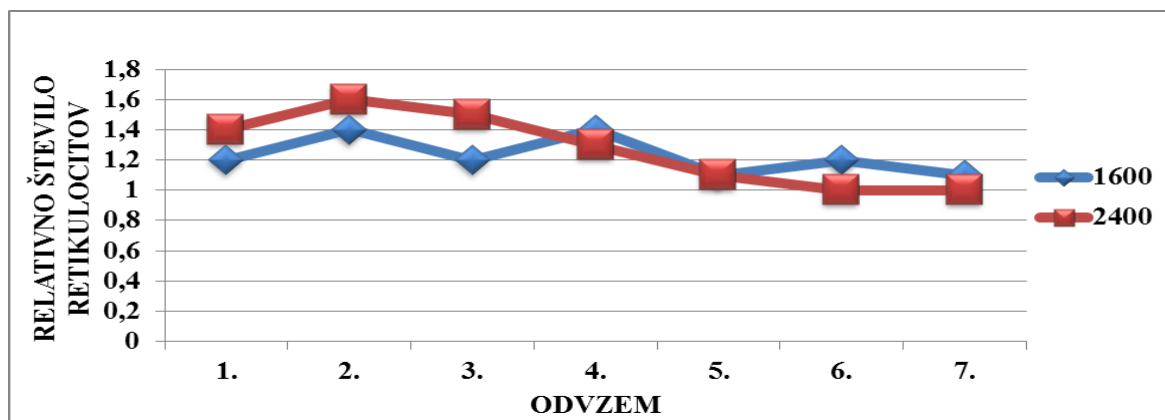
Preglednica XX: Relativno število retikulocitov (%) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	$\Delta (7.-1.)$
1/M	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	1,0	0,8	0,1
2/Ž	2,1	2,3	1,8	1,4	1,7	1,3	1,7	-0,4
3/M	0,9	1,3	1,0	1,4	1,0	1,8	0,9	0,0
4/M	1,2	1,1	1,3	1,4	1,1	1,1	1,1	-0,1
5/M	1,2	1,4	1,2	1,9	0,9	0,9	1,1	-0,1
povprečje	1,2	1,4	1,2	1,4	1,1	1,2	1,1	-0,1
RSD (%)	45	42	31	28	32	30	32	/

Preglednica XXI: Relativno število retikulocitov (%) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	1,9	1,7	1,5	1,0	1,1	1,2	1,2	-0,7
2/Ž	1,1	1,3	1,1	1,0	1,3	1,0	0,7	-0,4
3/M	1,5	1,4	1,8	2,0	1,0	/	1,0	-0,5
4/M	1,3	/	1,5	1,4	1,1	1,1	1,2	-0,1
5/M	1,1	2,0	1,5	1,0	1,0	0,8	1,1	0,0
povprečje	1,4	1,6	1,5	1,3	1,1	1,0	1,0	-0,3
RSD (%)	24	20	17	34	11	17	21	/

Graf 6 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic XX in XXI.



Graf 6: Relativno število retikulocitov (%) v krvi športnikov med preizkusom

Oba grafa retikulocitov (graf 5 in 6) sta zelo podobna, kar kaže tudi normalno število glede na eritrocite. Krivulja skupine 1600 ne kaže bistvenih nihanj, opazni so le rahli dvigi (2., 4. in 6. odvzem). Skupina 2400 kaže nihanje, ki je vpliv EPO (graf 1). Vidimo pospešeno eritropoezo na začetku višinskih priprav, ki pri skupini 1600 ni vidna kljub visoki vrednosti EPO in rdečih krvnih celic. Dvig pri skupini 2400 lahko povežemo tudi s porastom eritrocitov, Hb in Ht (graf 2, 3 in 4). Po začetnem dvigu sledi padec, manjši dvig pa je ponovno opažen na koncu raziskav (7. odvzem), podobno kot pri EPO.

4.3.1 Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino

Preglednica XXII: Razlika v številu retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	57,32	54,44	Mean	68,68	49,22
Variance	403,977	192,763	Variance	298,607	135,697
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	0,98985		t Stat	3,03394	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Preglednica XXIII: Razlika v relativnem številu retikulocitov (%) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	1,22	1,12	Mean	1,38	1,04
Variance	0,287	0,122	Variance	0,112	0,043
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	1,19523		t Stat	2,63891	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

V skupini 2400 je prišlo do statistično značilne razlike v številu retikulocitov pred in po pripravah, torej so višinske priprave število signifikantno znižale ($\alpha=0,05$). Število retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) je padlo s 68,7 na 49,2. Nizke vrednosti na koncu so lahko posledica začetnega porasta retikulocitov, zaradi česar je bila na koncu raziskav nižja potreba po eritropoezi. Ostali trije testi ne kažejo signifikantnih razlik (preglednica XXII in XXIII). Tako kot pri EPO, začetne in končne vrednosti retikulocitov nimajo velikega pomena na športne rezultate. Da se izboljšuje pripravljenost športnikov, nam pokaže dvig vrednosti na začetku višinskih priprav. Ta pričakovan dvig, ki mu sledi padec, je bil viden le pri skupini 2400. Skupina 1600 nam večjih nihanj ne pokaže, čeprav bi po grafih EPO (graf 1) in rdečih krvničk (grafi 2, 3, 4) pričakovali, da bo število na začetku večje, nato pa padalo do konca priprav. Relativna vrednost retikulocitov se statistično značilno ne

zmanjša niti pri skupini 2400, kar pomeni, da se je poleg števila retikulocitov zmanjšalo tudi število eritrocitov. Tako kot vse krvne parametre, bi tudi spremembe retikulocitov lažje razložili, če bi imeli podatke o krvi športnikov še pred začetkom priprav. Verjetno so bile vrednosti pred pripravami podobne tistim na koncu, ko pri športnikih ni bilo večje potrebe po eritropoezi.

4.3.2 Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama

Preglednica XXIV: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi števila retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	2,88	19,46
Variance	42,327	205,703
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	4,85985	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	124,015	
df	8	
t Stat	2,35406	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Število retikulocitov ($10^9 \times L^{-1}$) je med pripravami v skupini 1600 padlo za 2,9, v skupini 2400 pa za 19,5. Razlika je signifikantna (preglednica XXIV), torej je višinska soba vplivala na število retikulocitov ($\alpha=0,05$). Prišlo je do hitrega dviga števila retikulocitov v skupini 2400 na začetku višinskih priprav, nato pa je število močno padlo, verjetno zaradi zmanjšane potrebe, saj so se posamezniki na koncu že prilagodili na hipoksijo. Seveda lahko poleg višinske sobe sumimo tudi druge razloge za spremembe. Kot pri prejšnjih testih, bi lahko tudi pri tem na razliko vplivala morebitna slabša pripravljenost skupine 2400. Število retikulocitov je bilo višje v tej skupini že pri 1. odvzemu, ko sta obe skupini trenirali skupaj in bivali v dolini.

Preglednica XXV: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi relativnih vrednosti retikulocitov (%) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0,1	0,34
Variance	0,035	0,083
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	2,37143	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	0,059	
df	8	
t Stat	1,56227	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Povprečni vrednosti relativnega števila retikulocitov (%) sta se v času raziskav zmanjšali za 0,1 pri skupini 1600 in za 0,3 pri skupini 2400, kar ne pomeni signifikantne razlike ($\alpha=0,05$). Višinska soba ni vplivala na relativno število retikulocitov. Opazimo lahko, da je sprememba števila retikulocitov vplivala na spremembo števila eritrocitov, ki se je prav tako znižalo. To je razlog, da do statistično značilne razlike ne pride (preglednica XXV).

4.4 ERITROCITNI INDEKSI

V preglednicah XXVI in XXVII so vrednosti MVC v krvi naših preiskovancev.

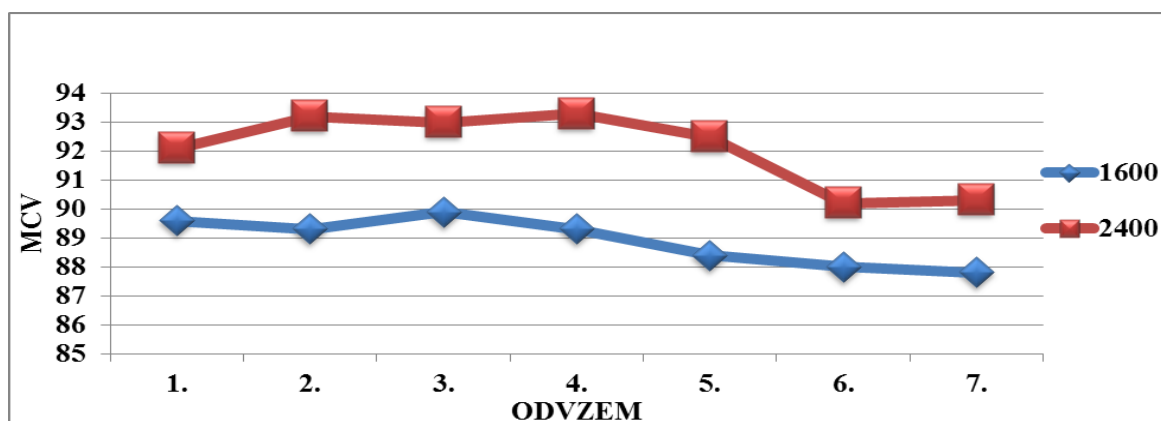
Preglednica XXVI: MCV (fL) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/M	89,0	88,5	88,1	89,3	86,4	87,8	87,5	-1,5
2/Ž	88,7	89,7	90,2	90,2	89,6	87,7	87,6	-1,1
3/M	90,4	89,3	89,4	88,7	90,1	86,7	87,8	-2,6
4/M	89,2	88,6	89,7	88,0	86,7	88,1	87,1	-2,1
5/M	90,9	90,5	92,3	90,2	89,1	89,8	89,2	-1,7
povprečje	89,6	89,3	89,9	89,3	88,4	88,0	87,8	-1,8
RSD (%)	1,1	0,9	1,7	1,1	1,9	1,3	0,9	/

Preglednica XXVII: MCV (fL) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	90,3	91,3	91,6	91,8	91,4	90,5	87,7	-2,6
2/Ž	96,0	94,8	94,6	96,3	96,0	93,6	92,8	-3,2
3/M	95,5	96,0	95,8	95,1	95,4	/	93,0	-2,5
4/M	87,5	/	90,1	90,4	89,6	87,1	87,9	0,4
5/M	91,3	90,7	93,1	93,0	89,9	89,6	90,1	-1,2
povprečje	92,1	93,2	93,0	93,3	92,5	90,2	90,3	-1,8
RSD (%)	3,9	2,8	2,5	2,6	3,3	3,0	2,8	/

Graf 7 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic XXVI in XXVII.



Graf 7: MCV (fL) v krvi športnikov med preizkusom

V preglednicah XXVIII in XXIX so vrednosti MCH v krvi naših preiskovancev.

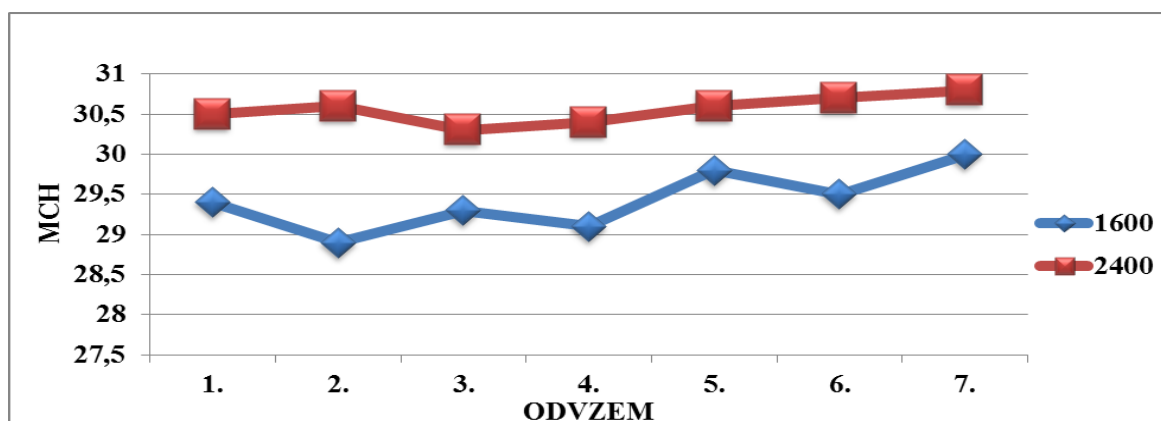
Preglednica XXVIII: MCH (pg) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/M	28,7	28,2	28,2	28,1	29,7	28,5	29,3	0,6
2/Ž	29,4	29,1	29,8	29,7	30,3	29,4	31,0	1,6
3/M	29,7	29,0	29,3	29,0	29,2	28,8	29,2	-0,5
4/M	29,4	28,5	28,7	28,8	29,3	29,8	29,5	0,1
5/M	30,0	29,6	30,3	30,1	30,4	30,8	30,8	0,8
povprečje	29,4	28,9	29,3	29,1	29,8	29,5	30,0	0,5
RSD (%)	1,6	1,9	2,9	2,7	1,9	3,1	2,9	/

Preglednica XXIX: MCH (pg) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	31,0	30,2	30,7	30,0	29,8	31,2	30,5	-0,5
2/Ž	30,7	30,0	30,8	31,0	31,9	30,5	31,5	0,8
3/M	31,0	31,0	30,8	31,4	30,7	/	31,1	0,1
4/M	29,3	/	28,9	29,0	29,4	30,0	29,4	0,1
5/M	30,7	31,0	30,5	30,8	31,4	31,2	31,3	0,6
povprečje	30,5	30,6	30,3	30,4	30,6	30,7	30,8	0,2
RSD (%)	2,3	1,7	2,7	3,1	3,4	1,9	2,8	/

Graf 8 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic XXVIII in XXIX.



Graf 8: MCH (pg) v krvi športnikov med preizkusom

V preglednicah XXX in XXXI so vrednosti MCHC v krvi naših preiskovancev.

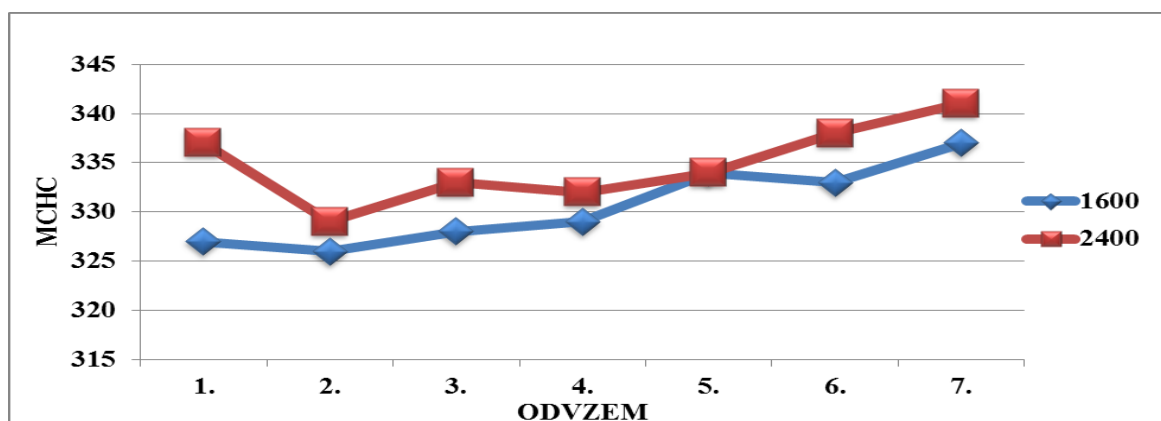
Preglednica XXX: MCHC (g/L) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							Δ (7.-1.)
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
1/M	318	319	322	322	332	326	325	7
2/Ž	333	326	333	333	332	342	341	8
3/M	324	327	329	328	327	333	334	10
4/M	324	326	327	329	334	330	341	17
5/M	336	334	331	335	343	335	346	10
povprečje	327	326	328	329	334	333	337	10
RSD (%)	2,2	1,6	1,3	1,5	1,8	1,8	2,4	/

Preglednica XXXI: MCHC (g/L) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							Δ (7.-1.)
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	
1/Ž	343	332	338	337	339	341	350	7
2/Ž	319	317	326	322	321	327	333	14
3/M	335	324	332	332	329	/	338	3
4/M	339	/	330	326	330	338	336	-3
5/M	347	343	339	342	351	347	350	3
povprečje	337	329	333	332	334	338	341	5
RSD (%)	3,2	3,4	1,6	2,4	3,4	2,5	2,4	/

Graf 9 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic XXX in XXXI.



Graf 9: MCHC (g/L) v krvi športnikov med preizkusom

MCV je po začetnem dvigu pri obeh skupinah kasneje padal (graf 7). MCH je rahlo narastel pri obeh skupinah, vendar med odvzemi ni bistvenih razlik (graf 8). MCHC je v obeh skupinah narastel, opazen je padec pri drugem odvzemu skupine 2400 (graf 9). Vzrok za padec je lahko pospešena eritropoeza na začetku, težko pa bi trdili, da je vzrok pomanjkanje katerega od vitaminov (vitamin B₁₂, folna kislina), saj so ob uravnoveženi prehrani nekateri dobivali tudi prehranska dopolnila.

4.4.1 Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino

Preglednica XXXII: Razlika v MCV (fL) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	89,64	87,84	Mean	92,12	90,3
Variance	0,913	0,643	Variance	12,952	6,525
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	7,00649		t Stat	2,82723	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Preglednica XXXIII: Razlika v MCH (pg) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	29,44	29,96	Mean	30,54	30,76
Variance	0,233	0,753	Variance	0,503	0,718
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	1,48029		t Stat	0,97038	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Preglednica XXXIV: Razlika v MCHC (g/L) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	327	337,4	Mean	336,6	341,4
Variance	54	66,3	Variance	116,8	64,8
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	5,94528		t Stat	1,71429	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Test nam kaže signifikantno manjši MCV po pripravah pri obeh skupinah ($\alpha=0,05$). Volumen (fL) je padel pri skupini 1600 z 89,6 na 87,8, pri skupini 2400 pa z 92,1 na 90,3. Ponavadi je razlog za zmanjšanje pomanjkanje železa v krvi, vendar so bile pri naših odvzemih koncentracije železa v krvi normalne. Višinske priprave so torej statistično značilno zmanjšale MCV (preglednica XXXII). Pri MCH ni prišlo do statistično značilnih razlik ($\alpha=0,05$) pri nobeni skupini, signifikantno pa se je med pripravami skupine 1600 povečal MCHC, torej so višinske priprave ene skupine vplivale tudi na statistično značilno povečanje MCHC (preglednica XXXIII in XXXIV). Koncentracija (g/L) se je povečala s 327 na 337. Možen razlog za to spremembo bi sicer lahko bilo pomanjkanje oziroma povečana potreba po vitaminih (vitamin B₁₂, folna kislina) in neustrezna prehrana na začetku priprav, kar pa pri naših preiskovancih ni možno, saj so poleg uravnovežene prehrane dobivali tudi dodatke.

Na spremembe eritrocitnih indeksov ima vpliv tudi volumen krvi, ki se je verjetno med preiskavo povečal. Sprememba okolja in priprave torej lahko vplivajo na eritrocitne

indekse, vendar so naše vrednosti v mejah normale, zato ne bi smele imeti bistvenega pomena na rezultate športnikov. Prav tako spremembe znotraj normalnih vrednosti ne pomenijo grožnje za zdravje športnika, seveda pa jih je ob večjih naporih priporočljivo spremljati.

4.4.2 Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama

Preglednica XXXV: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi vrednosti MCV (fL) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	1,8	1,82
Variance	0,33	2,072
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	6,27879	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	1,201	
df	8	
t Stat	0,02886	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Volumen (fL) se je v obeh skupinah zmanjšal za povprečno 1,8. Razlika v spremembi volumna ni statistično značilna ($\alpha=0,05$), torej višinska soba ni vplivala na spremembo volumna eritrocitov (preglednica XXXV).

Preglednica XXXVI: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi vrednosti MCH (pg) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	-0,52	-0,22
Variance	0,617	0,257
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	2,40078	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	0,437	
df	8	
t Stat	0,71755	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Povprečna vrednost MCH (pg) se je v skupini 1600 povečala za 0,5, v skupini 2400 pa za 0,2. Spremembi nista statistično značilno različni ($\alpha=0,05$), kar pomeni, da višinska soba ni vplivala na povprečno količino Hb v eritrocitu (preglednica XXXVI).

Preglednica XXXVII: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi vrednosti MCHC (g/L) med skupinama (t-test)

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	-10,4	-4,8
Variance	15,3	39,2
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	2,56209	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	27,25	
df	8	
t Stat	1,69619	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Koncentracija Hb (g/L) v eritrocitih se je med pripravami v skupini 1600 povečala za povprečno 10, v skupini 2400 pa za povprečno 5. Povečanje med skupinama ni statistično značilno ($\alpha=0,05$), zato višinska soba ni vplivala na spremembo MCHC v času priprav (preglednica XXXVII).

Uporaba višinske sobe ni vplivala na eritrocitne indekse. Tak rezultat smo pričakovali, saj so pri zdravih športnikih večje spremembe indeksov in nenormalne vrednosti ob nadzorovanem treniranju, normalnem vnosu tekočine in hranil malo verjetne, kljub višinskim pripravam in uporabi višinske sobe. Vrednosti indeksov sicer nimajo večjega vpliva na športne rezultate, vseeno pa jih je priporočljivo spremljati zaradi morebitnih bolezni in neustrezne prehrane.

4.5 KOEFICIENT VARIACIJE VOLUMNA RDEČIH KRVNIH CELIC (RDW)

V preglednicah XXXVIII in XXXIX so vrednosti RDW v krvi naših preiskovancev.

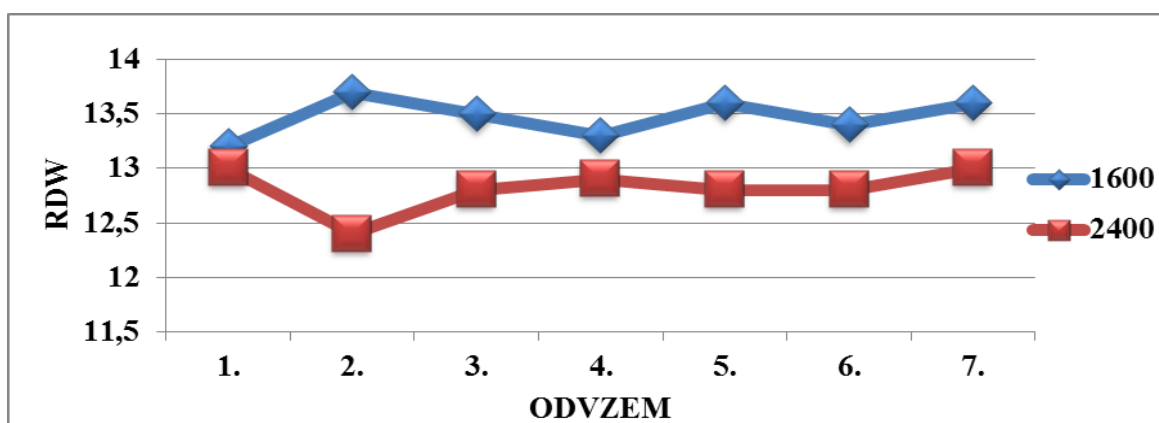
Preglednica XXXVIII: RDW (%) v krvi športnikov skupine 1600

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	$\Delta (7.-1.)$
1/M	13,4	14,2	14,0	14,3	14,5	14,3	14,5	1,1
2/Ž	12,8	12,9	12,8	12,8	12,9	12,8	12,9	0,1
3/M	13,7	14,3	14,1	13,7	13,8	13,3	14,2	0,5
4/M	13,5	14,1	13,7	13,4	13,7	13,4	13,6	0,1
5/M	12,7	12,9	12,7	12,5	13,1	13,1	12,6	-0,1
povprečje	13,2	13,7	13,5	13,3	13,6	13,4	13,6	0,3
RSD (%)	3,4	5,2	4,9	5,4	4,7	4,2	6,0	/

Preglednica XXXIX: RDW (%) v krvi športnikov skupine 2400

oseba/spol	odvzem							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Δ (7.-1.)
1/Ž	12,9	12,7	12,9	13,0	12,9	13,2	13,2	0,3
2/Ž	12,5	12,1	12,8	12,8	12,7	12,5	12,8	0,3
3/M	13,6	12,8	13,3	12,9	12,5	/	12,7	-0,9
4/M	13,1	/	13,0	13,2	13,2	12,7	13,2	0,1
5/M	12,9	12,1	12,1	12,8	12,9	12,6	13,0	0,1
povprečje	13,0	12,4	12,8	12,9	12,8	12,8	13,0	0,0
RSD (%)	3,1	3,0	3,5	1,3	2,0	2,4	1,8	/

Graf 10 smo izrisali na podlagi podatkov iz preglednic XXXVIII in XXXIX.



Graf 10: RDW (%) v krvi športnikov med preizkusom

Grafa obeh skupin nam večjih nihanj ne pokažeta (graf 10). Opaženo je znižanje oziroma zvišanje vrednosti pri 2. odvzemu. Vse vrednosti so bile v času raziskav normalne. To nam pove, da volumni eritrocitov med pripravami niso močno variirali, tako da ni sledi o anizocitozi.

4.5.1 Razlika vrednosti pred in po pripravah za vsako skupino

Preglednica XL: Razlika v RDW (%) pred in po pripravah (parni t-test)

t-Test: Paired Two Sample for Means					
1600			2400		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	13,22	13,56	Mean	13	12,98
Variance	0,197	0,663	Variance	0,16	0,052
Observations	5	5	Observations	5	5
df	4		df	4	
t Stat	1,5922		t Stat	0,08909	
t Critical two-tail	2,77645		t Critical two-tail	2,77645	

Test nam je potrdil, da do signifikantnih razlik pri obeh skupinah pred in po pripravah ni prišlo ($\alpha=0,05$). Variiranje pred in po pripravah se ni bistveno spremenilo, torej višinske priprave na RDW niso vplivale (preglednica XL). Statistično značilnih razlik pri RDW nismo pričakovali.

4.5.2 Primerjava sprememb vrednosti pred in po pripravah med obema skupinama

Preglednica XLI: Test enakosti varianc (F-test) in razlika v spremembi vrednosti RDW (%) med skupinama (t-test)

	Variable 1	Variable 2
Mean	-0,34	0,02
Variance	0,228	0,252
Observations	5	5
F-Test Two-Sample for Variances		
df	4	4
F	1,10526	
F Critical one-tail	6,38823	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Pooled Variance	0,24	
df	8	
t Stat	1,1619	
t Critical two-tail	2,306	

Varianci nista statistično značilno različni.

Povprečni RDW se je v skupini 1600 med pripravami povečal za 0,3 %, medtem ko je v skupini 2400 ostal enak (preglednica XLI). Med skupinama ni prišlo do statistično značilne razlike ($\alpha=0,05$), torej višinska soba ni vplivala na RDW. Tako kot krvni indeksi, tudi RDW ne pove veliko o napredku športnikov na pripravah. Služi nam kot kontrola in pri večjih spremembah kot opozorilo na nepravilnosti pri volumnih eritrocitov. Tudi te vrednosti smo spremljali in po pričakovanjih ni prišlo do signifikantne razlike med skupinama.

5. SKLEP

V diplomski nalogi smo spoznali, da so spremembe v krvi zelo zapleten proces, saj na njih vpliva veliko dejavnikov. V našem primeru so poleg vsakodnevnih treningov skozi celotno preiskavo posamezniki imeli del priprav na višini, nekateri so bivali tudi v višinski sobi. Paziti je potrebno na pravilen vnos hranil in tekočine, saj lahko tudi to vpliva na rezultate. Nikakor ne smemo spregledati, da so preiskovanci vrhunski športniki in so reagirali med preiskavo drugače, kot bi povprečni posamezniki. To so razlogi, zaradi katerih je težko z gotovostjo trditi, da na spremembe vpliva le en faktor, v našem primeru višinske priprave oziroma višinska soba, saj je številne druge razloge težko izključiti.

Profesionalni športniki so po navadi ljudje z vrhunsko fizično pripravljenostjo, če pa so ti športniki tekači na smučeh, lahko sklepamo, da imajo odlično aerobno sposobnost. Njihova maksimalna aerobna moč in vzdržljivost sta večino časa na zelo visokem nivoju, včasih tudi na optimalnem. To je eden od razlogov, da pri njih težko dosežemo signifikanten napredek, kar se je videlo tudi v diplomskem delu.

Zanimivo bi bilo preveriti, kakšen način treninga so imeli preiskovanci pred pripravami, da je bila vrednost EPO in retikulocitov na začetku (1. odvzem) tako visoka. Morda bi odvzem še pred začetkom priprav in skupnih treningov dal precej odgovorov. Videli bi koncentracijo EPO, število eritrocitov, Hb, Ht in število retikulocitov pred vsakodnevnimi treningi. Te vrednosti so se verjetno precej razlikovale oziroma so bile nižje od tistih pri prvem odvzemu, ko so bili športniki že nekaj časa v programu vadbe.

Pričakovan dvig EPO in retikulocitov pri 2. odvzemu bi lahko tudi statistično obdelali kot razliko vrednosti med 1. in 2. odvzemom. Nizko število preiskovancev se je pri 2. odvzemu še zmanjšalo, saj vzorca en posameznik ni oddal, tako da bi bili rezultati manj reprezentativni. EPO in retikulociti so le posredni pokazatelj vpliva višinske sobe in višinskih priprav na športnikove rezultate, zato nas bolj zanima statistična analiza rdečih krvnih celic.

Z merjenjem volumna krvi bi bili rezultati o vplivu višinskih priprav verjetno bolj razumljivi, saj bi dobili celokupno količino krvnih parametrov. To v času preiskave ni bilo mogoče, saj so natančna merjenja predraga, prezahtevna, hkrati pa bi močno posegli v športnikovo telo, kar bi lahko prineslo neželene učinke in manj uspešne treninge.

Poleg dveh preučevanih skupin bi za bolj pregledne rezultate potrebovali še skupino športnikov, ki bi bivala in trenirala v dolini, s tem da bi bili treningi enaki kot pri naših skupinah. Ta skupina nam bi služila kot kontrola. Tako bi videli, ali so spremembe posledica treningov ali nadmorske višine. Lahko bi preučevali še skupino, ki bi bivala še v večji hipoksiji, kot je pri 2400 m, saj je morda razlika v vsebnosti O₂ med 1600 in 2400 m prenizka za športnike. Možen bi bil tudi večji napredek športnikov, če bi se treningi opravljali na nižjih legah kot je 1600 m. Treningi bi lahko bili bolj intenzivni, saj je zrak v nižinah bolj bogat z O₂.

Število preiskovancev je bilo zelo nizko. Od 15 športnikov, ki so sodelovali, nam je uporabne rezultate dalo le deset posameznikov, ki so bili deljeni v dve skupini. Seveda bi bilo bolje opazovati večje število preiskovancev, vendar bi morali preiskovati posameznike, ki so primerni za našo preiskavo. V našem primeru so to bili profesionalni tekači na smučeh, ki so bili pripravljani biti prisotni skoraj na vseh treningih in odvzemih. Za obširnejšo študijo z več preiskovanci takega kova bi verjetno potrebovali tudi športnike iz tujine, ki pa imajo svoj način priprav, verjetno tudi raziskave.

Natančnejše rezultate bi poleg večjega števila preiskovancev lahko dali pogostejši odvzemi. V našem primeru smo kri odvzeli športnikom največ enkrat tedensko. Tako so lahko na rezultat vplivali različni dejavniki (slab spanec, dehidriranost, počutje, menstrualni cikel...). S pogostejšimi odvzemi bi vpliv teh dejavnikov zmanjšali, seveda pa bi s tem preiskovanci izgubili še več krvi, prav tako pa je pogost odvzem krvi zelo moteč. Lahko bi prišlo do slabšega počutja in do manj kakovostnih treningov, in tako bi poslabšali rezultate v prihodnosti.

Bolj kot vsi krvni parametri je na koncu priprav za vrhunske športnike najbolj pomemben rezultat, dosežen v njihovi disciplini, v našem primeru v teku na smučeh. Da pride do tega izboljšanja, lahko nadzorujemo njihovo kri, kar nam pomaga pri sestavi in načrtovanju priprav. Če bi merili čase in pretečeno razdaljo v teku na smučeh, bi dobili jasen odgovor, kakšen vpliv imajo višinske priprave in višinska soba na profesionalne športnike. V tej raziskavi to zaradi letnega časa ni bilo možno, lahko pa bi napredek merili na rolgah, atletski stezi, na kolesu, v krosu, na utežeh... Ker to niso discipline naših preiskovancev, bi verjetno prišlo hitreje do napredka, vendar pa to ne bi imelo enakega pomena kot napredek pri rezultatih v teku na smučeh. Tako ne bi dobili jasnega odgovora o vplivu višinskih

priprav na športnike. Čeprav bi prišlo hitreje do napredka, pa bi kljub temu bila opažena morebitna razlika med obema skupinama. Tako bi lažje razložili vpliv višinske sobe.

Pri naših ugotovitvah pride po višinskih pripravah do naslednjih statistično značilnih sprememb:

- pri obeh skupinah se zniža koncentracija EPO in MCV,
- pri skupini 2400 se zniža število eritrocitov, retikulocitov in Ht,
- pri skupini 1600 se poveča MCHC.

Uporaba višinske sobe je po naših zaključkih vplivala na:

- koncentracijo EPO (pri skupini 1600 je zabeležen večji padec kot pri skupini 2400),
- število retikulocitov (pri skupini 2400 je zabeležen večji padec kot pri skupini 1600).

Čeprav smo pričakovali pri nekaterih parametrih drugačne rezultate in smo bili pri nekaterih meritvah presenečeni, smo kasneje ugotovili, da je ravno zaradi mnogih dejavnikov rezultate takih preiskav težko napovedati. Podobnih študij je bilo v tujini že veliko. Pri nekaterih so imele višinske priprave in hipoksični prostori pozitivne učinke na športnike, pri nekaterih pa učinka ni bilo ali pa so športniki celo nazadovali. Za boljše rezultate športnikov in njihov napredek na višinskih pripravah in v višinskih sobah bo potrebno še veliko skrbno načrtovanih in natančnih študij.

6. LITERATURA

- 1) Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Ljubljana, 2007: 284-307.
- 2) <http://www.sportecoach.com.au/downloads/ERYTHROPOETIN-A%20BIOCHEMICAL%20AND%20PHYSIOLOGICAL%20PERSPECTIVE.doc>
(dostop: april, 2011)
- 3) Elliott S: Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. Br J Pharmacol. 2008; 154(3): 529–541.
- 4) Avberšek Lužnik I, Čelhar T, Karas Kuželički N, Milek M, Pajič T: Vaje iz klinične kemije 1, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009: 4-18.
- 5) Sackmann E, Lipowsky R: Handbook of Biological Physics, Volume 1, Elsevier Science B.V., Graching, Germany, 1995: str. 8-14.
- 6) <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kri> (dostop: januar 2012)
- 7) Hsia CCW, M.D.: Respiratory Function of Hemoglobin. The New England journal of medicine 1998; 338: 239-248.
- 8) Weatherall DJ: Molecular Basis for Some Disorders of Haemoglobin Synthesis. British Medical Journal 1974; 4(5942): 451–454.
- 9) <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje27R2011.pdf>
(dostop: marec 2012)
- 10) Hillman RS, Ault KA, Rinder HM : Hematology in clinical practice: a guide to diagnosis and management. 4th edition. The McGraw Hill Companies 2005; 12-26.
- 11) Wallach J, MD: Interpretation of diagnostic tests, 8th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, str. 368-417
- 12) Convertino VA: Blood volume: its adaptation to endurance training. Medicine and Science in Sports and Exercise 1991; 23(12):1338-48.
- 13) 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.
- 14) Vahid B: Measurement of Blood Volume at Bedside: New Era in Critical Care Medicine. *The Internet Journal of Emergency and Intensive Care Medicine* 2007; Volume 10: Number 1.
 - 15) Orth VH, Rehm M, Haller M, Thiel M, Finsterer U: The measurement of blood volume-state of the art. *Anaesthesist* 2001; Aug 50(8):562-568.
 - 16) Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ: The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol.* 2008; 141(3): 325–334.
 - 17) <http://cochin.inserm.fr/research/scientific-departments/emc/team-15/equipe-15-genes-nutriments-et-fer/> (dostop: oktober 2012)
 - 18) Paralikar SJ, Paralikar JH: High-altitude medicine. *Indian J Occup Environ Med.* 2010; 14(1): 6–12.
 - 19) Faura J, Ramos J, Reynafarje C, English E, Finne P, Finch CA: Effect of Altitude on Erythropoiesis. *Blood* 1969; 33: 668-676.
 - 20) Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C: Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol.* 1989; 66(4):1785-8.
 - 21) Richalet JP, Souberbielle JC, Antezana AM, Déchaux M, Le Trong JL, Bienvenu A, Daniel F, Blanchot C, Zittoun J: Control of erythropoiesis in humans during prolonged exposure to the altitude of 6,542 m. *Am J Physiol.* 1994; 266(3 Pt 2):R756-64.
 - 22) Levine BD Stray-Gundersen J: Dose-Response of Altitude Training: How Much Altitude is Enough?. *Hypoxia and Exercise, Advances in Experimental Medicine and Biology* 2007; Volume 588: 233-247.
 - 23) West JB: High Life: A History of High-Altitude Physiology and Medicine. *JAMA* 1999; 281(14): 1341-1342.
 - 24) 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.

- 25) Weir EK, Archer SL: The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.* 1995;9(2):183-189.
- 26) <http://www.sportsci.org/encyc/index.html> (Hallagan LF, Pigman EC: Encyclopedia of Sports Medicine and Science, Altitude: Acclimatization to Intermediate Altitudes, Department of Emergency Medicine, George Washington University Medical Center, Washington, DC, USA, 1998) (dostop: maj 2012)
- 27) Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Ljubljana, 2008: 123-180.
- 28) Garrett WE Jr., Kirkendall DT: Exercise and sport science, Lippinkott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000: 447-457.
- 29) http://www.altitude.org/altitude_training.php (dostop: maj 2012)
- 30) <http://www.sportsci.org/traintech/altitude/wgh.html> (Baker A, Hopkins WG: Altitude training for sea-level competition In: Sports Science Training & Technology. Internet Society for Sport Science, 1998) (dostop: maj, 2012)
- 31) Ashenden MJ, Gore CJ, Martin DT, Dobson GP, Hahn AG: Effects of a 12-day "live high, train low" camp on reticulocyte production and haemoglobin mass in elite female road cyclists. *Eur J Appl Physiol* (1999) 80: 472-478
- 32) http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay~q_catId~e-103~a_catTree~e100001,1009256~a_langId~e103~a_productId~e172952~a_storeId~e10001.htm (dostop: januar, 2012)
- 33) <http://www.medcompare.com/details/13964/ADVIA-120-Hematology-System.html> (dostop: januar, 2012)
- 34) http://vetlabor.hu/images/laboratorium/advia120_ismerteto.ppt (dostop: januar, 2012)
- 35) Španinger K, Debeljak N: Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 279-285.