

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA LOKAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANITA LOKAR

**VPLIV INTENZIVNOSTI TRENINGA BIATLONCEV NA SPREMEMBO
PROFILA ERITROPOETINA V URINU IN NEKATERIH KRVNIH
PARAMETROV**

**IMPACT OF BIATHLON TRAINING INTENSITY ON THE MODIFICATION OF
ERYTHROPOIETIN ISOFORMS AND HAEMATOLOGICAL PARAMETERS**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja in somentorstvom asist. dr. Klemna Španingerja, mag. farm. Pripravo in analizo urinskih vzorcev ter IEF sem opravila na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Radioimunološke meritve (RIA) in analizo krvi so opravili pristojni na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju, somentorju asist. dr. Klemnu Španingerju, mag. farm., in doc. dr. Nataši Debeljak za strokovno usmerjanje, dragocene nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Janezu Vodičarju, prof. šp. vzg., za pridobitev podatkov, ge. Stanki Sever za izvedbo analize RIA in zaposlenim na Medicinskem centru za molekularno biologijo in Centru za funkcijsko genomiko in bio-čipe za pomoč v času laboratorijskega dela.

Prav posebna zahvala vsem mojim prijateljem za spodbudo pri izdelavi diplomske naloge in seveda moji družini in Dušanu za neizmerno pomoč, razumevanje in podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja, prof. dr. Joška Osredkarja, in somentorja, asist. dr. Klemna Španingerja, mag. farm.

Anita Lokar

KAZALO

KAZALO	I
POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 ENDOGENI ERITROPOETIN (EPO).....	1
1.1.1 Homeostaza in regulacija eritropoetina	3
1.1.2 Eritropoetinski receptor	5
1.1.3 Eritropoeza.....	6
1.2 REKOMBINANTNI ERITROPOETIN	7
1.2.1 Zloraba rekombinantnega eritropoetina.....	8
1.3 ŠPORTNA AKTIVNOST NA VIŠJI NADMORSKI VIŠINI.....	9
1.3.1 Fiziološka prilagoditev na višinske razmere	9
1.3.2 Oblike višinskih treningov	11
1.3.3 Spremembe eritropoetina in hematoloških parametrov pod vplivom treninga »Živi visoko – treniraj nizko«	12
1.3.4 Izboljšave višinskih treningov	13
1.4 DETEKCIJA ERITROPOETINA Z IZOELEKTRIČNIM FOKUSIRANJEM... 14	
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 PREISKOVANCI	17
3.2 ZBIRANJE VZORCEV	18
3.3 MATERIALI IN APARATURE	18
3.4 PRIPRAVA VZORCEV – KONCENTRIRANJE URINA.....	20
3.4.1 Kemikalije in priprava delovnih reagentov	20

3.4.2	Postopek koncentriranja urina	20
3.5	RADIOIMUNOLOŠKA METODA (RIA)	21
3.6	IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM.....	22
3.6.1	Kemikalije in priprava delovnih reagentov	22
3.6.2	Priprava gela	24
3.6.3	Izoelektrično fokusiranje	25
3.6.4	Dvojni prenos	27
3.6.5	Prvi prenos	27
3.6.6	Drugi prenos	28
3.6.7	Kemiluminiscenčna vizualizacija	30
3.6.8	Statistične metode.....	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM.....	31
4.1.1	Analiza profila izoform endogenega eritropoetina v urinu	31
4.2	SERUMSKA KONCENTRACIJA ERITROPOETINA (EPO) IN HEMATOLOŠKI PARAMETRI	35
4.2.1	Analiza serumske koncentracije eritropoetina (EPO)	36
4.2.2	Analiza hematoloških parametrov	37
5	RAZPRAVA.....	40
5.1	IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM.....	40
5.2	SERUMSKA KONCENTRACIJA ERITROPOETINA (EPO) IN HEMATOLOŠKI PARAMETRI	43
6	PREDLOGI ZA PRIHODNOST	48
7	SKLEP	49
8	LITERATURA	50
9	PRILOGE.....	56

POVZETEK

Eritropoetin (EPO) je najpomembnejši rastni dejavnik, ki spodbuja nastajanje rdečih krvnih celic v kostnem mozgu. Zmanjšana oksigenacija tkiv (hipoksija) stimulira povečano tvorbo EPO v ledvicah. Profesionalni športniki uporabljajo nove pristope za izboljšanje maksimalne aerobne zmogljivosti in učinkovitosti vadbe. Eden takšnih je specifična kombinacija višinskega treninga ("Live high – train low", LH-TL), ki pospešuje eritropoezo. Sočasni vpliv višine in intenzivnega treninga na profil EPO izoform ni znan.

Spremljali smo 12 člansko odpravo profesionalnih biatloncev med 3 tedne trajajočimi višinskimi pripravami. Vsi športniki so trenirali pod enakimi pogoji na višini okoli 1500 m, z različnimi pogoji počivanja. Člani kontrolne skupine ($n = 5$) so spali na višini 1500 m, športniki skupine LH-TL ($n = 7$) pa v višinskih (hipoksičnih) sobah z nadmorsko višino 2500 m. Odvzeti so bili vzorci krvi in urina pred, med in po odpravi. Analizirali smo hematološke parametre in serumsko koncentracijo EPO. Z metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) smo določili izoforme endogenega EPO v urinu.

Po 21 dneh treninga smo opazili porazdelitev EPO izoform v bolj bazična področja. Spremembe so bile vidne v skupini LH-TL in v kontrolni skupini, kar potrjuje učinek vadbenega režima na profil EPO. Zaradi zanemarljivih razlik med skupinama domnevamo, da bivanje v višinskih sobah ni bistveno pripomoglo k drugačni razporeditvi izoform EPO glede na izoelektrično točko. Pri primerjavi vzorcev pred in po koncu višinskih priprav se je serumska koncentracija EPO znižala za $30,1 \pm 6,79$ % pri skupini LH-TL, navkljub opaznemu začetnemu zvišanju koncentracije EPO po 1 ali 7 dneh. Delež hematokrita je bil izboljšan v obeh skupinah verjetno zaradi zmanjšanja volumna plazme. Po 14 dneh smo zaznali dvig koncentracije hemoglobina v LH-TL zaradi zapoznelega učinka eritropoeze. Število eritrocitov in retikulocitov je bilo 14 dni po prihodu iz višinskega kampa znižano pod izhodiščni nivo. Izsledki študije nakazujejo, da 8 urna dnevna izpostavljenost hipoksičnim pogojem skupine LH-TL ni bila zadostna za izboljšanje fizične zmogljivosti.

IEF je ustrezna metoda za analizo vpliva višinskega treninga LH-TL na profil EPO v urinu, vendar so potrebne nadaljnje študije protokola IEF in LH-TL treninga za natančnejšo obrazložitev omenjenega vpliva.

KLJUČNE BESEDE: eritropoetin, izoelektrično fokusiranje, LH-TL višinski trening

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is an essential growth factor which stimulates the production of red blood cells in the bone marrow. Reduced tissue oxygenation (hypoxia) triggers increased production of EPO predominantly synthesised in adult kidneys. Professional sportsmen use new approaches to improve maximal aerobic capacity and exercise performance. One of such is a specific combination of altitude (hypoxic) training that naturally speeds up erythropoiesis. The impact of altitude training on EPO isoforms is not known.

We analyzed 12 professional biathlons during 3 weeks long “Live high - train low” (LH-TL) training. All of them trained at 1,500 m, while sleeping at 1,500 m (control group) or in hypoxic rooms with simulated 2,500 m altitude (LH-TL group). Blood and urine samples were collected before, during and after (post) training. Hematological parameters and EPO concentration were determined. EPO isoforms were analyzed by isoelectric focusing (IEF).

After 21 days of training, distribution of EPO isoforms towards the basic area was observed. Changes were noticed in LH-TL group as well as in the control group confirming the effect of exercise regime on EPO profile. Due to the negligible differences between the two groups we assume staying in altitude rooms does not sufficiently contribute to modification of EPO patterns. Overall a decrease in serum EPO concentration before vs. post training by 30.1 ± 6.79 % in LH-TL group was detected, although initial increase in EPO concentration after 1 or 7 days was observed. Hematocrit values were improved in both groups probably due to reduction in plasma volume. After 14 days hemoglobin concentration increased in LH-TL because of delayed effect of erythropoiesis. 14 days after the arrival from altitude training camp the levels of erythrocytes and reticulocytes were decreased under the baseline values. The present results suggest that 8h/day of hypoxic exposure for LH-TL group is not sufficient for improvement of sea level performance.

IEF is a suitable method to investigate the impact of altitude training LH-TL on EPO patterns. However, further studies of IEF protocol and LH-TL training should be assessed to elucidate this influence.

KEYWORDS: erythropoietin, isoelectric focusing, LH-TL altitude training

SEZNAM OKRAJŠAV

AMS	akutna višinska bolezen (angl. acute mountain sickness)
ARNT	β – podenota hipoksije inducibilnega faktorja (angl. arylhydrocarbon receptor nuclear translocator)
BFU-E	matične izvorna celica eritrocitne vrste, predstopnja CFU-E (angl. burst forming unit - erythroid)
BHK	ledvične celice mladiča hrčka (angl. baby hamster kidney cells)
CERA	pegilirana oblika epoetina β (angl. continuously erythropoiesis receptor activator)
CFU-E	matična izvorna celica eritrocitne vrste (angl. colony forming unit-erythrocyte)
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (angl. chinese hamster ovary cells)
CSF	faktor stimulacije granulocitnih in trombocitnih kolonij (angl. colony - stimulating factor)
CŽS	centralni živčni sistem
EPO	eritropoetin
EPOR	eritropoetinski receptor
ESA	faktorji, ki stimulirajo eritropoezo (angl. erythropoiesis-stimulating agents)
GA-EPO	epoetin δ
GATA-2	vezavni protein GATA 2 (angl. GATA binding protein 2)
GLUT	glukoзни transporter (angl. glucose transporter)
HACE	možganski edem, posledica višinske bolezni (angl. high altitude cerebral edema)
HAPE	pljučni edem, posledica višinske bolezni (angl. high altitude pulmonary edema)
Hb	hemoglobin
Ht	hematokrit
HIF	hipoksija inducibilni faktor (angl. hypoxia inducible factor)
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
H ₃ O ⁺	oksonijevi (vodikovi) ioni (angl. hydrogen ions)
HNF-4 α	hepatocitni jedrni faktor 4 α (angl. hepatocyte nuclear factor)

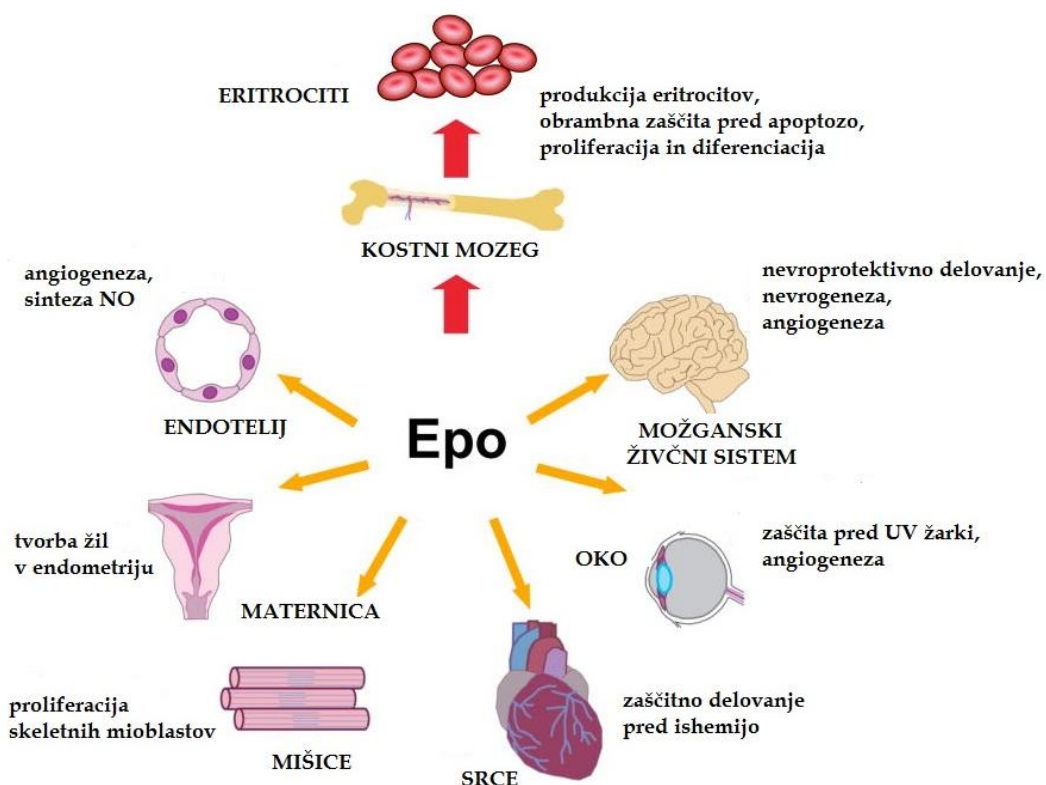
HRE	element odziven na hipoksijo (angl. hypoxia-response element)
IEF	izoelektrično fokusiranje
IGF-1	inzulinu podoben rastni faktor 1 (angl. insulin-like growth factor 1)
IHE	kratkotrajna izpostavljenost hipoksičnim pogojem pri počivanju (angl. intermittent hypoxic exposure at rest)
IHT	kratkotrajna izpostavljenost hipoksičnim pogojem pri treniranju (angl. intermittent hypoxic training)
IL	interlevkin
IOC	Mednarodni olimpijski komite (angl. International Olympic Committee)
JAK2	Janus kinaza 2
LH-TH	režim treninga Živi visoko – treniraj visoko, bivanje in treniranje na visoki nadmorski višini (angl. Live high – train high);
LH-TL	režim treninga Živi visoko – treniraj nizko, bivanje na visoki nadmorski višini in treniranje na nizki nadmorski višini (angl. Live high – train low)
LL-TH	režim treninga Živi nizko – treniraj visoko, bivanje na nizki nadmorski višini in treniranje na visoki nadmorski višini (angl. Live low – train high)
MAIIA	imunološka metoda (angl. membrane assisted isoform immuno assay)
MAPK	mitogeno aktivirana protein kinaza (angl. ras mitogen- activated protein kinase)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger ribonucleic acid)
NESP	glikozilirana oblika epoetina α , darbepoetin α (angl. new erythropoiesis stimulating protein)
NF- κ B	jedrni faktor κ B (angl. nuclear factor κ B)
pI	izoelektrična točka
PI3K	signalna pot fosfatidilinozitol 3 – kinaze (angl. phosphatidylinositol 3-kinase)
PEG	polietilen glikol
PKC	protein kinaza C (angl. protein kinase C)
pO ₂	parcialni tlak kisika
PRCA	aplazija rdečih krvnih celic (angl. pure red cell aplasia)
RBP	retinol – vezavni protein
rHuEPO	rekombinantni humani eritropoetin
RIA	radio-imunološka metoda (angl. radioimmunoassay)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)

SHP	protein tirozin fosfataza z domeno SH2 (angl. SH2 containing phosphotyrosine phosphatase)
SOCS	citokine inducibilni proteini z domeno SH2 (angl. cytokine inducible SH2 domain proteins)
STAT	pretvorniki signala in aktivatorji prepisovanja (angl. signal transducers and activators of transcription)
sTfR	serumska koncentracija topnega transferinskega receptorja
TNF- α	tumor nekrozn faktor - α (angl. tumor necrosis factor α)
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor (angl. vascular endothelial growth factor)
VHL	protein Von Hippel-Lindau
VO ₂ max	maksimalna aerobna kapaciteta
WADA	Svetovna protidopinška agencija (angl. The World Anti-Doping Agency)

1 UVOD

1.1 ENDOGENI ERITROPOETIN (EPO)

Eritropoetin (EPO) je najpomembnejši hematopoetski rastni dejavnik, ki vpliva na eritropoezo pri ljudeh in živalih. Deluje neposredno na eritroidne matične celice in prekursorje eritrocitov v kostnem mozgu ter nadzira njihovo proliferacijo, diferenciacijo in zorenje (1, 2). Biološki učinki EPO niso omejeni zgolj na eritropoezo, temveč tudi na širok spekter funkcij v nehematopoetskih tkivih (3). Poleg produkcije endogenega EPO v ledvičnih peritubulnih fibroblastih pri odraslih in jetrnih celicah plodu, so prisotnost EPO in izražanje eritropoetskega receptorja (EPOR) odkrili še v celicah centralnega živčnega sistema (CŽS), v kardiomiocitih, v gladkih mišičnih celicah ter v ostalih tkivih in organih, predstavljenih na Sliki 1 (4).

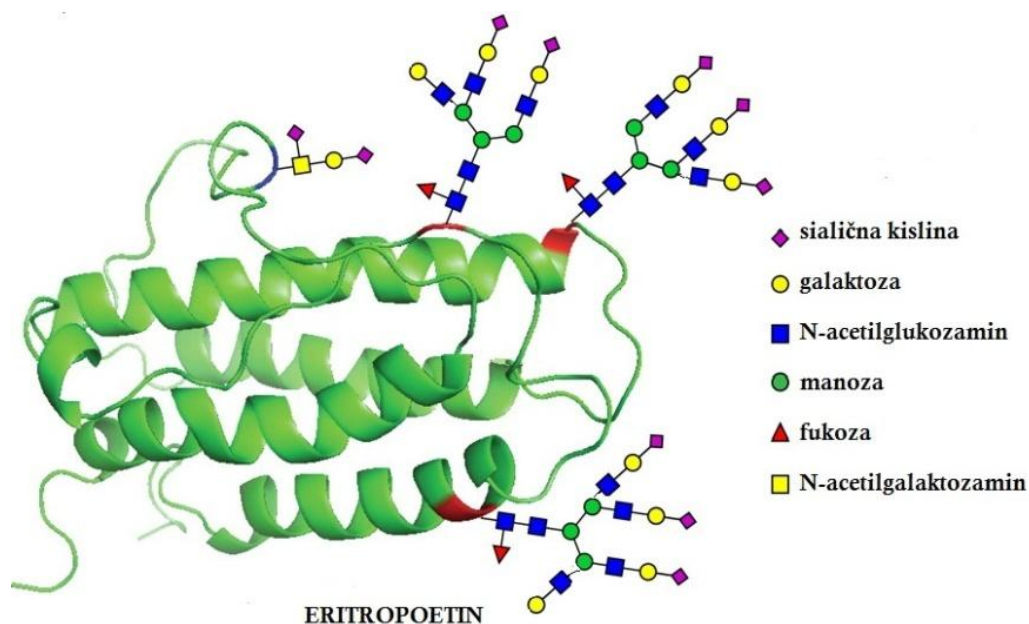


Slika 1: Vloga eritropoetina. Odkrili so parakrino in avtokrino delovanje eritropoetina v telesu. Prirejeno po (4).

EPO povečuje celično proliferacijo, zavira apoptozo, spodbuja angiogenezo in vzdržuje žilno stabilnost. Lokalno zmanjšuje vnetje, edeme, njegovo zaščitno delovanje pa odpira vprašanje o možnostih zdravljenja zapletov kot so; poškodba hrbtenjače, neurodegenerativne bolezni in bolezni mrežnice (5). Odkrili so tudi več tumorskih celic, ki

so proizvajale EPO in EPOR. Domnevajo, da EPO sodeluje pri preživetju in proliferaciji rakavih celic, vendar njegova vloga pri nastanku tumorjev še ni dobro pojasnjena (6).

EPO strukturno uvrščamo med glikoproteine s 166 aminokislinami v velikosti 30-34 kDa (1, 2). Gen za EPO so prvič klonirali leta 1985. Nahaja se na sedmem kromosomu, na poziciji 7q22, kjer ga sestavlja 5 eksonov in 4 introni, v skupni dolžini 3 kb (7, 8). Vsebuje zapis za 193 aminokislin dolgo polipeptidno verigo in omogoča sintezo EPO v obliki prohormona (2). Posttranslacijske modifikacije, ki obsegajo odcepitev 27 aminokislinskega peptida z N-terminalnega konca in odstranitev Arg166 na C-terminalnem koncu, omogočajo nastanek funkcionalnega EPO. Nativno obliko sestavlja 60 % proteinskega dela, preostanek 40 % tvorijo polisaharidi. Molekulo EPO sestavljajo 4 neodvisne sladkorne verige, pripete na asparaginske (N-glikozidne vezi N24, N38, N83) in serinske (O-glikozidna vez S126) ostanke ter dve intramolekularni disulfidni vezi vzpostavljeni med cisteini (Cys7 - Cys161 in Cys29 - Cys33) (1). Za *in vitro* aktivnost je potreben le proteinski del molekule, medtem ko sladkorne komponente sodelujejo pri biološki aktivnosti EPO *in vivo*. Pomembne so pri biosintezi EPO, sekreciji, afiniteti do receptorja, podaljšujejo delovanje EPO in zmanjšujejo njegovo eliminacijo iz telesa (8). Na sladkorne skupine EPO je vezanih najmanj 10 molekul sialične kisline, kar daje molekuli kisel značaj z izoelektrično točko okoli 4,4 (2). Če se na EPO ne veže dovolj sialičnih kislin, se ta hitro izloči iz krvnega obtoka preko vezave na galaktozni receptor v jetrih (4).



Slika 2: Struktura eritropoetina. Na molekuli EPO so 4 neodvisne sladkorne verige pripete na asparaginske ali serinske ostanke, nastaneta pa tudi dve intramolekularni disulfidni vezi med Cys7 in Cys161 ter med Cys29 in Cys33. Prirejeno po (1,8).

1.1.1 HOMEOSTAZA IN REGULACIJA ERITROPOETINA

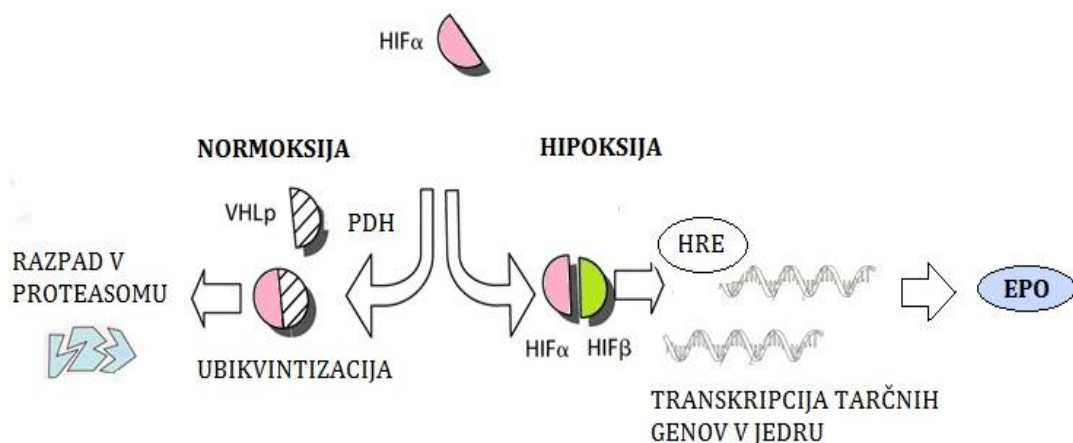
Rdeče krvne celice oz. eritrociti zagotavljajo nemoteno oskrbo tkiv s kisikom, in sicer s prevzemom kisika iz pljuč in transportom do vseh celic, obratno pa odstranjujejo CO₂ iz telesa. Pri izmenjavi plinov sodelujeta kardiovaskularni in respiratorni sistem, kjer so pomembni oksiformna kapaciteta volumske enote krvi (kapaciteta za prenos kisika), mehanizmi dihanja (alveoarna ventilacija, difuzija O₂ skozi alveolokapilarno membrano, perfuzija alveolov s krvjo) in zadostna oskrba tkiv s krvjo. Stanje pomanjkanja O₂ v tkivih glede na potrebe oksidativnega metabolizma imenujemo hipoksija, do katere lahko pride v primerih, kadar:

- ni dovolj O₂ v vdihanem zraku (premik na višje nadmorske višine, bivanje v hipobaričnih komorah, dušikovih sobah),
- je dobava O₂ omejena zaradi bolezenskih stanj (obsežne krvavitve, anemije, pri zmanjšanem pretoku krvi skozi ledvica, zmanjšani afiniteti hemoglobina do O₂, pri kronični obstruktivski pljučni bolezni in pri nekaterih oblikah srčnih boleznih) in
- so močno povečane metabolične potrebe po O₂ (intenzivni telesni napor, tirotoksikoza) (9).

S pomočjo študij na transgenih miših so odkrili specializirane intersticijske celice v ledvicah, občutljive na znižan pO₂ v tkivih (hipoksijo) in predstavljajo počasnejši sistemski kompenzacijski odziv na nivo O₂ v telesu. Te fibroblastom podobne celice proizvajajo hormon EPO, ki s povečano eritropoezo izboljša oksiformno kapaciteto krvi (10). Ledvica dnevno proizvede 2–3 IU EPO/kg telesne teže pri zdravem posamezniku za nemoteno vzdrževanje bazalne koncentracije EPO (6–32 IU/l krvi) in s tem eritrocitne kapacitete. Določena bolezenska stanja vplivajo na proizvodnjo EPO v ledvicah. Ne zadostno sintezo EPO opazimo pri kroničnem ledvičnem popuščanju, akutnih in kroničnih infekcijah, avtoimunih boleznih in opeklinah. Do hiperodzivnosti ledvičnih celic oz. pretirane sinteze EPO privedejo kronična višinska bolezen, ledvične ciste, stenoza ledvične arterije in tumor ledvične skorje. Pretok krvi v ledvicah ima cirkadiani ritem, zato lahko pričakujemo dnevno nihanje v proizvodnji hormona. EPO doseže najvišje ravni v večernih urah in ponoči, medtem ko so zjutraj zabeležili relativno manjše vrednosti. Koncentracija EPO se v hipoksičnih pogojih poveča celo za 100–1000-krat in narašča preko zvečanja števila celic, ki proizvajajo EPO in ne kot zvišana koncentracija EPO znotraj ene celice (11). Pri primerjavi stopnje izražanja informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) se ta razlikuje

glede na mesto nastanka (ledvica, jetra), kar pripisujejo različnim podpornim elementom gena. Gen za EPO ima v ledvicah na 5`- glavni regiji vezan aktivni pospeševalec, na hipoksijo odziven element (HRE), v jetrih se HRE nahaja na 3`- regiji. V obeh tkivih je izražanje EPO regulirano s strani specifičnih transkripcijskih faktorjev (12). V normalnih pogojih (normoksija) transkripcijo gena za EPO preprečujeta vezavni protein GATA 2 (GATA-2) in jedrni faktor κ B (NF- κ B), inhibitorno delujejo tudi provnetni citokini, interlevkin-1 (IL-1) in tumor nekrozni faktor - α (TNF- α). V primeru hipoksije GATA-2 razpade, kar omogoči vezavo HRE s hipoksično inducibilnim faktorjem (HIF) (13). Poleg HIF stimulatorno deluje tudi hepatocitni jedrni faktor 4 α (HNF-4 α) (12). HIF je proteinski heterodimer, sestavljen iz dveh osnovnih α vijačnic in β zanke. Do sedaj so bile odkrite tri različne podenote α , in sicer HIF-1 α , HIF-2 α in HIF-3 α , ki so v citoplazmi in so občutljive na nivo O₂. β – podenota (ARNT) je konstantno prisotna v jedru (14). HIF-1 α regulira celično in sistemsko prilagajanje organizma na fiziološki stres oz. hipoksijo z aktivacijo genov za EPO, vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF), glukozni transporter (GLUT-1, GLUT-3), transferin in transferinski receptor (4, 15).

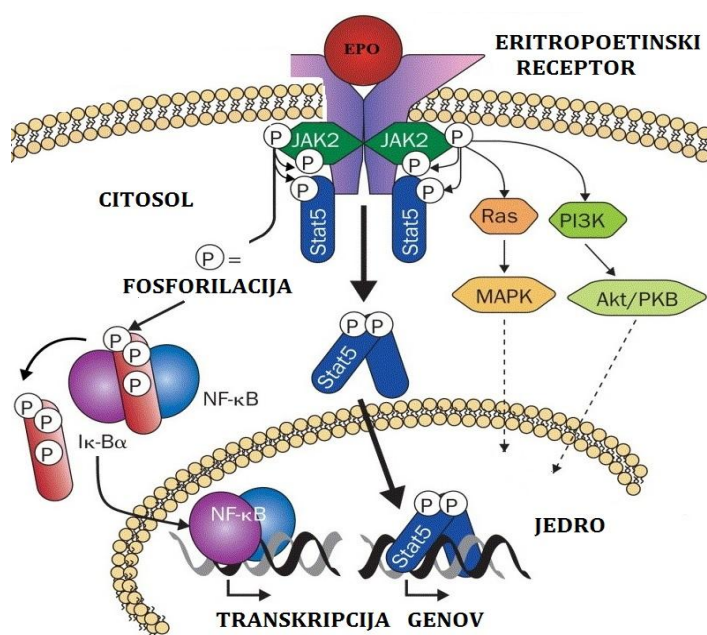
V novejših raziskavah so velik pomen namenili faktorju HIF-2 α . Za razliko od HIF-1 α , ki se nahaja v jedrih vseh celic; so HIF-2 α našli v vaskularnih endotelijskih celicah, ledvičnih intersticijskih celicah, hepatocitih, kardiomiocitih in astrocitih (10). Odkrili so pomembno vlogo pri regulaciji sinteze EPO pri odraslih in določili HIF-2 α kot glavno farmakološko tarčo pri zdravljenju anemij (posledica znižane sinteze EPO) v prihodnosti (16).



Slika 3: Aktivacija in razpad hipoksija inducibilnega faktorja HIF. Pri normalnem arterijskem pO₂ se prolinski ostanki (Pro⁴⁰², Pro⁵⁶⁴ ali Pro⁴⁰⁵, Pro⁵³¹) na α - podenoti HIF hidroksilirajo s prolil-hidroksilazo (PDH). Delovanje encimov PDH je odvisno od prisotnosti kofaktorjev 2-oksoglutarata, askorbata in železa (Fe²⁺). Hidroksilirani prolini se povežejo s proteinom von Hippel-Lindau (VHL), kar vodi do ubikvintizacije nastalega kompleksa in hitrega razpada v proteasomu. Nasprotno, so v hipoksičnih razmerah encimi PDH manj aktivni, podenota HIF- α se stabilizira, potuje do jedra, kjer se združi v dimer skupaj z β -podenoto, ARNT. Dimer (HIF-1 α /HIF-1 β ali HIF-2 α /HIF-1 β) se na specifičnem odseku gena za EPO veže na HRE, kar sproži kaskado reakcij, aktivira transkripcijo gena in posledično sintezo EPO. Ledvične celice nato novonastali EPO sprostijo v krvni obtok. Prirejeno po (17, 18, 19).

1.1.2 ERITROPOETINSKI RECEPTOR

EPO po krvnem obtoku potuje do svojih tarčnih celic. To so vse celice, tako hematopoetske kot celice endotelijskih, možganskih, mišičnih, srčnih in ledvičnih tkiv. Vsem je skupen EPOR, ki se nahaja na celični površini, in po vezavi s svojim fiziološkim ligandom EPO sproži kaskado reakcij (4, 12). Za vezavo EPO so najbolj občutljive matične eritroidne celice (BFU-E; in predvsem CFU-E), kjer se izražanje EPOR bistveno poveča, celo za desetkrat, med pozno eritropoezo pa količina EPOR molekul upade (4, 20). Gen za človeški EPOR, dolg 6 kb, vsebuje 8 eksonov in kodira 508 dolgo aminokislinsko zaporedje prekursorja EPOR. Med posttranslacijskimi modifikacijami, ki obsegajo glikozilacije in fosforilacije EPOR, se molekulska masa glikoproteina poveča s 56 kDa na 66 kDa (21). EPOR je transmembranski protein, član družine citokinskih I receptorjev, kamor spada tudi raznolika skupina hematopoetskih faktorjev in rastnih hormonov (8). Zrela oblika EPOR vsebuje 3 regije; ekstracelularno, transmembransko in citoplazemsko (Slika 4). Ekstracelularna regija je 225 dolgo aminokislinsko zaporedje, sestavljeno iz dveh strukturnih motivov; ohranjenih cisteinskih ostankov (domena D1 in D2) (7) in zaporedja Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSAWSE). Zaporedje WSAWSE prispeva k izražanju EPOR na celični površini, aktivaciji EPOR in vezavi EPO na receptor (4). Citoplazemska regija EPOR nima nobene encimske aktivnosti, vendar vsebuje fragmenta Box 1 in Box 2, ki sta odgovorna za aktivacijo določenih signalnih poti preko Janus kinaze 2 (JAK2). V študijah so ugotovili, da ima molekula EPO dve vezavni mesti za EPOR; visoko afinitetno (nM) in nizko afinitetno vezavno mesto (μM) (5).



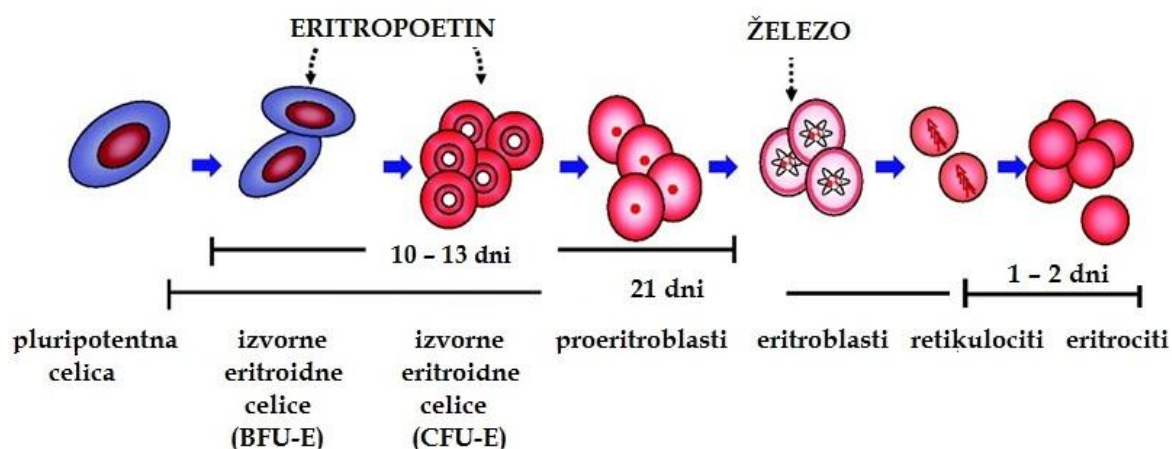
Slika 4: Vezava eritropoetina na receptor

Ob vezavi EPO na zunajcelično območje dveh EPOR se spremeni konformacijsko stanje. Homodimerizacija EPOR omogoča zblizanje dveh molekul JAK2, poteče aktivacija JAK2 in EPOR. Sledi fosforilacija 8 tirozinskih ostankov citoplazemske regije EPOR, ki delujejo kot vezavna mesta za celične proteine s Src-2 (SH2) homologno domeno kot so Src-homologna tirozin fosfataza, fosfatidil-inozitol 3 kinaza (PI-3K/Akt), prevodniki signala in transkripcijskih faktorjev (STAT5). Povezava EPO/EPOR aktivira signalne poti, ki omogočajo obrambo matičnih eritroidnih celic pred apoptozo in normalni razvoj eritrocitov. Prirejeno po (5).

Blokiranje celičnega signaliziranja EPO/EPOR poteka zelo hitro. EPOR je takoj po fosforilaciji podvržen reakcijam ubikvitizacije in dokončno razpade v lizosomih. Ostala dejavnika vključena v negativno regulacijo sta negativni regulator SHP1 (protein tirozin fosfataze) in citokin inducibilni SH2 protein (SOCS1) (22).

1.1.3 ERITROPOEZA

Človeško telo vsebuje 5 l krvi, 45 % predstavljajo celični elementi (eritrociti, levkociti, trombociti), ostalo je plazma (55 %). Eritropoeza je proces nastajanja zrelih in funkcionalnih rdečih krvnih telesc v kostnem mozgu. Normalno število eritrocitov v krvi je okoli 5×10^{12} celic/l, življenjska doba pa od 100 do 120 dni. Za vzdrževanje stabilnega krvnega obtoka se propadli eritrociti (okoli 1 % dnevno) nadomestijo z novimi; dnevna produkcijska kapaciteta je $2,5 \times 10^{11}$ celic/dan (23). Nefunkcionalni eritrociti se dokončno razgradijo v jetrih, vranici ali kostnem mozgu s pomočjo makrofagov. Eritrociti so morfološko bikonkavni diski brez jedra, mitohondrijev in ribosomov, v svoji citoplazmi pa vsebujejo Hb, globularno molekulo, katere ključna naloga je izmenjava O_2 in CO_2 med pljuči in tkivi. Tetramerni protein sestavljajo dve α in β verigi ter 4 molekule železa (Fe), ki so vključene v hem. Molekule O_2 se reverzibilno vežejo po principu alosterije na Fe (fero stanje Fe^{2+}) in tvorijo oksihemoglobin. Koncentracija Hb običajno znaša med 120 in 180 g/l (7, 24). Za potek normalne eritropoeze je pomemben hormon EPO, ki ga uvrščamo v družino citokinov, kamor spadajo rastni hormon, prolaktin, granulocitne in trombocitne kolonije stimulirajoči faktor (CSF) in interleukini 2–7 (7). Na delovanje EPO vplivajo tudi hormoni, kot so testosteron, somatotropin in inzulinu podobni rastni faktor 1 (IGF-1) (25).



Slika 5: Eritropoeza v kostnem mozgu. Razvoj rdečih krvnih celic poteka v kostnem mozgu po zgoraj opisanih stopnjah. Pomembna koraka sta vključevanje Fe in povečana sinteza Hb v eritroblastih, ki se z izločitvijo jedra (enukleacija), pretvorijo do retikulocitov. Ti se sprostijo v krvni obtok in v 1–2 dneh dozori do funkcionalnih eritrocitov. Prirejeno po (24).

1.2 REKOMBINANTNI ERITROPOETIN

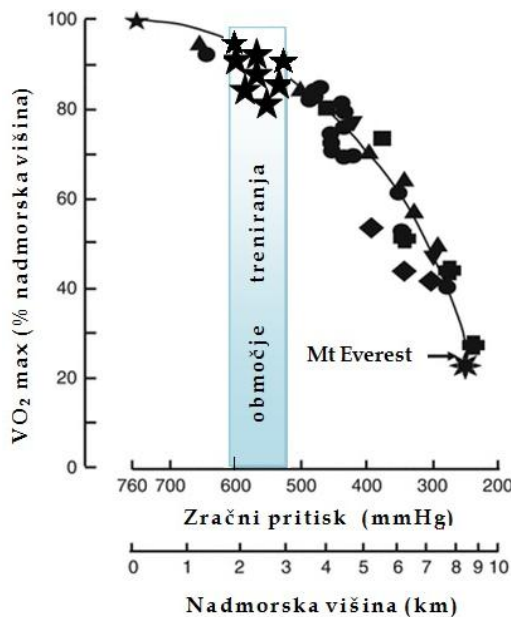
Napredek sodobne biotehnologije je omogočil razvoj rekombinantnega človeškega eritropoetina (rHuEPO) za potrebe pri zdravljenju anemij, zlasti tistih, ki so posledica kronične bolezni oz. odpovedi ledvic (26). Prav tako se rHuEPO uporablja za zdravljenje anemij pri vnetnih, avtoimunskih boleznih, pri okužbah z virusom humane imunske pomanjkljivosti (HIV), za zdravljenje anemij pri nedonošenčkih, po avtologni transfuziji pred operacijo, za zdravljenje anemij, ki nastanejo pri terapiji rakavih obolenj s kemoterapijo in radioterapijo (2, 27). Intravenska ali podkožna aplikacija rHuEPO s stimuliranjem eritropoeze zviša koncentracijo hemoglobina (Hb) (28). Posledično se izboljša ne le fizično stanje anemičnih bolnikov, temveč se zmanjša obseg hemodializ, transfuzij ter s tem povezanih zapletov (povečana intravenska količina železa, imunološke reakcije, virusne in bakterijske okužbe). Pri terapiji z rHuEPO je potrebno redno spremljanje koncentracije Hb, da se preprečijo nezaželeni tromboembolični zapleti, hipertenzija, alergične reakcije in primeri aplazij rdečih krvnih celic (PRCA) (2, 15, 29). Danes imamo na tržišču več različnih eritropoetinskih analogov, ki se od endogenega EPO razlikujejo po celičnih sevih iz katerih so izolirani. Translacijske modifikacije EPO so specifične za posamezne sesalske celice, razlikujejo se v tipu glikozilacije, proizvodnem procesu, farmakološkem delovanju, v farmakodinamičnih (afiniteta do EPOR) in farmakokinetičnih (razpolovna doba, očistek ...) lastnostih (8, 15, 24, 30). Vsi klinično uporabni rHuEPO se pridobivajo bodisi iz ovarijskih celic kitajskega hrčka (CHO), bodisi iz ledvičnih celic mladičkov hrčka (BHK) ali iz človeških fibrosarkomskih celic (HT-1080) (8). Te sesalske celične linije zagotavljajo identično aminokislinsko zaporedje, pravilno tvorbo disulfidnih mostov in štiri glikozilacijska mesta (28). V prvo generacijo rHuEPO uvrščamo epoetine alfa in beta. Večina jih je pridobljenih iz CHO s transfekcijo človeške EPO komplementarne molekule DNA ali gena za EPO. Prvi komercialno pridobljen epoetin alfa je bolj homogen in izkazuje manj bazičnih lastnosti kot epoetin beta, le-ta pa ima večjo biološko aktivnost (29). V drugo generacijo eritropoeze – stimulirajočih faktorjev (ESA) – uvrščamo darbepoetin alfa (NESP), ki je modificiran epoetin alfa, z dvema dodatnima N-glikozilacijskima mestoma (31). Pridobivajo ga iz CHO s točkovno usmerjeno mutagenezo (29). NESP ima zaradi dodatnih verig ogljikohidratov in 22 sialičnih kislin višjo molekulsko maso, tri-krat daljšo razpolovno dobo in s tem boljšo biološko aktivnost. V primerjavi s prvo generacijo se je interval

doziranja zmanjšal s tri-krat na enkrat tedensko administracijo zdravila za dosego enakega farmakološkega učinka (32). S kovalentno vezavo metoksi polietilen glikol polimera (PEG) na epoetin beta so ustvarili tretjo generacijo epoetinov, pegilirano obliko epoetina beta (CERA). CERA ima molekulsko maso okoli 60 kDa in v primerjavi z zgoraj opisanimi epoetini in NESP-om bistveno daljšo biološko uporabnost (21). Sedanje raziskave novih analogov EPO kot so peptidni mimetiki EPO, fuzijski proteini EPO, endogeni aktivatorji gena EPO in genska terapija, so usmerjene predvsem v izboljšanje fizikalno-kemijskih lastnosti, novih formulacij za peroralno aplikacijo zdravil, zmanjšanje dozirnih intervalov in zagotavljanje visokega varnostnega profila zdravil. Zgoraj omenjeni analogi EPO so sedaj v fazah kliničnih testiranj (8, 15).

1.2.1 ZLORABA REKOMBINANTNEGA ERITROPOETINA

Svetovna protidopinška agencija (WADA) opredeljuje krvni doping kot »nedovoljeno uporabo nekaterih tehnik in/ali snovi za povečanje števila eritrocitov, ki omogočijo dostavo večjega števila molekul O₂ v mišice in s tem povečajo aerobno moč« (33, 34). Tako kot endogeni EPO tudi rHuEPO aktivira enake mehanizme za vzpostavitev normalne dostave O₂ vsem tkivom. Pozitivne učinke rHuEPO so začeli izkoriščati športniki predvsem za izboljšanje svoje fizične zmogljivosti na tekmovanjih. Mednarodni olimpijski komite (IOC) je leta 1990 prepovedal uporabo rHuEPO v športu in ga uvrstil na listo nedovoljenih substanc, čeprav do takrat še niso poznali direktne metode s katero bi detektirali koncentracijo rHuEPO v bioloških vzorcih. V nekaj letih so pod okriljem WADA-e razvili indirektne in direktne metode za določitev rHuEPO, ki se še danes uporabljajo ne le za protidopinške namene temveč tudi za spremljanje učinkovitosti zdravljenja z rHuEPO in za ocenjevanje delovanja ledvic (1, 35). Hematološki parametri, ki se zvišajo ob jemanju rHuEPO so koncentracija Hb, Ht, število retikulocitov, delež hipokromnih makrocitov in serumska koncentracija topnega transferinskega receptorja (sTfr), regulirana s strani celičnega železa (20). Z encimskoimunskim testom (ELISA) in radio-imunološkimi metodami (RIA) določamo serumske koncentracije EPO. Uvedba biološkega potnega lista omogoča še večji pregled nad spremembami hematoloških kazalcev med časovnimi obdobji, zaobjema intra- in interindividualne razlike med športniki ter omogoča boljši pregled za dokazovanje zlorabe rHuEPO. Za razliko od indirektnih metod je izoelektrično fokusiranje (IEF) prva direktna metoda s katero detektiramo in ločimo endogeni EPO ter rHuEPO v urinskih in krvnih vzorcih (36).

1.3 ŠPORTNA AKTIVNOST NA VIŠJI NADMORSKI VIŠINI



Med fizičnim naporom so potrebe organizma po O₂ zelo velike in lahko dosežejo mejno vrednost, maksimalno aerobno kapaciteto (VO₂ max, l/min). VO₂ max je največji volumen O₂ (l), ki ga lahko telo porabi na časovno enoto (min) med intenzivno vadbo. Višja nadmorska višina zmanjša pO₂ v arterijski krvi, povzroči tkivno hipoksijo in posledično zviša dostavo O₂ skeletnim mišicam kar vpliva na izboljšanje športnikove vzdržljivosti, predvsem v športnih disciplinah, kot so tek na dolge razdalje, kolesarjenje ali tek na smučeh (38).

Slika 6: Maksimalna aerobna kapaciteta v odvisnosti od zračnega pritiska oz. nadmorske višine. Največja poraba O₂ (VO₂ max) pada z naraščajočo nadmorsko višino, že od 600 m naprej. Na višini, kjer potekajo višinski treningi (2000 – 3000 m), zmanjšanje VO₂ max nakazuje veliko variabilnost (5 – 20%). Prirejeno po (37).

1.3.1 FIZIOLOŠKA PRILAGODITEV NA VIŠINSKE RAZMERE

Vzpon na višje nadmorske lege predstavlja stresno okolje za organizem, ki se zaradi motenj v homeostazi O₂ prilagodi z aktivacijo komponent nevroendokrinega sistema. Fiziološki odzivi se sprožijo takoj po prihodu na višino in se v celoti razvijejo v nekaj dnevih, medtem ko daljša izpostavljenost zahteva postopne prilagoditve v nekaj tednih. Avtonomni živčni sistem in nadledvična žleza vplivata na delovanje kardiovaskularnega, respiratornega sistema in na metabolične procese v telesu (39).

- Akutna prilagoditev

Hipoksija aktivira periferne kemoreceptorje (karotidno telo), ki z delovanjem na dihalni center v podaljšani hrbtenjači, povzročijo hiperventilacijo in povečajo volumen pljuč. Človek diha hitreje in globlje kot odgovor na padec arterijskega pO₂ pod fiziološko mejo 100 mmHg. Stranski učinek je prekomerno izločanje CO₂, zniža se koncentracija ionov H₃O⁺ (pH) v krvi, kar vodi v respiratorno alkalozo. Zaradi alkaloze se disociacijska krivulja Hb premakne v levo. Večja afiniteta Hb do O₂ omogoča lažjo difuzijo O₂ iz pljuč v kri, vendar težje oddajanje O₂ tkivom. Pod vplivom hipoksije se iz nadledvične žleze sproščata adrenalin in noradrenalin. Vezava na β-adrenergične receptorje povzroči

simpatično stimulacijo srca. Arterijski tlak ostane konstanten, kljub simpatični aktivnosti, saj hipoksija direktno vpliva na periferno vazodilatacijo, ki onemogoči dvig arterijskega tlaka. Takojšnja akutna prilagoditev ne more v celoti izboljšati oksiformne kapacitete krvi za maksimalne potrebe tkiv po O_2 med telesno obremenitvijo. Posledično upade tudi VO_2 max (41).

- Aklimatizacija pri daljši izpostavljenosti

Daljše bivanje nad 2000 m v 10–14 dneh zviša občutljivost perifernih kemoreceptorjev, ki povzročijo stanje ventilacijske aklimatizacije. Motnje v kislinsko - bazičnem ravnotežju se popravijo zaradi pospešenega izločanja bikarbonatnega aniona (HCO_3^-) iz ledvic, kar pa vpliva na zmanjšano pufersko kapaciteto plazme (42). Renalna kompenzacija in povečana sinteza 2,3-bisfosfonata v eritrocitih prispevata k lažjemu oddajanju O_2 s Hb, disociacija krivulja O_2 se premakne nazaj v normalen položaj. Izločanje večjih količin soli (Na^+) in vode (povečana diureza) zmanjša volumen plazme, kar posledično poveča koncentracijo Hb v prvih dneh izpostavljanja višini. Po 2–3 tednih bivanja nad 2000 m opazimo povišano koncentracijo Hb na račun večjega števila novo nastalih eritrocitov kot zakasneni odgovor eritropoeze, ki je ena izmed glavnih značilnosti višinske aklimatizacije (40). Srčni utrip se zmanjša, čeprav je simpatična aktivnost izrazito zvišana. Upad srčnega utripa pojasnjujejo z aktivacijo vagalnega tonusa in morebitno negativno regulacijo β -receptorjev (42). Spremembe so opazne tudi v morfološki in metabolični funkciji skeletnih mišic (zmanjšanje velikosti mišičnih vlaken). Brez aklimatizacije učinki hipoksije omejujejo duševno in fizično zmogljivost, kar nakazuje postopni upad VO_2 max, predvsem pri profesionalnih športnikih (40). Zdravstvene težave, ki nastopijo pri prehitrem vzponu, so odvisne od nadmorske višine, hitrosti vzpenjanja, individualne predispozicije in pomanjkanja aklimatizacijskih procesov. Najpogosteje se pojavijo simptomi kot so glavobol, vrtoglavica, otopelost, slabost in utrujenost, ki so značilni za akutno višinsko bolezen (AMS) (43). Simptomi se pojavijo postopoma po 4–8 urah bivanja na višini > 2000 m in minejo po 3–4 dneh. V nekaterih primerih (individualna občutljivost, hiter vzpon na višine > 4000 m) lahko pride do resnejših oblik višinske bolezni, tj. možganskega (HACE) in pljučnega (HAPE) edema. Smrtno nevarna stanja zahtevajo takojšnjo ponovno oksigenacijo, predvsem s spustom na nižjo nadmorsko višino. Za preprečitev pojava opisanih patoloških oblik je potreben postopen vzpon (manj kot 400 m višinske razlike med dvema zaporednima nočema) in omejitev gibanja v prvih 3 dneh na višini (37).

1.3.2 OBLIKE VIŠINSKIH TRENINGOV

Trenutno so v vrhunskem športu v uporabi različni višinski treningi. Čeprav med njimi obstajajo razlike, vsi strmiijo k istemu cilju, tj. doseganje boljših rezultatov na nižini (44).

a) Bivanje in treniranje na visoki nadmorski višini (LH-TH)

Tradicionalni višinski trening zajema življenje in treniranje na višji nadmorski višini med 1800 in 4000 m. Takšen način vadbe uporabljajo športniki, ki živijo na višjih legah (etiopijski, kenijski tekači). Klasično metodo treninga sta leta 1997 izpopolnila Levine in Stray-Gunderson z namenom omejiti slabosti kronične (hipoksične) izpostavljenosti. Pri profesionalnih tekačih so namreč opazili 3–8 % upad telesne zmogljivost po vrnitvi na nižino (izguba mišične mase, utrujenost) (45).

b) Bivanje na visoki in treniranje na nizki nadmorski višini (LH-TL)

Atleti bivajo oz. spijo na 1800–3000 m, nižinski trening opravljajo na < 1500 m višine. Zaradi nenehnega prilagajanja športnikov različnim višinskim razmeram (potovanja na nižino in vzponi na višje lege) so umetno ustvarili hipoksične pogoje, ki korelirajo s tistimi na naravni nadmorski višini (46). V uporabi so metode LH-TL:

- z N₂

Dušikove hiše/sobe so prostori z normobaričnim hipoksičnim okoljem. Zunanji sestavi zraka (20,9 % O₂, 79,0 % N₂) se dodaja 100 % N₂, ki nato preko prezračevalnega sistema v sobi izhaja v obliki sestave 15,3 % O₂ in 84,7 % N₂. Takšna sestava zraka ustreza nadmorski višini okoli 2500 m oz. pO₂ v vdihanem zraku znaša 116 mmHg (47).

- z dodatkom medicinsko preverjenega O₂

Športniki bivajo na naravni nadmorski višini med 2000 in 3000 m, medtem ko intenzivni trening poteka v prostorih z umetnimi ustvarjenimi nižinskimi pogoji (45).

- s filtracijo O₂

V uporabi so stanovanja ali cenovno bolj ugodni hipoksični šotori, kjer O₂ – membranski filtri zmanjšujejo molekularno koncentracijo O₂ v zunanjem atmosferskem zraku in ga nato z generatorjem črpajo v notranjost sobe za doseg zahtevanih višinskih pogojev (45).

Morebitne negativne učinke kot sta upad števila levkocitov in posledično poslabšanje imunskega sistema so opazili pri vrhunskih športnikih, ki so bili določen čas izpostavljeni višinam do 3500 m. WADA je potrdila, da obstajajo potencialni faktorji, ki lahko vplivajo na zdravje športnikov, vendar so ti povečini minimalni in fiziološko nepomembni (44, 45).

c) Bivanje na nizki in treniranje na visoki nadmorski višini (LL-TH)

Metoda LL-TH omogoča bivanje v nižinskem okolju, treniranje zajema kratke časovne intervale (5–180 min) v prostorih/napravah z umetno ustvarjenimi hipoksičnimi pogoji (4500–6000 m) med počivanjem (IHE) ali med intenzivnimi treningi (IHT). Ustrezne pogoje dosežejo z N₂, s filtracijo O₂ ali z barometričnimi (dekompresijskimi) komorami in vdihavanjem hipoksične zračne zmesi (45, 48).

1.3.3 SPREMEMBE ERITROPOETINA IN HEMATOLOŠKIH PARAMETROV POD VPLIVOM TRENINGA »ŽIVI VISOKO – TRENIRAJ NIZKO«

V zadnjih letih je veliko študij namenjenih pridobivanju konkretnih dokazov o dolgotrajnih efektih metode bivanja/spi visoko, treniraj nizko (LH-TL). Določeni znanstveniki so uspešno potrdili dejstva Levin-a in sodelavcev, zasnovana na principu pozitivnih učinkov višinske aklimatizacije in nižinskega treninga (izboljša se maksimalen transport O₂) (49, 50).

V enem izmed Rusko-vih eksperimentov so vrhunski športniki (brez kontrolne skupine) 4 tedne trenirali na 1250 m, 14 ur/dan pa so bili izpostavljeni hipoksičnim višinskim pogojem (2500 m). Po 11 dneh so opazili viden porast v serumski koncentraciji EPO (31 %) in v številu retikulocitov (7 %). Prvi in sedmi dan po končani odpravi so določili 1 do 3 % izboljšanje v VO₂ max na nižini v primerjavi z vrednostmi pred odpravo in metodo LH-TL označili kot ustrezno za uporabo v športni praksi (46). V nasprotju z zgornjimi izsledki so rezultati avstralskih vrhunskih športnikov, ki so po treningu (24 dni, 8-11 ur/dan na višini 2650 m, intenzivni trening na višini 600 m), zaznali porast v serumski koncentraciji EPO po prvem (57 %) in petem (42 %) dnevu, po petnajstih dneh pa so vrednosti izrazito upadle za 4 % glede na izhodiščne vrednosti. Dvig serumskih koncentracij EPO v prvih dneh nakazuje na izredno visok hipoksični dražljaj za sintezo EPO, ki nato najverjetneje upade zaradi negativne regulacije EPO. Prehodno višji EPO ni vplival na pospešeno eritropoezo v kostnem mozgu, saj ni vidnih sprememb v številu eritrocitov in retikulocitov v primerjavi s kontrolno skupino (51). Garnican in sodelavci so poskušali ugotoviti časovno odvisnost na višji nadmorski višini s porastom koncentracije Hb v krvi. Opazili so podobne odzive kot v prejšnjih študijah; po 2 dneh so izmerili 64,2 % porast EPO in po 11. in 19. dnevu zvišano koncentracijo Hb (2 in 3,5 %). Število retikulocitov in sTfR sta bila sprva rahlo zvišana, po 20 dneh so se vrednosti povrnile v normalo. Meritve, opravljene tretji in deseti dan po vrnitvi v dolino, so pokazale nenaden upad tako v koncentraciji Hb (za 1,5 %) kot tudi v koncentraciji EPO (za 41,1 %), kar je v nasprotju s študijami, kjer so

hematološki parametri zvišani še 1 teden, športnikova uspešnost pa vsaj še 3 tedne po vrnitvi v dolino. V kontrolni skupini so se vrednosti EPO spreminjale med treningom, vendar med začetno in končno koncentracijo EPO ni bilo statistično pomembnih razlik ($p > 0,05$). Koncentracija feritina je po koncu priprav drastično narasla, kar je koreliralo s hitrim upadom Hb (zaradi hemodilucije in verjetnim pojavom stanja neocitolize) (52).

Ne smemo zanemariti ostalih fizioloških sprememb, ki nastanejo zaradi višinske tkivne hipoksije in intenzivnih obremenitev. Izboljšanje maksimalnih sposobnosti, zvišana kapaciteta mišičnega pufra, ohranitev velikosti mišičnih vlaken so nehematološki parametri, ki so jih opazili pri profesionalnih tekačih med višinskimi LH-TL treningi (49).

1.3.4 IZBOLJŠAVE VIŠINSKIH TRENINGOV

V športnih panogah, kjer je potrebna visoka vzdržljivost pri premagovanju naporov, so višinski treningi postali osnovni, rutinski način izboljšanja športnikove forme. Da bi preprečili morebitne neželene učinke višinskega treninga predvsem v vrhunskem športu (slabša telesna pripravljenost po pripravah, zdravstvene težave) in izboljšali končne rezultate, je smotrno upoštevati smernice, ki so povzete iz preteklih študij.

a) Optimalni višinski pogoji

Znanstveniki pod okriljem IOC so preiskovali učinkovitost različnih višinskih treningov. Rezultati raziskave so privedli do zaključka, da je za indukcijo pospešene eritropoeze:

- optimalna višina 2200–2500 m nadmorske višine,
- čas treningov na omenjeni višini naj bo vsaj 3–4 tedne,
- minimalna dnevna izpostavljenost najmanj 12 ur/dan; izboljšanje časa pri teku na 5000 m pa so dosegli športniki, ki so 14–18 ur/dan preživeli v hipoksični sobi z znižanim pO_2 (46).

b) Združitev različnih oblik višinskih treningov

Za doseglo boljših izkoristkov hipoksičnih metod so predlagali kombinacijo klasične metode LH-TL skupaj z metodo IHT, kjer bi višinska aklimatizacija, intenzivni nižinski trening in intenzivna vadba na visoki nadmorski višini stimulirala mišične prilagoditve, tako za aerobne kot anaerobne vadbe, in omejili zmanjšanje moči (46).

c) Zdravstveni status športnika

Bolezen ali akutna poškodba med treningom vpliva na upad športnikove pripravljenosti. Aktivacija vnetnih citokinov, kot so interlevkini IL-1 α , IL-1 β in tumor nekrozni faktor - α

(TNF- α), vodi do nižje odzivnosti predhodnih eritropoetskih celic ali do zmanjšane sinteze EPO, dolgoročno pa vodi v anemije. V kontrolni skupini (bivanje in treniranje na 1360 m) so po dveh tednih hudega vnetja in poškodbe pri vrhunskih športnikih opazili drastičen padec v celokupni masi Hb. Pri bolnih in med treningom poškodovanih športnikih (skupina LH-TL) se vrednosti Hb niso zmanjšale (bile so celo primerljive z zdravimi posamezniki v skupini LH-TL), kar nakazuje, kako eritropoetska stimulacija, povzročena zaradi hipoksičnih pogojev, kompenzira zaviralne učinke vnetnih citokinov (53).

d) Ustrezna prehrana

Za ustrezno metabolno aktivnost skeletnih mišic in preprečitev višinsko odvisnega izgubljanja telesne teže morajo športniki dnevno zaužiti dovolj:

- tekočine in kalorične hrane (ogljikohidratov),
- vitaminov (vitamin B₁₂ in folna kislina) in mikroelementov kot so kalcij (Ca), cink (Zn) in železo (Fe). Dodaten vnos Fe skupaj z vitaminom C je izrednega pomena zaradi višinsko pospešene eritropoeze.

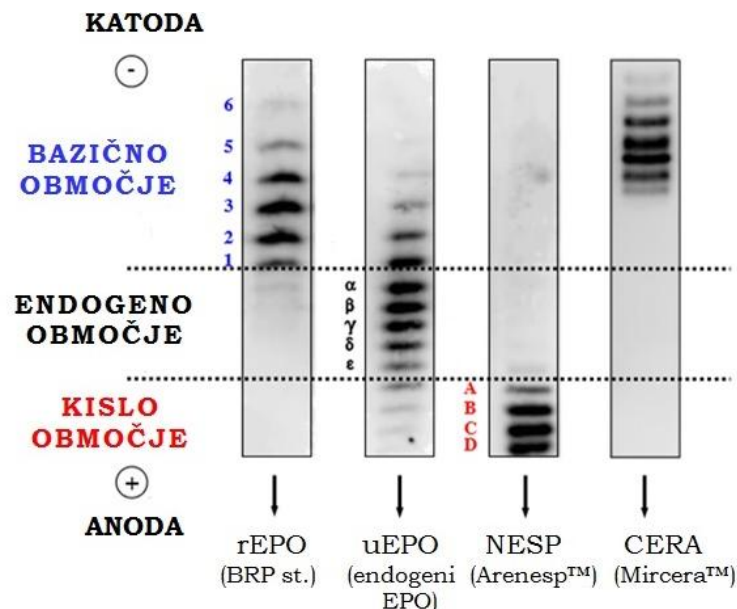
Strokovnjaki pri načrtovanju uravnotežene prehrane športnika upoštevajo trenutne prehranjevalne navade, stanje vadbe, okoljske dejavnike, starost, spol in genetiko posameznika. Efektiven prehranjevalni program prav tako vpliva na izboljšanje športnikovih sposobnosti, pospeši okrevanje in zmanjšuje tveganja za poškodbe (54, 55).

1.4 DETEKCIJA ERITROPOETINA Z IZOELEKTRIČNIM FOKUSIRANJEM

Leta 2000 sta Lasne in de Ceaurriz prvič predstavila izpopolnjeno metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) z dvojnimi prenosom za detekcijo rHuEPO v urinskih vzorcih športnikov (56). Metoda se je izkazala za učinkovito in specifično že istega leta na olimpijskih igrah v Sydneyju. Celoten postopek ločitve med endogenim EPO in rHuEPO obsega koncentriranje urina, razporeditev izoform s pomočjo električnega toka na poliakrilamidnemu gelu z gradientom pH od 8 do 2 (IEF), dvojni prenos in kemiluminiscenčno vizualizacijo (57, 58). Heterogenost med endogenim EPO in rHuEPO temelji na razliki v masi, različni stopnji glikozilacije, številu vezanih sialičnih kislin, kar vpliva na razliko v električnem naboju in izoelektrični točki (pI). pI je tista vrednost pH, pri kateri je neto naboj molekule enak nič. Profil izoform EPO je sestavljen iz števila horizontalnih lis, kjer je njihova pozicija na gelu določena s pI (29, 59). Veliko pozornosti se namenja interpretaciji »atipičnih profilov« endogenega EPO, kajti določeni fiziološki

pogoji, kot sta izpostavljenost hipoksičnim pogojem in kratkotrajna fizična aktivnost, vplivajo na transformacijo urinskih izoform endogenega EPO v netipične, bazične izoforme. Takšna opažanja so poskušali obrazložiti z dejstvom prehodnega motenega delovanja ledvic, ki se opira na vzporedne preiskave proteinurije v istem vzorcu. V normalnih pogojih so izoforme EPO v serumu bolj bazične kot v urinu. Proksimalne tubulne celice lahko absorbirajo večino bazičnih izoform EPO, izoforme kislega območja tako ostanejo v urinu. Intenzivna vadba predstavlja stresno situacijo in vpliva na delovanje ledvic (zmanjšana reabsorbcija v proksimalnih tubulih in povečana glomerulna permeabilnost). Zaradi zasičenosti absorpcije tubulnih celic, te ne morejo več odstranjevati bazičnih izoform EPO, kar so opazili v urinskih vzorcih vrhunskih športnikov. Dodatne pojasnitve takšnih sprememb v profilu izomer endogenega EPO so še danes cilji mnogih raziskav (31, 57, 61).

Metoda IEF z dvojnim prenosom ni primerna le za urinske temveč tudi za plazemske vzorce, kjer izvedemo še imunoafinitetno čiščenje s pomočjo monoklonalnih anti EPO protiteles. Alternativne metode s katerimi lahko spremljamo koncentracijo EPO v bioloških tekočinah so kapilarna elektroforeza, dvo-dimenzionalna elektroforeza (2-D), imunološka metoda (MAIA), masna spektrometrija, vendar le IEF omogoča semi-kvantifikacijo specifičnih izoform EPO (7, 60).



Slika 7: Elektroferogram eritropoetina. Izoforme endogenega EPO so razporejene skozi celotno območje pI (10 do 12 izoform), po jakosti so šibkejše od izoform rHuEPO (25). Epoetini alfa in beta (BRP st.; Biological Reference Preparation of the European Pharmacopoeia) imajo 4 do 6 izoform v bazičnem območju, NESP (Aranesp™) 4 izoforme v kislem območju, CERA (Mircera™) ima pI v najbolj bazičnem območju (60). Prirejeno po (29).

2 NAMEN DELA

Vrsto let športniki izboljšujejo svojo fizično pripravljenost s skrbno načrtovanimi in nadzorovanimi višinskimi treningi. Hipoksično okolje izzove pospešeno eritropoezo, kar vodi do povišanja količine EPO, števila eritrocitov, koncentracije Hb in Ht. Spremembe v hematoloških parametrih zaradi vpliva višinskih treningov so bile v preteklosti nemalokrat tarča raziskav z različnimi zaključki, vendar vpliv višine in intenzivnih treningov na nivo izoform EPO še ni v celoti pojasnjen.

Poglavitni namen diplomske naloge je raziskati vpliv višjih nadmorskih višin in intenzivnih treningov na profil izoform endogenega EPO v urinu, na spremembe v koncentraciji EPO in krvnih parametrov med višinskim treningom. Analizirali bomo krvne in urinske vzorce 12 biatloncev, ki so mesec dni preživel na Rogli v okviru sezonskih športnih priprav. Športniki so bili razdeljeni v dve skupini, LH-TL skupino (spanje v višinskih sobah pri pO_2 , ki ustreza nadmorski višini 2500 m, in treniranje pri pogojih na Rogli, okoli 1500 m) in kontrolno skupino (spanje in treniranje pri pogojih na Rogli okoli 1500 m). Celoten načrt višinske odprave je bil prilagojen po smernicah metode Živi visoko – treniraj nizko.

Po predhodni pripravi urinskih vzorcev bomo z radioimunološko metodo (RIA) določili celokupno koncentracijo EPO v urinu. Razporeditev izoform endogenega EPO na gelu bomo dosegli z uporabo metode izoelektričnega fokusiranja (IEF) z dvojnimi prenosom. Spremembe v profilu izoform bomo ocenili na podlagi elektroferogramov s pomočjo računalniškega programa GASepo. Vpliv višinskega treninga bomo spremljali tudi pri koncentraciji EPO in krvnih parametrih ter te statistično ovrednotili.

Pred načrtovanjem eksperimentalnega dela smo si zastavili naslednje hipoteze:

- (1) Višja nadmorska višina in intenzivni treningi spremenijo profil izoform endogenega EPO v urinu.
- (2) Koncentracija EPO in vrednosti hematoloških parametrov se razlikujejo pred in po odpravi pri športnikih obeh skupin.
- (3) Koncentracija EPO in vrednosti hematoloških parametrov se razlikujejo med športniki obeh skupin pred in po višinski odpravi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V okviru diplomske naloge smo analizirali krvne in urinske vzorce športnikov slovenske biatlonske reprezentance. V študiji je sodelovalo 12 športnikov, od tega 3 ženske in 9 moških, v starosti od 19 do 30 let. Celotne sezonske priprave so trajale približno mesec in pol ter so obsegale manj zahtevni trening pred in po odpravi na Roglo kot tudi 21 dni visokointenzivnega treninga na Rogli. Načrt višinske ekspedicije je bil zasnovan po svetovnih smernicah Živi visoko – treniraj nizko. Preiskovanci so bili po prihodu na Roglo razvrščeni v dve skupini, LH-TL skupino in kontrolno skupino (Tabela I in Tabela II). Športniki v skupini LH-TL so bili 8 ur dnevno izpostavljeni hipoksičnim pogojem, ki ustrezajo nadmorski višini 2500 m (uporaba višinskih sob v času spanja), trenirali so na 1500 m višine, v pogojih na Rogli. Športniki kontrolne skupine so trenirali in bivali na nadmorski višini okoli 1500 m, na Rogli.

Tabela I: LH – TL skupina

	spol	teža (kg)
oseba 1	ženski	61,5
oseba 2	ženski	61,05
oseba 4	moški	70,5
oseba 5	moški	74,1
oseba 7	moški	72,05
oseba 8	moški	81,2
oseba 11	moški	72,7

Tabela II: Kontrolna skupina

	spol	teža (kg)
oseba 3	ženski	64,3
oseba 6	moški	74,1
oseba 9	moški	73,0
oseba 10	moški	75,8
oseba 12	moški	72,6

Vsi preiskovanci so podpisali soglasje o uporabi svojih krvnih in urinskih vzorcev za namene raziskave vpliva višinskih treningov na spremembe nivoja EPO in krvnih parametrov s posledičnim povišanjem športnikove vzdržljivosti. Odvzem vzorcev je bil odobren s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka dokumenta 69/10/10).

3.2 ZBIRANJE VZORCEV

Biatlonci so oddajali vzorce urina (50 ml) in krvi (plazma, v obliki 250 µl alikvotov) pred, med in po odpravi na Roglo. Natančen časovni potek odvzemov bioloških tekočin je prikazan na Sliki 8. Do pričetka analize so bili vzorci urina in krvi shranjeni v zamrzovalniku pri -70 °C. Urinski vzorci so služili za detekcijo EPO z metodo IEF z dvojnim prenosom, odvzeta kri za namene analize hematoloških parametrov, opravljena je bila krvna preiskava (hemogram).



Slika 8: Načrt poteka višinskega treninga in časovni odvzemi urinskih in krvnih vzorcev.

3.3 MATERIALI IN APARATURE

Pri laboratorijskem delu smo skrbno pazili, da smo uporabljali povsem nove materiale, ki še niso bili v stiku z različnimi pralnimi sredstvi. V primeru že uporabljenih materialov, opranih z detergentom, smo te očistili z uporabo 0,1 M raztopine NaOH in štirikratnega spiranja z bidestilirano vodo. Zaradi možne kontaminacije z NaOH smo s pH metrom preverili pH vrednost vode v steklenicah. Z zgoraj opisanimi postopki smo preprečili neželeno denaturacije EPO.

MATERIAL:

- centrifugirke (50 ml, 15 ml)
- centrifugalni filter z ultracel-30k membrano (Amicon[®] Ultra, Millipore): 50 ml in 0,5 ml
- čaša
- distančniki
- elektrodni trakovi (Electrofocusing strips, GE Healthcare)
- epice (1,5 ml)
- erlenmajerica in zamašek
- filter papirčki (Bio - rad)

- filter papir (1F Grade, Munktell)
- kadičke za membrane
- magnetno mešalo
- mehanske pipete
- membrana (ImmobilonTM- P, Millipore)
- membrana (Durapore[®], Millipore)
- nastavki za mehanske pipete
- parafilm
- plastična podpora (Gel-Fix[®] for PAG, Serva)
- plovci za epice
- reagenčni koriti
- rokavice
- stekleni plošči (25 x 12,4 x 0,5 cm in 24 x 12,4 x 0,5 cm)
- steklene pipete (10 ml, 25 ml)
- spatula
- 0,22 µm sterilni vakuumsko filtracijski sistem (Steriflip[®] filter, Millipore)
- stojala za centrifugirke in epice
- škatle za shrambo epic
- škarje
- termometer
- valjček
- vrečka za shranitev gela
- zatiči za držanje kalupa

APARATURE:

- avtomatski pipetor za pipetiranje večjih volumnov
- centrifuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf)
- centrifuga (Centrifuge 5471C, Eppendorf)
- kamera (ImageQuantTM LAS 4000, GE Healthcare)
- magnetno mešalo z možnostjo segrevanja
- mešalo vorteks
- napajalnik (Electrophoresis Power Supply - EPS 3501 XL, Amersham Biosciences)
- napajalnik (PowerPac BasicTM, Biorad)
- naprava za polsuh prenos (Trans - blot[®] SD; Semi – dry transfer cell, BIO – RAD)
- odstranjevalec gela
- pH meter
- rezalnik papirja
- sistem za elektroforezo (MultiphorTM II, Amersham Biosciences)
- stresalnik
- termostatska črpalka (MultiTempTM III, Amersham Biosciences)
- vakuumska črpalka

3.4 PRIPRAVA VZORCEV – KONCENTRIRANJE URINA

Vzorci urina smo pred nanosom na gel najprej skoncentrirali po spodaj opisanem postopku, zaradi majhne količine EPO v urinu. Pri laboratorijskem delu smo se držali načel dobre laboratorijske prakse in z vzorci preiskovancev rokovali kot s potencialno kužnimi.

3.4.1 KEMIKALIJE IN PRIPRAVA DELOVNIH REAGENTOV

- fiziološka raztopina
- 37% raztopina HCl
- raztopina proteinaznega inhibitorja (CompleteTM, Roche): 1 tableto smo raztopili v 2 ml bidestilirane vode neposredno pred analizo. Pri raztapljanju smo si pomagali z mešalom vorteks.
- 3,75 M TRIS/HCl, pH 7,4: (Tris (hidroksimetil) aminometan, Acros Organics): v steklenico z mešalom smo natehtali 218 g TRIS, dodali 220 ml bidestilirane vode in postopoma dodajali HCl do pH 7,4. Ob ustreznem pH smo razredčili z bidestilirano vodo do 500 ml.
- 50 mM TRIS/HCl, pH 7,4: pripravili smo dve raztopini (A in B). Za raztopino A (0,2 M TRIS) smo v steklenico zatehtali 24,2 g TRIS in dopolnili do 1 l s H₂O. Pri raztopini B smo v steklenico odmerili 16,66 ml 37% razt. HCl in dopolnili do 1 l s H₂O (najprej smo dodali nekaj vode, šele nato HCl). Za pripravo 50 mM TRIS/HCl smo uporabili 500 ml A raztopine, 414 ml B raztopine in 1086 ml H₂O.

3.4.2 POSTOPEK KONCENTRIRANJA URINA

1. Urinske vzorce športnikov, shranjene na temperaturi -70 °C, smo čez noč odmrznili.
2. V centrifugirke smo prenesli 18 ml urina in dodali 200 µl (1/100 urina) raztopine proteinaznega inhibitorja ter 1,8 ml (1/10 urina) 3,75 M TRIS/HCl, pH 7,4. Centrifugirke smo zamašili in vsebino premešali z mešalom vorteks.
3. Centrifugirali smo v centrifugi (Centrifuge 5810R, Eppendorf) pri 2700 RCF, 10 min, 20 °C, z namenom odstranitve celic, kristalov in ostalih usedlin, ki bi lahko zamašile filtre in kolone. Supernatant smo prenesli v čisto centrifugirko.
4. S pomočjo vakuumske črpalke smo filtrirali urin skozi 0,22 µm filter (Steriflip® filter, Millipore).

5. Prva ultrafiltracija: uporabili smo centrifugalni filter z ultracel-30k membrano – 50 mL (Amicon[®] Ultra, Millipore) in ultrafiltrirali pri 3220 RCF, 10 min, 20 °C v



Slika 9: Prva ultrafiltracije

- centrifugi (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Zaradi prevelike količine vzorca smo po dodatku preostalega vzorca ultrafiltracijo ponovili pod enakimi pogoji.
6. Koncentrat smo spirali z 20 ml 50 mM TRIS/HCl, pH 7,4 in dodatkom 200 μ l proteinanega inhibitorja. Zaradi prevelike količine smo spirali v dveh delih v centrifugi (Centrifuge 5810R, Eppendorf) pri 3220 RCF, 15 min, 20 °C.
 7. Druga ultrafiltracija: prvi koncentrat smo prenesli v centrifugalni filter z ultracel-30k membrano – 0,5ml (Amicon[®] ultra, Millipore) in ultrafiltrirali pri 14000 RCF, 15 min v centrifugi (Centrifuge 5471C, Eppendorf).
 8. Volumen pridobljenega koncentrata je moral biti manjši ali enak 25 μ l. V primeru manjšega volumna smo do 25 μ l dopolnili s pufrom 50 mM Tris/HCl, pH 7,4. Koncentrat (20 μ l za IEF in 3 μ l za RIA-o + 2 μ l mrtvega prostora) smo prenesli v epice (1,5 ml, Eppendorf) in do nadaljnje analize zamrznili na -20 °C.
 9. Dan pred analizo z metodo RIA smo 3 μ l koncentrata razredčili do 500 μ l s fiziološko raztopino.

3.5 RADIOIMUNOLOŠKA METODA (RIA)

Radioimunološke meritve vzorcev predhodno koncentriranega urina so opravili ustrezno usposobljeni zaposleni Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Za kvantitativno določitev koncentracij EPO v urinu so uporabili radio-imunološki set (EPO-Trac ¹²⁵I RIA KIT, DiaSorin).

3.6 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM

3.6.1 KEMIKAJIJE IN PRIPRAVA DELOVNIH REAGENTOV

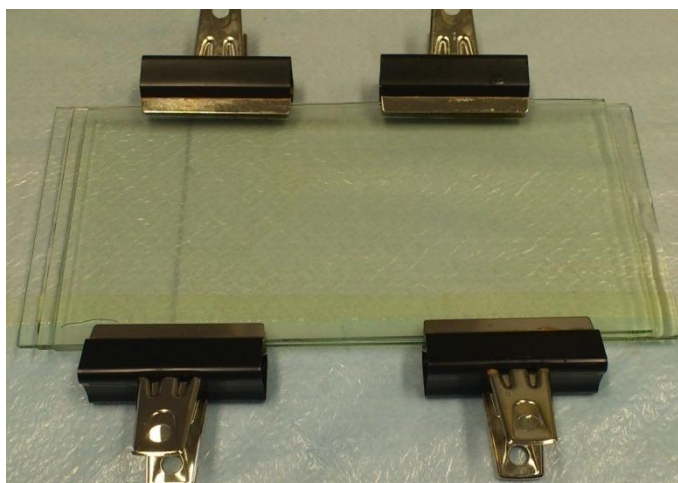
- akrilamid (Acrylamide – BIS, solution (29 : 1), 30 % w/w, Serva)
- amfoliti (Servalit[®] 2–4, 4–6, 6–8, Serva)
- etanol
- glacialna očetna kislina
- metanol
- saharoza (Sukrose, Kemika)
- urea (Urea - Molecular Biology Grade, Calbiochem[®])
- 10% v/v raztopina neionskega detergenta (Tween[®] 20, Calbiochem[®])
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (PlusOne TEMED, Amersham Biosciences)
- PBS (Phosphate buffered Saline, Sigma): za pripravo 1 l PBS, smo v steklenico z mešalom dali 5 tablet PBS in dopolnili do 1 l z bidestilirano vodo. Na magnetnem mešalu smo mešali, dokler se tablete niso raztopile. Pufer smo shranili v hladilniku.
- 438 mM raztopina amonijevega persulfata (APS, Merck): potrebno ga je pripravljati sveže vsak teden. V 2 ml bidestilirane vode smo dodali 0,2 g APS. Centrifugirko smo ovili s aluminijasto folijo in jo shranili pri 4 °C.
- TRIS (Tris (hidroksimetil) aminometan, Acros Organics)
- albumin iz govejega seruma (BSA, Sigma)
- 1% BSA/50 mM TRIS: 50 mM TRIS smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,657 g TRIS, dopolnili z bidestilirano vodo do oznake v 100- ml bučki. Nato smo v drugo 100 ml bučko zatehtali 1g BSA, dopolnili do 100 ml s predhodno narejenim 50 mM TRIS.
- barvilo metil-rdeče (Methyl red, ACS, Reag. Ph. Eur, Merck)
- katodni elektrolit: za pripravo 0,5% w/v raztopine metil rdeče v metanolu (MR/MeOH) smo zatehtali 20 mg barvila MR in ga raztopili v 4 ml MeOH. Za pripravo 20 ml katodnega elektrolita smo uporabili 75 µl (MR/MeOH), 1 ml amfolita 6–8 dopolnili do 20 ml z bidestilirano vodo.
- 0,5 M H₃PO₄ (o – Phosphorsaure, ≥ 85%, p.a., ACS, ISO, Rotipuran[®])
- anodni elektrolit: za pripravo 20 ml anodnega elektrolita smo potrebovali 700 µl H₃PO₄ (85%) in dopolnili do 20 ml z bidestilirano vodo.

- referenčni standard: 600 IU/l epoetin β in 400 IU/l darbepoetin
600 IU/l epoetin β (NeoRecormon[®] 20000 NE/i.e., Roche)
 - raztapljanje 1/100 (raztopina A): 5 μ l epoetina β + 495 μ l 1% BSA/TRIS
 - raztapljanje 1/250 (raztopina B): 5 μ l raztopine A + 1245 μ l 1% BSA/TRIS
- 400 IU/l darbepoetin (Aranesp 150 mg, AMGEN)
 - raztapljanje 1/100 (raztopina C): 5 μ l darbepoetina + 495 μ l 1% BSA/TRIS
 - raztapljanje 1/10 (raztopina D): 5 μ l raztopine C + 45 μ l 1% BSA/TRIS
 - raztapljanje 1/127 (raztopina E): 5 μ l raztopine D + 630 μ l 1% BSA/TRIS
- Za nanos (raztopina F): 200 μ l raztopine B (epoetin β) + 200 μ l raztopine E (darbepoetin) + 44 μ l 10% v/v raztopina neionskega detergenta (Tween[®] 20).
- 0,7% CH₃COOH: v steklenico smo nalili nekaj bidestilirane vode, ji dodali 14 ml CH₃COOH in dopolnili z bidestilirano vodo do oznake.
- glicin (Glycine, Acros Organics)
- 25 mM Tris/192 mM Glicin pufer: v steklenico z mešalom smo dodali 3,29 g TRISA in 14,41 g glicina ter dopolnili z bidestilirano vodo do 1l. Pufer smo premešali na magnetnem mešalu in ga shranili v hladilniku.
- DTT (UltraPure[™] Dithiothreitol – Cleland's Reagent, Invitrogen[™])
- 5 mM DTT v PBS: natehtali smo 116,25 mg DTT in dopolnili do 150 ml s PBS.
- LFM (Posneto mleko v prahu, Pomurske mlekarne)
- 0,5% LFM/PBS: zatehtali smo 5 g LFM in ga dopolnili do 1 l s PBS.
- 1% LFM/PBS: 5% LFM/PBS smo redčili v razmerju 1:5 s PBS.
- 5% mleko v prahu z nizko vsebnostjo maščob (5% LFM): zatehtali smo 10 g LFM in ga dopolnili do 200 ml s PBS.
- primarna protitelesa (mišja monoklonska protitelesa proti človeškemu EPO, AE7A5, R&D)
- primarna protitelesa (1/1000; 1 μ g/ml) v 1% LFM/PBS: neposredno pred uporabo smo v centrifugirko odmerili 10 ml 1% LFM/PBS in s pipeto dodali 10 μ l primarnih protiteles. Nepripravljena protitelesa smo hranili na -70 °C.
- sekundarna protitelesa (kozja biotinirana IgG proti mišjim protitelesom, Thermo Scientific)

- sekundarna protitelesa (1/1600) v 1% LFM/PBS: neposredno pred uporabo smo v centrifugirko odmerili 10 ml 1% LFM/PBS in dodali 6,25 μ l sekundarnih protiteles. Nepripravljena protitelesa smo hranili v zamrzovalniku na -70 °C.
- terciarna protitelesa (kompleks streptavidin – peroksidaza, Invitrogen)
- terciarna protitelesa (1/1330) v 1% LFM/PBS: neposredno pred uporabo smo v centrifugirko dali 10 ml 1% LFM/PBS in s pipeto dodali 7,5 μ l terciarnih protiteles. Nepripravljena protitelesa smo hranili v zamrzovalniku na -70 °C.
- kemiluminiscentna raztopina (SuperSignal West Femto, Thermo Scintific)

3.6.2 PRIPRAVA GELA

1. Gel smo vlili 24 ur pred analizo in ga shranili preko noči v hladilniku v vlažnih pogojih, da smo preprečili pretirano izsušitev gela.
2. V erlenmajerico z mešalom smo zatehtali 16,8 g uree, 1,95 g saharoze in dodali 15 ml bidestilirane vode, 2 ml amfolita 2–4 in 4–6 ter 6,7 ml akrilamida.
3. Mešanico smo istočasno razplinjali s pomočjo vakuumske črpalke in mešali na magnetnem mešalu najmanj 15 minut.
4. Medtem smo pripravili kalup za vlivanje gela. Stekleno ploščo z merami 25 x 12,4 x 0,5 cm smo uporabili kot podporo za Gel-Fix[®], stekleno ploščo z merami 24 x 12,4 x 0,5 cm pa kot pokrov. Na podporo smo nakapali bidestilirano vodo ter Gel-Fix[®] namestili 0,4 cm preko zunanjšega krajšega roba. Za odstranitev presežka vode smo Gel-Fix[®] prekrili z vpojnim papirjem ter povaljali z valjčkom. Poskrbeli smo, da pod Gel-Fix[®]-om ni bilo mehurčkov.



Slika 10: Kalup za vlivanje gela

5. Vzdolž vsakega dolgega roba smo nastavili distančnika debeline 1 mm.
6. Pokrov smo očistili z etanolom in ga zbrisali do suhega. Postavili smo ga na podporo tako, da se je krajši rob pokrova uskladi s krajšim robom podpore. Z izpostavitvijo okoli 1,4 cm Gel-Fix[®] smo omogočili nanos gela. Na koncu smo pritrdili zatiče ob straneh kalupa.
7. Po 15 minutah mešanja smo gelski mešanici dodali 165 μ l APS in 16,5 μ l TEMED ter nežno premešali. Gel smo s konstantnim pretokom nanесли na sredino zgornjega roba kalupa in pustili, da se je kalup zaplnil po principu kapilarnega vleka.
8. Kalup smo pustili stati najmanj eno uro, da je gel polimeriziral, nato pa smo ga shranili čez noč na vlažnem na 5–8 °C.

3.6.3 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

1. Termostatsko črpalko smo nastavili na 10 °C.
2. Spodnjo ploščo gela smo od kalupa ločili s pomočjo tanke spatule, ki smo jo vstavili med podporno ploščo in Gel-Fix[®] pod koncem enega od distančnikov. Nežno smo dvignili kotiček Gel-Fix[®]-a in gel odstranili iz steklenega pokrova. Krajša dela gela smo obrezali s škarjami.
3. Z vodo smo omočili površino hladilne plošče. Gel z Gel-Fix[®]-om navzdol smo postavili na hladilno ploščo, ga poravnali ter popivnali odvečno vodo. Preverili smo prisotnost mehurčkov pod Gel-Fix[®]-om z namenom preprečiti vnetje gela na visokonapetostni elektrodi.



Slika 11: Priprava elektrodnih trakov

4. Elektrodna trakova, popolnoma enake dolžine, smo narezali na okoli 2 mm krajšo velikost od gela. Katodni elektrolit smo vlili v reagenčno korito. Elektrodni trak smo omočili in mu nežno popivnali rob, da smo odstranili presežek elektrolita. Namestili smo ga na gel na označeno pozicijo. Po tem koraku smo zamenjali

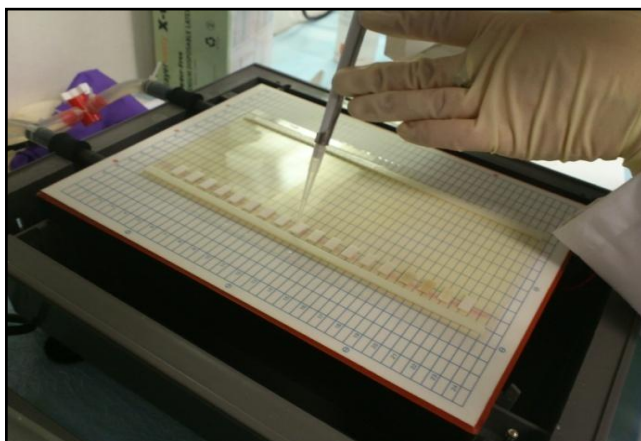
rokavice. Nato smo po istem principu pripravili in namestili anodni elektrodni trak z 0,5 M H₃PO₄.

5. Prefokusiranje: 250 V, 30 minut, 10 °C, 150 mA, 70 W
6. Med čakanjem smo pripravili 20 µl vzorce s segrevanjem 3 minute pri temperaturi točno 80 °C in jih ohladili v hladni vodi. Dodali smo 2,2 µl 10% v/v Tween 20, da smo dobili končno koncentracijo 1% v/v. Referenčni standard smo z 1% BSA/TRIS redčili do 600 IU/l za epoetin β in do 400 IU/l za darbepoetin.



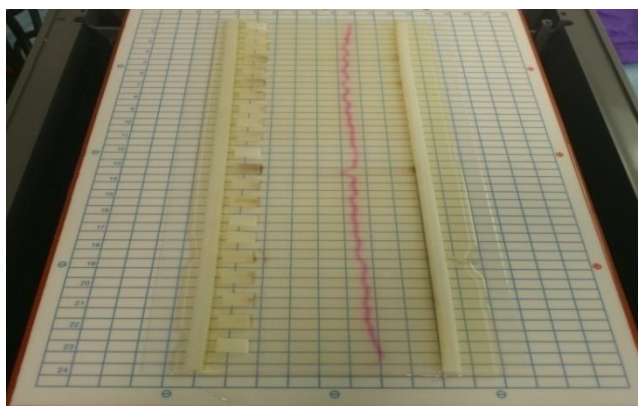
Slika 12: Segrevanje vzorcev

7. Omočene (z 20 µl 1% BSA/TRIS) filter papirčke (1,0 x 0,5 cm, Biorad) smo nanesli na površino gela, 0,5 cm stran od katodnega traku, tako da je bil krajši rob filter papirčkov vzporeden elektrodnemu traku, papirčki pa so imeli 1 cm razmika. Na filter papirčke smo nanesli posamezne vzorce in referenčne standarde.



Slika 13: Nanos vzorcev in referenčnih standardov

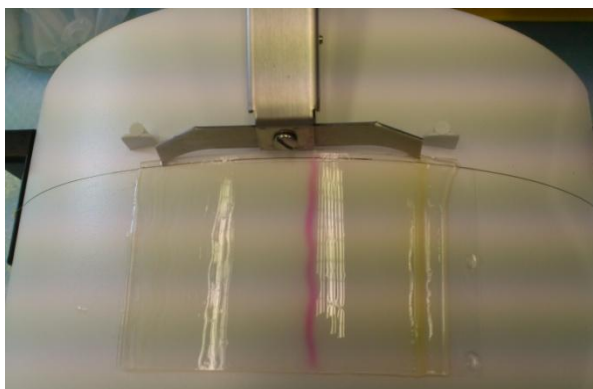
8. IEF nastavitve: moč – 1 W/cm dolžine gela, V_{max} = 2000V, 3600 Vh, 10 °C, 150 mA.



Slika 14: Elektroforeza

3.6.4 DVOJNI PRENOS

1. Med čakanjem na zaključek elektroforeze smo pripravili membrane in filter papir za vse naslednje korake. Odrezali smo dve »ImmobilonTM – P« in dve »Durapore[®]« membrani, enakih dolžin in širin (okoli 7,5 cm) kot gel. Membranama ImmobilonTM – P smo s številčkama 1 in 2 označili desni zgornji kot ob daljšem navpičnem robu membrane. Štiri nize devetih listov filter papirja smo narezali na dolžino 1 cm in širino 0,5 cm krajšo kot so mere membran (papir ne sme viseti čez robove membran zaradi možnega kratkega stika pri prenosu).
2. Po koncu IEF smo odstranili gel iz aparatur. S pomočjo ostrih škarij smo odrezali cono vzorca (gel + »Gel-Fix[®]«) in odstranili anodni trak iz površine gela. Gel obrnjen navzgor smo 2 minuti namakali v 25 mM Tris/192 mM glicin pufru.



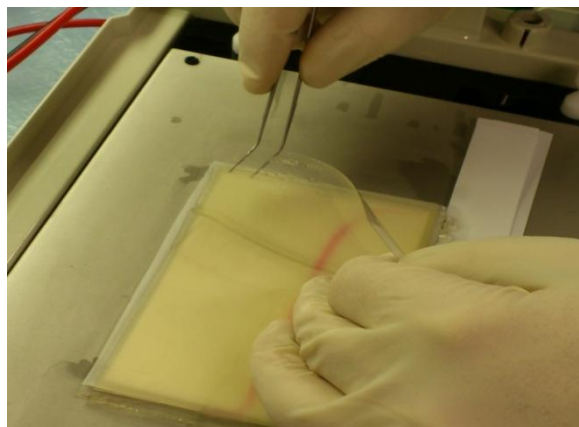
Slika 15: Razrez gela

3. Presežni pufer smo odcedili in namestili gel na odstranjevalec gela, kjer smo s pomočjo ostre žice gel z enim korakom odstranili z Gel-Fix[®] podlage.

3.6.5 PRVI PRENOS

1. ImmobilonTM – P membrano številka 1 smo namočili v metanolu (10 s) in trikrat sprali z bidestilirano vodo. Nato smo jo prenesli v 25 mM Tris/192 mM glicin pufer, kjer je bila najmanj 10 minut v celoti potopljena v pufer. V isto kadičko smo potopili tudi Durapore[®] membrano za najmanj 10 minut (brez omočitve v metanolu). Nazadnje smo omočili še dva niza devetih listov filter papirja.
2. Napravo za polsuh prenos smo obrisali z bidestilirano vodo. Niz devetih listov filter papirja smo postavili na sredino anode. S pomočjo parafilma in valjčka smo iztisnili presežen pufer ter ga popivnali s papirjem.

3. Gel smo s hrbtnim delom Gel-Fix[®]-a postavili na mizo. Na gel smo namestili Durapore[®] membrano, katere daljši del smo uskladili z anodnim robom. Nato smo na Durapore[®] membrano namestili Immobilon[™] – P membrano, s številko 1, obrnjeno navzgor (proteini so na nasprotni strani), nasproti obrezanemu robu. Preverili smo prisotnost mehurčkov med membranama. Na del gela, ki ni prekrit z membranami, smo dali trak suhega papirja za pomoč pri rokovanju.
4. Sklop smo obrnili in ga namestili na niz papirja na anodi tako, da je membrana visela čez na vseh straneh. Previdno smo odstranili Gel-Fix[®]. Odvečen gel smo obrezali s suhim papirjem. Nato smo namestili drugi niz filter papirja na gel. Prekrili smo ga s parafilmom, z valjčkom iztisnili presežen pufer in ga popivnali.
5. Katodo smo namestili na mesto.
6. Nastavitve prenosa: konstanten tok: 1 mA/cm², 30 minut (PowerPac Basic[™], Biorad)
7. Po končanem prenosu smo Immobilon[™] – P membrano takoj inkubirali v 5 mM DTT v PBS, 45 minut, pri 37 °C.
8. Nato smo trikrat kratko spirali s PBS s stresanjem z roko.
9. Membrano smo blokirali v 5% LFM/PBS: 45 minut, sobna T, nežno stresanje.
10. Sledilo je kratko spiranje s PBS s stresanjem z roko.
11. Membrano smo inkubirali s primarnimi protitelesi (mišja monoklonska protitelesa proti človeškemu EPO, AE7A5) v 1% LFM/PBS, 1 ura, sobna T, nežno mešanje.
12. Šestkrat smo spirali v 0,5% LFM/PBS: 3 x 1 minuta, 3x 8 minut, sobna T, močno stresanje.
13. Nato smo dvakrat kratko spirali s PBS s stresanjem z roko.

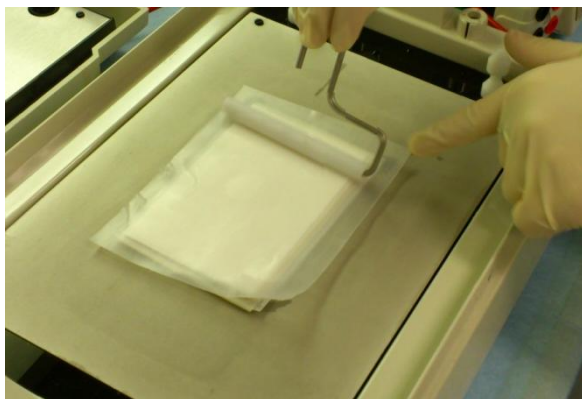


Slika 16: Odstranitev Gel-Fix[®]-a od gela

3.6.6 DRUGI PRENOS

1. Immobilon[™] – P membrano številka 2 smo namočili v metanolu in trikrat spirali z vodo. Prenesli smo jo v 0,7% raztopino očetne kisline (v/v), kjer je bila najmanj 10 minut v celoti potopljena v raztopino. V isto kadičko smo za najmanj 10 minut

potopili tudi Durapore® membrano (brez omočitve v metanolu) in nize filter papirja, in sicer po principu, opisanem pri prvem prenosu.



Slika 17: Iztis presežnega pufra

2. Napravo za polsuh prenos smo obrisali z bidestilirano vodo. Niz devetih listov filter papirja smo postavili na sredino anode. S pomočjo parafilma in valjčka smo iztisnili presežen pufra ter ga popivnali s papirjem.

3. Immobilon™ – P membrano 1 smo namestili s številko 1 obrnjeno navzdol k filter papirju (oznaka na levem zgornjem kotu), nanjo smo namestili Durapore® membrano, za njo pa še Immobilon™ – P membrano 2 s številko 2, obrnjeno navzdol tako, da sta se številki na Immobilon™ – P membranah prekrivali. Ponovno smo preverili prisotnost mehurčkov. Izogibali smo se premikanju membran po njihovi namestitvi (namestitev membran v enem koraku in brez prilagoditev). Na koncu smo na vrh namestili drugi niz papirja, pravilno centriran na membrano. Prekrili smo ga s parafilmom, z valjčkom iztisnili odvečno raztopino ter ga popivnali. Na sklop smo namestili katodno ploščo. Nastavitev prenosa: 0,8 mA/cm², 10 minut (PowerPac Basic™, Biorad).
4. Odstranili smo Immobilon™ – P membrano številka 2, jo spirali s PBS in jo postavili v blokirni postopek: 5% LFM/PBS, 45 minut, sobna T. Immobilon™ – P membrano številka 2 smo shranili v PBS pri 4 °C za primer ponovnega preizkušanja. Naslednje korake smo opravili z uporabo membrane številka 2.
5. Najprej smo membrano spirali s PBS.
6. Membrano smo inkubirali s sekundarnimi protitelesi (kozja biotinizirana IgG proti mišjim protitelesom) v 1% LFM/PBS preko noči, +4 °C, nežno mešanje.
7. Membrano smo šestkrat spirali z 0,5% LFM/PBS: 3 x 1 minuta, 3 x 10 minut, močno stresanje.
8. Inkubirali smo jo s terciarnimi protitelesi (kompleks streptavidin - peroksidaza) v 1% LFM/PBS, 1 ura, sobna T, nežno mešanje, +4 °C.
9. Membrano smo šestkrat spirali s PBS: 3 x 1 minuta, 3 x 8 minut, močno stresanje.

3.6.7 KEMILUMINISCENČNA VIZUALIZACIJA

1. Membrano smo pustili v PBS do popršitve s kemiluminiscentno raztopino. Glede na velikost membrane ($30 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) smo pripravili kemiluminiscentni raztopini peroksidni pufer in luminol v razmerju 1 : 1.
2. Membrano smo vzeli iz PBS, popivnali odvečen pufer in jo položili na prozorno folijo (ponovno smo se izogibali mehurčkom). Folijo z membrano smo postavili na polico v temnem polju v kameri. Za pravilno namestitev membrane v vidno polje smo izbrali tipko »focusing«. Nato smo se vrnili v program kamere.
3. Kemiluminiscentni raztopini smo zmešali in razporedili po membrani (če je bilo potrebno, smo uporabili pipeto za enakomeren nanos). Po 5 minutah smo membrano vzeli iz kamere, popivnali odvečno raztopino in jo prenesli na drugo prozorno folijo. Ponovno smo jo postavili na polico v kameri in zagnali program.
4. Čas slikanja smo nastavili na 30 sekund in shranili slike na računalnik.

3.6.8 STATISTIČNE METODE

Z računalniškim programom GASepo smo ocenili zastopanost izoform EPO. Za statistično ovrednotenje hematoloških podatkov smo uporabili programa IMB SPSS Statistics Version 21 in Microsoft Office Excel 2007. Vsem spremenljivkam smo določili povprečno vrednost, standardni odklon in odstotek spremembe pred, med in po odpravi na Roglo. V te namene smo uporabili statistična testa Shapiro-Willkov test normalnosti in parni T-test za obe skupini športnikov ter še statistična testa, kjer primerjamo podatke med skupinami, to sta F-test in test ANOVA.

4 REZULTATI

Spremljali smo sezonske športne priprave na Rogli in vpliv višinskega treninga na profil izoform endogenega EPO v urinu, spremembe v serumski koncentraciji EPO in ostalih hematoloških parametrov. Športniki so bili razdeljeni v dve skupini, prilagojeno LH-TL skupino (n = 7) in kontrolno skupino (n = 5). Vsi so trenirali pod enakimi pogoji, drugačna je bila le izpostavljenost znižanemu pO_2 v času spanja pri športnikih LH-TL skupine. Spali so v višinskih sobah (8ur/dan), ki korelirajo pogojem pri 2500 m nadmorske višine. Načrt odprave je podrobno opisan na Sliki 8.

4.1 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM

V predhodno koncentriranih urinskih vzorcih športnikov smo izmerili koncentracijo EPO z metodo RIA. Meritve so predstavljene v prilogi (Tabela V). Urinske vzorce vseh 12 športnikov smo analizirali z metodo IEF z dvojnimi prenosom v treh različnih časovnih točkah. Profilov izoform nismo uspeli pridobiti za osebi 4 in 6. Za nadaljnjo semi – kvantitativno analizo izoform EPO s programom GASepo smo uporabili le popoln set vzorcev osebe 9 (kontrolna skupina) in osebe 11 (LH-TL skupina).

4.1.1 ANALIZA PROFILA IZOFORM ENDOGENEGA ERITROPOETINA V URINU

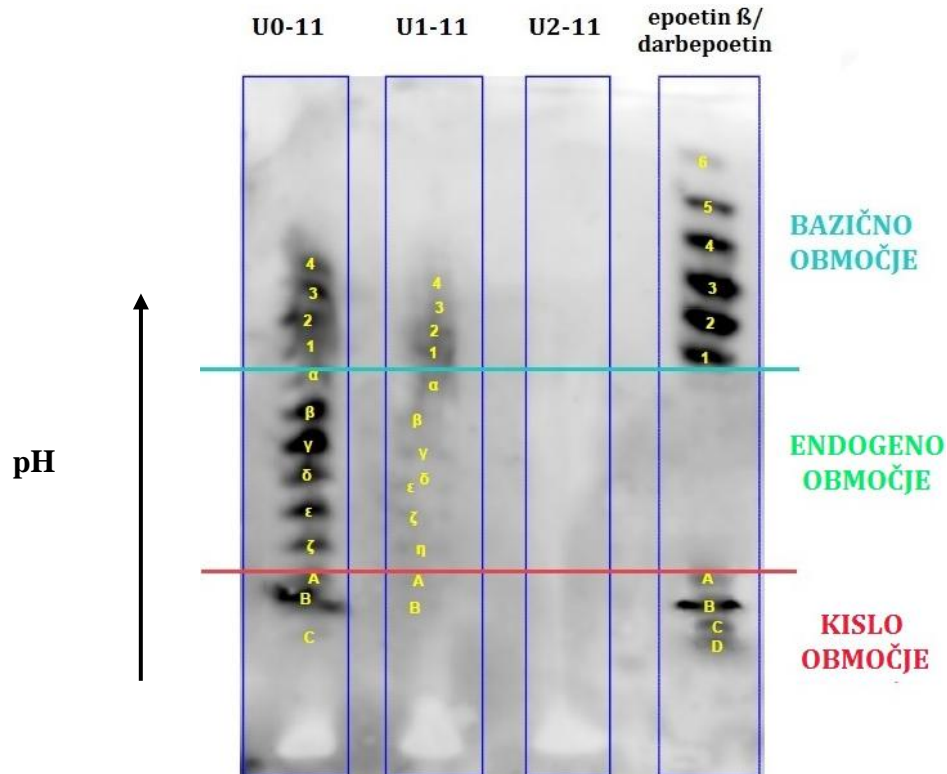
S programom GASepo smo analizirali izbrane profile izoform EPO v urinu na podlagi primerjanja jakosti in razporeditve izoform referenčnega standarda. Enake postopke uporabljajo v protidopinških laboratorijih za detekcijo nedovoljene uporabe rHuEPO v športu.

Izmed sedmih urinskih odvzemov smo za analizo IEF z dvojnimi prenosom izbrali tri časovne točke:

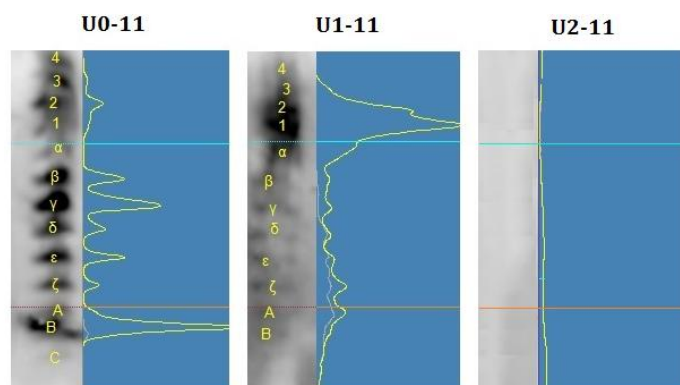
U0 – urinski vzorec odvzet 7 dni pred odpravo

U1 – urinski vzorec odvzet po 21 dneh intenzivnega treninga

U2 – urinski vzorec odvzet 14 dni po vrnitvi v Ljubljano

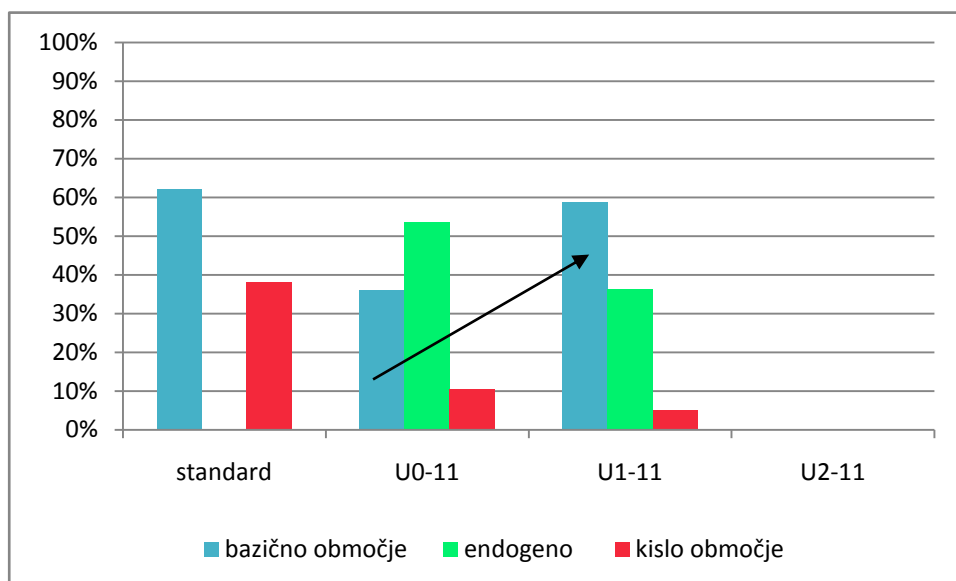


Slika 18: Elektroferogram gela IEF. Prikaz detekcije izoelektričnega profila EPO v različnih časovnih točkah osebe 11. Izoforme smo označili s programom GASepo glede na pojavnost v kislem, endogenem ali bazičnem območju s pomočjo izoform referenčnega standarda (epoetin β + darbepoetin). Izoforme epoetina β potekajo od 1–6 in darbepoetina od A do D.

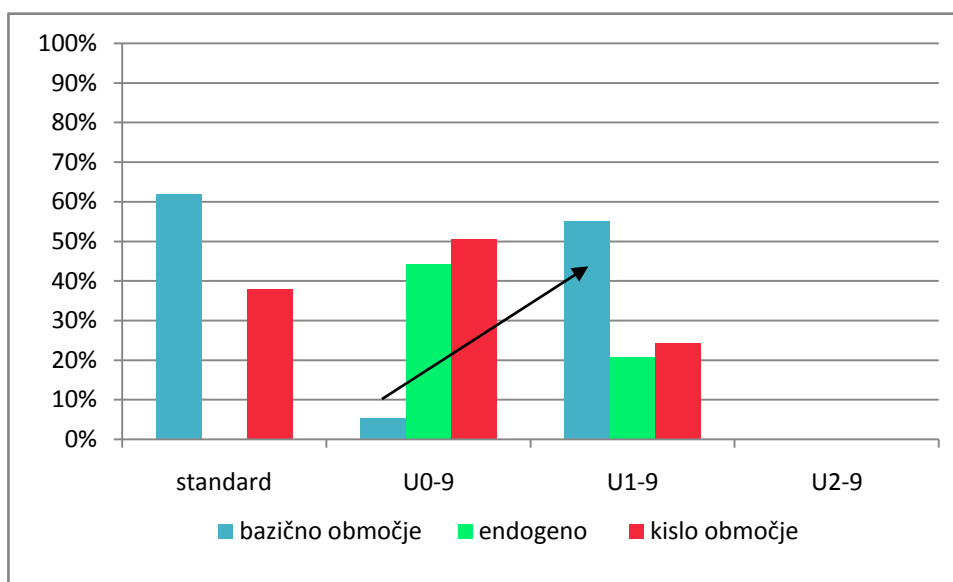


Slika 19: Densitometrična analiza izoform EPO v urinskem vzorcu osebe 11 z uporabo računalniškega programa GASepo. V vzorcu U0 in U1 so izoforme razporejene čez celotno področje (kislo, endogeno in bazično), medtem ko je bila v vzorcu U2 koncentracija EPO v urinu prenizka za detekcijo.

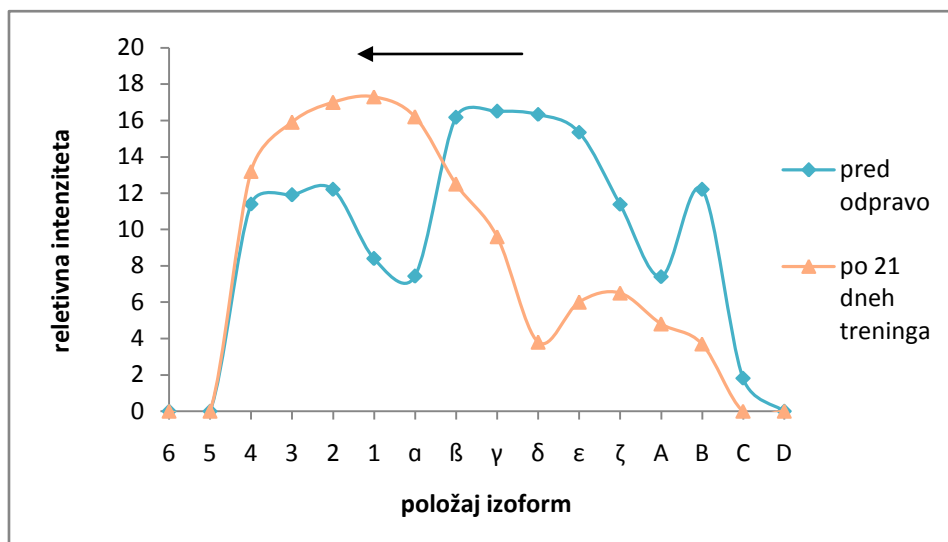
S pomočjo programa GASepo smo določilo odstotno porazdelitev izoform v bazičnem, endogenem in kislem območju v odvisnosti od časovnih odvzemov.



Graf 1: Odstotna (%) porazdelitev izoform v bazično, endogeno in kislo območje osebe 11 (LH-TL skupina) glede na časovne točke. Na podlagi porazdelitve referenčnih standardov (epoetin β + darbepoetin) smo ocenili premike izoform osebe 11 v bolj bazična področja (primerjava vzorcev U0 in U1), kar vidimo s ponazorjeno puščico. V vzorcu U2 je bila koncentracija EPO prenizka za detekcijo.



Graf 2: Odstotna (%) porazdelitev izoform v bazično, endogeno in kislo območje osebe 9 (kontrolna skupina) glede na časovne točke. Na podlagi porazdelitve referenčnih standardov (epoetin β + darbepoetin) smo ocenili premike izoform osebe 9 v bolj bazična področja (primerjava vzorcev U0 in U1), kar vidimo s ponazorjeno puščico. V vzorcu U2 je bila koncentracija EPO prenizka za detekcijo.



Graf 3: Položaj in jakost posameznih izoform EPO pri osebi 11 (LH-TL skupina). Izoforme endogenega EPO so razporejene skozi celotno območje: 6–1 je območje bazičnih izoform, α– ζ območje endogenih izoform in A–D območje kislih izoform. Smer puščice nakazuje premik profila izoform vzorca U0 v bolj bazična področja (vzorec U1) in spremembo v intenziteti določenih izoform.

4.2 SERUMSKA KONCENTRACIJA ERITROPOETINA (EPO) IN HEMATOLOŠKI PARAMETRI

Spremljali smo vpliv višinskega treninga na spremembe v koncentraciji EPO in določenih hematoloških parametrov, predvsem spremembe v številu eritrocitov, retikulocitov, koncentraciji Hb, deležu Ht in količini feritina. V ta namen je bila izvedena analiza krvnih vzorcev vseh športnikov v obsegu sedmih časovnih odvzemov na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

OBRAZLOŽITEV ČASOVNIH ODVZEMOV:

- 1. odvzem** – krvni vzorec odvzet 7 dni pred odpravo
- 2. odvzem** – krvni vzorec odvzet takoj po prihodu na Roglo
- 3. odvzem** – krvni vzorec odvzet po 7 dneh intenzivnega treninga
- 4. odvzem** – krvni vzorec odvzet po 14 dneh intenzivnega treninga
- 5. odvzem** – krvni vzorec odvzet po 21 dneh intenzivnega treninga
- 6. odvzem** – krvni vzorec odvzet takoj po vrnitvi v Ljubljano
- 7. odvzem** – krvni vzorec odvzet 14 dni po vrnitvi v Ljubljano

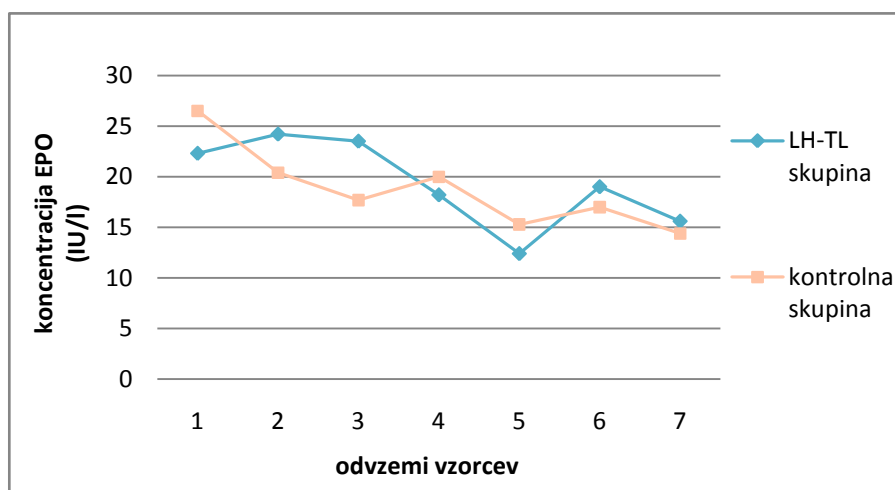
Vse rezultate vzorcev krvi 12 biatloncev (sedem časovnih točk) smo statistično opredelili s Shapiro-Wilkovim testom normalnosti, kjer smo preverili normalno porazdelitev pridobljenih podatkov. Vsi hematološki parametri se porazdeljujejo normalno, kar lahko sklepamo iz dobljenih p vrednosti ($p > 0,05$). Podrobna statistična obdelava normalnosti rezultatov je predstavljena v Tabeli VI v poglavju Priloge.

Za primerjavo sprememb (%) med sedmimi časovnimi odvzemi znotraj skupine športnikov LH-TL smo uporabili parni T-test. Enako smo analizirali časovne spremembe med člani kontrolne skupine. Vsaki spremenljivki smo določili povprečno vrednost spremembe (%) in standardni odklon ter primerjali razliko povprečnih vrednosti hematoloških parametrov med odvzemi. V Tabeli III in Tabeli IV so povzete le statistično signifikantne spremembe med časovnimi točkami za skupino LH-TL in kontrolno skupino.

Zanimale so nas tudi spremembe hematoloških parametrov med obema skupinama, zaradi izpostavljenosti različnim višinskim pogojem. V ta namen smo uporabili F-test, kjer smo spremljali enakost/razliko varianc med skupinama in izvedli še statistični test ANOVA.

Za boljšo ponazoritev časovnega spreminjanja koncentracije EPO in hematoloških parametrov med skupinama smo rezultate grafično predstavili. Podatki so povzeti iz tabele IX v poglavju Priloge.

4.2.1 ANALIZA SERUMSKE KONCENTRACIJE ERITROPOETINA (EPO)



Graf 4: Koncentracija eritropoetina (EPO). Spremembe v koncentraciji EPO glede na časovne odvzeme pri obeh skupinah športnikov, LH-TL skupini in kontrolni skupini.

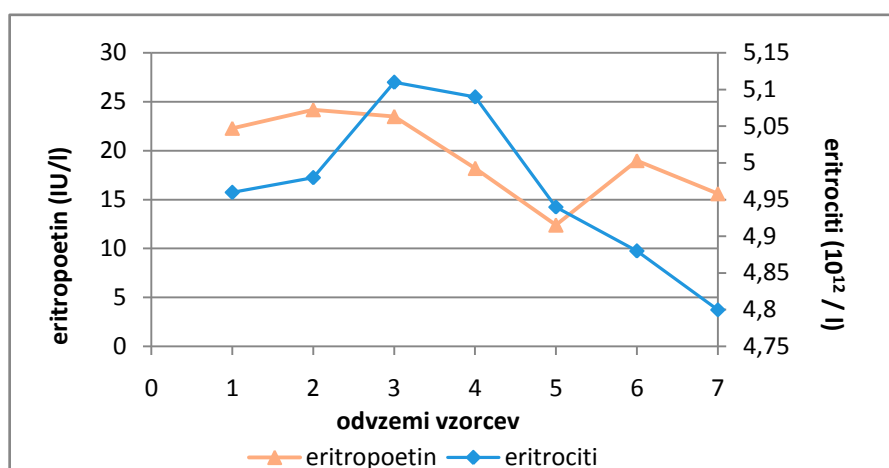
Tabela III: Parni T-test koncentracije eritropoetina za obe skupini. Prikazane le statistično pomembne razlike v koncentraciji EPO med prvim odvzemom in ostalimi časovnimi odvzemi.

	razlika med časovnimi odvzemi	povprečna vrednost razlike	T vrednost	povprečna vrednost spremembe (%)	SD (%)	statistična značilnost (dvostranska)	statistično pomembne razlike NS/S
LH-TL skupina	1. – 5.	10,613	4,666	↓ 45,9	37,6	0,001	S
	1. – 6.	6,144	5,267	↓ 18,5	12,3	0,001	S
	1. – 7.	8,830	8,262	↓ 30,1	6,79	0,000	S
kontrolna skupina	1. – 5.	9,870	2,687	↓ 44,2	15,7	0,043	S
	1. – 6.	4,040	3,580	↓ 33,6	11,8	0,023	S
	1. – 7.	6,650	8,158	↓ 45,7	5,06	0,000	S

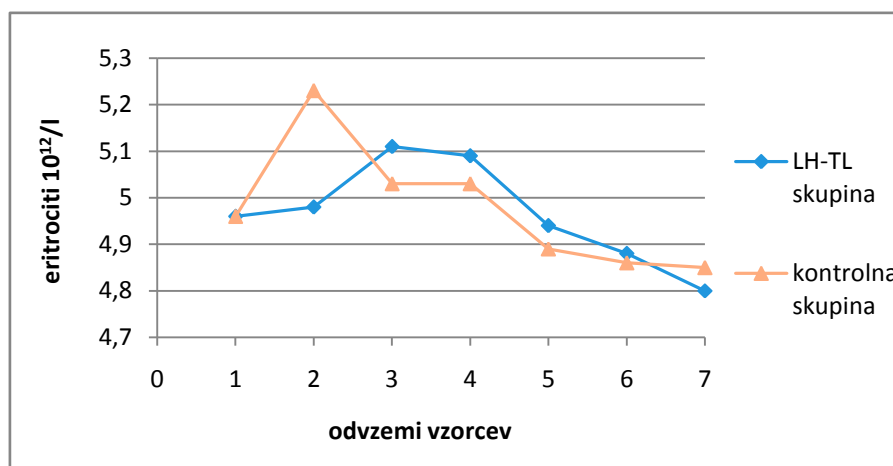
*NS - statistično neznačilne razlike ($p > 0,05$)

*S - statistično značilne razlike ($p < 0,05$)

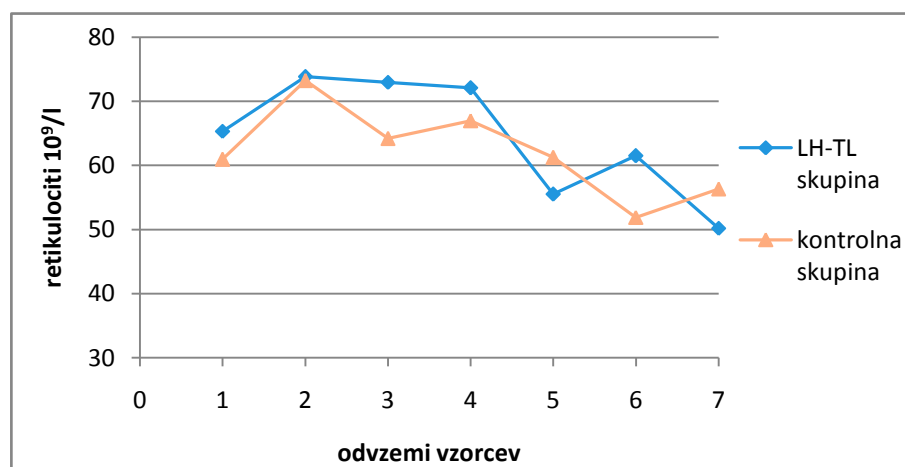
4.2.2 ANALIZA HEMATOLŠKIH PARAMETROV



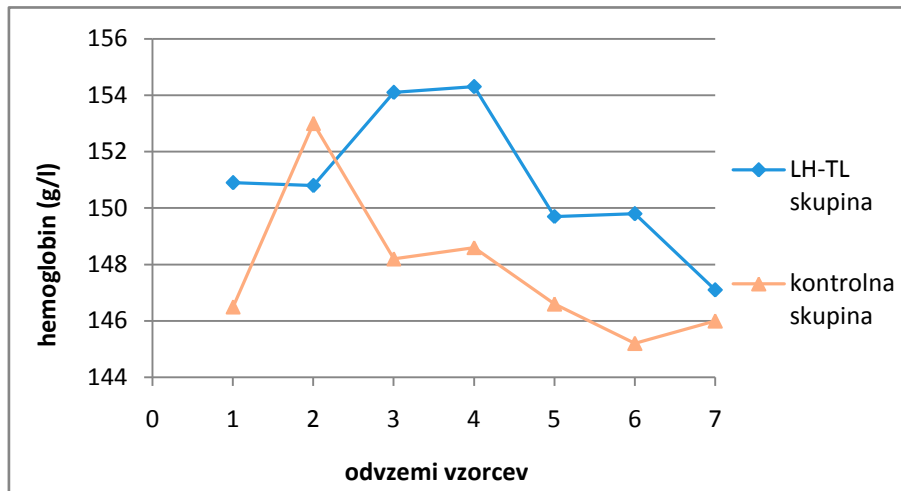
Graf 5: Eritropoetin in eritrociti. Povezava med eritropoetinom in zakasnenim porastom števila eritrocitov pri športnikih LH-TL skupine.



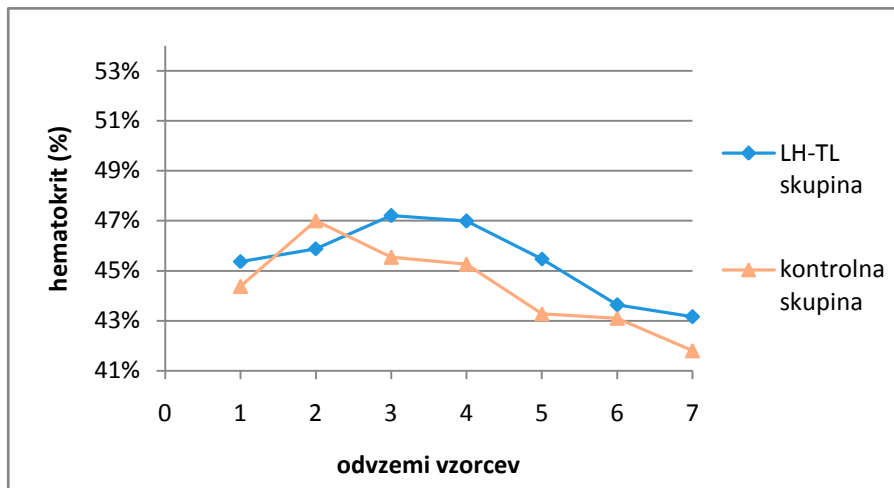
Graf 6: Število eritrocitov. Spremembe v številu eritrocitov glede na časovne odvzeme pri obeh skupinah športnikov, LH-TL skupini in kontrolni skupini.



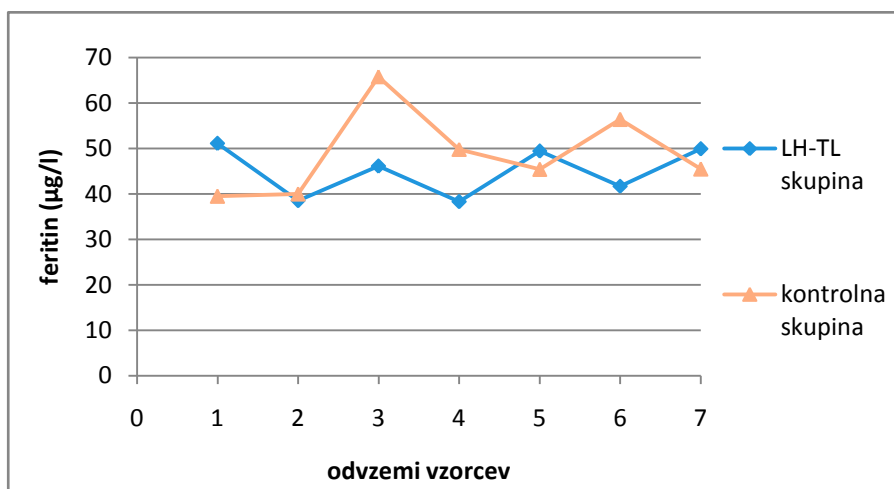
Graf 7: Število retikulocitov. Spremembe v številu retikulocitov glede na časovne odvzeme pri obeh skupinah športnikov, LH-TL skupini in kontrolni skupini.



Graf 8: Koncentracija Hb. Spremembe v koncentraciji Hb glede na časovne odvzeme pri obeh skupinah športnikov, LH-TL skupini in kontrolni skupini.



Graf 9: Delež Ht. Spremembe v deležu Ht glede na časovne odvzeme pri obeh skupinah športnikov, LH-TL skupini in kontrolni skupini



Graf 10: Koncentracija feritina. Spremembe v koncentraciji feritina glede na časovne odvzeme pri obeh skupinah športnikov, LH-TL skupini in kontrolni skupini.

Tabela IV: Parni t test hematoloških parametrov za obe skupini. Prikazane le statistično pomembne razlike posameznih hematoloških parametrov med prvim odvzemom in ostalimi časovnimi odvzemi.

	razlika med časovnimi odvzemi	povprečna vrednost razlike	T vrednost	povprečna vrednost spremembe (%)	SD (%)	statistična značilnost (dvostranska)	statistične razlike NS/S
Eritrociti ($10^{12}/l$)							
LH-TL	1. – 7.	0,142	2,412	↓ 3,06	3,36	0,037	S
kontrola	1. – 7.	0,159	2,331	↓ 1,95	5,20	0,059	S
Retikulciti ($10^9/l$)							
LH-TL	1. – 7.	11,31	2,893	↓ 20,4	19,3	0,016	S
kontrola	1. – 7.	15,13	2,727	↓ 5,45	8,30	0,034	S
Feritin ($\mu g/l$)							
LH-TL	1. – 2.	10,50	4,051	↓ 33,2	14,2	0,003	S
kontrola	1. – 2.	14,17	5,222	↓ 13,1	20,6	0,003	S
Hematokrit (%)							
	1. – 3.	- 0,017	- 2,216	↑ 4,18	3,67	0,006	S
LH-TL	1. – 4.	- 0,013	- 3,503	↑ 3,66	3,35	0,041	S
	1. – 7.	0,021	3,877	↓ 4,80	2,42	0,004	S
	1. – 3.	- 0,018	- 2,995	↑ 3,81	4,90	0,024	S
kontrola	1. – 4.	- 0,016	- 2,907	↑ 1,92	6,02	0,027	S
	1. – 7.	0,022	4,967	↓ 3,36	6,63	0,003	S
Hemoglobin (g/l)							
LH-TL	ni statistično signifikantnih sprememb ($p > 0,05$)						NS
kontrola							NS

*NS - statistično neznačilne razlike ($p > 0,05$)

*S - statistično značilne razlike ($p < 0,05$)

5 RAZPRAVA

5.1 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM

Leta 2000 so Lasne in sodelavci metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) izpopolnili z vključevanjem imunoafinitetnih tehnik dvojnega prenosa, s katerimi so izboljšali selektivnost detekcije med endogenim in rHuEPO v urinu. Na podlagi različne glikozilacije omenjenih molekul in posledične razporeditve izoform na poliakrilamidnem gelu, je takšen način ločbe še danes ključnega pomena za odkrivanje zlorab rHuEPO v športu (56). Vendar na spremenjen profil EPO ne vpliva samo aplikacija umetnih analogov kot npr. rHuEPO, temveč tudi določena fiziološka stanja spremenijo pojavnost izooblik endogenega EPO. Znani so pojavi atipičnih profilov EPO v urinu kot posledice kratkotrajnega napora pri športnikih (62), toda do sedaj še ni veliko pojasnjenega o sočasnem vplivu višinskih pogojev in intenzivnih treningov na spremembe v izoformah EPO. V ta namen smo spremljali odpravo 12 članske ekipe slovenskih biatloncev, ki so 21 dni trenirali po prilagojenem režimu Živi visoko – treniraj nizko.

Pred nanosom vzorcev na poliakrilamidni gel smo kvantitativno določili koncentracijo EPO v koncentriranih urinskih vzorcih z metodo RIA (Tabela V v poglavju Priloge). Analiza ni bila optimalno izvedena, saj se vrednosti EPO v koncentriranem urinu niso ujemale z dobljenimi profili izoform. Vendar nam neujemanje v rezultatih ni predstavljalo nevšečnosti pri izvedbi IEF in kasnejši vizualizaciji rezultatov. Naši preiskovani vzorci so vsebovali večinoma nizke koncentracije EPO, zato se pasovi izoform med seboj niso prekrivali. To je bolj značilno za vzorce z visoko vsebnostjo EPO, predvsem ob prisotnosti eritropoetinskih analogov.

S primerjanjem položaja izoform referenčnih standardov smo s programom GASepo označili izoforme endogenega EPO v bazičnem, endogenem in kislem območju (Slika 18). Ob uporabi metode IEF smo naleteli na nekaj zapletov med delovnim procesom, saj je metoda zelo kompleksna in je potreben strog nadzor vseh uporabljenih reagentov, kemikalij, materialov in aparatov. Zaradi visoke vsebnosti proteinov v urinskih vzorcih (posledica intenzivnega napora) je prišlo do zasičenja poliakrilamidnega gela. Le to je povzročilo zamegljenost in otežilo natančno detekcijo vseh izoform EPO pri določenih osebah, zato smo za nadaljnje denziometrične analize (Slika 19) kvantitativno določili odstotno razporeditev izoform EPO le za osebi 11 in 9. Pri športniku, ki je treniral po

smernicah metode Živi visoko – treniraj nizko (oseba 11, skupina LH-TL), smo v urinskem vzorcu odvzetem 7 dni pred odpravo (U0-11), opazili največji obseg izoform znotraj endogenega območja. Presenetljivo visok delež zajemajo izoforme bazičnega značaja, okoli 38 % (Graf 1), kar je neobičajno glede na izsledke dosedanjih študij, ki potrjujejo razporeditev izoform endogenega EPO skozi celotno področje pI, vendar z izrazitejšimi pasovi v kislem območju (61). To smo opazili v urinskem vzorcu osebe 9 (U0-9), kjer so najbolj intenzivne izoforme v kislem območju pI (Graf 2). Razlike med obema vzorcema lahko izhajajo iz interindividualnih razlik med športnikoma (genetika, splošna fizična kondicija), visoka bazičnost urinskih izoform osebe 11 pa nakazuje na morebitno obsežno fizično aktivnost pred odhodom na višinske priprave. Po 21 dneh intenzivnega treninga na Rogli in 8-urni dnevni izpostavljenosti hipoksičnim pogojem (18,5 % O₂) smo v urinskem vzorcu osebe 11 (U1-11) opazili premik izoform v bazično področje (↑ 59 %) v primerjavi z urinskim vzorcem U0-11. Enako sosledje smo zasledili pri športniku kontrolne skupine, ki je za razliko od športnikov LH-TL skupine treniral in spal v enakem višinskem okolju na Rogli. Zastopanost bazičnih izoform se je povišala s 5 % na 55 %. Zamiki izoform endogenega EPO v bazična področja so najverjetneje posledica fizioloških stresnih okoliščin, ki privedejo do prehodno oslabiljene ledvične funkcije. Spremembe v permeabilnosti glomerulne membrane in znižanje v ledvični hemodinamiki med intenzivnim naporom vodijo do proteinurije, povišanega izločanja proteinov v urinu, kar vpliva na spremembe pI izoform EPO (63). Urinske in serumske izoforme EPO se med seboj vidno razlikujejo, serumske izoforme pri športniku v stanju počivanja so izrazito bazične narave, urinske imajo večje število pasov v kislem območju. Po športni aktivnosti se bazične izoforme ne morejo več ustrezno odstranjevati in z vidika sestave izoform urin postane enak serumu (31). Vzrok so lahko motnje v filtracijski sposobnosti glomerulov, nezmožnost reabsorpcije zaradi zasičenosti prevelike količine proteinov ali sočasna posledica obeh dejavnikov. Bazične izoforme EPO, nizko molekularnega proteina se zaradi prehodno zmanjšane ledvične funkcije ne morejo več vračati v kri in ostanejo v urinu (64, 65). Do podobnih zaključkov je prišla raziskovalka Severine Lamon, ki je spremljala vpliv visoko intenzivnega vadbenega protokola na spremembe v urinskih in krvnih vzorcih. Celoten enodnevni protokol je vseboval nize mirovanja, ogrevanja in sklope intenzivnih naporov. Opazila je neznačilne pretvorbe izoform endogenega EPO v urinu, zaradi nastale tubularne proteinurije po 2 serijah intenzivnih vaj, ki so jo potrdili z vzporednimi

preiskavami celokupne vrednosti proteinov in s povišanimi koncentracijami RBP proteinskega markerja v urinu (31).

Za razliko od dosedanjih izsledkov smo tako pri skupini LH-TL kot tudi pri kontrolni skupini med urinskimi vzorci U0 in U1 opazili morebiten vpliv proteinurije na spremembe v izoelektričnem profilu EPO, in sicer po 21 dneh višinskega treninga. Povišanja bazičnih izoform korelirajo z intenziteto vadbe in kratkotrajnimi fizičnimi napori, vendar nismo zasledili premika izoform EPO nazaj v bazalno stanje kot je hitro izboljšanje ledvične funkcije 3 ure po prenehanju stresne vadbe opisala Lamonova (61). Vsi urinski odvzemi športnikov obeh skupin so bili opravljeni najmanj 8 ur po končanju intenzivne vadbe z namenom preprečevanja previsokih koncentracij EPO po takojšnji stimulaciji. Razlogi zakaj pri preiskovanih športnikih nismo opazili povrnitve izoform EPO v prvotno stanje, so lahko sočasni vplivi intenzivnega 21-dnevnega treninga in dolgotrajna izpostavljenost višinskemu okolju 1500 m. V eni izmed predhodnih študij so potrdili vpliv višjih nadmorskih višin na spremenjeno delovanje ledvic. Pri plezalcih, ki so dosegali vrhove nad 5000 m, so opazili zakasnjeno proteinurijo v obdobju 1 do 3 dni za razliko od rezultatov Severine Lamon (66). Vendar je v naši raziskavi vprašljiv pomen faktorja višinskega okolja na spremenjen nivo izoform EPO, kajti biatlonci so trenirali na višini okoli 1500 m in niso bili izpostavljeni tako ekstremnim pogojem kot v zgoraj omenjeni študiji.

Spremljanje bivanja izbranih športnikov v sobah z znižanim pO_2 ni prineslo pričakovanih rezultatov, kajti bivanje skupine LH-TL v višinskih sobah, v primerjavi s športniki kontrolne skupine, ni bistveno vplivalo na razlike v odstotnem zamiku izoform v bazična področja, saj so zamiki v enako smer vidni pri obeh skupinah (Graf 1 in Graf 2). V urinskem vzorcu, odvzetem 14 dni po vrnitvi v Ljubljano (U2-9 in U2-11), nismo uspeli pridobiti profila izoform, saj je bila koncentracija EPO v vzorcih prenizka za detekcijo, kar sovпада z nižjo serumsko koncentracijo EPO v enakem časovnem odvzemu.

Opazovali smo tudi spreminjanje posamezne izoforme znotraj celotnega izoelektričnega profila endogenega EPO, ki obsega izoforme v bazičnem (1–6), endogenem (α – ζ) in kislem (A–D) območju (29). Osredotočili smo se predvsem na položaj in jakost posamezne izoforme. Na podlagi izračuna relativne intenzitete s programom GASapo smo uspeli pridobiti položaj izoform za osebo 11, ki so prikazane na Grafu 3. Primerjali smo urinska vzorca v dveh časovnih točkah, pred odpravo (U0) in po 21 dneh intenzivnega treninga (U1). S primerjanjem obeh krivulj zasledimo značilen pomik v bazična območja pri vzorcu U1. Intenziteta izoform se iz položaja β, γ, δ premakne v smeri puščice do položaja 1 in 2

(Graf 3). V eni izmed raziskav so opazili vrh krivulje kontrolnega vzorca v položaju izoform α , β , γ , po fizični aktivnosti pa v poziciji 1 in 2 (31). Razlike v intenziteti vzorca U0 našega športnika in kontrolnega vzorca osebe iz opisane študije so lahko posledica interindividualnih razlik med posameznikoma ali v metodi dela.

Hipotezo »Višja nadmorska višina in intenzivni treningi spremenijo profil izoform endogenega EPO v urinu« lahko le delno potrdimo. Ugotovitve naše študije so v skladu z zaključki znanstvenikov o vplivu intenzivne aktivnosti na spremembo izooblik EPO. Dodaten vpliv višinske proteinurije in višinskih sob (18,5 % O₂) na izoelektrični profil EPO bi bilo v našem primeru potrebno še podrobneje preučiti. Vidnejše razlike v izoformah EPO bi opazili z vključitvijo še ene kontrolne skupine, ki bi trenirala in bivala na nižini, skupina LH-TL pa bi bila po priporočilih svetovnih smernic višinskih treningov dnevno vsaj 12 ur izpostavljena hipoksičnim pogojem nad 2500 m.

5.2 SERUMSKA KONCENTRACIJA ERITROPOETINA (EPO) IN HEMATOLOŠKI PARAMETRI

Z analizo koncentracije serumskega EPO in hematoloških parametrov smo dopolnili študijo. Preverili smo vpliv športne aktivnosti in različnega višinskega okolja na zgoraj omenjene parametre pri elitnih slovenskih biatloncih. Športni trenerji že mnogo let uporabljajo režime treningov Živi visoko – treniraj nizko, in sicer za izboljšanje aerobnih kapacitet svojih varovancev. Pozitivni efekti športnega protokola obsegajo dvig EPO predvsem pa izboljšanje v koncentraciji Hb tudi 14 dni po končanem višinskem treningu. Takšnih rezultatov nismo uspeli potrditi. Pri obeh skupinah, LH-TL in kontrolni skupini smo spremljali koncentracijo serumskega EPO v odvisnosti od časovnih odvzemov med celotno višinsko odpravo (Tabela VII in Tabela VIII v poglavju Priloge). Opazili smo občuten upad koncentracije serumskega EPO 14 dni po končanju višinskega treninga (7. odzem), kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji. Koncentracija serumskega EPO se je pri skupini LH-TL signifikantno ($p < 0,05$) znižala za $30,1 \pm 6,79$ %, pri kontrolni skupini pa celo za $45,7 \pm 5,06$ % v primerjavi s koncentracijo serumskega EPO pred odpravo na Roglo (Tabela III). Zvišanju koncentracije EPO po nekaj dnevih bivanja na višji nadmorski višini in posledični aklimatizaciji na novo okolje, sledi strmo znižanje zaradi negativne povratne zanke v regulaciji EPO, kar opisujejo tudi v študiji avstralskih športnikov (47).

Hipoksično stimulacijo sinteze EPO nazorno prikazuje Graf 4. Pri skupini LH-TL krivulja nakazuje porast v koncentraciji EPO po 1 dnevu in 7 dneh višinskega treninga. Koncentracija EPO dosega vrednosti okoli 24 UI/l, medtem ko v kontrolni skupini zasledimo znižanje v enakih časovnih odvzemih. Razlike med športniki obeh skupin so očitne že z vidika izhodiščnih koncentracij EPO. Povprečne koncentracije EPO športnikov kontrolne skupine so višje kot pri skupini LH-TL, kar lahko nakazuje na intenzivnejšo pripravljenost kontrolne skupine oz. opravljanje zahtevnejših treningov pred začetkom višinske ekspedicije. Podatki o predhodnih treningih športnikov bi pripomogli k boljši obravnavi obstoječih hematoloških rezultatov med odpravo. Pri kontrolni skupini beležimo nižanje koncentracije EPO med višinskim treningom na 1500 m s porastom v časovni točki 4 in 6. Dvig koncentracije EPO takoj po prihodu v Ljubljano je bil opažen pri športnikih obeh skupin. Vzrok za višje sproščanje EPO iz ledvic je lahko nenaden sestop v okolje z normalnim pO_2 in posledično pretirano zmanjšanim krvnim pretokom. Za natančnejše obrazložitve bi potrebovali še podatke o volumnu krvi športnikov med časovnimi odvzemi. Minimalne spremembe nakazujejo, da športniki med treningi na nadmorski višini Rogle niso bili izpostavljeni hudim hipoksičnim pogojem, kar še omogoča normalni potek vsakodnevnih treningov navkljub rahlo zmanjšani VO_2 max posameznika. Za razliko od kontrolne skupine, pri skupini LH-TL opazimo pospešeno eritropoezo pri 2. in 3. odvzemu, ki se kaže z enotedenskim zakasnjanim porastom rdečih krvničk glede na zvišano sintezo EPO (Graf 5). Nastanek novih eritrocitov je ključna fiziološka prilagoditev organizma na višje nadmorske višine (37). Sklepamo, da sta bivanje v sobah z nižjim pO_2 in intenziven trening na višini 1500 pripomogla k dodatnemu nastanku EPO. Stray Gunderson in Levine, inovatorja metode Živi visoko – treniraj nizko sta želela izboljšati aerobno kapaciteto in fizično zmogljivost športnikov z zvišanjem koncentracije Hb. Do podobnih zaključkov so prišli tudi finski znanstveniki, kjer so tekači na smučeh in triatlonci 7 dni po koncu višinske odprave (2500 m, 25 dni) dosegali do 3% izboljšanje v VO_2 max s predhodnimi signifikantnimi zvišanji hematoloških parametrov (število eritrocitov, retikulocitov, koncentracija Hb) (46). Tudi v obravnavanem diplomskem delu krivulje povprečnih vrednosti števila eritrocitov, retikulocitov in koncentracije Hb obeh skupin korelirajo s sintezo EPO in časovno odvisnostjo diferenciacije CFU-E v zrele eritrocite. Povprečna koncentracija Hb kontrolne skupine je dosegla najvišji vrh ($153,0 \pm 10,1$ g/l) takoj po prihodu na Roglo, kar povezujemo z vplivom izredno visokih vrednost EPO že pred odpravo in vplivom renalne kompenzacije s pospešeno diurezo ter zmanjšanim volumnom

plazme. Najvišje povprečne koncentracije Hb športnikov LH-TL se gibljejo v intervalu $154,3 \pm 10,4$ g/l (niso statistično signifikantne $p < 0,05$) in lahko trdimo, da je zvišanje Hb po 7 in 14 dneh treninga na višini posledica prilagoditve na novo okolje kot tudi sočasen vpliv intenzivnih režimov vadbe. Pri primerjanju vrednosti ostalih hematoloških parametrov pred in po odpravi (1.–7. odvzem) smo naleteli na presenetljive rezultate, saj so vsi merjeni parametri 14 dni po vrnitvi v Ljubljano statistično ($p < 0,05$) nižji od izhodiščnega nivoja. Padec v številu eritrocitov (za $3,06 \pm 3,36$ %), retikulocitov (za $20,4 \pm 19,3$ %) in deležu Ht ($\downarrow 4,80 \pm 2,42$ %) skupine LH-TL je podoben rezultatom avstralske študije, kjer Ashenden pojasnjuje, da navkljub začetno visokemu hipoksičnemu dražljaju za sintezo EPO (višji za 57 %) ta ni v zadostni meri vplival na pospešeno eritropoezo v kostnem mozgu, saj ni bilo sprememb v hematoloških parametrih med preiskovano in kontrolno skupino. Razloge za neuspelo izboljšanje koncentracije Hb so pripisali prekratki časovni izpostavljenosti normobaričnim hipoksičnim pogojem (priporočeno je dnevno > 12 h, na višini 2500 m, vsaj 3–4 tedne treninga) in nesmotrnemu načrtovanju športnega protokola (51). Slednje, še vedno predstavlja velik problem, kajti neskladja v metodologiji načrtovanja vadbenih režimov otežujejo primerjanje študij med seboj in s tem odkrivanje prednosti ter slabosti posameznih športnih metod. Tudi v našem primeru zaradi signifikantnega znižanja končnih vrednosti v primerjavi z izhodiščnimi, bi lahko potrdili razloge, ki so jih navedli Ashenden in sodelavci. Dodaten vzrok bi lahko bilo hitro višanje volumna plazme po vrnitvi na nižino, ki pa je morebiti vplival tudi na nižanje Hb že med potekom treningov. O neocitolitskih procesih bi težko govorili kot o možnih razlogih za zmanjšano količino eritrocitov in retikulocitov. 10% upad eritrocitov znotraj 7 dni so opazili pri sestopu z visokih nadmorskih višin (> 4300 m) na nižino pri dobro aklimatiziranih alpinistih (67), obravnavani biatlonci pa so bivali v zračnem okolju med 2500 in 2800 m. Vendar je izreden upad serumskega EPO eden izmed glavnih dražljajev za prezgodnjo hemolizo, ogromen padec v koncentraciji EPO pa smo zaznali tudi pri obravnavanih športnikih. Delež Ht je sprva po 7 dneh pri članih obeh skupin signifikantno narasel za 4,18 % (skupina LH-TL) in 3,18% (kontrolna skupina) ter po 14 dneh vrnitve v Ljubljano upadel pod izhodiščni nivo. Zvišanje Ht je lahko posledica večjega števila dejavnikov, kot so npr. vplivi znižanja volumna plazme, dehidracije, hipertermije, nadmorske višine in pospešene eritropoeze. Zaradi velikega števila spremenljivk Ht ni dober napovedni faktor izboljšanja aerobne zmogljivosti športnika (68). Zato se največkrat spremljajo vrednosti VO_2 max med in po koncu višinskih priprav ali se opravijo testiranja z

beleženjem časovnega napredka pri določeni obremenitvi. V naši študiji se meritve VO₂ max žal niso izvajale, kajti v nasprotnem primeru bi lahko lažje preverili učinkovitost zastavljenega protokola in s tem razlike uspešnosti med skupinama. Za nadaljnje spremljanje napredka športnikov je bistvenega pomena, da bi v študijo vključili ne le spremljanje VO₂ max, temveč tudi mišično pufrsko kapaciteto, sestavo mišičnega tkiva, vrednosti laktatnega praga ter učinkovitost pridobitve v hitrosti in moči glede na porabljeno količino kisika oz. energije (38). Omenjeni periferni faktorji in njihovi učinki na izboljšanje vzdržljivosti športnikov so še vedno aktualne teme sedanjih raziskav.

Ne smemo zanemariti vpliva ustrezne prehrane športnika, ki je pomembna za vzdrževanje fizične pripravljenosti. V vzdržljivostnem športu, kot je biatlon, in pri treniranju na višinah so potrebe po kisiku ogromne, zato je za nemoteno izgradnjo Hb potrebno zagotoviti zadostne količine Fe. Vsi športniki obeh skupin so v času bivanja na Rogli prejeli nadomestke Fe v obliki tablet. Podatkov o režimu jemanja in velikosti odmerkov nismo pridobili, vendar lahko iz serumskih koncentracij feritina ocenimo ali so telesne zaloge Fe optimalne za vzdrževanje eritropoeze. Iz grafičnega prikaza krivulj povprečnih koncentracij feritina pri obeh skupinah opazimo skokovito naraščanje in upadanje, kar je verjetno posledica jemanja dodatkov Fe in povečane sinteze Hb (Graf 10). Signifikantno značilen je upad v 2. odzemu (Tabela IV), toda koncentracija feritina ni nikoli upadla pod vrednost 35 µg/l, ki je v literaturi opisana kot priporočena koncentracija feritina za zagotavljanje potreb po Fe pri razmerah višinskega treninga (16).

Z raziskavo smo želeli preveriti ali se s takšnim režimom vadbe spremenijo izbrani hematološki parametri, ki posledično vplivajo na izboljšano športnikovo zmogljivost in če dobljene vrednosti ostanejo nad izhodiščnimi koncentracijami tudi po končanju višinskih priprav. Hipotezo (2) lahko potrdimo, saj se koncentracije EPO in hematoloških parametrov signifikantno spremenijo znotraj obeh skupin športnikov (Tabela V, Tabela VI), vendar lahko iz rezultatov zaključimo, da nobeden izmed merjenih parametrov ni ostal povišan po 1 dnevu ali 14 dneh vrnitve v Ljubljano. Glede na statistično obravnavo med obema skupinama smo pričakovali, da bo skupina LH-TL, ki je trenirala pod pogoji Živi visoko – treniraj nizko, dosegala bistveno boljše rezultate kot kontrolna skupina. S statističnima testoma F-test in ANOV-o smo ovrgli hipotezo (3), saj nismo odkrili signifikantnih razlik ($p < 0,05$) v hematoloških parametrih med skupinama. Pri interpretaciji vseh pridobljenih rezultatov smo se srečali s problemom vpliva dejavnikov kot so genetska predispozicija posameznika, prehranjevalne navade, fiziološko delovanje

organizma, športna pripravljenost, bolezni, ki prispevajo k interindividualnim razlikam med preiskovanimi športniki. Našteti faktorji so pripomogli k velikemu razponu med športniki znotraj določene časovne točke, kar se odraža v standardni deviaciji (Tabela III in Tabela IV). V ta namen smo z grafičnim prikazom predstavili trend gibanja povprečnih vrednosti hematoloških parametrov, statistično signifikantni podatki pa prikazujejo enotnost med športniki v določenem časovnem intervalu.

6 NADALJNJE DELO

Za izboljšano detekcijo izoform endogenega EPO z metodo IEF in širšo analizo hematoloških parametrov vrhunskih športnikov, ki trenirajo po vadbenem protokolu LH-TL, bi za prihodnje raziskave predlagali:

- optimizacijo metode IEF z zagotovitvijo ustrezne kakovosti in učinkovitost uporabljenih aparatov, materialov, kemikalij in reagentov,
- ustrezno shranjevanje urinskih vzorcev
- optimalno izvedbo radioimunološke metode ali uporabo metode ELISA,
- potrditev proteinurije s proteinskimi lističi, RBP proteinskim markerjem ali z oceno glomerulne filtracije,
- večje število urinskih odvzemov med višinskimi treningi za lažje določanje odstotnih porazdelitev posameznih izoform,
- upoštevanje smernic za optimalno uspešnost metode LH-TL; 2500 m, > 12h/dan izpostavljenosti hipoksičnim pogojem, vsaj 3–4 tedne
- športni protokol naj zajema še dodatno kontrolno skupino, ki trenira na pogojih pri nižji nadmorski višini (do 600 m), s katero bi lažje opredelili, ali so spremembe hematoloških parametrov posledica vadbe in/ali nadmorskih višin,
- novejša zasnova športnih protokolov s kombinacijami IHE in IHT metod,
- spremljanje športnikove fizične pripravljenosti že pred začetkom višinskih treningov,
- spremljanje posameznikove VO₂ max med in po odpravi, merjenje časov pri njihovih športnih disciplinah po končanju priprav,
- spremljanje perifernih dejavnikov, ki izboljšujejo aerobne sposobnosti (mišična puferska kapaciteta, koncentracija laktata ...), ne le hematoloških parametrov,
- zmanjšanje interindividualnih razlik med posamezniki z natančnejšim spremljanjem preostalih dejavnikov (genetika, fizična kondicija, bolezni, prehrana).

7 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Izoforme EPO se po 21 dneh treninga na Rogli pomaknejo proti bazičnim področjem. Spremembe smo zasledili pri športnikih, ki so trenirali pod pogoji metode LH-TL (59 % zvišanje bazičnega področja) in tudi pri kontrolni skupini (55 % zvišanje). Zaradi zanemarljivih razlik med skupinama sklepamo, da bivanje v višinskih sobah in nadmorska višina nista pomembno prispevala k premiku izoform. Glavni dejavnik, ki je največ prispeval k spremenjenemu profilu EPO je intenzivna aktivnost oz. vadbeni režim. Ta je bil enak za obe skupini.
- Intenziteta izoform se iz položaja β, γ, δ (endogene izoforme vzorca U0) premakne do položaja 1 in 2 (bazične izoforme vzorca U1).
- Vpliv hipoksičnih razmer nakazuje porast EPO po 1 in 7 dneh treninga, zvišanje Hb po 7 in 14 dneh treninga pri LH-TL skupini pa je posledica prilagoditve na višinsko okolje in sočasnega vpliva treningov. Kontrolna skupina je dosegla vrh Hb takoj po prihodu na Roglo, kar povezujemo z vplivom visokega EPO že pred odpravo.
- Signifikanten porast Ht po 7 dneh bivanja na višini 1500 m opazimo pri članih obeh skupin. Na zvišanje Ht vpliva večje število dejavnikov, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da je zvišanje Ht posledica pospešene eritropoeze.
- Telesne zaloge Fe smo ocenili iz serumskega feritina. Koncentracija je bila pri vseh športnikih zadostna za vzdrževanje eritropoeze zaradi jemanja nadomestkov Fe.
- Športniki skupine LH-TL niso uspeli doseči pozitivnih efektov omenjene metode. Po 14 dneh vrnitve v Ljubljano namreč opazimo signifikantno ($p < 0,05$) znižanje serumskega EPO (za 30,1 %) in znižane vrednosti vseh hematoloških parametrov v primerjavi z vzorci odvzetimi pred odpravo.
- S primerjavo koncentracije EPO in hematoloških parametrov med obema skupinama (F-test, ANOVA) smo ugotovili, da ni statistično pomembnih razlik med LH-TL in kontrolno skupino. Uporabljen režim treningov in s tem bivanje v sobah z nižjim pO_2 in treniranjem na 1500 m nadmorske višine ni pripeljalo do rezultatov, ki jih opisujejo zagovorniki metode Živi visoko – treniraj nizko.

8 LITERATURA

1. Španinger K., Debeljek N. Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija. *Farm vestn.* 2009; 60: 7.
2. Doljak B. Eritropoetin. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine.* Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007. p. 284–307.
3. Moriconi F., Ramadori P., Schultze F., Blaschke M., Amanzada A., Khan S., et al. Characterization of the erythropoietin/erythropoietin receptor axis in a rat model of liver damage and cholangiocarcinoma development. *Histochemistry and Cell Biology.* 2013;139(3): 473–85.
4. Noguchi CT, Wang L., Rogers HM, Teng R., Jia Y. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med.*10: e36.
5. Dame C. Molecular biology of the erythropoietin receptor in hematopoietic and non-hematopoietic tissues. In: Molineux G, Foote M, Elliott S, editors. *Erythropoietins and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy MDT: Birkhäuser Basel;* 2006. p. 35–64.
6. Jelkmann W., Depping R., Metzen E. Nonhematopoietic effects of erythropoiesis-stimulating agents. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy: Birkhäuser Basel;* 2009. p. 299–317.
7. Španinger K. Rekombinantni človeški eritropoetin: analiza celokupnega eritropoetina z izoelektričnim fokusiranjem pri bolnikih z rakom in molekularni mehanizmi nevroprotekcije v celičnim linijah : doktorsko delo = Recombinant human erythropoietin / Klemen Španinger. Ljubljana: [K. Španinger]; 2011.
8. Debeljak N., Sytkowski AJ. Erythropoietin and erythropoiesis stimulating agents. *Drug Test Anal.* 2012;4(11): 805–12.
9. Michael J. Fundamentals of Medical Physiology. In: Sircar S, editor. *New York*2010. p. 111–413.
10. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Reviews.* 2013; 27(1): 41–53.
11. Doshi S., Perez-Ruixo J., Jang G., Chow A. Pharmacokinetics of erythropoiesis-stimulating agents. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy: Birkhäuser Basel;* 2009. p. 199–223.

12. Chateauvieux S., Grigorakaki C., Morceau F., Dicato M., Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol.* 82. England: 2011 Elsevier Inc; 2011. p. 1291–303.
13. Tanaka T., Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. *Experimental Cell Research.* 2012; 318(9): 1068–73.
14. Mole D., Ratcliffe P. Regulation of endogenous erythropoietin production. In: Elliott S., Foote M., Molineux G., editors. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy.* Birkhäuser Basel; 2009. p. 19–40.
15. Stoian I., Manolescu B., Atanasiu V., Lupescu O. New alternatives for erythropoietin therapy in chronic renal failure. *Central European Journal of Medicine.* 2007; 2(4): 361–78.
16. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299(1): F1–F13.
17. Diskin CJ. Towards erythropoietin equations that estimate oxygen delivery rather than static hemoglobin targets. *Nephron Clin Pract.* 2012; 120(1): c48–53; discussion c.
18. Wenger RH., Hoogewijs D. Regulated oxygen sensing by protein hydroxylation in renal erythropoietin-producing cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 2010; 298(6): F1287–F96.
19. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood.* 114. United States 2009. p. 2015–9.
20. Robinson N., Giraud S., Saudan C., Baume N., Avois L., Mangin P., et al. Erythropoietin and blood doping. *Br J Sports Med.* 40 Suppl 1. England 2006. p. i30–4.
21. Debeljak N., Sytkowski AJ. Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(13): 1302–10.
22. Debeljak N., Sytkowski AJ. *EpoR UCSD Signaling Gateway* 2007.
23. Molineux G, Sinclair A. Biology of erythropoietin. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy.* Birkhäuser Basel; 2009. p. 41–60.
24. Elliott S. Erythropoiesis-Stimulating Agents. In: Lyman GH, Dale DC, editors. *Hematopoietic Growth Factors in Oncology. Cancer Treatment and Research.* 157: Springer US; 2011. p. 55–74.

25. Jelkmann W. Erythropoietin. In: Ghigo E, Lanfranco F, Strasburger CJ, editors. *Hormone Use and Abuse by Athletes. Endocrine Updates.* 29: Springer US; 2011. p. 99–109.
26. Foote M. Studies of erythropoiesis and the discovery and cloning of recombinant human erythropoietin. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy: Birkhäuser Basel;* 2009. p. 77–85.
27. Su D., Zhao H., Xia H. Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity. *International Journal of Hematology.* 2010;.91(2): 238–44.
28. Jelkmann W. Pharmacology, pharmacokinetics and safety of recombinant human erythropoietin preparations. In: Nowrousian M, editor. *Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology: Springer Vienna;* 2008. p. 407–31.
29. Reichel C., Gmeiner G. Erythropoietin and Analogs. In: Thieme D, Hemmersbach P, editors. *Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis. Handbook of Experimental Pharmacology.* 195: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 251–94.
30. Kamioner D. Erythropoietin biosimilars currently available in hematology-oncology. *Targeted Oncology.* 2012; 7(1):25–8.
31. Lamon S., Robinson N., Saugy M. Direct Methods for Distinction Between Endogenous and Exogenous Erythropoietin. In: Ghigo E, Lanfranco F, Strasburger CJ, editors. *Hormone Use and Abuse by Athletes. Endocrine Updates.* 29: Springer US; 2011. p. 163–75.
32. Kiss Z., Elliott S., Jedyndasty K., Tesar V., Szegedi J. Discovery and basic pharmacology of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), including the hyperglycosylated ESA, darbepoetin alfa: an update of the rationale and clinical impact. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 2010;.66(4): 331–40.
33. Jelkmann W., Lundby C. Blood doping and its detection. *Blood.* 2011; 118(9): 2395–404.
34. Jelkmann W. Erythropoietin gene doping: facts and fictions. *Sportwissenschaft.* 2012; 42(4): 280–5.
35. Catlin D., Hatton C. Abuse of recombinant erythropoietins and blood products by athletes. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. *Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy: Birkhäuser Basel;* 2009. p. 249–78.

36. Lasne F., Martin L., Crepin N., de Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 311. United States 2002. p. 119–26.
37. Richalet J-P. Training, Altitude. In: Mooren F, editor. *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 859–64.
38. Friedmann-Bette B. Classical altitude training. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.* 2008; 18: 11–20.
39. Altitude Training. In: Mooren F, editor. *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 54- 66.
40. Piantadosi CA. *Biology of Human Survival : Life and Death in Extreme Environments.* Cary, NC, USA: Oxford University Press, USA; 2003.
41. Hainsworth R., Drinkhill MJ., Rivera-Chira M. The autonomic nervous system at high altitude. *Clin Auton Res.* 2007;17(1):13–9.
42. Bärtsch P., Saltin B. General introduction to altitude adaptation and mountain sickness. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.* 2008; 18: 1–10.
43. Schommer K., Bartsch P. Basic medical advice for travelers to high altitudes. *Dtsch Arztebl Int.* 2011; 108(49): 839–47; quiz 48.
44. Strzala M., Ostrowski A., Szygula Z. Altitude training and its influence on physical endurance in swimmers. *J Hum Kinet.* 2011; 28: 91–105.
45. Wilber RL. Application of altitude/hypoxic training by elite athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(9): 1610–24.
46. Millet G., Roels B., Schmitt L., Woorons X., Richalet JP. Combining Hypoxic Methods for Peak Performance. *Sports Medicine.* 2010; 40(1): 1–25.
47. Wilber R. Current Trends in Altitude Training. *Sports Medicine.* 2001; 31(4): 249-65.
48. Bärtsch P., Dehnert C., Friedmann-Bette B., Tadibi V. Intermittent hypoxia at rest for improvement of athletic performance. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports.* 2008; 18: 50–6.
49. Robach P., Schmitt L., Brugniaux J., Nicolet G., Duvallet A., Fouillot J-P, et al. Living high–training low: effect on erythropoiesis and maximal aerobic performance in elite Nordic skiers. *European Journal of Applied Physiology.* 2006; 97(6): 695–705.
50. Levine BD., Stray-Gundersen J. Dose-response of altitude training: how much altitude is enough? *Adv Exp Med Biol.* 2006; 588:233–47.

51. Ashenden MJ., Gore CJ., Dobson GP., Boston TT., Parisotto R., Emslie KR., et al. Simulated moderate altitude elevates serum erythropoietin but does not increase reticulocyte production in well-trained runners. *European Journal Of Applied Physiology*. 2000; 81(5): 428–35.
52. Garvican L., Martin D, Quod M., Stephens B., Sassi A., Gore C. Time course of the hemoglobin mass response to natural altitude training in elite endurance cyclists. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2012; 22(1): 95–103.
53. Wachsmuth NB., Völzke C., Prommer N., Schmidt-Trucksäss A., Frese F., Spahl O., et al. The effects of classic altitude training on hemoglobin mass in swimmers. *European Journal of Applied Physiology*. 2013 ;113(5): 1199–211.
54. Eberle S. Nutritional Needs of Endurance Athletes. In: Antonio J, Kalman D, Stout J, Greenwood M, Willoughby D, Haff GG, editors. *Essentials of Sports Nutrition and Supplements: Humana Press*; 2008. p. 329–48.
55. Beavers K., Serra M. Essential and Nonessential Micronutrients and Sport. *Nutritional Supplements in Sports and Exercise: Humana Press*; 2008. p. 121–65.
56. Breidbach A., Catlin DH., Green GA., Tregub I., Truong H., Gorzek J. Detection of Recombinant Human Erythropoietin in Urine by Isoelectric Focusing. *Clinical Chemistry*. 2003; 49(6): 901–7.
57. Segura J., Pascual J., Gutiérrez-Gallego R. Procedures for monitoring recombinant erythropoietin and analogues in doping control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007; 388(7): 1521–9.
58. Bajla I., Holländer I., Gmeiner G., Reichel C. Quantitative analysis of images in erythropoietin doping control. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 2005; 43(3): 403–9.
59. Španinger K., Borštnar S., Matos E., Možina B., Sytkowski AJ., Komel R., et al. Report on isoelectric focusing trial of erythropoietin profiling in two cancerpatients during chemotherapy and darbepoetin treatment / Klemen Španinger ... [et al.]. *Acta chimica slovenica*. 2011; 58(1): str. 139–43.
60. Reichel C. Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem*. 2011; 401(2): 463–81.
61. Lamon S., Martin L., Robinson N., Saugy M., Ceaurriz Jd., Lasne F. Effects of exercise on the isoelectric patterns of erythropoietin. *Clinical Journal Of Sport Medicine: Official Journal Of The Canadian Academy Of Sport Medicine*. 2009 ;19(4): 311–5.

62. Belalcazar V., Gutierrez Gallego R., Llop E., Segura J., Pascual JA. Assessing the instability of the isoelectric focusing patterns of erythropoietin in urine. *Electrophoresis*. 2006 ;27(22): 4387–95.
63. Delanghe JR., Bollen M., Beullens M. Testing for recombinant erythropoietin. *American Journal of Hematology*. 2008 ;83(3): 237–41.
64. Kashif W., Siddiqi N., Dincer AP., Dincer HE., Hirsch S. Proteinuria: how to evaluate an important finding. *Cleve Clin J Med*. 2003; 70(6): 535–7, 41–4, 46–7.
65. Peeri M., Kohanpour M-A., Sanavi S., Matinhomae H., Mirsepasi M. Effects of different intensities of aerobic exercise on proteinuria in hypoxia and normoxia conditions in young football players. *Diálisis y Trasplante*. 2012; 33(3): 84–8.
66. Khan I., Sial SHJ., Waris S., Iqbal Z., Khan FA. Renal Excretory Response at High Altitude. *Journal of Postgraduate Medical Institute (Peshawar - Pakistan)*; Vol 12, No 1 (1998). 2011.
67. Schmidt W., Prommer N. Effects of various training modalities on blood volume. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2008; 18: 57–69.
68. Heuberger JAAC., Cohen Tervaert JM., Schepers FML., Vliegenthart ADB., Rotmans JJ., Daniels JMA., et al. Erythropoietin doping in cycling: lack of evidence for efficacy and a negative risk–benefit. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2013; 75(6): 1406–21.

9 PRILOGE

Tabela V: Meritve koncentracij EPO v koncentriranih urinskih vzorcih izvedene z radioimunološko metodo (RIA).

LH-TL skupina				kontrolna skupina			
oseba	oznaka vzorcev	koncentracija EPO po koncentriranju (UI/l)		oseba	oznaka vzorcev	koncentracija EPO po koncentriranju (UI/l)	
oseba 1	U0-1	2,381	5,026	oseba 3	U0-3	NK	4,936
	U1-1	NK	1,239		U1-3	NK	0,368
	U2-1	0,157	1,669		U2-3	NK	NK
oseba 2	U0-2	1,926	3,475	oseba 6	U0-6	NK	NK
	U1-2	NK	1,538		U1-6	NK	2,886
	U2-2	0,089	1,854		U2-6	NK	1,402
oseba 4	U0-4	NK	NK	oseba 9	U0-9	4,109	4,928
	U1-4	0,834	1,096		U1-9	NK	0,954
	U2-4	NK	NK		U2-9	3,73	4,028
oseba 5	U0-5	0,475	2,048	oseba 10	U0-10	0,761	4,676
	U1-5	4,187	5,354		U1-10	1,879	3,623
	U2-5	0,798	1,405		U2-10	NK	1,242
oseba 7	U0-7	3,013	4,296	oseba 12	U0-12	NK	1,873
	U1-7	NK	2,234		U1-12	3,152	3,567
	U2-7	2,789	5,848		U2-12	NK	NK
oseba 8	U0-8	NK	3,5				
	U1-8	5,043	5,664				
	U2-8	4,722	5,877				
oseba 11	U0-11	3,356	4,898				
	U1-11	4,926	6,169				
	U2-11	NK	NK				

OPOMBA: U0 – urinski vzorec odvzet 7 dni pred odpravo
 U1 – urinski vzorec odvzet po 21 dneh intenzivnega treninga
 U2 – urinski vzorec odvzet 14 dni po vrnitvi v LJ
 NK – neopredeljena koncentracija vzorca zaradi prenizke koncentracije EPO

Tabela VI: Shapiro – Wilkov test normalnosti

hematološki parametri	št. odvzemov	časovna opredelitev	LH-TL skupina		kontrolna skupina	
			statistika	statistična značilnost	statistika	statistična značilnost
Eritropoetin (IU/l)	1. odvzem	pred odpravo	0,922	0,548	0,983	0,747
	2. odvzem	prihod na Roglo	0,885	0,362	0,997	0,904
	3. odvzem	7 dni intenzivnega treninga	0,910	0,481	0,786	0,081
	4. odvzem	14 dni intenzivnega treninga	0,853	0,236	0,815	0,150
	5. odvzem	21 dni intenzivnega treninga	0,783	0,075	0,983	0,754
	6. odvzem	vrnitev v LJ	0,909	0,476	0,923	0,463
	7. odvzem	14 dni po vrnitvi v LJ	0,971	0,850	0,957	0,602
Eritrociti ($10^{12}/l$)	1. odvzem	pred odpravo	0,886	0,365	0,945	0,548
	2. odvzem	prihod na Roglo	0,964	0,805	0,958	0,604
	3. odvzem	7 dni intenzivnega treninga	0,981	0,910	0,974	0,691
	4. odvzem	14 dni intenzivnega treninga	0,937	0,636	0,997	0,900
	5. odvzem	21 dni intenzivnega treninga	0,882	0,346	0,944	0,542
	6. odvzem	vrnitev v LJ	0,935	0,626	0,952	0,577
	7. odvzem	14 dni po vrnitvi v LJ	0,985	0,932	0,960	0,615
Hemoglobin (g/l)	1. odvzem	pred odpravo	0,818	0,138	0,990	0,811
	2. odvzem	prihod na Roglo	0,998	0,994	0,998	0,915
	3. odvzem	7 dni intenzivnega treninga	0,975	0,875	0,993	0,843
	4. odvzem	14 dni intenzivnega treninga	0,925	0,563	0,878	0,317
	5. odvzem	21 dni intenzivnega treninga	0,922	0,550	0,862	0,274
	6. odvzem	vrnitev v LJ	0,856	0,247	0,824	0,174
	7. odvzem	14 dni po vrnitvi v LJ	0,864	0,275	0,807	0,132
Hematokrit (%)	1. odvzem	pred odpravo	0,885	0,362	0,949	0,567
	2. odvzem	prihod na Roglo	0,921	0,543	0,969	0,661
	3. odvzem	7 dni intenzivnega treninga	0,911	0,486	0,999	0,945
	4. odvzem	14 dni intenzivnega treninga	0,917	0,518	0,986	0,771
	5. odvzem	21 dni intenzivnega treninga	0,889	0,378	0,750	0,018
	6. odvzem	vrnitev v LJ	0,830	0,168	0,950	0,570
	7. odvzem	14 dni po vrnitvi v LJ	0,934	0,620	0,964	0,637
Retikilociti ($10^9/l$)	1. odvzem	pred odpravo	0,834	0,178	1,000	0,985
	2. odvzem	prihod na Roglo	0,994	0,976	0,964	0,638
	3. odvzem	7 dni intenzivnega treninga	0,854	0,238	0,908	0,411
	4. odvzem	14 dni intenzivnega treninga	0,822	0,147	0,940	0,529

	5. odvzem	21 dni intenzivnega treninga	0,828	0,163	1,000	0,969
	6. odvzem	vrnitev v LJ	0,773	0,061	0,917	0,441
	7. odvzem	14 dni po vrnitvi v LJ	0,817	0,137	0,997	0,897
Feritin (µg/l)	1. odvzem	pred odpravo	0,724	0,021	0,862	0,274
	2. odvzem	prihod na Roglo	0,735	0,028	0,818	0,157
	3. odvzem	7 dni intenzivnega treninga	0,926	0,571	0,781	0,070
	4. odvzem	14 dni intenzivnega treninga	0,918	0,523	0,907	0,407
	5. odvzem	21 dni intenzivnega treninga	0,915	0,507	1,000	1,000
	6. odvzem	vrnitev v LJ	0,811	0,123	0,883	0,334
	7. odvzem	14 dni po vrnitvi v LJ	0,951	0,725	0,861	0,271

Tabela VII: Vrednosti koncentracije EPO posameznikov, povprečne vrednosti in standardni odklon (SD) v sedmih časovnih točkah pri športnikih LH-TL skupine

št. odvzemov oseba	1. odvzem	2. odvzem	3. odvzem	4. odvzem	5. odvzem	6. odvzem	7. odvzem
oseba 1	22,7	34,3	23,3	16,0	9,67	17,1	15,0
oseba 2	34,0	35,3	26,3	27,1	13,7	27,8	24,6
oseba 4*	84,7	70,1	70,0	59,7	44,1	53,6	64,5
oseba 5	18,3	11,4	32,6	12,9	4,82	/	11,3
oseba 7	18,3	14,5	17,9	14,1	11,4	15,9	11,8
oseba 8	16,2	/	17,7	9,50	4,40	10,6	12,8
oseba 11	24,1	25,7	23,4	29,3	30,4	23,7	18,2
povprečna vrednost	22,3	24,2	23,5	18,2	12,4	19,0	15,6
standardni odklon	6,47	11,0	5,58	8,10	9,55	6,77	5,07

* osebe 4 nismo upoštevali pri statistični obravnavi zaradi previsokih izstopajočih vrednosti.

Tabela VIII: Vrednosti koncentracije EPO posameznikov, povprečne vrednosti in standardni odklon (SD) v sedmih časovnih točkah pri športnikih kontrolne skupine

št. odvzemov oseba	1. odvzem	2. odvzem	3. odvzem	4. odvzem	5. odvzem	6. odvzem	7. odvzem
oseba 3	25,4	19,8	14,2	16,3	9,19	20,1	13,5
oseba 6	23,8	15,2	14,5	20,5	17,7	13,3	12,2
oseba 9	26,4	17,7	20,5	20,9	14,4	15	16,3
oseba 10	30,2	24,5	22,3	28,6	17,6	22,3	15,4
oseba 12	/	24,7	16,9	13,5	17,6	14,1	/
povprečna vrednost	26,5	20,4	17,7	20,0	15,3	17,0	14,4
standardni odklon	2,72	4,18	3,61	5,72	3,69	3,99	1,85

Tabela IX: Povprečne vrednosti hematoloških parametrov pri LH-TL skupini in kontrolni skupini

št. odvzemov/ hematološki parametri	1. odvzem	2. odvzem	3. odvzem	4. odvzem	5. odvzem	6. odvzem	7. odvzem
Erc. ($10^{12}/l$)							
LH-TL	4,96 ± 0,43	4,98 ± 0,49	5,11 ± 0,34	5,09 ± 0,39	4,94 ± 0,39	4,88 ± 0,44	4,80 ± 0,36
kontrola	4,96 ± 0,49	5,23 ± 0,40	5,03 ± 0,37	5,03 ± 0,25	4,89 ± 0,26	4,86 ± 0,22	4,85 ± 0,31
Retic. ($10^9/l$)							
LH-TL	65,3 ± 17,3	73,9 ± 15,2	73,0 ± 15,9	72,1 ± 24,5	55,5 ± 6,91	61,5 ± 22,9	50,2 ± 10,2
kontrola	61,0 ± 21,2	73,2 ± 25,4	64,2 ± 16,1	67,0 ± 20,7	61,3 ± 21,1	51,9 ± 5,46	56,4 ± 15,3
Hb (g/l)							
LH-TL	150,9 ± 11,7	150,8 ± 13,1	154,1 ± 7,52	154,3 ± 10,4	149,7 ± 9,72	149,8 ± 12,0	147,1 ± 8,40
kontrola	146,5 ± 13,5	153,0 ± 10,1	148,2 ± 7,85	148,6 ± 8,56	146,6 ± 7,33	145,2 ± 9,44	146,0 ± 8,91
Ht (%)							
LH-TL	45,4 ± 3,09	45,9 ± 4,13	47,2 ± 2,75	47,0 ± 2,70	45,5 ± 3,08	43,6 ± 2,83	43,2 ± 2,81
kontrola	44,4 ± 4,57	47,0 ± 3,39	45,5 ± 2,97	45,3 ± 2,03	43,3 ± 2,06	43,1 ± 2,16	41,8 ± 2,75
feritin ($\mu\text{g}/l$)							
LH-TL	51,1 ± 32,2	38,5 ± 32,0	46,1 ± 25,1	38,3 ± 22,4	49,4 ± 24,7	41,7 ± 34,5	49,9 ± 29
kontrola	39,5 ± 20,4	40,0 ± 21,6	65,8 ± 15,8	49,8 ± 13,6	45,4 ± 15,2	56,4 ± 27,0	45,5 ± 21,0

* Osebe 4 nismo upoštevali pri statistični obravnavi zaradi previsokih izstopajočih vrednosti.