

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA PETERLE

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA PETERLE

DOLOČANJE ERITROPOETINA Z IZOELEKTRIČNIM FOKUSIRANJEM PRI
ALPINISTIH, IZPOSTAVLJENIH RAZLIČNIM NADMORSKIM VIŠINAM

ERYTHROPOIETIN DETERMINATION IN ALPINISTS EXPOSED TO DIVERSE
ALTITUDES USING ISOELECTRIC FOCUSING

Ljubljana, 2013

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, somentorici doc. dr. Nataši Debeljak in delovnemu mentorju asist. dr. Klemnu Španingerju, mag. farm., za strokovno pomoč, koristne nasvete in usmerjanje pri delu.

Zahvaljujem se tudi ga. Stanki Sever za izvedbo analize RIA in zaposlenim na Medicinskem centru za molekularno biologijo in Centru za funkcijsko genomiko in biočipe za vso pomoč v času laboratorijskega dela.

Posebna zahvala gre tudi Katji J., Aniti L., Manci Ž., Katji O. in Roku P. za spodbudne besede med nastajanjem diplomske naloge.

Ob koncu pa bi se prav posebej zahvalila tudi moji družini in Denisu za podporo in mirne živce v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja in somentorice doc. dr. Nataše Debeljak.

Maja Peterle

1 KAZALO

1	KAZALO	I
2	POVZETEK	III
3	ABSTRACT	IV
4	SEZNAM OKRAJŠAV	V
5	UVOD	1
5.1	ERITROPOETIN	1
5.1.1	IZRAŽANJE ERITROPOETINA	4
5.1.2	ERITROPOETINSKI RECEPTOR (EPOR)	5
5.1.3	SIGNALNE POTI ERITROPOETINA	6
5.1.4	VLOGA ERITROPOETINA V OSTALIH TKIVIH	7
5.1.5	REKOMBINANTNI ERITROPOETIN	8
5.2	VPLIV NADMORSKE VIŠINE IN TELESNE AKTIVNOSTI NA ERITROPOETIN IN KRVNE PARAMETRE	10
5.2.1	AKUTNA PRILAGODITEV NA VIŠJO NADMORSKO VIŠINO	11
5.2.2	AKLIMATIZACIJA NA VIŠJO NADMORSKO VIŠINO	11
5.2.3	ŽIVLJENJE NA VIŠJI NADMORSKI VIŠINI	14
5.2.4	VPLIV VIŠINSKE AKTIVNOSTI NA ERITROPOETIN IN KRVNE PARAMETRE	14
5.3	DETEKCIJA ERITROPOETINA IN IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE	18
6	NAMEN DELA	20
7	MATERIALI IN METODE	21

7.1	PREISKOVANCI	21
7.2	ZBIRANJE VZORCEV	21
7.3	MATERIALI IN APARATURE	22
7.4	PRIPRAVA VZORCEV – KONCENTRIRANJE URINA.....	24
7.4.1	REAGENTI	24
7.4.2	POSTOPEK KONCENTRIRANJA URINA	24
7.5	RADIOIMUNOLOŠKA METODA (RIA)	25
7.6	IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE Z DVOJNIM PRENOSOM.....	26
7.6.1	REAGENTI	26
7.6.2	PRIPRAVA GELA.....	28
7.6.3	IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE.....	29
7.6.4	DVOJNI PRENOS	31
7.6.5	KEMILUMINISCENČNA VIZUALIZACIJA.....	34
7.6.6	STATISTIČNE METODE IN ORODJA	34
8	REZULTATI	35
8.1	ANALIZA IZOFORM EPO	35
8.2	KONCENTRACIJA EPO IN HEMATOLOŠKI PARAMETRI.....	39
9	RAZPRAVA	42
9.1	PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE METODE IN RAZISKAVE	46
10	SKLEP	47
11	LITERATURA	48
12	PRILOGE	53

Eritropoetin (EPO) je človeški hormon, glikoprotein, ki se primarno sintetizira v ledvicah. Njegova naloga je stimulacija nastanka rdečih krvnih celic in posledično izboljšanje prenosa kisika v krvi. Eden izmed sprožilnih dejavnikov za povečano sintezo EPO je hipoksija, ki se pojavi med treningom ali bivanjem na visoki nadmorski višini. Medtem ko se profil izoform EPO v urinu lahko spremeni med ekstremnimi napori, vpliv višinskega treninga ni znan.

Sedem alpinistov je pred in po 18- do 22-dnevni alpinistični odpravi oddalo vzorce plazme in urina. Preiskovanci so po aklimatizacijski turi pri 3300 m in vzponu na več gorskih vrhov med 4000 in 5642 m zbrali vzorce urina. Z namenom določitve izoelektričnega profila EPO smo s pomočjo izoelektričnega fokusiranja analizirali vzorce urina. V krvi smo določili hematološke parametre. Koncentracijo EPO smo analizirali s pomočjo radioimunološke metode.

Štiri dni po vzponu na višjo nadmorsko višino smo opazili premik EPO-izoforme proti bolj bazični pI, kar potrjuje vpliv napora in visoke nadmorske višine na EPO-profil. V času 12- do 16-dnevnega bivanja na višini med 2200 in 4355 m so se izoforme EPO začele vračati na začetno stanje, najverjetneje zaradi prilagoditve hipoksičnim razmeram. Pri primerjavi hematoloških parametrov pred in po ekspediciji smo opazili znižano koncentracijo EPO za $17,5 \pm 14,8$ % in povišane vrednosti eritrocitov, hematokrita in majhno, nesignifikantno povečanje koncentracije hemoglobina. Bolj presenetljivi so rezultati števila trombocitov in levkocitov, ki so se povečali za $12,8 \pm 8,5$ % oziroma $17,2 \pm 8,8$ %.

Čeprav je izoelektrično fokusiranje, specifično za EPO, primerno orodje za raziskavo vpliva višinskega treninga na vzorce endogenega EPO, bodo potrebne nadaljnje študije za razjasnitev tega vpliva.

KLJUČNE BESEDE: eritropoetin, višina, alpinisti, izoelektrično fokusiranje.

Erythropoietin (EPO) is a human glycoprotein hormone primarily synthesized by the kidney. It stimulates the production of red blood cells and consequently improves the blood's oxygen carrying capacity. One of the triggering factors resulting in increased EPO production is hypoxia, which arises while training or living at high altitude. EPO profile in urine may be modified during extreme exercises, while the impact of altitude training is not known.

Plasma and urine samples of 7 alpinists were obtained before and after 18 – 22 day-long climbing expedition. During acclimatization step at 3300 m and rise to several mountain peaks between 4000 to 5642 m several urine samples were collected. Urine samples were analyzed using isoelectric focusing in the aim to determine the EPO isoelectric patterns. Haematological parameters in the blood were determined. EPO concentration was assessed by RIA.

4 days after ascent to the high altitude shift of EPO isoforms toward a more basic pI was observed, confirming the effect of extreme exercise in high altitude on EPO profile. 12 – 16 days living between 2200 – 4355 m a return of the EPO pattern to the initial state was detected due to possible acclimatization. Comparing the hematological parameters before and after expedition the EPO was decreased by $17,5 \pm 14,8$ %. We also observed improvement in levels of erythrocytes, hematocrit and small, but not significant enlargement of haemoglobin. More surprisingly, platelets and leucocytes were increased by $12,8 \pm 8,5$ % and $17,2 \pm 8,8$ %.

Even though EPO specific IEF provides a tool to investigate effect of altitude training on endogenous EPO patterns further studies are required in order to clarify this influence.

KEYWORDS: erythropoietin, altitude, alpinists, isoelectric focusing.

APS	amonijev persulfat (angl. ammonium persulfate)
BFU-E	mieloična izvorna celica eritrocitne vrste, predstopnja CFU-E (angl. burst-forming unit-erythroid)
BHK	ledvične celice mladiča hrčka (angl. baby hamster kidney cells)
BSA	albumin iz govejega seruma (angl. bovine serum albumin)
CERA	pegilirana oblika epoetina β (angl. continuously erythropoiesis receptor activator)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (angl. complementary deoxyribonucleic acid)
CFU-E	mieloična izvorna celica eritrocitne vrste (angl. colony-forming unit-erythrocyte)
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (angl. chinese hamster ovary cells)
EPO	eritropoetin
EPOR	eritropoetinski receptor
DTT	ditiotreitol
FIH-1	faktor inhibicije HIF (angl. factor inhibiting HIF-1)
GA-EPO	epoetin δ
GATA-2	GATA vezoč protein 2 (angl. GATA-binding protein 2)
G-CSF	faktor stimulacije granulocitne kolonije (angl. granulocyte-colony stimulating factor)
GM-SCF	faktor stimulacije granulocitno-makrofagne kolonije (angl. granulocyte macrophage-colony stimulating factor)
GRB2	protein 2 vezan na receptor za rastni dejavnik (angl. growth factor receptor-bound protein 2)
Hb	hemoglobin
Hct	hematokrit
HIF	hipoksija inducibilni faktor (angl. hypoxia-inducible factor)
HIF-PH	HIF-prolil hidroksilaza
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
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, tudi somatomedin C (angl. insulin-like growth factor 1)
IL	interlevkin
IOC	mednarodni olimpijski komite (angl. International Olympic Committee)
Jak2	Janus kinaza 2
LFM	mleko z nizko vsebnostjo maščob (angl. low fat milk)
MAIIA	imunološka metoda (angl. membrane assisted isoform immuno assay)
MAPK	z mitogenom aktivirana protein kinaza (angl. ras mitogen-activated protein kinase)
MR	barvilo metil rdeče
NESP	glikozilirana oblika epoetina α , darbepoetin α (angl. new erythropoiesis stimulating protein)
NF- κ B	jedrni faktor κ B (angl. nuclear factor κ B)
ODD	od O ₂ odvisne degradacijske domene (angl. oxygen-dependent degradation domain)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate buffered saline)
pI	izoelektrična točka
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza (angl. Phospatidylinositol-3-kinase)
PEG	polietilen glikol
pO ₂	parcialni tlak kisika
RCF	relativna centrifugalna sila (angl. relative centrifugal force)
rHuEPO	rekombinantni humani eritropoetin
RIA	radio-imunološka metoda (angl. radioimmunoassay)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
SCF	faktor izvornih celic (angl. stem cell factor)
SHP	protein tirozin fosfataza z vsebujočo SH2-domeno (angl. SH2 containing phosphotyrosine phosphatase)
SOCS	citokine inducibilni proteini s SH2-domeno (angl. Cytokine inducible SH2 domain proteins)

STAT	pretvorniki signala in aktivatorji prepisovanja (angl. signal transducers and activators of transcription)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TRIS	(hidroksimetil) aminometan
VHL	protein Von Hippel-Lindau
VO ₂ max	maksimalna aerobna kapaciteta

5.1 ERITROPOETIN

Eritropoetin (EPO) je endogeni hormon, pomemben pri uravnavanju nastajanja eritrocitov v rdečem kostnem mozgu. Glavni vir sinteze EPO med embriogenezo predstavljajo jetra, pri odraslih pa se ga večina (do 90 %) tvori v peritubularnih fibroblastih skorje ledvic. Manjši del EPO nastaja še v jetrih, možganih, vranici, pljučih in testisih. V primeru bolezni ledvic količina hormona sintetizirana izven ledvic ne zadošča za ustrezno uravnavanje eritropoeze (1, 2).

Kljub majhni sekvenčni homologiji je EPO član večje citokinske družine, v katero uvrščamo še rastni hormon, prolaktin, interleukine 2–7, faktor stimulirajoče granulocitne kolonije (G-CSF) in druge. Članom družine je skupna podobnost v številu eksonov in strukturni obliki proteina (1).

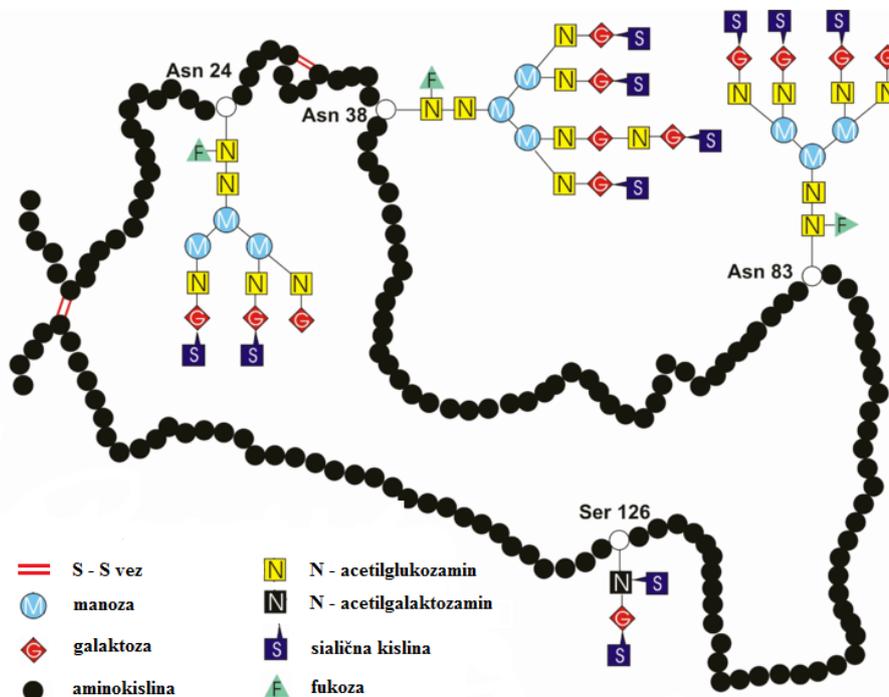
Človeški gen za EPO so klonirali in izrazili leta 1985. Omenjeni gen se nahaja na položaju 7q22 kromosoma 7 v velikosti 3 kb in vsebuje 5 za prohormon kodirajočih eksonov. Do sedaj ni poznana še nobena mutacija gena EPO, ki bi izzvala bolezen pri ljudeh (3).

Pomanjkanje kisika v tkivih, hipoksija, je primarni regulator izražanja EPO-gena. Poleg hipoksije prepisovanje gena urejajo tudi inhibitorna transkripcijska faktorja GATA-2 in NF- κ B ter stimulatorna transkripcijska faktorja HNF-4 α in HIF-2 (3).

Funkcionalno obliko hormona sestavlja glikoprotein, sestavljen iz 165 aminokislin z molekulsko maso 30–34 kDa, dveh intramolekularnih disulfidnih vezi (C7-C161 in C29-C33) in štirih neodvisnih sladkornih verig, ki predstavljajo 35–40 % molekulske mase proteina. Pri hipoksiji se EPO sprva sintetizira v obliki prohormona s 193-dolgim aminokislinskim zaporedjem. V procesu posttranslacijske modifikacije se iz prohormona odstranita 27 aminokislin dolgi peptid z N-terminalnega konca ter R166 na C-terminalnem koncu (1, 3).

Sladkorne verige so pripete na asparaginske in serinske aminokislinske ostanke. Na asparaginske ostanke so z N-glikozilacijo vezane tri sladkorne verige (N24, N38 in N83). Slednje igrajo ključno vlogo pri biosintezi, sekreciji, afiniteti do receptorja, razpolovnem času v plazmi in očistku hormona *in vivo*, ne vplivajo pa na vezavo EPO na receptor ali na

funkcijo *in vitro*. Na serinske aminokislinske ostanke je z O-glikozilacijo vezana ena sladkorna veriga (S126), katere vloga za enkrat še ni znana (Slika 1) (1, 3, 4).

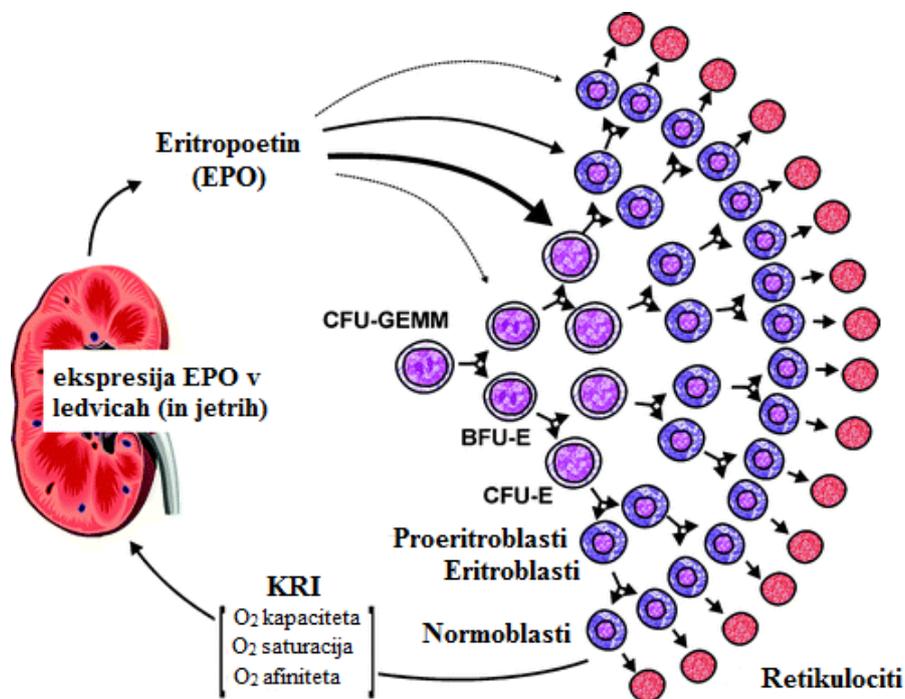


Slika 1: Eritropoetin. Struktura EPO je sestavljena iz 165 aminokislinskih ostankov, dveh intramolekularnih disulfidnih vezi in štiri sladkorni verige, pripetih na serinske in asparaginske aminokislinske ostanke (prirejeno po: (5)).

Končna oblika EPO se sprosti v krvni obtok, po katerem dospe do rdečega kostnega mozga in z vezavo na eritropoetinski receptor mieloičnih izvornih celic eritrocitne vrste (BFU-E in CFU-E) izzove biološki učinek (1, 3). Zavre se programirana celična smrt (apoptoza) CFU-E celic, spodbudi se njihova proliferacija in diferenciacija z nastankom proeritroblastov, eritroblastov, normoblastov in retikulocitov (Slika 2). Eritropoeza je počasen proces, saj od zaznane naraščajoče koncentracije EPO preteče 3–4 dni, preden zasledimo prisotnost retikulocitov tudi v plazmi (2, 6).

Poleg EPO pri eritropoezi sodelujejo še rastni faktorji, kot so faktor stimulacije granulocitne kolonije (G-CSF), interleukini (IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11), faktor izvornih celic (SCF), faktor stimulacije granulocitno-makrofagne kolonije (GM-CSF) in inzulinu podoben rastni faktor 1 (IGF-1) (7).

Med eritropoezo naraste tudi število makrocitov in koncentracija topnega transferinskega receptorja, ki je posledica naraščajočega izražanja transferinskih receptorjev na membrani celic (6). Le-ti omogočajo prenos zadostne količine železa vezanega na transferin v celice (8).



Slika 2: Potek eritropoeze po principu negativne povratne zanke. Zmanjšana raven kisika v krvi pospeši nastajanje EPO v ledvicah. EPO z vezavo na eritropoetinski receptor BFU-E in CFU-E celic zavre apoptozo, pospeši proliferacijo in diferenciacijo celic eritrocitne vrste. Po nastanku retikulocitov se izboljša O₂ kapaciteta v krvi (prirejeno po (6)).

Odrasel človek ima povprečno pet litrov krvi, v kateri je $2,5 \times 10^{13}$ eritrocitov z življenjsko dobo okoli 120 dni. S spremembo 20–30 % izvornih celic v celice eritrocitne vrste vsakodnevno nastane okoli 2×10^{11} novih eritrocitov, ki pripomorejo k ohranjanju eritrocitnega ravnotežja (8). Pri zdravih ljudeh je za vzdrževanje dinamičnega ravnovesja eritrocitov v krvnem obtoku potrebna nizka koncentracija EPO. Bazalna koncentracija hormona v plazmi se med posamezniki močno razlikuje in se giblje od 6 do 32 IU/l (okoli 10^{-11} M) neodvisno od starosti in spola. Prav tako je bazalna koncentracija podvržena cirkadianemu ritmu z najnižjimi koncentracijami EPO v dopoldanskem času (2) in njenim porastom čez dan za 60 %, neodvisno od fizične aktivnosti preiskovancev. Opisana dnevna

nihanja lahko vplivajo na rezultate raziskav, kot je npr. vpliv treninga na koncentracijo EPO v krvi; v tem primeru vzorce krvi odvzamemo zjutraj v izogib lažno povišanim koncentracijam (9).

5.1.1 IZRAŽANJE ERITROPOETINA

Pri odraslih sta izražanje in sinteza EPO v ledvicah in deloma tudi v jetrih pogojena s tkivno hipoksijo. Vendar se nivo ekspresije glede na mesto nastanka razlikuje; tako v jetrih nastaja stopenjsko, medtem ko je v ledvicah sinteza regulirana po principu »vse ali nič« s tvorbo hormona v odvisnosti od kapacitete, koncentracije in afinitete O₂ v krvi (1).

V regulaciji ekspresije EPO-gena je eden izmed najpomembnejših transkripcijskih faktorjev hipoksija inducibilni faktor (HIF). HIF je heterodimer sestavljen iz α - in β -podenote (10). V citoplazmi celice najdemo tri α -podenote: HIF-1 α , HIF-2 α in HIF-3 α , medtem ko je β -podenota, ki je stalno prisotna v jedru, le ena: HIF-1 β (1). Izoforme HIF- α so z molekulsko maso 120 kDa težje od podenote HIF- β s težo 90–95 kDa (2). Najširše izraženo α -podenoto HIF-1 α najdemo v tubulnih in glomerulnih epitelnih celicah ishemičnih ledvic. Izomera HIF-2 α se nahaja v glomerulnih in endotelijskih celicah ter fibroblastih (11). HIF-2 α je primarni transkripcijski faktor za povečanje stopnje ekspresije EPO (2). Podenote HIF- α vsebujejo na C-terminalnem koncu od O₂ odvisne degradacijske domene (ODD), ki so hidroksilirane na prolinskem (Pro⁴⁰² in Pro⁵⁶⁴ pri HIF-1 α , Pro⁴⁰⁵ in Pro⁵³¹ pri HIF-2 α) (1, 2) in asparaginskem ostanku (Asn⁸⁰³) (12). ODD so udeležene v ubikvitinaciji in proteasomalni degradaciji (1, 2).

V stanju optimalne oksigenacije krvi je razpolovni čas podenot HIF- α zelo kratek, saj so podvržene neprestani uravnoveženi dinamiki njihove sinteze in hitre razgradnje. V hipoksičnih razmerah se proces razgradnje α -podenot zaustavi, slednje prehajajo v jedro in se povežejo s podenoto HIF-1 β v aktiven HIF-kompleks. Le-ta z vezavo na hipoksijo odzivne elemente (HRE) aktivira prepis tarčnih genov (11). HRE so transkripcijski faktorji vključeni v regulacijo procesov angiogeneze, vazomotorične kontrole, energijskega metabolizma, apoptoze in eritropoeze (1). Proces slednje je pospešen zaradi povečanega števila celic, ki proizvajajo EPO, ne zaradi povečane sinteze EPO na celico. V primeru hude anemije z izrazito nizko koncentracijo O₂ se raven hormona v serumu lahko zaradi hiperplazije celic poveča tudi do 1000-krat (10).

Po ponovni vzpostavitvi glede na tkivo ustrezne koncentracije kisika se v regulacijo podenot HIF- α vključijo encimi HIF-prolil hidroksilaze (HIF-PH-1, -2, -3) in faktor inhibicije HIF (FIH-1). Ti encimi hidroksilirajo α -podenote, kar vodi v ubikvitinacijo s strani proteina Von Hippel–Lindau (VHL) in posledično proteasomalno degradacijo podenot. Za svoje delovanje hidroksilirajoči proteini potrebujejo kofaktorje: O₂, železo in 2-oksoglutarat (10, 12).

5.1.2 ERITROPOETINSKI RECEPTOR (EPOR)

EPOR je član družine receptorjev za rastne faktorje in citokine (3). Največje število EPOR je med procesom eritropoeze izraženo na CFU-E in pronormoblastih, manjše število pa še na celicah BFU-E. Z vsako naslednjo stopnjo diferenciacije eritroidnih celic število receptorjev na površini postopoma upada do stanja popolne odsotnosti na ravni retikulocitov in zrelih eritrocitov (7).

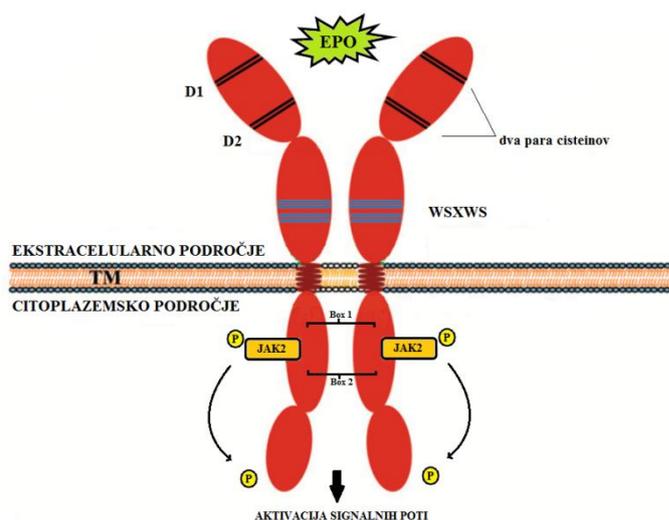
EPOR-gen so klonirali leta 1990. Zapis ima velikost 6 kb, leži na položaju 19p13,3–p13,2 in vsebuje 8 eksonov, ki kodirajo 508 aminokislin dolgo zaporedje prekursorja EPOR. Obstaja več različic genskega zapisa: gen za funkcionalni transmembranski protein, gen za nekodirajočo RNA in gen za topni EPOR. Mutacija genskega materiala v področjih zapisanih variant povzroči znižanje ali zvišanje ravni tvorbe eritrocitov, kar se klinično izraža kot različne oblike hematoloških obolenj (3, 13).

Po nastanku prekursorja receptorja poteče več posttranslacijskih modifikacij, kot so cepitev 24 aminokislin dolgega signalnega peptida, glikozilacija, fosforilacija in ubikvitinacija (1). Tako ima funkcionalna oblika EPOR molekulska masa 66–78 kDa (7) ter vsebuje 483 aminokislin, ki sestavljajo ekstracelularno, transmembransko in citoplazemsko področje. Ekstracelularno področje sestavljajo štiri cisteini (domeni D1 in D2) in WSXWS (triptofan-serin-x-triptofan-serin). Odgovorni so za pravilno zlaganje proteina, transport, internalizacijo receptorja ter za vezavo EPO. Po vezavi EPO na EPOR sta domeni D1 in D2 odgovorni za konformacijsko spremembo receptorja. Za pretvorbo signala v transmembranskem področju sta nadaljnje odgovorna dva levcina, ki hkrati sodelujeta pri tvorbi dimera. Citoplazemsko področje EPOR je razdeljeno na box1 in box2, regiji pomembni za interakcijo in aktivacijo Jak2, ter iz osmih fosforiliranih tirozinskih ostankov sestavljen distalni del, ki je mesto vezave za proteine s SH-domeno (Grb2, STAT5) (1, 13).

EPO se na dve identični podenoti EPOR homodimera veže z dvema neidentičnima vezavnima mestoma. Za vezavo EPO na EPOR sta odgovorni dve domeni: visoko afinitetna, ki vsebuje Arg¹⁵⁰, Gly¹⁵¹, Lys¹⁵² (kDa ≈ 1 nM), in nizko afinitetna, ki vsebuje Arg¹⁴, Arg¹⁰³, Ser¹⁰⁴ (kDa ≈ 2 μM) (1, 7, 13).

Vezavo EPO na EPOR pojasnjujeta dve znani teoriji, ki se bistveno razlikujeta glede na strukturno pretvorbo receptorja v dimer v odvisnosti od vezave hormona na ustrezno podenoto. Prva zagovarja tvorbo EPOR-dimera po vezavi, nasprotno druga utemeljuje obstoj dimera že pred zasedenostjo receptorja s hormonom (1, 13).

Vezava EPO na EPOR povzroči konformacijsko spremembo citoplazemskega področja. Pri tem se v procesu transfosforilacije aktivira kinaza Janus 2 (Jak2), ki fosforilira osem tirozinskih ostankov distalnega dela področja receptorja v citoplazmi (7). Posledica je aktivacija več signalnih poti: STAT, MAPK ali PI3K (Slika 3) (1, 13).



Po vezavi eritropoetina (EPO) na EPOR se spremeni konformacija dimera v citoplazmeskem področju, kar vodi v aktivacijo Janus kinaze 2 (JAK2) in v fosforilacijo tirozinskih ostankov, ki aktivirajo več signalnih poti (STAT, MAPK ali PI3K) (prirejeno po: (14)).

Slika 3: Eritropoetinski receptor (EPOR) in aktivacija signalnih poti

5.1.3 SIGNALNE POTI ERITROPOETINA

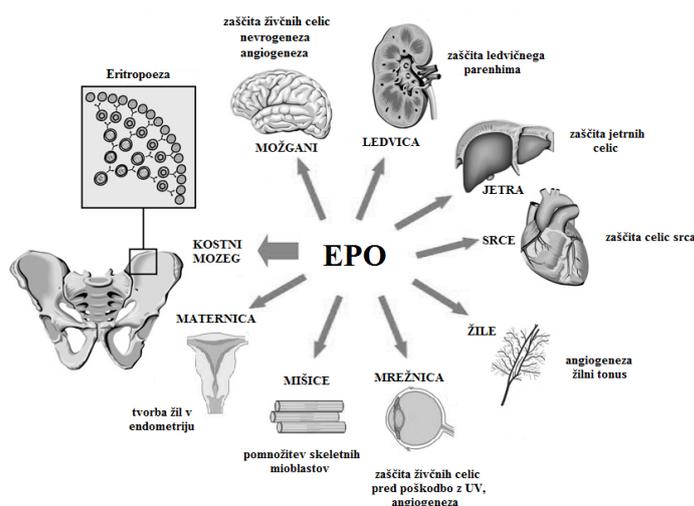
Po vezavi EPO na EPOR se sproži kaskada dogodkov. Po fosforilaciji tirozinskih ostankov encima Jak2 se na vezavna mesta za proteine s SH-domeno vežejo citosolne signalne molekule, kot so STAT5, PI3K, ter proteina Shc in Grb2, ki aktivirata MAPK-pot. Fosforilirani tirozinski ostanki in sam encim Jak2 prav tako aktivirajo več signalnih supresorjev, vključno s fosfatazami (SHP), kot so proteini tirozin fosfataze SHP-1, več zavornih in inhibitornih proteinov citokinskega signaliziranja (SOCS) in novo odkrite člane družine LNK-adaptor proteinov (13, 15).

Vloga signalnih poti EPO pri inhibiciji apoptoze, proliferaciji in diferenciaciji eritroidnih celic je le delno pojasnjena. Toda raziskave kažejo ključno vlogo funkcionalnega EPOR in njegovih signalnih molekul pri zagotavljanju ustreznega efektornega delovanja EPO (16). Slednje utemeljujejo z ugotovitvami, da celična proliferacija in inhibicija apoptoze nista zadostni v primeru le izolirane aktivacije posamezne EPOR-signalne poti.

Tudi z vidika citološkega delovanja imajo signalne poti različne vloge; v primeru delovanja Jak/STAT- in MAPK-poti naj bi bila spodbujena proliferacija eritrocitov, aktivacija vseh treh signalnih poti pa naj bi zagotavljala celično preživetje (17). Aktivacija EPOR se zaključuje z Jak2-defosforilacijo in internalizacijo kompleksa EPO/EPOR (16).

5.1.4 VLOGA ERITROPOETINA V OSTALIH TKIVIH

Čeprav je glavno mesto sinteze EPO v ledvicah, ga predvsem kot odgovor na presnovni stres lokalno sintetizirajo tudi številna tkiva v centralnem živčnem sistemu, gastrointestinalnem traktu, srcu, žilah, rodilih, pljučih in ostalih organih (Slika 4). V njih s svojo parakrino in avtokrino vlogo zavira apoptozo in aktivira številne zaščitne tkivne mehanizme, ki so pod vplivom presnovnega stresa (npr. zmanjšuje vnetje in lokalni edem). Pomembno vlogo ima tudi v razvoju in v odraslem organizmu s posredovanjem več trofičnih učinkov, ki vodijo v pospešeno celjenje in regeneracijo tkiva. Prav tako povečuje kognitivne sposobnosti pri zdravih in bolnih ljudeh (4, 18).



Slika 4: Vloga eritropoetina v tkivih. Poleg sinteze eritropoetina v ledvicah in jetrih nastaja eritropoetin tudi v številnih drugih tkivih (v srcu, žilah, centralnem živčnem sistemu, gastrointestinalnem traktu, rodilih, pljučih), kjer deluje antiapoptotično in/ali mitogeno (prirejeno po (16)).

5.1.5 REKOMBINANTNI ERITROPOETIN

Po uspešnem kloniranju gena EPO leta 1985 so začeli sintetizirati rekombinantni eritropoetin (rHuEPO). Zaradi njegovega stimulativnega delovanja na koncentracijo eritrocitov v krvi so ga vključili v terapijo pri bolnikih z anemijami, kroničnimi ledvičnimi boleznimi, rakavimi obolenji, okužbami s HIV, bolnikih pred operacijo in pri prezgodaj rojenih otrocih (19-21). Pred tem je bilo zdravljenje naštetih bolnikov omejeno le na androgeno terapijo in ponavljajoče se transfuzije z nevarnostjo infekcij ter hemokromatoze (19).

Uporaba rHuEPO ni omejena le na bolnike, temveč jo zasledimo tudi pri športnikih. rHuEPO z indukcijo eritropoeze poveča dotok O₂ v tkiva, posledično se poveča vzdržljivost športnika, zato je Mednarodni olimpijski komite (IOC) njegovo uporabo v športne namene leta 1990 prepovedal (doping) (4, 22, 23).

rHuEPO pridobivajo z vključitvijo cDNA v genom celičnih linij. Ponavadi so to CHO- ali BHK-celice. S CHO-celičnimi linijami pridobivajo epoetin α , β , ζ ter darbepoetin α – NESP, z BHK-celičnimi linijami pa se pridobiva epoetin ω . S CHO- in z BHK-celičnimi linijami se v strukturi EPO pravilno tvorijo disulfidne vezi in vežejo sladkorne verige, s čimer zagotovimo biološko aktivnost EPO. rHuEPO se od endogenega EPO razlikuje le na nivoju glikozilacije, saj je aminokislinsko zaporedje pri obeh enako. Ravno spremembe na nivoju glikozilacije so vodile v razvoj dolgodelujočih rHuEPO, med katere spadata darbepoetin α in CERA (1, 4, 24).

Darbepoetin α oziroma NESP je oblika epoetina α z daljšo razpolovno dobo glede na preostale epoetine (z izjemo CERA). Daljši serumski razpolovni čas, povečano biološko aktivnost in zmanjšano afiniteto do EPOR so dosegli z zamenjavo petih aminokislin, ki omogočajo vezavo dveh dodatnih N-glikoziliranih verig na mestih N30 in N88. Za razliko od preostalih rHuEPO ima darbepoetin α večjo molsko maso (37,1 kDa namesto 30,4 kDa), večjo vsebnost sialičnih kislin (22 namesto 14 sialičnih kislin) in večji negativni naboj. Daljša prisotnost darbepoetina α v krvi je pomembna zaradi frekvence aplikacije zdravila; medtem ko se preostale epoetine (razen CERA) aplicira 3-krat tedensko, se darbepoetin aplicira le 1-krat/1–2 tedna (4, 19, 24).

CERA je nova oblika epoetina β , ki prav tako spada med dolgodelujoče rHuEPO. Podaljšan razpolovni čas so dosegli z vezavo polidisperznih polimerov s t. i. metoksi

polietilnim glikolnim polimerom (PEG). Ta se s pomočjo sukcinimidil butanojske kisline veže na N-terminalno aminokislino in aminoskupino lizina 52 in lizina 45 (19, 24, 25). Zaradi vezave PEG znaša molekulska masa CERA-e okoli 60 kDa. Poleg podaljšane razpolovne dobe v telesu (okoli 130 ur po subkutani ali intravenozni aplikaciji) se poveča tudi eritropoezna aktivnost. Vzrok naj bi bil v počasnejši vezavi CERA-e na EPOR in hitrejši sprostitvi iz njega, kar naj bi vodilo v večje število ponovitev (vezava CERA-e, stimulacija, sprostitvev CERA-e) (19, 24).

5.1.5.1 OSTALA SREDSTVA ZA STIMULACIJO ERITROPOEZE

Poleg endogenega EPO in različnih oblik rHuEPO spadajo med sredstva za stimulacijo eritropoeze tudi hiperglikozilirani analog EPO, darbepoetin alfa (AMG 114), sintetični eritropoezni protein (SEP), fuzijski proteini rHuEPO (Epo-Epo, Epo-Fc, Epo- β HCG), peptidni mimetiki EPO (Hematide), aktivatorji in prenašalci gena EPO. Med aktivatorje gena EPO uvrščamo GATA-inhibitorje (povečajo acetilacijo GATA-2 in izboljšajo DNA-vezavo HIF-enot) in HIF-stabilizatorje. V skupino HIF-stabilizatorjev uvrščamo kelator deferoksamin, kobaltov klorid, inhibitorje prolil hidroksilaz (FG-2216, FG-4592). Večina izmed njih je še v fazi predkliničnih raziskav (4, 6, 25, 26).

5.2 VPLIV NADMORSKE VIŠINE IN TELESNE AKTIVNOSTI NA ERITROPOETIN IN KRVNE PARAMETRE

Pri nizki stopnji telesne aktivnosti (npr. sedenje brez govorjenja, počasna hoja) opazimo zelo majhen prilagoditveni odziv telesa. Z zvišanjem stopnje telesne aktivnosti in s povečanjem frekvence, trajanja in intenzitete vadbe prilagoditveni odziv sorazmerno narašča, kar se klinično kaže v večji zmogljivosti športnika ter povišanju fizioloških parametrov (zvišana maksimalna aerobna moč, izboljšana vzdržljivost, razširjena anaerobna kapaciteta). V določeni točki nadaljnjo stopnjevanje telesnih aktivnosti ne vodi nujno k večjemu prilagoditvenemu odzivu organizma, lahko pa pripomore k pojavu neželenih učinkov izžetosti, preobremenitve in pretreniranosti (27).

Pri enkratni naporni fizični aktivnosti, kot so tek na smučeh, biatlon in kolesarjenje, na nižini niso opazili vpliva športa na koncentracije EPO v plazmi. Izjemo predstavlja le tek na dolge proge, kjer je bila koncentracija hormona v plazmi nekaj ur po naporni vadbi rahlo povišana (6, 28). Med normoksično vadbo je možno pomanjkanje večjih učinkov proizvodnje EPO, saj se kisikovi sensorji nahajajo v ledvicah in ne v obremenjenih organih, kot so skeletne mišice in srce. Na izražanje EPO pa verjetno pomembno vpliva zmanjšan pretok krvi skozi ledvice (6). Ta trditev je podprta z ugotovitvijo, da zaradi hipoksije v ledvicah med fizično aktivnostjo narastejo vrednosti encimov γ -GT, N-acetil-fl-glukozaminidaze v urinu, ki kažejo na poškodbe celičnih membran in lizocimov proksimalnih in tubularnih celic v ledvicah (28).

Navkljub nespremenjeni koncentraciji EPO v plazmi med fizično aktivnostjo v normoksičnih pogojih pa lahko po 1–2 dneh naraste število retikulocitov. Sprememba retikulocitne koncentracije je najverjetneje posledica sproščanja stresnih hormonov kateholaminov (adrenalin, noradrenalin) in kortizola, ki spodbujajo sproščanje novih rdečih krvničk iz kostnega mozga (6).

Trening v normoksičnih pogojih vpliva tudi na celokupno maso hemoglobina (Hb) in hematokrit (Hct). Sprememba celokupne mase Hb za 1 g povzroči zvišanje ali znižanje VO_2 max za približno 4 ml/min (29). Normalne vrednosti Hct med počitkom so pri zdravih moških 40–45 % in pri zdravih ženskah 37–42 %. Optimalni Hct se pojavi, ko sta vsebnost O_2 v arterijski krvi (CaO_2) in minutni volumen srca skupno največja. Med vadbo lahko vrednost Hct naraste, kar je primarno povzročeno predvsem s prehodnim premikom tekočine iz intravaskularnega v ekstravaskularni prostor sočasno s povečanim pretokom

krvi, prekrvavljenostjo kapilar in s povečano filtracijo tako kožnih kot mišičnih kapilarnih prepletov. K hemokoncentraciji nekoliko prispevajo tudi eritrociti zaradi adrenergično stimulirane vranice ter izguba tekočine z znojem med dolgotrajnejšo telovadbo. Hemokoncentracija povzročena s telovadbo je sicer majhna, vendar signifikantna z zvišanjem Hct za približno 4–6 % (vrednost Hct pri moških 45–50 % in ženskah 42–47 %) in izboljšanima Hb in nosilno zmogljivostjo kisika za približno 10 % (30). Lahko se tudi zgodi, da je koncentracija Hb in Hct pri športnikih nižja od pričakovane (psevdoanemija), kar je praviloma posledica povečanega volumna plazme (6).

5.2.1 AKUTNA PRILAGODITEV NA VIŠJO NADMORSKO VIŠINO

Z vzponom na višjo nadmorsko višino zračni tlak pada. Pri tem se parcialni O_2 v vdihanem zraku zniža, posledično se znižata tudi pO_2 in nasičenost krvi. Nastalo stanje zaznajo periferni receptorji, ki spodbudijo hiperventilacijo (hitrejše in/ali globlje dihanje) in aktivacijo simpatičnega živčnega sistema. Pri zvišani frekvenci dihanja se do neke mere zviša alveolarni pO_2 , kar povzroči zvišanje arterijskega pO_2 in nasičenosti krvi, z aktivacijo simpatika pa se zviša srčni utrip, ki nadomesti manjšo vsebnost O_2 v prečrpani krvi glede na utrip. Vendar ti dve prilagoditvi ne moreta popolnoma preprečiti z nadmorsko višino omejenega transporta kisika in posledično zmanjšanja VO_2 max (31).

Pri telesnih aktivnostih s porabo kisika blizu maksimalnih vrednosti se na višini poveča frekvenca ventilacije in bitja srca v primerjavi z aktivnostmi na nižini. Arterijski krvni tlak ostane bolj ali manj konstanten, navkljub aktivaciji simpatika, ki bi ga lahko zvišal. Nespremenjena vrednost tlaka je posledica s hipoksijo povzročene periferne vazodilatacije (31).

5.2.2 AKLIMATIZACIJA NA VIŠJO NADMORSKO VIŠINO

Kronična izpostavljenost nižjim vrednostim parcialnega tlaka kisika na višjih nadmorskih višinah spodbudi proces aklimatizacije s številnimi fiziološkimi prilagoditvami. V nekaj dneh se izboljša transport kisika do tkiv. Razlog za izboljšanje sta nadaljnja rast ventilacije, t. i. ventilacijska aklimatizacija, ter zmanjšan volumen plazme zaradi diureze. Ventilacijska aklimatizacija se v prvih 1–2 tednih bivanja na višini nenehno izboljšuje in vzdržuje (glede na potrebe tkiv) (31). Kot posledica respiratornih prilagoditev se v telesu razvije

respiratorna alkalozna, ki jo ledvice kompenzirajo z izločanjem presežka HCO_3^- -ionov in posledično večjo diurezo. Nastali zmanjšani volumen plazme vpliva na prehodno povišanje koncentracije Hb v začetnih dneh in na učinkovitost treninga. V primeru dolgotrajne aklimatizacije (2–3 tedne) se zaradi pospešene eritropoeze s porastom na novo nastalih rdečih krvničk ponovno povečata koncentracija Hb in volumen krvi (31, 32). Ti mehanizmi aklimatizacije zvišajo transport O_2 na enoto prostornine krvi in posledično izboljšajo delovanje posameznika v območju njegovih maksimalnih vrednosti. Tako človeku omogočijo izvajanje enakih vsakodnevnih in športnih aktivnosti z nižjimi srčnimi frekvencami, manjšo stopnjo zadihanosti in občutkom navora v primerjavi z dejavnostmi izvajajočimi v akutni fazi bivanja na visokih nadmorskih višinah (31).

Pri bivanju okoli dva meseca na višini okoli 5000 m se pri posameznikih pojavijo še spremembe v sami strukturi skeletnih mišic z zmanjšanim volumnom mišic in manjšo oksidativno kapaciteto mišičnih vlaken. Opazna sta tudi izguba mitohondrijev in ohranjen kapilarni preplet, zaradi katerega se stanje oskrbe za preostale mitohondrije izboljša (33).

Pri nadmorskih višinah preko 4000 m adaptacijski procesi zaradi spremembe v prerazporeditvi krvi ne morejo izboljšati $\text{VO}_2 \text{ max}$, saj se ob odsotnosti povečevanja minutnega volumna srca kri iz mišic porazdeli po vitalnih organih in kompenzira metabolne potrebe tkiv pri nižjih koncentracijah kisika. Pri daljšem bivanju na višjih nadmorskih višinah poraste tudi krvni tlak zaradi naraščajoče simpatične aktivacije (pri višini 4500 m arterijski tlak naraste za 10 mmHg) (31).

5.2.2.1 NEGATIVNI VPLIVI VZPONA BREZ AKLIMATIZACIJE

Vse več smučarjev, pohodnikov in alpinistov za rekreacijo dosega višine od 2500 m do 8000 m, zato so nenadni vzponi brez koristne aklimatizacije vse bolj pogosti (Tabela I). Hitra sprememba višine lahko vodi v razvoj višinskih bolezni. Višinske bolezni so niz sindromov, običajno razdeljenih v štiri kategorije: akutna gorska bolezen, višinski cerebralni edem, višinski pljučni edem in kronična gorska bolezen.

Akutna gorska bolezen in višinski cerebralni edem navadno prizadene ljudi, ki se hitro povzpnejo na višino nad 2500 m. Glavni simptomi akutne gorske bolezni so: glavobol, prebavne motnje, omotica, utrujenost in nespečnost (34). Ponavadi se pojavijo 4–8 ur po izpostavljenosti hipoksiji in izginejo po 3–4 dneh (35). V večini primerov so simptomi

blagi, pri nekaterih ljudeh pa se tekočina nabere v možganih, kar povzroči nevaren višinski cerebralni edem z značilnima simptomoma ataksijo in zmanjšano stopnjo zavesti.

Višinski pljučni edem se navadno pojavi drugo noč na višji nadmorski višini. Prepoznamo ga po začetni utrujenosti, dispneji, kašlju in cianozi. Nezdravljena bolezen lahko privede do življenjsko ogrožajočega stanja. Najboljša preventiva za višinski cerebralni in pljučni edem sta postopni vzpon (manj kot 400 m višinskega vzpona dve zaporedni noči) in omejitev treninga v prvih treh dneh (35).

Kronična gorska bolezen je pogost zdravstveni problem prebivalcev višinskega sveta. Za bolezen je značilna huda kronična hipoksemija, ki vodi v prekomerno eritrocitozo (ženske, Hb 19 g/dl⁻¹; moški, Hb 21 g/dl⁻¹), cianozo in pljučno hipertenzijo (34). Bolezen srečamo tudi pri športnikih z dolgotrajnim treningom na višjih nadmorskih višinah, pri katerih se zaradi zvišanja oksiformne kapacitete krvi s povišanim Hct poveča tudi viskoznost krvi (6).

Tabela I: Opredelitev različnih ravni nadmorske višine (povzeto po (35))

VIŠINSKI RAZPON	DEFINICIJA	UČINEK
0–500 m	bližina morja	ni učinka na počutje in zmogljivost
500–2000 m	nizka nadmorska višina	ni učinka na počutje, možen učinek na zmogljivost, predvsem pri zelo treniranih atletih
2000–3000 m	zmerna nadmorska višina	možen pojav akutne gorske bolezni pri neaklimatiziranih ljudeh, značilno zmanjšanje aerobne zmogljivosti
3000–5500 m	visoka nadmorska višina	pogosta akutna gorska bolezen, možna pljučni ali cerebralni edem, aerobna zmogljivost je resno zmanjšana, tudi po aklimatizaciji
nad 5500 m	ekstremna nadmorska višina	resno tveganje za zdravje, nezmožnost stalnega bivanja, resne spremembe fizične in duševne zmogljivosti

5.2.3 ŽIVLJENJE NA VIŠJI NADMORSKI VIŠINI

Za ustrezno delovanje mitohondrijev v celicah je potrebna nemotena oskrba s kisikom, ki je ogrožena pri dolgotrajnem bivanju na višji nadmorski višini. Za ohranitev primerne ravni kisika v tkivih je ključna prilagoditev transporta kisika. Primer uspešne prilagoditve so avtohtoni prebivalci Andov, Tibeta in Etiopije, ki so razvili genetske prilagoditve skozi tisočletja bivanja v hipoksičnem okolju (36). Dolgo sta se med znake prilagoditve kronični hipoksiji (> 3 mesece) štela povečana Hct in koncentracija Hb, vendar je primerjava avtohtonega prebivalstva Andov, Tibeta in Etiopije, živečega na višinah okoli 3500 m–4000 m ovrgla te trditve (37, 38). Medtem ko je bila koncentracija Hb pri domačinih iz Andov znatno zvišana ob nizki saturaciji kisika, je koncentracija Hb pri Etiopijcih in Tibetancih kazala malo ali nič zvišanja glede na vrednosti blizu morja. Pri nadmorski višini nad 4000 m se je povečala koncentracija Hb tudi Tibetancem in dosegla najvišjo vrednost pri bivanju okoli 5000 m. Pri primerjavi so opazili tudi razlike v nasičenosti krvi s kisikom. Vrednost vzorca prebivalca Andov je bila za 2,6 % višja od vrednosti vzorca Tibetanca glede na isto nadmorsko višino (3900 m), medtem ko je vzorec Etiopijca, živečega na 3530 m, kazal karakteristike podobne vrednostim blizu morja (36). Razlog za razlike med prebivalci Andov in Tibeta naj bi bil v mnogo daljši adaptaciji Tibetancev (50000 let) glede na prebivalce Andov (9000–12000 let). V obdobju 50000 let so Tibetanci doživeli naravno selekcijo, ki je preprečila preživetje in razmnoževanje oseb z visokimi koncentracijami Hb, medtem ko Andska skupnost še ni uspela doseči enake ravni prilagoditve, zato zaradi večje viskoznosti krvi pogosteje oboleva za srčno-žilnimi boleznimi in tromboemboličnimi zapleti. Glede na nasičenost krvi s kisikom pri Etiopijcih pa je najverjetneje, da je naravna selekcija privedla do boljše dostave O₂ v obtok in afinitete Hb do O₂ (39).

5.2.4 VPLIV VIŠINSKE AKTIVNOSTI NA ERITROPOETIN IN KRVNE PARAMETRE

Že več kot štiri desetletja tekmovalci v vzdržljivostnih športih (npr. kolesarjenje, biatlon) trenirajo na višjih nadmorskih višinah z namenom doseganja boljših rezultatov (40, 41). Pri treningu na višje ležečih področjih se zaradi nastanka hipoksije stimulira eritropoeza, ki ugodno vpliva na športnikovo pripravljenost (40). Najvišje vrednosti koncentracije EPO v plazmi so dosežene 1–2 dni po vzponu na višjo nadmorsko višino (6). Koncentracija EPO

poraste za 30 % na višini 1900 m oziroma za 300 % na višini 4500 m, glede na vrednosti blizu morja (39). V primeru nadaljnje aklimatizacije ostane eritropoeza stimulirana, navkljub le rahlemu naraščanju ali celo upadu koncentracije EPO (6, 42).

V nasprotju s povišano koncentracijo EPO se v študiji, kjer so spremljali športnike plavalce, masa Hb v prvem tednu na višini 2320 m ni povečala, kar je najverjetneje posledica 5- do 7-dnevnega zorenja prekursorjev rdečih krvnih celic v kostnem mozgu. Po 13 dneh bivanja na višini se je masa Hb povečala za približno 5 %, po 3–4 tednih pa za približno 7,2 %. Po vrnitvi iz višine je koncentracija Hb v nekaj dneh nekoliko upadla, kar je vsaj deloma posledica širitve volumna plazme, deloma pa bi znižanje mase Hb pričakovali tudi zaradi znižane koncentracije serumskega EPO, ki lahko privede do neocitolitskih procesov. Nadaljnjih 10 dni se je zvišan plato mase Hb vzdrževal, po treh tednih pa je pridobljena masa Hb znašala le še okoli 50 % ter se po petih tednih vrnila na izhodiščno vrednost (29).

V raziskavi, kjer so športniki štiri tedne trenirali na višini 2270 m, so dva dni po vrnitvi opazili povečanje Hct za 7,2 %. V drugi raziskavi, kjer so športniki samo 14 dni preživeli na nadmorski višini 2340 m, pa se je Hct povečal celo za 10,4 %. Pri obeh raziskavah so opazili tudi izboljšano zmogljivost športnikov (30). Velik porast koncentracije Hb in hematokrita so opazili tudi v raziskavi, kjer so spremljali alpiniste, namenjene na Cho Oyu (8201 m), med 15-dnevnim vzpenjanjem od Katmanduja (1530 m) do baznega tabora (okoli 5700 m) (39).

5.2.4.1 VPLIV DEJAVNIKOV NA ZMOGLJIVOST ŠPORTNIKA

Navkljub naraščanju eritropoeze z izpostavljanjem vse ostrejšim hipoksičnim pogojem pa so ugotovili, da so za doseg optimalne zmogljivosti športnika ključni naslednji faktorji:

- *Optimalna nadmorska višina*

Na plazemske koncentracije EPO vpliva izbira prave nadmorske višine za življenje športnikov. Kljub ugotovitvi da je izločanje EPO sorazmerno s stopnjo hipoksičnega stresa, bivanje na zelo visokih nadmorskih višinah ni nujno boljše z vidika optimalne pripravljenosti športnika (41). Uspešnost vadbe se linearno zmanjšuje od približno 300 m do 3000 m nadmorske višine s povprečnim zmanjšanjem VO_2 max za 6,4 % na vsakih 750 m. Izguba telesne zmogljivosti se še stopnjuje pri nadmorskih višinah višjih od 3000 m

(30). V raziskavi vpliva višine na uspešnost športnika so se udeleženi tekači na dolge proge po štirih tednih preživelih na različnih nadmorskih višinah pomerili v teku na 3000 m na nadmorskih višini z vrednostjo blizu morske gladine. Športniki, ki so prebivali na 2805 m (s treningi na nižji nadmorski višini), so kljub rahlo višji stopnji eritropoeze pri tekmovanju pokazali manjša izboljšanja (1,4-% izboljšanje) v primerjavi s tekači, ki so živeli na višini 2454 m (2,7-% izboljšanje) ali 2085 m (2,8-% izboljšanje) (27, 41). Minimalna meja za optimalno nadmorsko višino pri večini ljudi predstavlja 2000 m, čeprav se na določeni višini odgovi na eritropoezo med posamezniki zelo razlikujejo. Predlagana optimalna nadmorska višina za bivanje je med 2000 m in 2500 m; pri nadmorskih višinah nižjih od 2000 m pride do neustreznega odziva eritropoeze, medtem ko se pri višinah nad 2500 m lahko pojavijo tveganja za športnikov organizem vezana na procese aklimatizacije (npr. prekomerna ventilacijska aklimatizacija ali mišična atrofija) (27, 41).

- Dolžina bivanja na višji nadmorski višini

Priporočeno minimalno bivanje športnika na ustrezni višji nadmorski višini je 3–4 tedne. Že pri izpostavitvah višini krajši od treh tednov so opazili precejšnje povišanje števila rdečih krvnih teles. Dodatni teden bivanja pa je povzročil skorajšnje podvojitve števila rdečih krvnih teles (27, 40, 41).

- Čas dnevne izpostavljenosti hipoksičnim razmeram

Na podlagi do sedaj zbranih podatkov optimalni čas izpostavljenosti hipoksičnim razmeram za doseg ugodnih učinkov eritropoeze na športnikovo uspešnost predstavlja minimalno 12 ur dnevno (27).

Poleg primerne nadmorske višine, dolžine bivanja in časa dnevne izpostavljenosti hipoksičnim pogojem vplivajo na telesno pripravljenost pri bivanju na višini tudi naslednji dejavniki:

- različne nadmorske višine treniranja in spanja: na kvaliteto treninga na višini vplivata zmanjšan transport in privzem O₂ v delujočih mišicah ter manjša hitrost treninga (41). Z uveljavitvijo modela spanja na višini – treniranja na nižini, ki nadomešča klasični model spanja in treniranja na višini, se izboljšuje ravnovesje

med pozitivnimi učinki aklimatizacije in negativnimi učinki hipoksičnega treninga (41, 43),

- pomanjkanje železa: preprečuje povečanje števila rdečih krvnih teles,
- sočasna infekcija: lahko uravnava odziv telesa na hipoksijo zaradi nastanka citokinov, ki usmerjajo kostni mozeg v tvorbo belih krvničk s sočasno inhibicijo sinteze EPO,
- akutne travmatske poškodbe: zmanjšujejo stimulus za trening in povzročijo nastanek inhibitornih vnetnih citokinov – pri tem je potrebno pozornost nameniti primerni intenzivnosti treninga, ustrezni treniranju na višini,
- neustrezen vnos tekočine: povečuje dehidracijo, ki se zaradi večjih izgub vode preko ledvic, dihalnega trakta in kože pri bivanju na višini še pogloblja,
- neustrezen vnos prehranskih ogljikovih hidratov in proteinov: vnos prehranskih ogljikovih hidratov in proteinov je pomemben za obnovitev zalog glikogena in regeneracijo tkiv (44).

5.3 DETEKCIJA ERITROPOETINA IN IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

Zaradi pomembne vloge pri stimulaciji eritropoeze je EPO potencialni ojačevalec športnikove pripravljenosti v vzdržljivostnih športih. Po pojavu rHuEPO na tržišču se je zaradi njegove potencialne dopinške zlorabe pojavila potreba po ustrezni detekciji. Čeprav je rHuEPO mednarodni olimpijski komite (IOC) prepovedal že leta 1990, v tistem času detekcijska metoda še ni bila poznana (45). Analiza hematoloških in biokemičnih parametrov je sicer pokazala stimulacijo eritropoeze, vendar ni mogla potrditi, da je za stimulacijo kriva uporaba rHuEPO (22). Zaznava rHuEPO je postala možna šele leta 2000, ko je dr. Françoise Lasne razvila izoelektrično fokusiranje (IEF) v kombinaciji z dvojnimi prenosom.

IEF z dvojnimi prenosom temelji na diferenciaciji izoelektričnih izoform endogenega in rekombinantnega EPO v urinu in krvi. Zaradi razlik v glikozilaciji se izoforme v pH-gradientu različno gibljejo, njihov položaj na gelu pa določa pI (46). pI je pH, pri katerem je vrednost neto naboja molekule enaka 0. Na gelu so izoforme razporejene v obliki pasu. Profil izoform sestavlja več parametrov: pas, število izoform, pozicija v pH-gradientu in jakost signala. Razlike v profilu izoform nakazujejo na različne vrste izoform z raznolikimi strukturnimi lastnostmi. Večja kot je koncentracija določene izoforme v vzorcu, večja je jakost signala. Ločevanje EPO-izoform poteka pri gradientu pH 8–2, kjer se izoforme razporedijo glede na pI: manj glikozilirane imajo pI v bazičnem območju (epoetini), bolj glikozilirane pa v kislem območju (NESP). V primerjavi z ostalimi rHuEPO ima endogeni EPO večjo gostoto in večje število izoform (24). Večinoma ga sestavljajo kisle izoforme, ki so ob prisotnosti rHuEPO pri analizi z IEF odsotne (45, 47).

Metoda IEF se ne uporablja le kot del antidopinške kontrole, temveč je primerna tudi pri odkrivanju pomembnih razlik v izoelektričnih izoformah endogenega EPO v medsebojni primerjavi različnih vzorcev urina in seruma. Večina vzorcev urina ima značilne kisle izoforme, pri nekaterih pa je opazen premik izoform v smeri bazične pI. Premik izoform opazimo pri urinskih vzorcih športnikov zaradi proteinurije, ki je posledica intenzivnega treninga. Proteinurija se najverjetneje pojavi zaradi povečane glomerulne permeabilnosti in zmanjšane reabsorpcije v proksimalnih tubulih. Medtem ko intenzivni trening vpliva na izoforme v urinu, se izoforme v serumu ne spremenijo. Razlika med izoformami urina in seruma, opazna v mirovanju, se po intenzivnem treningu zmanjša zaradi premika urinskih

izoforn proti bazičnem področju kot posledica spremenjene absorpcije glomerulno filtriranega EPO v proksimalnih tubulnih celicah. Na prepoznavo in vezavo nizkomolekularnih proteinov (kot je hormon EPO) na membrano tubulnih celic močno vpliva električni naboj proteinov. Stopnja vezave na opisano membrano narašča s pI. Tako se izoforme bazičnega področja serumskega EPO po glomerulni filtraciji prednostno odstranijo iz urina preko membrane tubulnih celic, medtem ko kisle izoforme ostanejo v urinu. V primeru zasičenosti tubulne reabsorpcije, kar se dogodi po napornem treningu, se bazične izofome ne morejo več ustrezno odstranjevati in z vidika sestave izoform urin postane enak serumu (45, 46).

Poleg IEF v povezavi z dvojnimi prenosom se za karakterizacijo EPO uporabljajo tudi metode: kapilarna elektroforeza, dvodimenzionalna elektroforeza (2D), MAIIA (Membrane Assisted Isoform Immuno Assay) in druge. Za razliko od 1D IEF v kombinaciji z dvojnimi prenosom se pri uporabi 2D-metode pojavijo interference drugih proteinov, ki se prekrivajo s pI rHuEPO. Pri MAIIA-metodi, ki spada med ultra občutljive metode, pa analiza posameznih izoform EPO ni možna (46).

Eritropoetin (EPO) je endogeni hormon, pomemben pri uravnavanju poznejših faz tvorbe rdečih krvničk v procesu eritropoeze. Pri pomanjkanju kisika v tkivih (tkivna hipoksija) se v ledvicah sintetizira EPO, ki se po posttranslacijskih modifikacijah sprosti v krvni obtok. V krvi in urinu se hormon nahaja v obliki izoform z različnim nivojem glikozilacije.

Pri bivanju in intenzivnem treningu na visokih nadmorskih višinah pride zaradi izpostavljenosti hipoksiji do stimulacije eritropoeze, kar se odraža v povišani količini EPO, številu eritrocitov, koncentraciji Hb in Hct. Prav tako intenziven trening v visokogorju vodi v začasno proteinurijo, ki vpliva na izločanje EPO v ledvicah in njegov profil izoform v urinu. Vpliv intenzivnosti treninga in višine na nivo EPO-izoform še ni natančno raziskan.

Namen diplomske naloge je analiza vpliva višinske odprave na količine endogenega EPO med odpravo, izoformnega profila endogenega hormona v urinu ter krvnih parametrov. Analizirali bomo urin in kri alpinistov, ki so 18–22 dni bivali in trenirali na nadmorski višini nad 2130 m. Po predhodnem koncentriranju vzorcev urina bomo z radioimunološkim testom (RIA) določili celokupno količino EPO v krvi in urinu. Z metodo izoelektričnega fokusiranja (IEF) v povezavi z dvojnimi prenosom bomo med seboj ločili EPO-izoforme v urinu. S pomočjo statistične obdelave bomo ovrednotili vpliv višinskega treninga na koncentracije EPO, krvne parametre ter analizirali spremembe v zastopanosti različnih EPO-izoform v elektroferogramih z uporabo programske opreme GasEpo.

7 MATERIALI IN METODE

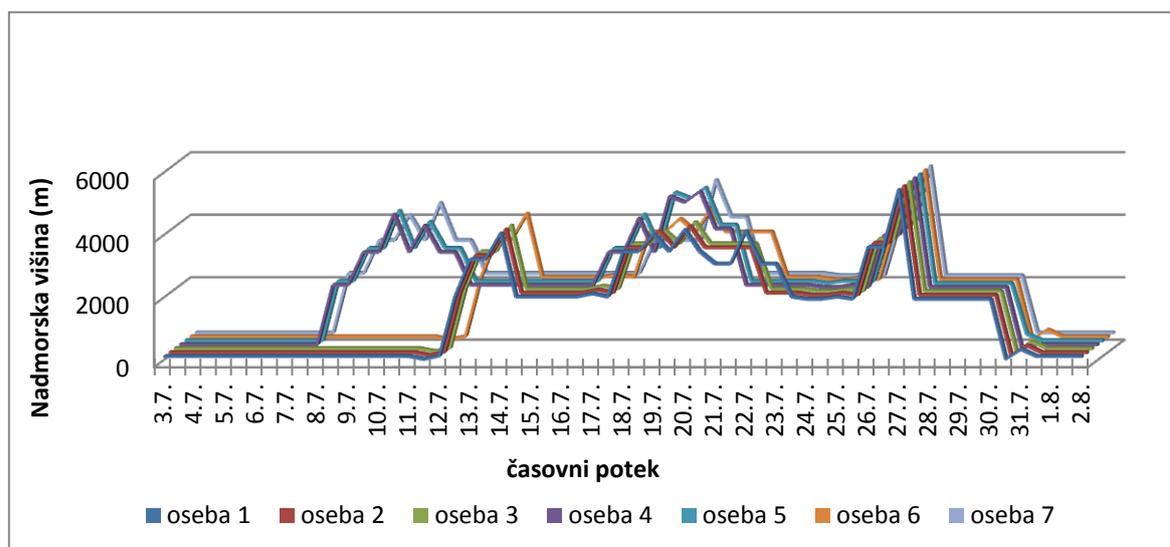
7.1 PREISKOVANCI

Za analizo vpliva višinskega treninga na EPO in krvne parametre smo uporabili kri in urin 7 alpinistov, starih od 23 do 37 let ($29 \pm 4,8$ let), od tega 3 ženske ($32,3 \pm 5,03$ let) in 4 moški ($26,5 \pm 3,11$ let), ki so 18–22 dni bivali in plezali na nadmorski višini od 2130 m do 5642 m.

Odvzete vzorce je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka dokumenta 39/8/07). Vsi preiskovanci so podpisali privolitev v sodelovanje v molekularno biološki raziskavi o vplivu nadmorske višine na sintezo EPO. Z vzorci preiskovancev smo rokovali kot s potencialno kužnimi. Pri laboratorijskem delu smo se držali načel dobre laboratorijske prakse.

7.2 ZBIRANJE VZORCEV

Alpinistom so bili pred odhodom in tri dni po vrnitvi odvzeti vzorci urina (50 ml) in krvi, ki so služili kot kontrolna vrednost. Med bivanjem na višini so alpinisti pisali dnevnik višinskega treninga (Graf 1) ter zbirali vzorec urina (50 ml) (Tabela II).



Graf 1: Dosežene nadmorske višine. Na grafu so predstavljeni profili gibanja 7 alpinistov od začetnega do končnega kontrolnega odvzema vzorcev krvi in urina.

Tabela II: Datumi in nadmorske višine odvzemov vzorca urina (50 ml)

	U0-pred	U1	U2	U3	U4	U5-po
odvzem oseba	odvzem 1/ 2.7.2007	odvzem 2/ 13.7.2007	odvzem 3/ 16.7.2007	odvzem 4/ 23.7.2007	odvzem 5/ 30.7.2007	odvzem 6/ 2.8.2007
1	9.7./295m	/	16.7./2200m	24.7./2130m	30.7./2130m	2.8./295m
2	295 m	/	15.7./2200m	23.7./2200m	30.7./2130m	2.8./295m
3	9.7./295 m	/	16.7./2200m	23.7./2200m	28.,30.7./2130m	2.8./295m
4	295 m	13.7./2200m	17.7./3252m	24.7./2130m	30.7./2130m	2.8./295m
5	295 m	13.7./2200m	17.7./3252m	24.7./2130m	30.7./2130m	2.8./295m
6	295 m	/	16.7./2200m	23.7./2200m	28.7./2130m	2.8./295m
7	295 m	13.7./2200m	18.7./3252m	/	30.7./2130m	2.8./295m

LEGENDA: / ni zbranega vzorca urina

Plazma, v obliki 250 µl alikvotov, in urin sta bila zamrznjena na -70 °C do analize. Z odvzeto krvjo smo naredili krvno preiskavo (hemogram).

7.3 MATERIALI IN APARATURE

Materiali, uporabljeni v raziskavi, niso smeli priti v stik z detergentom, saj bi le-ta denaturiral EPO. V primeru že uporabljenih materialov, ki so bili oprani z detergentom, smo le-te očistili z 0,1-M raztopino NaOH in štirikrat spirali z bidestilirano vodo. S pH-metrom smo preverili pH vode v steklenicah zaradi možne kontaminacije z NaOH (pH = 7).

UPORABLJENI MATERIALI:

- centrifugirke (50 ml, 15 ml)
- epice (1,5 ml)
- škatle za shrambo epic
- stojala za centrifugirke in epice
- steklene pipete 25 ml
- mehanske pipete
- nastavki za mehanske pipete
- magnetno mešalo
- spatula
- centrifugalni filter z ultracel-30k membrano (Amicon[®] Ultra, Millipore): 50 ml in 0,5 ml
- 0,22µm sterilni vakuumsko filtracijski sistem (Steriflip[®] Filter, Millipore)
- vrečka za shranitev gela

- erlenmajerica in zamašek
- 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)
- plastična podpora (Gel-Fix[®] for PAG, Serva)
- distančniki
- valjček
- zatiči za držanje kalupa
- rokavice
- škarje
- vpojni papir
- elektrodni trakovi (Electrofocusing strips, GE Healthcare)
- reagenčni koriti
- čaša
- plovci za epice
- termometer
- filter papirčki (Biorad)
- pinceta
- membrana (Immobilon[™]-P, Millipore)
- membrana (Durapore[®], Millipore)
- filter papir (1F Grade, Munktell)
- kadičke za membrane
- parafilm
- prozorna folija

UPORABLJENE APARATURE:

- pH-meter
- mešalo vorteks
- vakuumška črpalka
- magnetno mešalo z možnostjo segrevanja
- avtomatski pipetnik za pipetiranje večjih volumnov
- centrifuga (Centrifuge 5810R, Eppendorf)
- centrifuga (Centrifuge 5471C, Eppendorf)
- sistem za elektroforezo (Multiphor[™] II, Amersham Biosciences)
- termostatska črpalka (MultiTemp[™] III, Amersham Biosciences)
- napajalnik (Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, Amersham Biosciences)
- odstranjevalec gela
- rezalnik papirja
- naprava za polsuh prenos (Trans-Blot[®] SD; Semi-Dry Transfer Cell, Biorad)
- napajalnik (PowerPac Basic[™], Biorad)

- stresalnik
- kamera (ImageQuantTM LAS 4000, GE Healthcare)

7.4 PRIPRAVA VZORCEV – KONCENTRIRANJE URINA

Zaradi majhne količine EPO v urinu smo morali vzorce urina pred nanosom na gel skoncentrirati.

7.4.1 REAGENTI

- raztopina proteaznega inhibitorja (CompleteTM, Roche)
- TRIS (Tris (hidroksimetil) aminometan, Acros Organics)
- 37-% raztopina HCl
- fiziološka raztopina

7.4.1.1 PRIPRAVA REAGENTOV

- raztopina proteaznega inhibitorja CompleteTM: 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: 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 raztopino 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-% raztopine 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.

7.4.2 POSTOPEK KONCENTRIRANJA URINA

1. Urinske vzorce športnikov, hranjene na temperaturi -70 °C, smo čez noč odmrznili.
2. Za analizo RIA smo v epice odpipetirali 500 µl urina in jih zamrznili na -20 °C.

3. V centrifugirke smo prenesli 18 ml urina in dodali 200 μ l (1/100 urina) raztopine proteaznega inhibitorja ter 1,8 ml (1/10 urina) 3,75-M TRIS/HCl, pH 7,4. Centrifugirko smo zamašili in vsebino premešali z mešalom vorteks.
4. Centrifugirali smo v centrifugi (Centrifuge 5810R, Eppendorf) pri 2700 RCF, 10 min, pri 20 °C, da smo odstranili kristale, celice in ostale usedline, ki bi lahko zamašile filter. Supernatant smo prenesli v čisto centrifugirko.
5. Urin smo filtrirali skozi 0,22- μ m filter (Steriflip® Filter, Millipore) s pomočjo vakuumske črpalke.
6. Prva ultrafiltracija: uporabili smo centrifugalni filter z ultracel-30k membrano – 50 mL (Amicon® Ultra, Millipore) in ultrafiltrirali pri 3220 RCF, 10 min, pri 20 °C v centrifugi (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Zaradi prevelike količine vzorca smo po dodatku preostalega vzorca ultrafiltracijo še enkrat ponovili pod enakimi pogoji.
7. Koncentrat smo spirali z 20 ml 50-mM TRIS/HCl, pH 7,4 in dodatkom 200- μ l proteaznega inhibitorja. Zaradi prevelike količine smo spirali v dveh delih v centrifugi (Centrifuge 5810R, Eppendorf) pri 3220 RCF, 15 min, pri 20 °C.
8. 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).
9. Volumen dobljenega 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.
10. Dan pred analizo z metodo RIA smo 3 μ l koncentrata razredčili do 500 μ l s fiziološko raztopino.

7.5 RADIOIMUNOLOŠKA METODA (RIA)

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

7.6.1 REAGENTI

- metanol
- etanol
- glacialna očetna kislina
- saharoza (Sukrose, Kemika)
- amfoliti (Servalit[®] 2–4, 4–6, 6–8, Serva)
- urea (Urea – Molecular Biology Grade, Calbiochem[®])
- akrilamid (Acrylamide-Bis Solution (29:1), 30-% w/w, Serva)
- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (PlusOne TEMED, Amersham Biosciences)
- amonijev persulfat (APS, Merck)
- barvilo metil rdeče (Methyl red, ACS, Reag. Ph. Eur, Merck)
- 0,5 M H₃PO₄ (o-Phosphorsäure, ≥ 85 %, p.a., ACS, ISO, Rotipuran[®])
- 10-% v/v raztopina neionskega detergenta (Tween[®] 20, Calbiochem[®])
- albumin iz govejega seruma (BSA, Sigma)
- TRIS (Tris (hidroksimetil) aminometan, Acros Organics)
- epoetin β (NeoRecormon[®] 20000 NE/i.e., Roche)
- darbepoetin (Aranesp 150 mg, AMGEN)
- glicin (Glycine, Acros Organics)
- DTT (UltraPure[™] Dithiothreitol – Cleland's Reagent, Invitrogen[™])
- PBS (Phosphate buffered Saline, Sigma)
- LFM (posneto mleko v prahu, Pomurske mlekarne)
- primarna protitelesa (mišja monoklonska protitelesa proti človeškemu EPO, AE7A5, R & D)
- sekundarna protitelesa (kozja biotinizirana IgG proti mišjim protitelesom, Thermo Scintific)
- terciarna protitelesa (kompleks streptavidin-peroksidaza, Invitrogen)
- kemiluminiscentna raztopina (SuperSignal West Femto, Thermo Scintific)

7.6.1.1 PRIPRAVA REAGENTOV

- 438-mM raztopina amonijevega persulfata: potrebno ga je pripravljati sveže vsak teden. V 2 ml bidestilirane vode smo dodali 0,2 g APS. Centrifugirko smo ovili z aluminijasto folijo in jo shranili pri 4 °C.
- 1-% BSA/50-mM TRIS: 50-mM TRIS smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,657 g TRIS in dopolnili z bidestilirano vodo do oznake v 100-ml bučki. Nato smo v drugo 100-ml bučko zatehtali 1 g BSA in dopolnili do 100 ml s predhodno narejenim 50-mM TRIS.
- 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 in dopolnili do 20 ml z bidestilirano vodo.
- 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 epoetina β (Neorecormon 20000 IE) in 400 IU/l darbepoetina (Aranesp – 150 µl v 0,3 ml):
 - 600 IU/l epoetina β (Neorecormon):
 - raztapljanje 1/100 (raztopina A): 5 µl epoetina β + 495 µl 1-% BSA/TRIS
 - raztapljanje 1/250 (raztopina B): 5 µl raztopine A + 1245 µl 1-% BSA/TRIS
 - 400 IU/l darbepoetina (Aranesp)
 - raztapljanje 1/100 (raztopina C): 5 µl darbepoetina + 495 µl 1-% BSA/TRIS
 - raztapljanje 1/10 (raztopina D): 5 µl raztopine C + 45 µl 1-% BSA/TRIS
 - raztapljanje 1/127 (raztopina E): 5 µl raztopine D + 630 µl 1-% BSA/TRISZa nanos (raztopina F): 200 µl raztopine B (epoetin β) + 200 µl raztopine E (darbepoetin) + 44 µl 10-% v/v raztopine 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.
- 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 1 l. Pufer smo premešali na magnetnem mešalu in ga shranili v hladilniku.
- 5-mM DTT v PBS: natehtali smo 116,25 mg DTT in dopolnili do 150 ml s PBS.

- PBS: 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. Puffer smo shranili v hladilniku.
- 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 (1/1000; 1 µg/ml) v 1-% LFM/PBS: tik pred uporabo smo v centrifugirko dali 10 ml 1-% LFM/PBS in s pipeto dodali 10 µl primarnih protiteles. Nerazredčena protitelesa smo hranili v zamrzovalniku na -70 °C.
- Sekundarna protitelesa (1/1600) v 1-% LFM/PBS: tik pred uporabo smo v centrifugirko dali 10 ml 1-% LFM/PBS in s pipeto dodali 6,25 µl sekundarnih protiteles. Nepripravljena protitelesa smo hranili v zamrzovalniku na -70 °C.
- Terciarna protitelesa (1/1330) v 1-% LFM/PBS: tik pred uporabo smo v centrifugirko dali 10 ml 1-% LFM/PBS in s pipeto dodali 7,5 µl terciarnih protiteles. Nepripravljena protitelesa smo hranili v zamrzovalniku na -70 °C.

7.6.2 PRIPRAVA GELA

1. Gel smo vlili 24 ur pred analizo in ga shranili prek noči v hladilniku v vlažnih pogojih zaradi preprečitve izsuševanja gela.
2. V erlenmajerico z mešalom smo dali: 16,8 g uree, 1,95 g saharoze, 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 namestili Gel-Fix[®], pri tem je del Gel-Fix[®] gledal 0,4 cm preko zunanjšega krajšega roba. Poskrbeli smo, da pod Gel-Fix[®] ni bilo mehurčkov. Za odstranitev presežka vode smo Gel-Fix[®] pokrili z vpojnim papirjem ter povaljali z valjčkom. Ponovno smo preverili prisotnost mehurčkov pod Gel-Fix[®].

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 uskladil s krajšim robom podpore. Z izpostavitvijo okoli 1,4 cm Gel-Fix[®] smo omogočili nanos gela. Na koncu smo pritrdili zatiče ob straneh kalupa.



Slika 5: Kalup za gel

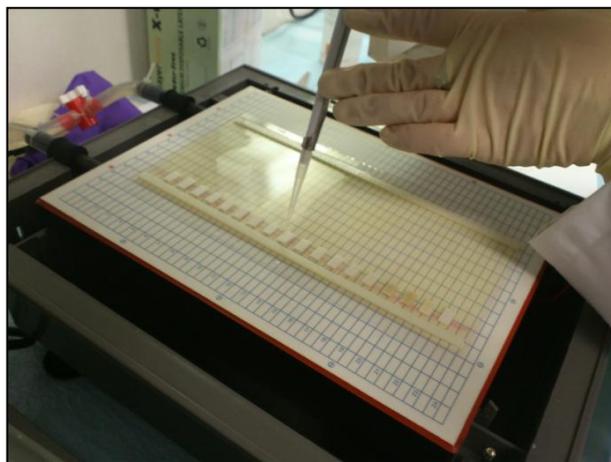
7. Gelsko mešanico smo vzeli iz mešala in vakuumske črpalke, dodali 165 μl APS in 16,5 μl TEMED ter nežno premešali. Gel smo takoj nanesli v kalup s pomočjo 25-ml pipete. Delali smo s konstantnim pretokom z nanosom na sredino zgornjega roba in pustili, da se je kalup zapolnil po principu kapilarnega 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.

7.6.3 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

1. Vkllopili smo termostatsko črpalko in jo nastavili na 10 °C.
2. Ločitev gela od kalupa. Odstranili smo spodnjo ploščo 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[®] in gel odstranili s steklenega pokrova. Krajša dela gela smo s škarjami obrezali naravnost.
3. Z vodo smo omočili površino hladilne plošče. Gel z Gel-Fix[®] navzdol smo postavili na hladilno ploščo, ga poravnali ter popivnali odvečno vodo. Preverili smo prisotnost mehurčkov pod Gel-Fix[®] z namenom preprečitve vnetja gela na visokonapetostni elektrodi.
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

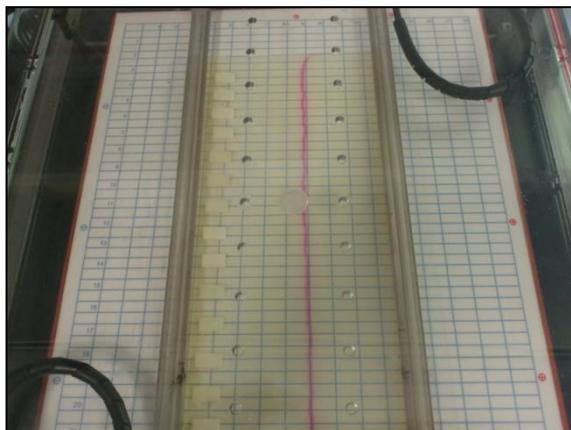
rokavice. Nato smo po istem principu pripravili in namestili anodni elektrodni trak z 0,5-M H_3PO_4 .

5. Prefokusiranje: 250 V, 30 minut, 10 °C, 150 mA, 70 W.
6. Med čakanjem smo pripravili 20- μ l vzorce s segrevanjem 3 minute pri temperaturi točno 80 °C in jih ohladili v hladni vodi. Dodali smo 2,2 μ l 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.
7. Omočene (z 20 μ l 1-% BSA/TRIS) filter papirčke (1,0 x 0,5 cm, Biorad) smo nanegli 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 razmik 1 cm. Na filter papirčke smo nanegli posamezne vzorce in referenčne standarde.



Slika 6: Nanos vzorcev in referenčnih standardov

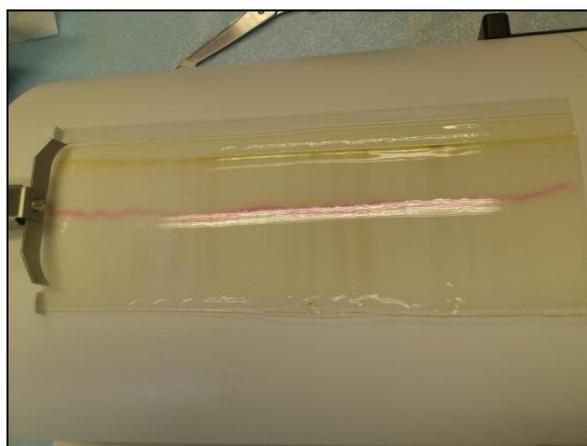
8. IEF nastavitve: moč – 1 W/cm dolžine gela, $V_{max} = 2000V$, 3600 Vh, 10 °C, 150 mA.



Slika 7: Potek elektroforeze

7.6.4 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 številka 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 s površine gela. Gel obrnjen navzgor smo 2 minuti namakali v 25-mM TRIS/192-mM glicin pufru.
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.



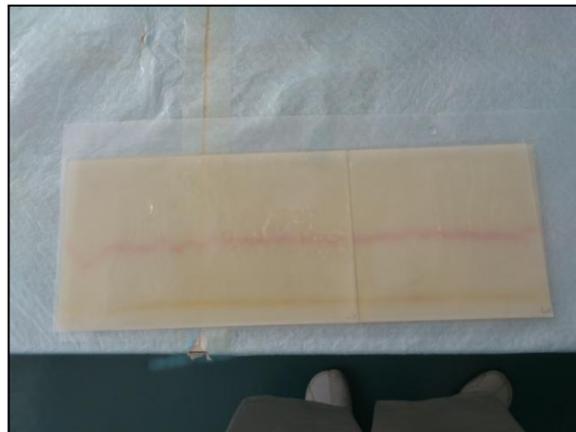
Slika 8: Odstranjevalec gela

7.6.4.1 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[®] 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.



Slika 9: Gel z nameščenima membranama

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, pravilno centriran na gel. Prekrili smo ga s parafilmom, z valjčkom iztisnili presežen pufer ter 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, 3 x 8 minut, sobna T, močno stresanje.

13. Nato smo dvakrat kratko spirali s PBS s stresanjem z roko.

7.6.4.2 DRUGI PRENOS

1. ImmobilonTM-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, po principu opisanem pri prvem prenosu.
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. ImmobilonTM-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 ImmobilonTM-P membrano 2 s številko 2 obrnjeno navzdol tako, da sta se številki na ImmobilonTM-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 BasicTM, Biorad).
4. Odstranili smo ImmobilonTM-P membrano številka 2, jo spirali s PBS in jo postavili v blokirno raztopino: 5-% LFM/PBS, 45 minut, sobna T. ImmobilonTM-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 prek 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.

7.6.5 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 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. Peroksidni pufer in luminol 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 ter zagnali program.
4. Čas slikanja smo nastavili na 30 sekund in shranili slike na računalnik.

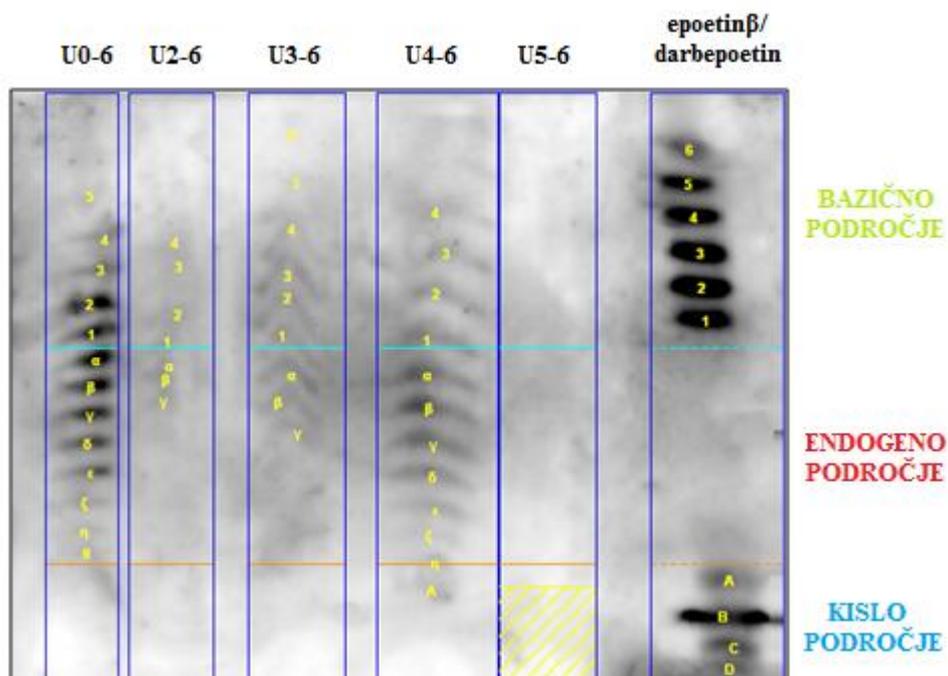
7.6.6 STATISTIČNE METODE IN ORODJA

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programe GASepo, IMB SPSS Statistics Version 21 in Microsoft Office Excel 2007. S pomočjo programa GASepo smo ovrednotili EPO-izoforme, s preostalima programoma smo izračunali povprečno vrednost, standardni odklon in odstotek spremembe za vrednosti hematoloških parametrov pred in po odpravi ter izvedli Shapiro-Willkov in parni t-test.

V raziskavo so zajeti podatki 7 alpinistov, ki so med odpravo na območju Kavkaza pisali dnevnik višinskega gibanja (Graf 1). Po prihodu na višino (2200 m) so se odpravili na aklimatizacijsko turo (okoli 3300 m), v nadaljevanju so se povzpeli na različne vrhove Kavkaza (4000–5200 m), ob koncu odprave pa so vsi alpinisti osvojili zahodni vrh Elbrusa (5642 m).

8.1 ANALIZA IZOFORM EPO

Koncentracijo EPO v vzorcih krvi in urina 7 alpinistov smo analizirali z metodo RIA. Rezultati kvantitativnih meritev vzorcev so predstavljeni v prilogi (Tabela VII). Z metodo izoelektričnega fokusiranja z dvojnimi prenosom smo uspeli pridobiti profile izoform EPO v vzorcih urina. Zaradi nizkih koncentracij EPO v vzorcih je bila primerjalna analiza med vzorci izvedena za osebe 1, 2 in 6. Izoforme endogenega EPO smo analizirali s programom GASepo, ki ga uporabljajo antidopinški laboratoriji za odkrivanje prisotnosti rHuEPO v vzorcih športnikov.



Slika 10: Analiza izoform EPO-vzorcev urina osebe 6. S programom GASepo smo označili izoforme glede na pojav le-teh v bazičnem, endogenem in kislem področju. Pri razvrščanju so nam v pomoč izoforme epoetina β (1–6) in darbepoetina (A–D).

S pomočjo analize v programu GASepo smo pridobili odstotek izoform EPO v bazičnem, endogenem in kislem področju, na podlagi katerega smo lahko ocenili premik profila izoform proti bazičnem področju oziroma vrnitev izoform EPO na začetno stanje.

LEGENDA VZORCEV:

U0-x: urinski vzorec pred odpravo

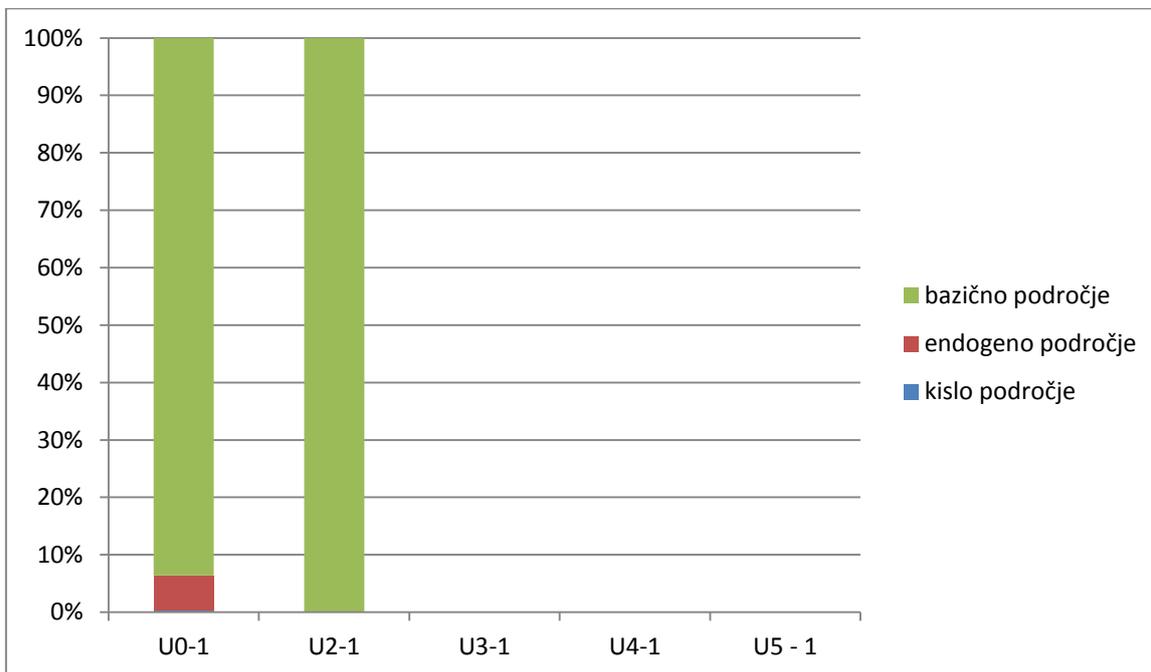
U2-x: urinski vzorec 4. dan bivanja na višini

U3-x: urinski vzorec 12. dan bivanja na višini

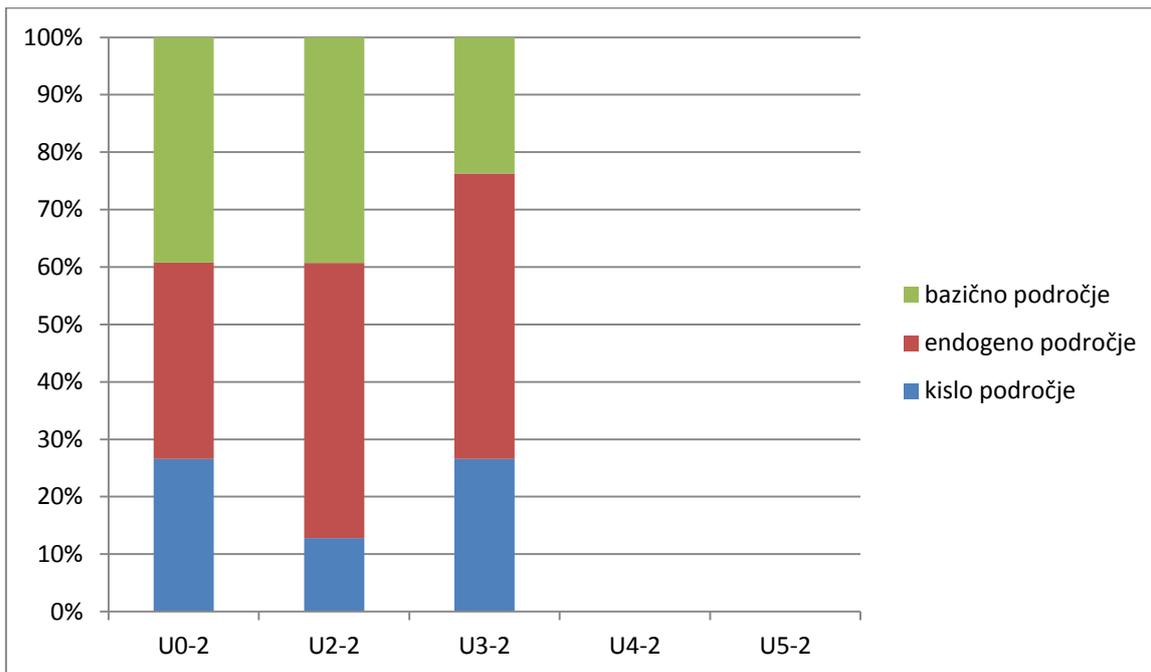
U4-x: urinski vzorec 16. dan bivanja na višini

U5-x: urinski vzorec po odpravi

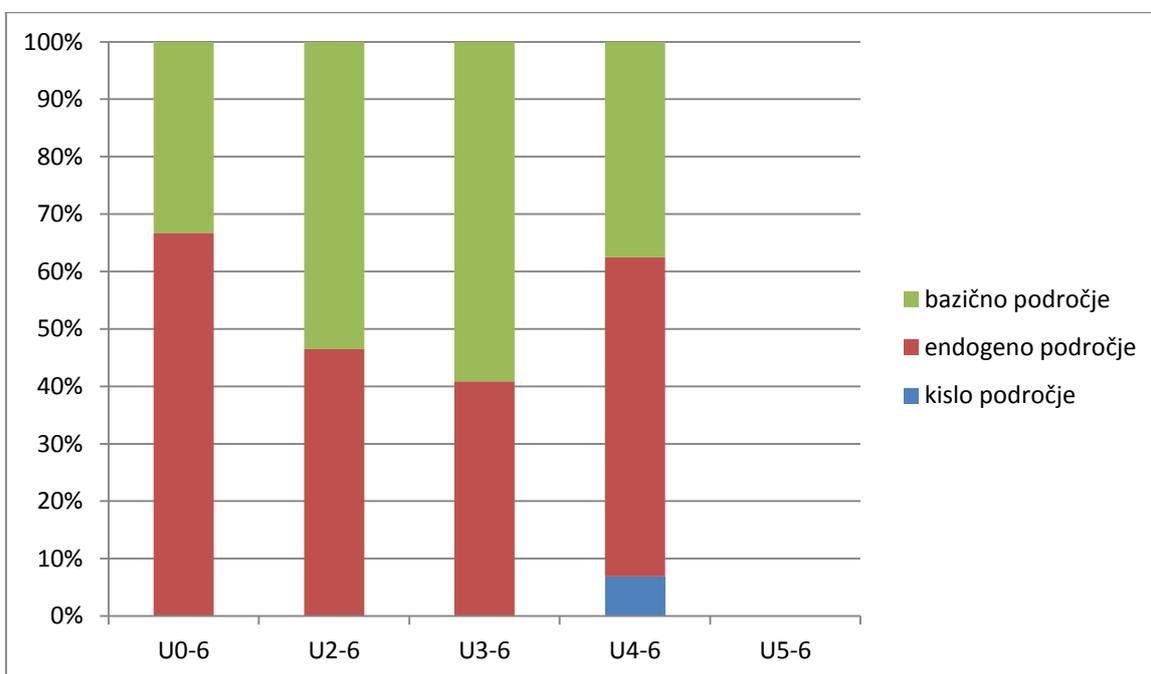
x – oseba 1, 2, 6



Graf 2: Oseba 1. Odstotek izoform EPO v bazičnem, endogenem in kislem področju pI. Vzorci U3-1, U4-2 in U5-2 vsebujejo prenizko koncentracijo EPO, zato jih ne moremo analizirati z GASepo.

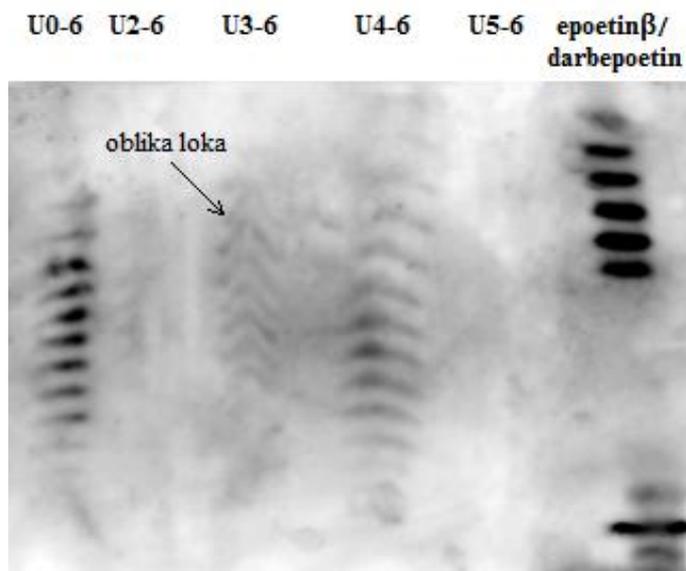


Graf 3: Oseba 2. Odstotek izoform EPO v bazičnem, endogenem in kislem področju pI. Vzorca U4-2 in U5-2 vsebujeta prenizko koncentracijo EPO, zato ju ne moremo analizirati z GASepo.



Graf 4: Oseba 6. Odstotek izoform EPO v bazičnem, endogenem in kislem področju pI. Vzorec U5-6 vsebuje prenizko koncentracijo EPO, zato ga ne moremo analizirati z GASepo.

Pri večini urinskih vzorcev urina oseb 1, 2, 6 smo opazili spremembo oblike izoform EPO iz ravnih v obliko loka, kar je posledica visoke vsebnosti skupnih proteinov v urinu oziroma proteinurije.



Slika 11: Vpliv proteinurije na izoforme EPO. Zaradi visoke vsebnosti proteinov v urinu izoforme EPO spremenijo obliko iz ravnih v obliko loka.

8.2 KONCENTRACIJA EPO IN HEMATOLOŠKI PARAMETRI

Analiza vzorcev krvi je bila opravljena na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) Kliničnega centra v Ljubljani. Pridobljene rezultate vzorcev krvi vseh 7 alpinistov pred in po odpravi smo statistično opredelili s Shapiro-Wilkovim testom normalnosti in jih ovrednotili s parnim t-testom. Za posamezne hematološke parametre smo izračunali tudi povprečno vrednost in standardno deviacijo odstotka spremembe.

S Shapiro-Wilkovim testom normalnosti smo preverili normalno porazdelitev rezultatov analize (Tabela III). Postavili smo hipotezi:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$; koncentracije hematoloških parametrov so normalno porazdeljene

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$; koncentracije hematoloških parametrov niso normalno porazdeljene

$\alpha = 0,05$

Tabela III: Shapiro-Wilkov test normalnosti

Hematološki parametri	Čas odvzema	Statistika	Prostostne stopnje	Statistična značilnost
Eritropoetin (U/l)	pred	0,958	7	0,803
	po	0,952	7	0,745
Eritrociti ($10^{12}/l$)	pred	0,899	7	0,323
	po	0,918	7	0,457
Hemoglobin (g/l)	pred	0,943	7	0,668
	po	0,890	7	0,275
Hematokrit (l)	pred	0,894	7	0,299
	po	0,856	7	0,140
Trombociti ($10^9/l$)	pred	0,875	7	0,206
	po	0,925	7	0,509
Levkociti ($10^9/l$)	pred	0,933	7	0,575
	po	0,885	7	0,251

Na podlagi dobljenih p-vrednosti ($p > 0,05$) smo ugotovili, da se vse vrednosti hematoloških parametrov porazdeljujejo normalno, zaradi česar smo jih lahko ovrednotili s parnim t-testom. Vsaki spremenljivki smo določili povprečno vrednost in standardni odklon (Tabela IV) in primerjali razliko povprečnih vrednosti hematoloških parametrov pred in po odpravi (Tabela V).

Tabela IV: Povprečne vrednosti in standardni odkloni izmerjenih koncentracij hematoloških parametrov pred in po odpravi

Hematološki parametri	Čas odvzema	Število vzorcev	Povprečna vrednost	Standardni odklon
Eritropoetin (U/l)	pred	7	15,863	4,851
	po	7	13,159	4,720
Eritrociti ($10^{12}/l$)	pred	7	4,576	0,303
	po	7	4,793	0,302
Hemoglobin (g/l)	pred	7	142,714	11,600
	po	7	147,143	10,254
Hematokrit (l)	pred	7	0,412	0,028
	po	7	0,432	0,027
Trombociti ($10^9/l$)	pred	7	279,286	50,721
	po	7	314,143	55,541
Levkociti ($10^9/l$)	pred	7	5,771	0,918
	po	7	6,757	1,190

Za parni t-test smo postavili ničelno in alternativno hipotezo:

H_0 : $\mu_{\text{pred}} = \mu_{\text{po}}$; vrednosti hematoloških parametrov se ne spremenijo

H_1 : $\mu_{\text{pred}} \neq \mu_{\text{po}}$; vrednosti hematoloških parametrov se spremenijo

$\alpha = 0,05$

Tabela V: Parni t-test. Razlika v koncentracijah hematoloških parametrov pred in po odpravi.

Hematološki parametri	Število parov	Povprečna vrednost (pred-po)	Standardni odklon	t	Prostostne stopnje	Statistična značilnost (dvostranska)
Eritropoetin (U/l)	7	2,704	2,498	2,864	6	0,029
Eritrociti ($10^{12}/l$)	7	-0,217	0,205	-2,801	6	0,031
Hemoglobin (g/l)	7	-4,429	6,949	-1,686	6	0,143
Hematokrit (l)	7	-0,020	0,018	-2,985	6	0,024
Trombociti ($10^9/l$)	7	-34,857	24,982	-3,691	6	0,010
Levkociti ($10^9/l$)	7	-0,986	0,546	-4,777	6	0,003

Primerjava meritev v krvi pred in po odpravi je pokazala, da je prišlo do statistično značilne razlike ($p < 0,05$) pri vrednostih EPO, eritrocitov, hematokrita (Hct), trombocitov in levkocitov, medtem ko razlika za koncentracijo hemoglobina (Hb) ni bila statistično značilna ($p > 0,05$). Za lažjo interpretacijo smo razlike vrednosti hematoloških parametrov zapisali v obliki povprečnega odstotka in standardnega odklona (Tabela VI).

Tabela VI: Povprečni odstotek (%) spremembe in standardni odklon hematoloških parametrov

Hematološki parametri	Število	Povprečna vrednost spremembe (%)	Standardni odklon
Eritropoetin (U/l)	7	-17,5	14,8
Eritrociti ($10^{12}/l$)	7	4,9	4,5
Hemoglobin (g/l)	7	3,3	4,9
Hematokrit (l)	7	5,0	4,3
Trombociti ($10^9/l$)	7	12,8	8,5
Levkociti ($10^9/l$)	7	17,2	8,8

Izoelektrično fokusiranje z dvojnimi prenosom uporabljajo laboratoriji z namenom odkrivanja zlorabe rHuEPO pri športnikih. Detekcija temelji na razlikovanju profila izoform endogenega EPO od rHuEPO v urinu. Medtem ko imata epoetin β in darbepoetin značilne izoforme v bazičnem (epoetin β) in kislem (darbepoetin) območju, so izoforme endogenega EPO običajno razporejene skozi celotno področje, z izrazitejšimi izoformami v kislem območju (45).

Pri analizi urinskih vzorcev kolesarjev in atletov, zbranih po kratkotrajnem naporu, so zasledili t. i. atipične izoforme z zaznanim premikom izoform naravnega EPO iz kislega proti bazičnemu področju pI (45). Zaenkrat še ni popolnoma jasno, ali se podoben premik izoform pojavi tudi pri drugih oblikah napora, kot je na primer rekreativno plezanje, prav tako ni znano, kako se profil endogenega EPO spreminja glede na različno nadmorsko višino.

Kvantitativna določitev koncentracije EPO v koncentriranih urinskih vzorcih z metodo RIA ni bila optimalno izvedena, saj se koncentracije EPO in profili izoform EPO niso ujemale. Možni razlog je neustrezno redčenje v predpripravi vzorca ali v sočasni analizi prevelikega števila urinskih vzorcev. Kljub temu nam neustrezni rezultati niso delali težav pri analizi z IEF in kasnejši interpretaciji rezultatov, saj se zaradi nizkih koncentracij endogenega EPO v vzorcih izoforme EPO niso prekrivale pri nobenem od preiskovancev.

Pri vzorcu U0 osebe 1, pridobljenem pred odpravo na višini 295 m, najdemo večino izoform EPO v bazičnem področju pI, kar ni značilno za običajno razporeditev izoform endogenega EPO. Glede na nizko koncentracijo EPO v krvi pred odpravo lahko izločimo sum o aplikaciji rHuEPO, vendar pa zaradi pomanjkanja podatkov o fizičnih aktivnostih pred odpravo in možnega vpliva proteinurije ne moremo trditi, da so za dobljeni profil endogenega EPO krive individualne razlike med posamezniki. Po 4 dneh bivanja na višini nad 2200 m (vzorec U2) pri vseh osebah opazimo premik izoform proti bazičnemu področju, navkljub razlikam v koncentraciji EPO. Vse tri osebe so 2 dni pred tem za namene aklimatizacije opravile vzpon na 3400 m in 4250 m visoka vrha, nato pa v bazi čakale na izboljšanje vremena. Raziskava Lamon in ostalih je dokazala korelacijo med intenziteto vadbe, premikom izoform EPO proti bazičnemu področju pI in proteinurijo, vendar sta se profil izoform EPO in koncentracija proteinov začela vračati na bazalno

stanje že po komaj treh urah (45). Glede na podatke te raziskave bi lahko trdili, da napor v našem primeru ne igra zelo pomembne vloge, saj so bili urinski vzorci alpinistov zbrani šele 2 dni po vzponu. Vseeno pa je možno, da se vpliv napora in začasne proteinurije na premik izoform spreminja s prihodom na višjo nadmorsko višino. V raziskavi, kjer so se preiskovanci 12 dni vzpenjali na 5800-m vrhove, so odkrili povezavo med višino in stopnjo proteinurije s časovnim zamikom le-te za 1–3 dni, kar sovpada tudi z zbiranjem naših urinskih vzorcev (48). Vpliv proteinurije na izoforme EPO vidimo pri večini vzorcev, zbranih na višini, najbolj nazorno pa se vidi pri kasnejših vzorcih osebe 6 (Slika 11). Zaradi visoke vsebnosti skupnih proteinov (več kot 5 g/100 ml) kot posledica preobremenitve gela izoforme spremenijo obliko iz ravnih v obliko loka (47).

Mehanizma za pojav proteinurije na višini in ob naporu sta lahko bodisi zmanjšana tubulna reabsorpcija bodisi povečana glomerulna filtracija ali obe hkrati (45, 48). S premikom urinskih izoform EPO proti bazičnem področju pI dobimo podoben izoelektrični profil izoform, kot ga lahko najdemo pri serumskem EPO. Glede na ugotovitve o pomembnosti električnega naboja na prepoznavo in vezavo nizkomolekularnih proteinov na membranah celic je možno, da se najbolj bazične izoforme serumskega EPO v primeru bivanja na nižini ali pri počitku po glomerulni filtraciji prednostno odstranijo iz urina preko tubulnih celic, v urinu pa ostanejo bolj kisle izoforme. Pri spremembi višine ali ob naporu pa je zaradi začasne proteinurije tubulna reabsorpcija zasičena, bazične izoforme se ne morejo odstranjevati, zato opazimo v urinu podoben profil izoform kot pri EPO v serumu (45).

Po 12 dneh bivanja na višini nad 2200 m in sestopu iz 5-dnevnega bivanja na višini okoli 4000 m pri osebi 1 (vzorec U3-1, Graf 2) izoforme EPO v urinu niso več opazne, pri osebi 2 (vzorec U3-2, Graf 3) se pomaknejo proti kislem območju, pri osebi 6 (vzorec U3-6, Graf 4) pa opazimo izrazit pomik proti bazičnem področju. Po 16 dneh bivanja na višini in sestopu iz 5642-m gore vidimo le še profil EPO osebe 6 (vzorec U4-6, Graf 4), s premikom izoform proti kislem območju pI. Oba vzorca sta bila zbrana naslednje jutro po sestopu iz gore. V raziskavi Khana in sodelavcev se je proteinurija po začetni naraščajoči koncentraciji začela zmanjševati že v času 5-dnevne odprave na višino okoli 4500 m in dosegla izhodiščno raven po vrnitvi na 500 m (49). Do podobne ugotovitve so prišli pri raziskavi, kjer je bila povprečna koncentracija proteinov v urinu čez 100 g/100 ml po ponavljajočih vzponih na višine do 5890 m v prvih 12 dneh, nato pa se je med kasnejšimi vzponi le-ta znižala na 15 mg/100 ml. Po njihovem mnenju je možni vzrok za zmanjšano

stopnjo proteinurije adaptacija ledvic na novo okolje (50, 51). Možno je torej, da se po določenem času bivanja na višini zaradi zmanjšane stopnje proteinurije ponovno vzpostavi normalna tubulna reabsorpcija, potrebna za odstranitev bazičnih izoform iz urina, profil izoform EPO pa se pomakne proti kislem območju.

Po vrnitvi na nadmorsko višino 295 m v urinskih vzorcih U5 izoforme EPO niso več opazne, najverjetneje zaradi nizke koncentracije EPO, kar potrjuje tudi signifikantno znižana koncentracija EPO v serumu. Koncentracija serumskega EPO se po koncu 18- do 22-dnevne odprave zniža za $17,5 \pm 14,8$ % v primerjavi s koncentracijo EPO pred odpravo, kar deloma potrjuje trditev, da se pri izpostavitvi hipoksiji koncentracija EPO v začetnih 24–72 urah povečuje, teden kasneje pa sledi znižanje (52, 53). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi pri analizi serumskih vzorcev alpinistov, kjer so opazili povišane vrednosti EPO 1. in 2. dne po prihodu na 3500 m in pri vzponu na 4500 m s kasnejšim upadom in vrnitvijo na kontrolne vrednosti EPO po 22 dneh (54). Za celostno potrditev njihovih dognanj bi tako potrebovali dodatno meritev serumskega EPO v roku enega tedna po prihodu na višino. Znižane vrednosti EPO so najverjetneje posledica prilagoditve hipoksičnim razmeram z nastankom novih rdečih krvnih celic. Dodatno lahko pomik k znižanim vrednostim pripišemo tudi normoksičnim pogojem, nastalim zaradi odvzema vzorcev 3 dni po koncu odprave. Glede na razpolovni čas EPO, ki je okoli 5,5 ure, se je v tem času nastali presežek EPO že izločil (42). Našo hipotezo o aklimatizaciji na višjo nadmorsko višino lahko potrdimo s signifikantno zvišanima vrednostma eritrocitov ($4,9 \pm 4,5$ %) in Hct ($5,0 \pm 4,3$ %), ne pa tudi Hb. Koncentracija Hb je bila sicer zvišana ($3,3 \pm 4,9$ %), vendar razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$). Nižje vrednosti Hb lahko vsaj deloma pripišemo hitremu širjenju volumna plazme. V raziskavi, kjer so 3 tedne preučevali vpliv višine (3800 m) na spremembe volumna krvi, so 4. dan po sestopu ugotovili povečanje volumna plazme v razponu 4–23 % in znižanje koncentracije Hb za več kot 2 % (55). Možen razlog za nizke vrednosti Hb bi lahko bila tudi znižana koncentracija serumskega EPO, ki lahko privede do neocitolitskih procesov po hitrem spustu iz 4500 m (29), kar pa bi seveda vplivalo tudi na koncentracijo eritrocitov. Dobljene vrednosti hematoloških parametrov so podobne rezultatom študije, kjer so alpinisti 3 tedne preživeli na višini med 5250 m in 7161 m po predhodni enotedenski aklimatizaciji med 2800 m in 5250 m. Izpostavljenost ekstremnim nadmorskim višinam je povzročila policitemijo s povečanimi vrednostmi eritrocitov (5,26 %), Hb (4,83 %) in Hct (6,26 %), merjenimi

naslednjega dne po sestopu z višine (56). Glede na le nekoliko višje vrednosti hematoloških parametrov in možen vpliv širitve volumna plazme v našem primeru bi tako domnevali, da višja nadmorska višina ni nujno zagotovilo za mnogo višjo stopnjo eritropoeze ob hkratnima povečanem tveganju za razvoj višinskih bolezni in znižani optimalni športnikovi pripravljenosti.

Po 22 dneh bivanja na višini smo opazili tudi signifikantno povišane vrednosti trombocitov ($12,8 \pm 8,5$ %) in levkocitov ($17,2 \pm 8,8$ %). Zaradi tromboze, znanega zapleta izpostavljenosti višjim nadmorskim višinam, se je zanimanje za trombocite in koagulacijo povečalo, vendar pa so si rezultati raziskav nasprotujoči. V raziskavi, kjer so preverjali vpliv višine na vrednosti trombocitov, so pri vzponu na 2990 m ugotovili 7-% znižanje vrednosti trombocitov. Dodatno znižanje za 25 % glede na izhodiščno vrednost je sledilo 2. dne po vzponu na 5370 m, po dodatnih 8 dneh na višini pa so ugotovili le še 7-% znižanje glede na izhodiščno vrednost. Do podobne ugotovitve so prišli pri študiji preiskovancev, izpostavljenih 3200 m in 3771 m, kjer je po 48–72 urah sledil padec vrednosti trombocitov za 12–26 % (57). Tudi v raziskavi, kjer so preiskovanci 13 mesecev prebivali na višini 4100–4500 m, so po 3 in 13 mesecih opazili padec števila trombocitov za 12 % in 31 % (58). Nasprotno so v študiji, kjer so preiskovanci 2 leti živeli na višini med 3600 in 5200 m, ugotovili signifikantni porast števila trombocitov. V drugi študiji, kjer so preiskovali vzorce 50 vojakov po vzponu na 3650 m in bivanju 8 dni, niso uspeli dokazati signifikantne razlike v številu trombocitov (57, 59, 60). Glede na nasprotujoče si podatke je možno, da EPO izzove tako trombocitopenijo kot tudi trombocitozo. Zmerna stimulacija EPO, ki se pojavi pri kratkotrajni hipoksiji ali ob zmernem pomanjkanju železa, lahko povzroči zmerno zvišanje trombocitov, intenzivna stimulacija EPO, npr. pri dolgotrajni hipoksiji ali hudem pomanjkanju železa, pa lahko izzove določeno stopnjo trombocitopenije. Vzrok za pojav različnih odzivov bi lahko bilo tekmovanje izvornih celic med eritroidnimi in trombocitnimi prekurzorji (61). V našem primeru je torej možno, da se je zaradi zmerne ravni stimulacije EPO in tekmovanja izvornih celic število trombocitov povečalo, vendar bi za potrditev domneve potrebovali vmesna višinska merjenja EPO.

Fizična aktivnost na višini v primerjavi s fizično aktivnost ob morju je povezana s številnimi odgovori, ki lahko dodatno znižajo delovanje imunskega sistema. Na imunski sistem lahko kot posledica aktivnosti na višini vplivajo povišane koncentracije stresnih hormonov, povečana poraba glikogena in aminokislin za namene telovadbe ter tkivna

hipoksija, ki okrepi lokalne vnetne odzive in olajša prodiranje endotoksinov skozi stene črevesja. Na žalost obstaja le nekaj dobro kontroliranih študij, ki so preiskovale vpliv fizične aktivnosti v hipoksičnih in normoksičnih pogojih, zato je težko razbrati jasne zaključke (62). Glede na povišane vrednosti števila levkocitov v naši raziskavi bi lahko trdili, da je vpliv EPO na celice imunske odpornosti primerljiv z možnim vplivom na število trombocitov. Čeprav je glavna vloga EPO stimulacija eritropoeze, so našli EPO-receptor tudi na ostalih tkivih in celicah, med katere spadajo tudi polimorfonuklearni levkociti, monociti in limfociti. Tako je verjetno, da ima EPO poleg eritropoetske funkcije tudi imunomodulatorne lastnosti (63).

9.1 PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE METODE IN RAZISKAVE

Izoelektrično fokusiranje z dvojnimi prenosom je primerna metoda za ugotavljanje vpliva višinske proteinurije na premik izoform EPO v urinu. Kljub temu da smo z njo uspeli pridobiti ustrezne rezultate, bi bilo potrebno metodo zaradi kompleksne izvedbe dodatno optimizirati s preverjanjem ustreznosti aparatur, materialov in reagentov. Zaradi nizke koncentracije endogenega EPO v urinu bi k boljši detekciji pripomogla tudi večja količina koncentriranega vzorca urina. Prav tako bi za optimalno kvantitativno določitev koncentracije EPO v urinu z metodo RIA potrebovali več manjših serij vzorcev z ustrežnejšim redčenjem koncentrata. Visoko vsebnost proteinov v urinu bi lahko potrdili z uporabo tako imenovane ocene glomerulne filtracije, ki je pokazatelj proteinurije. Zmanjšanje učinkov proteinurije na izoforme EPO bi lahko popravili z dodatkom WGA Sepharose, ki znižuje koncentracijo proteinov v koncentriranem vzorcu (47).

Za samo interpretacijo podatkov in potrditev naših domnev o vplivu višine in napora na profil izoform EPO, koncentracijo EPO in vrednosti hematoloških parametrov bi bilo potrebno odvzeti vmesne vzorce krvi in vse vzorce krvi in urina zbrati takoj po sestopu z višine oziroma ob prenehanju napora. Potreben bi bil tudi nadzor preostalih dejavnikov (prehrana, pomanjkanje železa, bolezni, fizična aktivnost pred odpravo).

V okviru naše raziskave smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- izoforme EPO v urinu se po 4 dneh bivanja na višini nad 2200 m pomaknejo proti bazičnem področju, kar je najverjetneje posledica napora in višinske proteinurije,
- po 12–16 dneh bivanja na višini je opazen ponoven premik proti kislem področju, najverjetneje zaradi adaptacije ledvic na novo okolje,
- po 22 dneh bivanja in plezanja na višini opazimo znižano serumsko koncentracijo EPO ($17,5 \pm 14,8$ %) zaradi prilagoditve hipoksičnim razmeram z nastankom novih rdečih krvnih celic in 3-dnevnim normoksičnim okoljem pred odvzemom vzorca,
- vpliv bivanja v hipoksičnih razmerah se odraža v signifikantnem porastu števila eritrocitov ($4,9 \pm 4,5$ %) in hematokrita ($5,0 \pm 4,3$ %), ne pa tudi hemoglobina; koncentracija hemoglobina je bila sicer zvišana ($3,3 \pm 4,9$ %), vendar razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$), kar lahko vsaj deloma pripišemo hitremu širjenju volumna plazme,
- po 22 dneh bivanja na višini opazimo signifikantno povišane vrednosti trombocitov ($12,8 \pm 8,5$ %), ki so možna posledica zmerne stimulacije EPO in tekmovanja izvornih celic,
- 3-tedensko bivanje in treniranje v hipoksičnih razmerah signifikantno poviša število levkocitov ($17,2 \pm 8,8$ %), kar je lahko posledica imunomodulatornih lastnosti EPO,
- izoelektrično fokusiranje z dvojnimi prenosom je primerna metoda za ugotavljanje vpliva višinske proteinurije na premik izoform EPO v urinu.

1. 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, 2011.
2. Jelkmann W: Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 589. England; 2011. p. 1251–8.
3. Debeljak N, Sytkowski AJ: Erythropoietin and erythropoiesis stimulating agents. *Drug Test Anal.* 2012; 4(11): 805–12.
4. Debeljak N, Sytkowski AJ: Erythropoietin: new approaches to improved molecular designs and therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des.* 2008; 14(13): 1302–10.
5. Erythropoietin Wikipedia 2007 [updated 26. 8. 2012; cited 2012 21. 12]. Available from: de.wikipedia.org/wiki/Erythropoietin.
6. 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.
7. Fisher JW: Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003; 228(1): 1–14.
8. Wick M, Pinggera W, Lehmann P: Erythropoiesis. *Clinical Aspects and Laboratory — Iron Metabolism, Anemias:* Springer Vienna; 2011. p. 17–23.
9. Klausen T, Dela F, Hippe E, Galbo H: Diurnal variations of serum erythropoietin in trained and untrained subjects. *European Journal Of Applied Physiology And Occupational Physiology.* 1993; 67(6): 545–8.
10. Elliott S, Sinclair AM: The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics.* 6. New Zealand; 2012. p. 163–89.
11. Zhang S, Han CH, Chen XS, Zhang M, Xu LM, Zhang JJ, et al.: Transient ureteral obstruction prevents against kidney ischemia/reperfusion injury via hypoxia-inducible factor (HIF)-2alpha activation. *PLoS One.* 7. United States; 2012. p. e29876.
12. Jelkmann W, Pagel H: 7th International Lübeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and other Hemopoietic Growth Factors. *Annals of Hematology.* 2006; 85(9): 641–69.

13. Debeljak N, Sytkowski AJ: EpoR. UCSD Signaling Gateway; 2007.
14. Constantinescu S: Mechanism of erythropoietin receptor activation. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy: Birkhäuser Basel; 2009. p. 175–96.
15. Lodish H, Ghaffari S, Socolovsky M, Tong W, Zhang J: Intracellular signaling by the erythropoietin receptor. In: Elliott S, Foote M, Molineux G, editors. Erythropoietins, Erythropoietic Factors, and Erythropoiesis. Milestones in Drug Therapy: Birkhäuser Basel; 2009. p. 155–74.
16. 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.
17. Cokic VP, Bhattacharya B, Beleslin-Cokic BB, Noguchi CT, Puri RK, Schechter AN: JAK-STAT and AKT pathway-coupled genes in erythroid progenitor cells through ontogeny. *J Transl Med.* 10. England; 2012. p. 116.
18. Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, et al.: Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105. United States; 2008. p. 10925–30.
19. Locatelli F, Del Vecchio L: Erythropoiesis-stimulating agents in renal medicine. *Oncologist.* 16 Suppl 3. United States; 2011. p. 19–24.
20. Goldsmith D: 2009: a requiem for rHuEPOs--but should we nail down the coffin in 2010? *Clin J Am Soc Nephrol.* 5. United States; 2010. p. 929-35.
21. Doljak B: Eritropoetin. In: Štrukelj B, Kos J, editors. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine.* Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo; 2007. p. 284–307.
22. Lasne F, de Ceaurriz J: Recombinant erythropoietin in urine. *Nature.* 2000; 405(6787): 635.
23. Reichel C: Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 401(2): 463–81.
24. Španinger K, Debeljak N: Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija. *Farm vestn.* 2009; 60:7.
25. Jelkmann W: Novel Erythropoietic Agents: A Threat to Sportsmanship. *Medicina Sportiva.* 2007; 11(2): 32–42.

26. Paolo B, Angela S, Federica F, Fabio P: EPO abuse in sport. *International SportMed Journal*. 2009; 10(1): 8.
27. Levine BD, Stray-Gundersen J: Dose-response of altitude training: how much altitude is enough? *Adv Exp Med Biol*. 2006; 588: 233–47.
28. Schwandt HJ, Heyduck B, Gunga HC, Röcker L: Influence of prolonged physical exercise on the erythropoietin concentration in blood. *European Journal Of Applied Physiology And Occupational Physiology*. 1991; 63(6): 463–6.
29. 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*. 2012.
30. Jacobs RA, Lundby C, Robach P, Gassmann M: Red blood cell volume and the capacity for exercise at moderate to high altitude. *Sports Medicine (Auckland, NZ)*. 2012; 42(8): 643–63.
31. Schommer K, Bartsch P: Basic medical advice for travelers to high altitudes. *Dtsch Arztebl Int*. 2011; 108(49): 839–47; quiz 48.
32. Paralikar SJ, Paralikar JH: High-altitude medicine. *Indian J Occup Environ Med*. 2010; 14(1): 6–12.
33. Hoppeler H, Vogt M: Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol*. 2001; 204 (Pt 18): 3133–9.
34. Leissner KB, Mahmood FU: Physiology and pathophysiology at high altitude: considerations for the anesthesiologist. *J Anesth*. 2009; 23(4): 543–53.
35. Richalet J-P: Training, Altitude. In: Mooren F, editor. *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 859–64.
36. Beall CM: Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integrative And Comparative Biology*. 2006; 46(1): 18–24.
37. Beall CM, Decker MJ, Brittenham GM, Kushner I, Gebremedhin A, Strohl KP: An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99. United States; 2002. p. 17215–8.
38. Strohl K: Lessons in hypoxic adaptation from high-altitude populations. *Sleep and Breathing*. 2008; 12(2): 115–21.
39. Windsor JS, Rodway GW: Heights and haematology: the story of haemoglobin at altitude. *Postgrad Med J*. 83. England; 2007. p. 148–51.

40. Heinicke I, Boehler A, Rechsteiner T, Bogdanova A, Jelkmann W, Hofer M, et al.: Moderate altitude but not additional endurance training increases markers of oxidative stress in exhaled breath condensate. *European Journal of Applied Physiology*. 2009; 106(4): 599–604.
41. Chapman RF, Stickford JL, Levine BD: Altitude training considerations for the winter sport athlete. *Exp Physiol*. 95. England; 2010. p. 411–21.
42. Paula P, Niebauer J: Effects of high altitude training on exercise capacity: fact or myth. *Sleep and Breathing*. 2012; 16(1): 233–9.
43. 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.
44. Stray-Gundersen J, Levine BD: "Living high and training low" can improve sea level performance in endurance athletes. *British Journal Of Sports Medicine*. 1999; 33(3): 150–1.
45. 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.
46. 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): 139–43.
47. 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.
48. West JB, Schoene RB, Milledge JS, Luks A: *High Altitude Medicine and Physiology 5E*: Taylor & Francis Limited; 2012.
49. 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.
50. Kohanpour MA, Sanavi S, Peeri M, Zare AH, Mirsepasi M: Effect of submaximal aerobic exercise in hypoxic conditions on proteinuria and hematuria in physically trained young men. *Iran J Kidney Dis*. 2012; 6(3): 192–7.

51. 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.
52. Berglund B: High-altitude training. Aspects of haematological adaptation. *Sports Med*. 1992; 14(5): 289–303.
53. McLean S, Kolb J, Norris S, Smith D: Diurnal normobaric moderate hypoxia raises serum erythropoietin concentration but does not stimulate accelerated erythrocyte production. *European Journal of Applied Physiology*. 2006; 96(6): 651–8.
54. Milledge JS, Cotes PM: Serum erythropoietin in humans at high altitude and its relation to plasma renin. *Journal of Applied Physiology*. 1985; 59(2): 360–4.
55. Myhre LG, Dill DB, Hall FG, Brown DK: Blood volume changes during three-week residence at high altitude. *Clin Chem*. 1970; 16(1): 7–14.
56. Magalhães J, Ascensão A, Marques F, Soares JC, Ferreira R, Neuparth M, et al.: Effect of a high-altitude expedition to a Himalayan peak (Pumori, 7,161 m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *European Journal of Applied Physiology*. 2005; 93(5-6): 726–32.
57. Hudson JG, Bowen AL, Navia P, Rios-Dalenz J, Pollard AJ, Williams D, et al.: The effect of high altitude on platelet counts, thrombopoietin and erythropoietin levels in young Bolivian airmen visiting the Andes. *International Journal of Biometeorology*. 1999; 43(2): 85–90.
58. Vij AG: Effect of prolonged stay at high altitude on platelet aggregation and fibrinogen levels. *Platelets*. 2009; 20(6): 421–7.
59. Sharma S: Platelet count on slow induction to high altitude. *International Journal of Biometeorology*. 1986; 30(1): 27–32.
60. Singh I, Chohan IS: Blood coagulation changes at high altitude predisposing to pulmonary hypertension. *Br Heart J*. 1972; 34(6): 611–7.
61. Beguin Y: Erythropoietin and platelet production. *Haematologica*. 1999; 84(6): 541–7.
62. Walsh NP, Whitham M: Exercising in environmental extremes: a greater threat to immune function? *Sports Med*. 2006; 36(11): 941–76.
63. Lisowska K, Jasiulewicz A, Bryl E, Witkowski J: Erythropoietin as an Immunomodulating Agent. *Nephro Urol Mon*. 2011; 3(4).

12 PRILOGE

Tabela VII: Radioimunološka metoda. Rezultati analize EPO v vzorcih urina in seruma, pridobljeni z metodo RIA.

datum	oznaka vzorcev	serum pred/po	koncentracija EPO pred koncentriranjem (UI/l).		koncentracija EPO po koncentriranju (UI/l).	
9.7.	U0-1	20,84	/	NK	NK	NK
16.7.	U2-1	/	/	NK	NK	NK
23.7.	U3-1	/	/	NK	NK	NK
30.7.	U4-1	/	/	34,657	0,614	1,283
2.8.	U5-1	19,945	/	NK	1,594	4,195
2.7.	U0-2	15,96	NK	NK	6,96	9,175
15.7.	U2-2	/	0,867	0,922	NK	NK
23.7.	U3-2	/	0,907	3,944	NK	NK
30.7.	U4-2	/	3,367	3,462	NK	1,626
2.8.	U5-2	11,279	NK	2,051	1,072	3,01
9.7.	U0-3	11,15	28,007	34,637	NK	4,976
16.7.	U1-3	/	6,263	7,303	NK	NK
23.7.	U2-3	/	6,089	6,12	NK	NK
30.7.	U3-3	/	8,405	10,759	NK	NK
30.7.	U4-3	/	NK	NK	NK	NK
2.8.	U5-3	10,83	NK	NK	NK	NK
2.7.	U0-4	13,227	NK	NK	NK	3,271
13.7.	U1-4	/	NK	NK	NK	NK
17.7.	U2-4	/	16,643	18,913	NK	NK
24.7.	U3-4	/	NK	NK	NK	NK
30.7.	U4-4	/	NK	0,708	NK	2,795
2.8.	U5-4	11,006	NK	NK	NK	NK
2.7.	U0-5	22,495	11,381	18,21	NK	2,852
13.7.	U1-5	/	10,26	10,84	NK	NK
17.7.	U2-5	/	0,021	2,155	NK	1,829
24.7.	U3-5	/	9,444	13,422	NK	0,34
30.7.	U4-5	/	2,552	3,997	1,61	2,054
2.8.	U5-5	15,526	NK	NK	NK	1,156
2.7.	U0-6	17,797	NK	NK	0,506	0,671
16.7.	U2-6	/	NK	NK	NK	1,61
23.7.	U3-6	/	NK	NK	NK	NK
28.7.	U4-6	/	NK	NK	3,984	5,073
2.8.	U5-6	17,446	3,505	4,337	1,907	3,426

datum	oznaka vzorcev	serum	koncentracija EPO pred koncentriranjem (UI/l).		koncentracija EPO po koncentriranju (UI/l).	
2.7.	U0-7	9,574	7,265	7,978	3,556	4,257
13.7.	U1-7	/	0,827	3,543	1,304	1,948
18.7.	U2-7	/	11,072	11,223	NK	NK
30.7.	U4-7	/	1,382	7,767	NK	NK
2.8.	U5-7	6,084	14,622	19,016	3,339	4,722

OPOMBA: NK – neopredeljena koncentracija vzorca zaradi prenizke količine EPO

/ - ni meritve