

**«Naturlig variasjon i hemoglobinmasse og blodvolum
hos utholdenhetsutøvere»**



**Høgskolen
i Innlandet**

IDR3005

Kandidatnummer 114

Vegard Nordli

FORORD

Denne masteroppgaven markerer slutten på mitt to-årige studie i Master i treningsfysiologi ved Høgskolen i Innlandet avd Lillehammer. Arbeidet med oppgaven har vært svært lærerikt og kombinasjonen av praktisk arbeid med datainnsamling i fysiologisk lab og teoretisk arbeid med skriving av oppgaven har gjort arbeidsprosessen allsidig og utfyllende. Jeg har fått praktisk opplæring i metoden som er benyttet i oppgaven og føler sånn sett et slags eierskap til prosjektet.

Jeg vil først og fremst takke veileder Carsten Lundby for gode tilbakemeldinger underveis i prosessen, både med skriving, men også med det praktiske arbeidet i laben. Her vil jeg også takke Joar Hansen og Simen Næss Berge. Disse har vært de jeg har jobbet tettest på i laben. De har bistått med god kompetanse, og har en stor del av æren for at datainnsamlingen har gått så bra som den har gjort, i perioden hvor jeg fortsatt ble lært opp. En takk sendes også til Håvard Nygaard for opplæring og veiledning i venøs blodprøvetaking.

Alt i alt vil jeg utrykke takknemlighet til alle som ellers har bidratt i prosjektet, være seg forsøkspersoner, assistenter i laben, korrekturlesere eller andre som har tatt del i at denne oppgaven har blitt til.

Lillehammer, 16.05,2022

Vegard Nordli

Innholdsfortegnelse

SAMMENDRAG	4
1.0 TEORI.....	5
1.1 HEMATOLOGI.....	5
1.1.1 <i>Erytrocytter</i>	5
1.2 BLODVOLUM.....	6
1.3 HEMOGLOBIN	8
1.4 TRENINGSEFFEKT	9
1.4.1 <i>Varmetrening</i>	9
1.4.2 <i>Høydetrening</i>	10
1.5 BLODDOPING	10
2.0 INTRODUKSJON	11
2.1 PROBLEMSTILLING/HYPOTESE	12
3.0 METODE	13
3.1 DESIGN	13
3.2 UTVALG.....	13
3.3 ETISKE GODKJENNINGER.....	13
3.4 FORSØKSPROTOKOLL	13
3.4.1 <i>Urinprøve</i>	13
3.4.3 <i>Venøs blodprøve</i>	14
3.4.3 <i>Hb-massemåling</i>	14
3.5 DATABEHANDLING OG STATISTIKK.....	15
3.6 RELIABILITET OG VALIDITET.....	15
4.0 RESULTATER.....	16
4.1 ENDRINGER I HBMASSE OG BLODVOLUM.....	16
5.0 DISKUSJON	19
5.1 VARIANS I HBMASSE	19
5.2 VARIANS I BLODVOLUM	20
4.3 ANTIDOPING	21
6.0 KONKLUSJON.....	22
LITTERATUR.....	23

Sammendrag

Denne oppgaven skulle se på den naturlige variansen i Hemoglobinmasse og blodvolum hos godt trente idrettsutøvere i utholdenhetsidrett. Videre skulle denne variansen vurderes, og det skulle settes en grense for hva som kan regnes som naturlig endring og hvor grensen går før man kan spekulere i doping. **Metode:** Prosjektet er longitudinelt studie hvor 20 idrettsutøvere måler Hb_{masse} og blodvolum gjennom CO-rebreathing metoden hver måned i 8 måneder. Gjennomsnittlig endring fra laveste til høyeste måling ble analysert i Excel og Graphpad Prism 9. Resultatene er oppgitt i gjennomsnitt (standardavvik) **Resultater:** Endringen i Hb_{masse} 56 g (22) var ikke signifikant ($p > 0.05$), her så man heller ingen signifikant endring for hverken menn 56,1 g (24,9) eller kvinner 51 g (6,4). I blodvolum ble det vist en signifikant ($p = 0.002$) endring 707 ml (241) fra laveste til høyeste måling. **Konklusjon:** Hb_{masse} fremstår som stabil over et lengre tidsperspektiv hos denne gruppen. Og resultatene fra prosjektet vurderes derfor som innenfor det man kan regne som naturlig variasjon.

1.0 Teori

1.1 Hematologi

Blodet hos mennesker består av celler og cellefragmenter i en væske som kalles plasma. Cellene i blodet er enten røde (erytrocytter) eller hvite (leukocytter) blodceller. De røde utgjør mer enn 99% av det totale cellenivået og deres oppgave i kroppen er å frakte oksygen til – og karbondioksid fra muskler og andre celler i kroppen. Prosentandelen av blodet som er erytrocytter kalles hematokritt. Normale hematokrittverdier er ligger på cirka 43% hos menn og cirka 39% hos kvinner. Den resterende delen av blodet er plasma. Mesteparten (>90%) av plasma er vann, men den består også av ulike substanser, både organiske og uorganiske. Summen av de røde blodcellene, de hvite blodcellene og plasma er det som betegnes som blodvolum (Widmaier et al., 2019).

1.1.1 Erytrocytter

Hovedoppgaven til de røde blodcellene er gasstransport. Erytrocyttene inneholder store mengder av proteinet hemoglobin. Dette proteinet har egenskaper og en sammensetning, av blant annet jernatomer, som gjør det enkelt for oksygen og karbondioksid å feste seg til det. Menneskekroppen mister jern naturlig via urin, svette, avføring og hud, i tillegg til at kvinner mister en ekstra del som følge av blødning under menstruasjon. Jernet som mennesket mister naturlig må erstattes fra mat som er rik på jern, for å opprettholde jernbalansen. Dersom det oppstår en ubalanse vil det gå ut over produksjonen av hemoglobin slik at denne blir utilstrekkelig. Som en videre konsekvens kan ubalansen føre til skader på andre organer, slik som for eksempel hjerte, lever og bukspyttkjertelen (Widmaier et. Al, 2019).

Erytrocyttenes fasong, med tykkere kanter en kjerne, gjør at de har en stor overflate sett opp mot dens totale volum. En slik fasong gjør det enkelt for oksygen og karbondioksid å diffusere til og fra cellekjernen i erytrocyttene. Forløperne til erytrocyttene produserer hemoglobin, men de vil med tiden miste de fleste organeller som fungerer som maskineri for proteinsyntese. Som følge av mangelen på organeller vil en erytrocytt ikke kunne formere seg eller opprettholde strukturen sin over lang tid. Dette medfører at levetiden til disse cellene er på omtrent 120 dager, og omkring 1% av cellene destrueres i milten eller nyrene hver eneste dag. Mesteparten av jernet som slippes fri blir konservert. Et viktig avfallsstoff som kommer fra erytrocyttene, er bilirubin. Dette tas opp i blodets sirkulasjon og gir plasmaet sin karakteristiske gulfarge (Widmaier et al., 2019).

1.2 Blodvolum

Utholdenhetsprestasjon hos atleter karakteriseres ofte av VO_{2maks} , som igjen blir påvirket av både anatomiske og fysiologiske faktorer. Flick's law forklarer at VO_{2maks} avhenger av cardiac output og $avDO_2$ (arteriovenous oxygen difference). Alle faktorer som limiterer en av disse to vil også limitere VO_{2maks} . Av de fysiologiske faktorene som omhandler blod vil totalt blodvolum være den mest begrensende for en utholdenhetsutøvers prestasjon. Årsaken til det er at et lavere blodvolum vil kunne begrense slagvolum og hemoglobinkonsentrasjon, som igjen påvirker O_2 -transporten i blodet og $avDO_2$ (Schmidt et al., 2002). Urente individer som får et økt volum av røde blodceller blir karakterisert med en høy VO_{2maks} (Montero et al., 2017). Studier har vist at kvinner normalt har en lavere VO_{2maks} enn menn grunnet lavere oksygentransport som blir en naturlig konsekvens av lavere totalt blodvolum (Koons et al., 2019). Menneskets totale blodvolum vil variere, og menn vil normalt ha et høyere totalt volum enn kvinner siden høyde og vekt spiller en rolle. Det ble gjort en studie som så på sammenhengen mellom lean body mass (LBM) og blodvolum og Hb_{masse} . Denne studien konkluderte med at LBM vil være et godt antropometrisk referansepunkt for både blodvolum og Hb_{masse} , da korrelasjonen mellom LBM og begge parametrene var sterk på gruppenivå. En noe mindre korrelasjon ble sett hvis man differensierte mellom kjønnene, men korrelasjonen var fortsatt betydelig. Menn vil ha en gjennomsnittlig høyere LBM, samt høyere blodvolum og Hb_{masse} enn kvinner, noe som fører til en bedre korrelasjon. Forklaringen på den sterke korrelasjonen mellom LBM og hematologiske parametere forklares med at blodet har i oppgave å frakte oksygen til musklene. I fysisk arbeid er musklene hovedforbruker av oksygen, samt at muskelmasse er en av de primære determinatorene av LBM (Falz et al., 2019). Et gjennomsnittlig menneske vil ha omtrent 5 liter blod i kroppen. Det finnes formler for å regne ut et menneskes blodvolum basert på høyde, vekt og kjønn. «Nadler Equation» er en metode utviklet av dr. Allen i 1962 som benytter seg av følgende formler:

Menn: $\text{Blodvolum} = (0.3669 \times \text{Høyde}^3) + (0.03219 \times \text{Vekt}) + 0.6041$

Kvinner: $\text{Blodvolum} = (0.3561 \times \text{Høyde}^3) + (0.03308 \times \text{Vekt}) + 0.1833$ (Sharma & Sharma, 2021).

En annen formel for utregning av blodvolum er «Lemmens-Bernstein-Brodsky»-metoden, som er oppkalt etter forskerne som kom opp med formelen. Denne utregningen er tiltenkt være mer nøyaktig for et høyere sprik i vekt og BMI (Body Mass Index). Dette ble gjort fordi forfatterne forklarte at blodvolum reduseres i et ikke-lineært forhold med økende kroppsvekt. Formelen her er lik for begge kjønn og ser slik ut:

$\text{Blodvolum} = 70 / [\text{kvadratrot}(\text{BMI}/22)]$ (Lemmens et al., 2006).

Blodvolumet har en sentral rolle i kroppen for å opprettholde en tilstrekkelig funksjon i celler og andre organer i kroppen. Blodet fungerer som en transportør av næringsstoffer til - og avfallsstoffer fra cellene. Blodvolum har også oppgaven med å opprettholde osmolalitet i kroppen. Begrepet osmolalitet er et mål på hvor mye av et gitt stoff som er løst opp i et annet stoff. Dersom det oppstår en ubalanse mellom stoffene, som gjerne er vann, vil det kunne bli en endring i plasmanivå. Det vil enten kunne øke eller synke som en konsekvens av ubalansen (Sharma & Sharma, 2021).

Det er bevist gjennom flere studier at blodvolumet hos aktive mennesker er betydelig større, helt opp til 20-25% enn det er hos inaktive mennesker i samme aldersgruppe. Disse resultatene kan gjelde for både kvinner og menn og virker å være gjeldende uansett alder. Forskjellene virker å være større, jo større differansen i aktivitetsnivå er mellom individene. En studie har vist at det kan skje en akutt økning i blodvolum gjennom trening som følge av økt plasmavolum. Økningen av blod- og plasmavolum skjer som følge av mekanismer som stimuleres av trening og bidrar til et økt væskeinntak og et redusert væskeutslipp fra urin. Tørsthetsfølelsen etter trening og væskeinntaket som følge av denne overstiger væsketapet fra svette, og resultatet av dette er at vannmengden i kroppen øker. Denne økningen vil normalt flate ut etter omtrent to uker. En videre økning i blodvolum i tiden etter dette vil være som følge av økning i plasmavolum, men også det totale volum av røde blodceller. En økning i volumet av erythrocytter vil oppstå etter 2-3 uker med trening. Denne økningen vil kunne føre til en økning i vaskulært volum som er omtrent 8-10% høyere enn baseline-verdiene (Convertino, 2007; Sawka et al., 2000). En studie som så på effekten av systematisk trening i en periode på 8 uker fikk dokumentert en økning i volum av røde blodceller i uke 4 med en videre økning i uke 8. Gjennomsnittlig så de en økning på 25 ml i uken, noe som tilsvarer verdiene som tidligere hadde blitt målt i moderat trente unge utøvere etter en måned med høydetrening (Montero et al., 2017). Økningen i plasmavolum vil kunne oppstå veldig akutt, i løpet av få timer, mens en økning i erythrocytter vil oppstå mer gradvis over tid. Hormonet erythropoetin (EPO) er med på å regulere produksjonen av erythrocytter. Denne produksjonen er hovedoppgaven til EPO. EPO kontrollerer produksjonen av røde blodceller gjennom å systematisere overlevelse, vekstproduksjon og reproduksjon av celler og differensiering av celler, altså spesialisering av cellens egenskaper. Dette skjer i erythroid progenitors i benmargen. Faktorer slik som ernæring og veksthormon stimulering vil også kunne bidra. (Sawka et al., 2000). EPO er den eneste hematologiske vekstfaktoren som påvirkes av hypoksi. Produksjonen av EPO reguleres av hypoksi som fører til et økt nivå av genuttrykk. Kontrollering av EPO genuttrykk inkluderer en komplisert interaksjon

mellom DNA og nuclear proteiner. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) er blitt identifisert som en sentral faktor for å forsterke genuttrykket av EPO. HIF-1 består av to mindre enheter kalt HIF-1a og HIF-1b. Begge disse enhetene betegnes som PAS-proteiner. PAS er en samlebetegnelse for transkripsjonsfaktorene Per/ARNT/Sim. Hypoksisk induserbarhet i HIF-1 skyldes kun akkumulering i HIF-1a. HIF-1a har egenskaper som gjør at den bedriver syntese uansett oksygenstatus i cellene. Dette gir en veldig rask respons til hypoksi i HIF-1 uten å måtte aktivere transkripsjonsmaskineriet (Lacombe & Mayeux, 1998; Fandrey, 2004).

1.3 Hemoglobin

Proteinet hemoglobin bidrar til transport av oksygen og karbondioksid i kroppen. Hemoglobin transporterer over 98% av det totale oksygenvolumet i en liter blod. Et hemoglobinmolekyl er bygd opp av fire «subunits» som er bundet sammen og hver av disse inneholder et jernatom. Noe som videre betyr at fire oksygen-, karbondioksid- eller koarbonsmonoksid molekyler kan feste seg til hvert hemoglobinmolekyl. Hvor mye oksygen som kan fraktes i per liter blod avgjøres altså av den totale massen av hemoglobin som finnes i blodet. En signifikant reduksjon i hemoglobin, anemi, vil føre til en tydelig begrensning i oksygenkonsentrasjon i blodet til enhver tid som følge av redusert evne til å frakte oksygen. Dersom hematokritten blir lav vil hemoglobinkonsentrasjonen også bli lavere. Årsaksforklaringen til en slik reduksjon i hematokritt vil kunne være et kronisk blodtap, hvor både plasmavolum og volum av røde blodceller naturligvis faller, eller en utilstrekkelig produksjon av erytrocytter i benmargen (Widmaier et al., 2019). Det er vist en tydelig korrelasjon mellom hemoglobinmasse (Hb_{masse}) og aerob kapasitet hos atleter (Lanfranko & Strasburger, 2016). Eliteutøvere i utholdenhetsidrett kjennetegnes som regel med å ha en signifikant forhøyet Hb_{masse} sammenlignet med den friske normalbefolkningen. Prommer et al., (2018) ønsket å se om dette kunne forklares ved at utøverne hadde vært aktive fra de var barn. Studien viste at barn og unge som er trener mer enn 4 timer ukentlig har en 7% høyere Hb_{masse} enn utrente. Studien viste videre en tydelig korrelasjon mellom Hb_{masse} og Lean Body Mass (LBM), og de konkluderte med at LBM er en svært viktig faktor for utvikling av høy Hb_{masse} (Prommer et al., 2018).

1.4 Treningseffekt

Trening på havnivå har normalt ingen effekt på EPO-nivå i plasma, og man kan også si at det er naturlig med lite effekt på EPO produksjon av trening i normoksi. O₂-sensorene som kontrollerer EPO-produksjonen er lokalisert i nyrene, og ikke skjelettmuskulatur eller hjertet som vil oppleve det fremste stimuli av trening på havnivå. Av de hematologiske faktorene er det primært Hb_{masse} som øker mest etter trening på havnivå (Lanfranco & Strasburger, 2016). Montero et al., viste derimot i sin 8-ukers treningsstudie en tidlig økning plasmavolum, EPO-nivå og stress-hormonet kortisol, som har en sentral rolle i produksjonen av røde blodceller. Økningen her flatet ut utover i prosjektet, og etter 8 uker var de tilbake i nærheten av baseline. Etter de 4 første ukene rapporterte de også en økning i volum av røde blodceller. Denne økningen fortsatte frem til uke nummer 8. Utviklingskurven kan, ifølge forfatterne, forklares ved et lavere homeostatisk stress i de tidligere ukene sammenlignet med uke 8 (Montero et al., 2017). Studier viser at utrente friske individer kan oppleve en økning i Hb_{masse} på 5-10% i løpet av en treningsperiode på 6 uker til 9 måneder. Godt trente utholdenhetsutøvere vil kunne oppleve liten (~3%) til ingen økning i Hb_{masse}. Treningseffekt på hav-nivå, alene, vil ikke være nok til å forklare forskjellen i Hb_{masse} mellom toppidrettsutøvere og normalbefolkningen (Steiner et al., 2019).

1.4.1 Varmetrening

En av de mange treningsmetodene som benyttes for å øke prestasjon i utholdenhetsidrett er varmetrening. Trening i et varmt miljø over tid vil blant annet kunne øke plasmavolum med en reduksjon i hematokritt som vil kunne stimulere EPO syntese og igjen øke Hbmassen. En studie så på effekten av å trene 5 uker med varmetrening for syklister, og det ble vist en økning på 4,6% fra baseline i Hbmasse hos varmegruppen. Volum av røde blodceller og totalt blodvolum forble uendret (Rønnestad et al., 2020). Et annet studie med en varighet på 5,5 uker så på effekten av varmetrening på godt trente syklister. Her ble det observert en økning i både plasmavolum og volum av røde blodceller i både varme- og kontrollgruppa. Det ble også observert en økning i Hb_{masse} for begge gruppene. Varmegruppa fikk rapportert en økning på cirka 3%, noe som viste en tendens til høyere økning enn kontrollgruppa. I denne studien blir det foreslått at individer med høy Hb_{masse} får et økt erytropoetisk stimuli av å trene i varme omgivelser. I studien nevnes flere studier som har vist mindre effekt av varmetrening. Forklaringen på de manglende resultatene menes å være varigheten på studiene. Begge de overnevnte studiene har en varighet på 5+ uker og har vist en effekt. Forfatterne mener at

varigheten på varmetreningen må være tilstrekkelig for å oppnå ønsket fysiologisk effekt (Oberholzer et al., 2019).

1.4.2 Høydetrening

En annen treningsmetode som diskuteres jevnlig er høydetrening. Årsaken til at det stadig diskuteres er uvissheten om hvorvidt det er verdt å bruke tid på, og om effekten av det faktisk er til stede. I en review av Lundy & Robach (2016) ble det ikke vist noen overbevisende resultater som kunne gi dem grunnlag til å anbefale høydetrening til atleter. De forklarte likevel at placeboeffekten av å trene i høyden kan være veldig stor og at atleter som har stor tro på det å trene i høyden skal kunne gjennomføre høydetrening (Lundby & Robach, 2016). Gore et al., (2013) viste på sin side en effekt av høydetrening med en økning på 3,3% etter 20 dager i høyden. De konkluderer dermed med at høydetreningsopphold på minimum 2 uker vil kunne være gunstig for å øke Hb_{masse} og derfor være fordelaktig for utholdhetsatleter (Gore et al., 2013).

1.5 Bloddoping

Som beskrevet ovenfor er blodvolum og blodverdier viktige faktorer for prestasjon i utholdenhetsidrett. Som følge av dette har bloddoping i form av blodtransfusjon eller misbruk av recombinant human erythropoetin (rhEPO) blitt mer framtrødende. Det ble innført et øvre tak for hvilke hemoglobinkonsentrasjons- og hematokrittverdier en idrettsutøver kunne ha for å forsøke å forhindre bruken av doping i idretten. Problemet med disse to verdiene er at de er enkelt å styre gjennom trening eller annen manipulerende adferd som for eksempel hydrering. Det er uansett Hb_{masse} som er den faktoren bloddoperne ønsker å øke, da den er vist å være den mest prestasjonsbegrensende faktoren for idrettsutøvere i utholdenhetsidrett. En transfusjon av en eller to enheter med blod vil kunne økte den totale Hb_{massen} med cirka 60 til 120g, mens bruk av rhEPO vil kunne øke Hb_{massen} med omkring 13% (Prommer et al., 2008). For å kunne detektere bloddoping mer effektivt vil det å måle Hb_{masse} være et viktig verktøy. Hvis Hb_{masse} skal kunne brukes aktivt i antidopingarbeid er det viktig å kartlegge hvor mye naturlig variasjon en kan forvente i løpet av et år. En longitudinell studie med 5 målinger i løpet av et treningsår hos 24 toppidrettsutøvere viste en total error of measurements (TEM) på 2,2%. TEM inkluderer typiske eller forventede målefeil, samt biologisk variasjon. Dette tallet viser at den biologiske variasjonen i studien var veldig lav (Prommer et al., 2008).

Hvordan målingene ble gjort i denne oppgaven og dets relevans for antidopingarbeid forklares videre i 2.0 Introduksjon og 3.0 Metode.

2.0 Introduksjon

Bloddoping er et mye omtalt tema innenfor de aller fleste former for utholdenhetsidrett, og det er lite som tilsier at omtalen vil avta med det aller første. Noe av årsaken til dette er at bloddoping er svært enkelt å gjennomføre dersom man innehar litt innsikt i biologisk arbeid, samtidig som det er gir enorme prestasjonsfremmende effekter. Til tross for bloddopingens tydelige innvirkning på idretten, er det vanskelig for world anti-doping agency (WADA) og andre antidopingforbund å detektere dopingsaker, da det ikke finnes gode nok tester for å registrere blodtransfusjon eller misbruk av recobinant human erythropoietin (rhEPO). Årsaken til at blodtransfusjon og bruk av rhEPO er så utbredt som dopingstrategier er at de manipulerer O_2 -transportkapasiteten i arterielt blod, noe som er en enkel prestasjonsfremmende faktor å manipulere (Lundby et al., 2011). EPO-behandling av friske mennesker har vist en økning i [Hb] som følge av økning i volum av røde blodceller og reduksjon i plasmavolum (Lundby et al., 2006). Den prestasjonsfremmende effekten av bloddoping er vist i flere studier. Allerede i 1960 ble det gjort studier som viste at power output på en gitt intensitet ble redusert med cirka 8% etter å ha tatt ut 600mL med blod. Prestasjonen økte med cirka 4% fra baseline etter å ha satt blodet tilbake i kroppen igjen (Solheim et al., 2019). Studier har videre vist at en naturlig høy haematocrit (Htc) ikke er ensbetydende med god prestasjon, mens en naturlig høy hemoglobinmasse ofte er assosiert med en høy VO_{2max} . Manipulasjon med begge disse faktorene vil gi en bedret utholdenhetsprestasjon. Man har blant annet sett en økning i Htc fra 47 til 59 % som følge av blodtransfusjon og en økning i VO_{2max} dersom [Hb] økte med 10% (Lundby et al., 2011).

I et forsøk på å detektere og limitere bruken av doping har WADA opprettet Athlete Biological Passport (ABP). ABP defineres som en individuell og langvarig observasjon av urin og biologiske markører som blir påvirket av manipulasjon av gener eller hormoner som kan føre til økt prestasjon hos idrettsutøvere (Saugy et al., 2014). Tanken med å ha et ABP er at blodtransfusjon, rhEPO-injeksjon eller andre dopingstrategier for å øke mengden røde blodceller vil gi utslag på de hematologiske parameterne som ABP inneholder. Disse er blant annet [Hb] og antall retikulocytter. Disse parameterne er lett manipulert av ikke-doping relatert aktivitet og testene har vist å ha lav sensitivitet (Lundby et al, 2011). I et forsøk på å

forbedre sensitiviteten har det blitt foreslått å inkludere Hb_{masse} som en parameter. En studie viste at OFR-hr (en algoritme basert på [Hb] og prosentandel av retikulocytter) og Hbmr (Hb_{masse} og prosentandel av retikulocytter) var de overlegent mest sensitive metodene for å detektere blodtransfusjon fra 1-4 uker, mens det var Hb_{masse} som var eneste metode som greide å akutt detektere blodtransfusjon. Da blodtransfusjon ofte gjøres akutt med injeksjon og uttak av blod i løpet av få dager virker Hb_{masse} som en nødvendighet for å kunne oppdage disse tilfellene (Mørkeberg et al., 2011). CO-rebreathing er en god metode for å detektere endringer i Hb_{masse} fordi karbonmonoksid er en markør som binder seg lettere til hemoglobin enn det oksygen gjør. Målingene som gjøres med denne metoden er så nøyaktige at de regnes som like god som "gullstandard" med å radioaktivt markere røde blodceller for å måle volum av røde blodceller og plasmavolum. I tillegg til å kunne fremstille lignende resultater som radioaktiv markering er CO-rebreathing assosiert med mindre helserisiko og kan sånn sett vurderes for å ta over tittelen som «gullstandard» (Siebenmann et al., 2017). Da Mørkeberg (2011) publiserte artikkelen var CO-rebreathing metoden vurdert som ugunstig for utøverne som følge av inhaleringen av karbonmonoksid og det ble derfor utelukket at en slik metode kunne brukes i antidopingarbeid. Den oppfatningen har endret seg, og med en standardisert og automatisert metode for gjennomføring blir utøvernes sikkerhet tatt hånd om slik at målingene trygt kan gjennomføres (Siebenmann et al., 2017).

2.1 Problemstilling/hypotese

Med denne teorien som introduksjon vil dette prosjektet se nærmere på Hb-masse og blodvolum og forsøke å finne hvordan naturlige variansen i disse to variablene hos friske eliteutøvere i utholdenhetsidrett, og videre vurdere hvor stor varians man vil kunne forvente over et helårsperspektiv før man vil kunne spekulere i bloddoping. Vi vil se på gruppen som helhet, men også se på kjønnene hver for seg for å se om det kan være forskjeller mellom gruppene.

"Hvor stor er den naturlige variansen i Hb_{masse} og blodvolum hos eliteutøvere i utholdenhetsidrett over et åtte måneders langt perspektiv"

Med hypotesen:

«Jeg tror vi vil se en liten variasjon i Hb_{masse} hos utøverne, men at blodvolum vil ha litt høyere varians som følge av endring i treningsvolum gjennom perioden»

3.0 Metode

3.1 Design

Dette er en longitudinell studie som skal gjennomføres over en tidshorisont på ett år. Samtlige forsøkspersoner skal innom Høgskolen i Innlandet avd. Lillehammer en gang i måneden for å gjennomføre testing av blodvolum og Hb-masse.

3.2 Utvalg

Studiet ønsket å inneholde cirka 20 eliteutøvere i utholdenhetsidrett. Aldersspennet til deltakerne skulle være mellom 18 og 35 år. For å rekruttere forsøkspersoner ble aktuelle lagledere for idrettslag kontaktet, og de ble informert om studiet via et infoskriv med vedlagt kontaktinformasjon til prosjektleder dersom det oppstod spørsmål. Utøvere fra Lillehammer skiklubb, ELON skiklubb og Team Kaffebrenneriet samt noen enkeltstående meldte seg til å delta.

Rekrutteringen ga oss 22 forsøkspersoner som alle var aktive utøvere på høyt nasjonalt nivå i utholdenhetsidrett, primært skiløpere. Alderen på deltakerne strekker seg fra 18-31 år. Høyde, vekt og alder ble registrert hos alle forsøkspersonene ved samtlige test-dager. Av de 22 som var med fra starten var det 20 som fullførte. Av disse var det 4 kvinner og 16 menn. 18 stk var skiløpere, 1 var skiskytter og 1 var kombinertløper.

Alle deltakere fikk beskjed om at deltakelsen ikke var bindende og at de selv stod fritt til å trekke seg uten noe krav om begrunnelse.

3.3 Etiske godkjenninger

Prosjektet har fått etisk godkjenning fra REK.

3.4 Forsøksprotokoll

3.4.1 Urinprøve

Forsøkspersonene leverte en urinprøve ved begynnelsen av hver test-dag. Urinprøven skulle gjennomføres ved ankomst i en utlevert kopp som de ble bedt om å fylle etter beste evne. Innholdet ble analysert med et Atago PEN-Urine S.G. Refraktometer for å måle væskebalanse. Refraktometeret ble satt i destillert vann for å nullstille målingen før det ble ført ned i urinprøven to ganger. Begge resultatene fra refraktometeret ble registrert.

11mL x2 ble overført til BD urin-rør som ble satt rett i frysen på cirka -20 grader.

3.4.3 Venøs blodprøve

Forsøkspersonene ble videre bedt om å sitte i en stol tilrettelagt for venøs blodprøvetaking i 10 minutter. Dette er tidspunkt standardisert fra WADA for å stabilisere blodstrømmen.

Blodprøven ble tatt fra en vene på innsiden av albuen. Fra denne prøven ble det hentet ut et 4ml rør med fullblod og et 9ml rør som ble satt i vertikal posisjon i minimum 15 minutter. Vi standardiserte ventetiden på denne til 30 minutter. Røret på 4ml ble forsiktig vendt 3 ganger før det ble analysert i Sysmex for å finne Hb-konsentrasjon og HCT. Prøven ble kjørt to ganger i Sysmex for å vise at tallene var reliable. HCT og Hb-konsentrasjon ble brukt for å måle blant annet blodvolum i programmet detalo-health. Dette ble gjort samtidig som måling av Hb_{masse} som forklares i 3.4.3. Ved stor differanse mellom prøvene ble de kjørt en tredje gang. Før blodprøven ble analysert, ble det også kjørt to kontrollprøver i Sysmex.

Kontrollprøvene ble levert fra samme leverandør og etter at de ble åpnet hadde de en holdbarhet på 10 dager før det måtte erstattes.

Røret på 9 ml ble, etter 30 minutter, satt til sentrifugering på 2000 omdreininger i 10 minutter for å skille ut serum. Serumet ble pipettert i doser på 900 mikroliter i tre mindre rør som ble direkte satt på frys i -20 grader.

3.4.3 Hb-massemåling

Etter den venøse blodprøven blir forsøksperson henvist til en benk hvor vedkommende skal ligge med beina på en kasse, samtidig som vedkommende har en pute på mage/bryst.

Munnstykket settes sammen og kobles til en slange som igjen er koblet i en syklus som går via CO-kammeret og en beholder med soda lime. Beholderen med soda lime må skiftes mellom hver test. Årsaken til dette er soda limens funksjon som er å samle opp karbondioksid som forsøkspersonen puster ut. Forsøkspersonen får en plastikkhanske med varmt vann for å holde i høyre hånd for å gjøre det lettere å gjennomføre fingerstikk. Testen starter med å gjennomføre et fingerstikk. Fra dette sticket skal tre kapillærrør fylles med blod før de skal vendes godt (cirka 20 ganger). Etter å ha blitt vendt godt blir kapillærrørene satt i ABL800 hvor %HbCO måles. Den første målingen viser den naturlige ansamlingen av CO i kroppen til forsøkspersonen. Vi gjør tre målinger for å sikre reliable resultater. Etter fingersticket kobles forsøkspersonen til munnstykket og får satt på en neseclippe. Det er viktig at både munnstykket og neseclippen er tett for å sikre at forsøkspersonen kun inhalerer den mengden

CO som blir tilført og at vi ikke får gasslekkasjer. Forsøkspersonen blir bedt om å puste normalt gjennom hele testen. De første 15 sekundene puster forsøkspersonen bare O₂ før vedkommende får tilført CO-gass. Etter at CO-gassen er tilført skal forsøkspersonen puste i 6 minutter med munnstykket i munnen. CO-gassen er en giftig gass og blir tilført i moderate mengder (1.0 ml/kg for menn og 0.8 ml/kg for kvinner). Under hele testen vil forsøkspersonen ha tilstrekkelig med O₂ tilgjengelig, men enkelte kan likevel oppleve testen som ubehagelig. Denne ubehagelige følelsen skyldes at det å puste i et lukket system kan være noe tyngre enn normalt. Testen er likevel helt ufarlig. Testleder vil alltid gi oppdateringer på hvor lang tid det er igjen. Etter 6 minutter med rebreath tar FP ut munnstykket og tar av neseklypen. Testleder måler hvor mye CO som er igjen i systemet. Mengden oppgis i ppm. Etter 4 minutter tas det et nytt fingerstikk hvor tre kapillærrør fylles. Disse analyseres på samme måte som før rebreathing. Resultatet fra analysen av blodprøvene fra fingerstikk og mengde CO som er pustet inn gjør at vi kan regne ut Hb_{massen} hos FP gjennom algoritmer i programmet Detalo Health. For å vise at resultatene er reproduerbare gjennomføres samme prosedyre etter en pause på 5 minutter. Ved å gjennomføre testen to ganger vil vi også kunne vurdere feilmarginen på testene våre. Det er på forhånd satt en feilmargin på 2%. Dersom forskjellen mellom test 1 og 2 er på mindre enn 2% vil vi kunne vurdere resultatene som reliable. I denne pausen luftes CO-kammeret og soda lime byttes ut.

3.5 Databehandling og statistikk

Dataene oppgis som gjennomsnitt \pm SD med et statistisk signifikansnivå på 5% ($p < 0.05$). Databehandlingen vil bli gjort i Microsoft Office Excel. Det vil bli brukt en uparet t-test for å se eventuelle forskjeller mellom kvinner og menn i prosjektet. For å finne endringer i Blodvolum, volum av røde blodceller og plasmavolum vil det bli kjørt en One-Way anova-test. Denne testen, samt den grafiske fremstillingen av den vil bli gjort i Graphpad Prism 9.

3.6 Reliabilitet og validitet

For å forsøke å skaffe et resultat som gjenspeiler virkeligheten har vi valgt ut en gruppe utøvere som i best mulig grad skal kunne gjenspeile målgruppen som prosjektet skal kunne vinkles inn på i toppidretten. I tillegg til prosjektet her i Lillehammer vil det samme prosjektet gjennomføres i Lausanne, Sveits og København, Danmark slik at det totale datasettet som skal brukes videre forbi denne masteroppgaven vil gjenspeile virkeligheten i enda større grad. Ved

å benytte oss av en kontrollgruppe vil vi også få en bedre indikator på om variansen hos idrettsutøvere skiller seg ut på noe vis fra den vanlige befolkningen.

For å vise at våre resultater er reproducerbare gjennomføres det alltid doble tester og lagres duplikater av det som skal lagres. Ved å gjøre doble tester reduserer vi sjansen for bias eller datainnsamlingsfeil noe som skal kunne vise at metoden vår, dersom gjennomført likt hver gang, vil kunne produsere samme resultater. Metoden er nøye utviklet av veileder Carsten Lundby med flere, og den er standardisert slik at den enkelt skal kunne reproduceres. I prosjektet er det de samme to personene som arbeider i labben. Dette minimaliserer sannsynligheten for datainnsamlingsfeil da gjennomføringen blir tilnærmet identisk hver gang. Under selve rebreathingen får forsøkspersonene alltid oppfølging med tiden, samt beskjed om når de får dosert inn CO-gass. Dette standardiseres slik at forsøkspersonene får en tilnærmet lik opplevelse av testen hver gang.

4.0 Resultater

4.1 Endringer i Hbmasse og blodvolum

Tabell 4.1 viser laveste og høyeste gjennomsnittlig måling av Hb_{masse} og blodvolum i hele gruppen, samt for kvinner og menn individuelt. Den laveste og høyeste målingen i løpet av de 8 målingene ble valgt ut for hver enkelt forsøksperson, før gjennomsnittet av hver respektive variabel ble regnet ut til slutt.

Tabell 4.1 Høyeste og laveste gjennomsnittlige målinger av Hbmasse og blodvolum for de forskjellige gruppene. Viser gjennomsnitt og (standardavvik)

UTVALG	LAVESTE <u>Hbmasse</u> (g)	HØYESTE <u>Hbmasse</u> (g)	LAVESTE BV (ml)	HØYESTE BV (ml)
Hele gruppen (n=20)	895 g (155)	951 g (167)	5938 ml (846)	6645 ml (952)
Menn (n=16)	940,1 g (122,2)	996,3 g (137,7)	6099,1 ml (747,4)	6826,9 ml (844,3)
Kvinner (n=4)	688,3 g (80,4)	793,3 g (86,7)	4969,8 ml (416,6)	5575,5 ml (516,9)

For å få en oversikt over den naturlige variansen til gruppene ble endringen fra laveste til høyeste gjennomsnittlige måling regnet ut. Som vist i tabell 4.2 ble endringene regnet ut i gram for Hb_{masse} og ml for blodvolum i tillegg til en prosentvis endring for begge variablene.

Tabell 4.2 Gruppevis endring i Hbmasse (g) og blodvolum (ml) fra laveste til høyeste måling, samt prosentvis endring i begge variablene

Utvalg	Endring i Hbmasse (g)	Endring i Hbmasse %	Endring i blodvolum (ml)	Endring i blodvolum %
Hele gruppen (n=20)	56 g (22)	6,3% (2,3)	707 ml (241)*	11,9% (4,0)
Menn (n=16)	56,1 g (24,9)	5,9% (2,5)	727,8 ml (234,5)	11,9% (3,6)
Kvinner (n=4)	51 g (6,4)	7,4% (0,1)	605,8 ml (273,7)	12,2 % (5,7)

Figur 4.1 viser ble ikke funnet noen signifikant økning i Hb_{masse} på gruppenivå 56 g (22) ($p>0,05$). Det var heller ingen signifikant endring hvis man så på menn 56,1 g (24,9) og kvinner 51g (6,4) individuelt.

Gjennomsnittlig hbmasse (g) laveste - høyeste

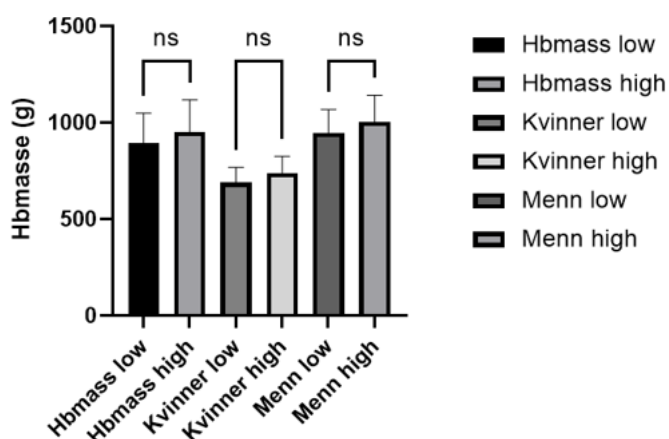


Fig 4.1 Viser endringer i hemoglobinmasse fra gjennomsnittlig laveste, til gjennomsnittlig høyeste måling på gruppenivå (n=20), for kvinner (n=4) og for menn (n=16)

Det ble vist en signifikant økning i blodvolum 707 ml (241) ($p=0.002$). Videre ble det ikke vist noen signifikant endring i volum av røde blodceller 256 ml (132) ($p>0.05$), men man kunne se en signifikant endring i plasmavolum 601 ml (238) ($p=0.01$). Dette vises i figur 4.2.

Differanse i laveste-høyeste verdi

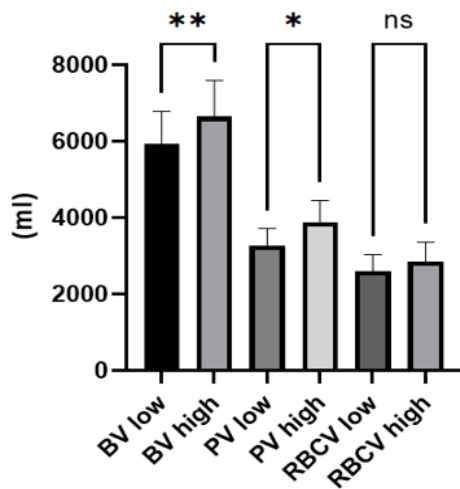
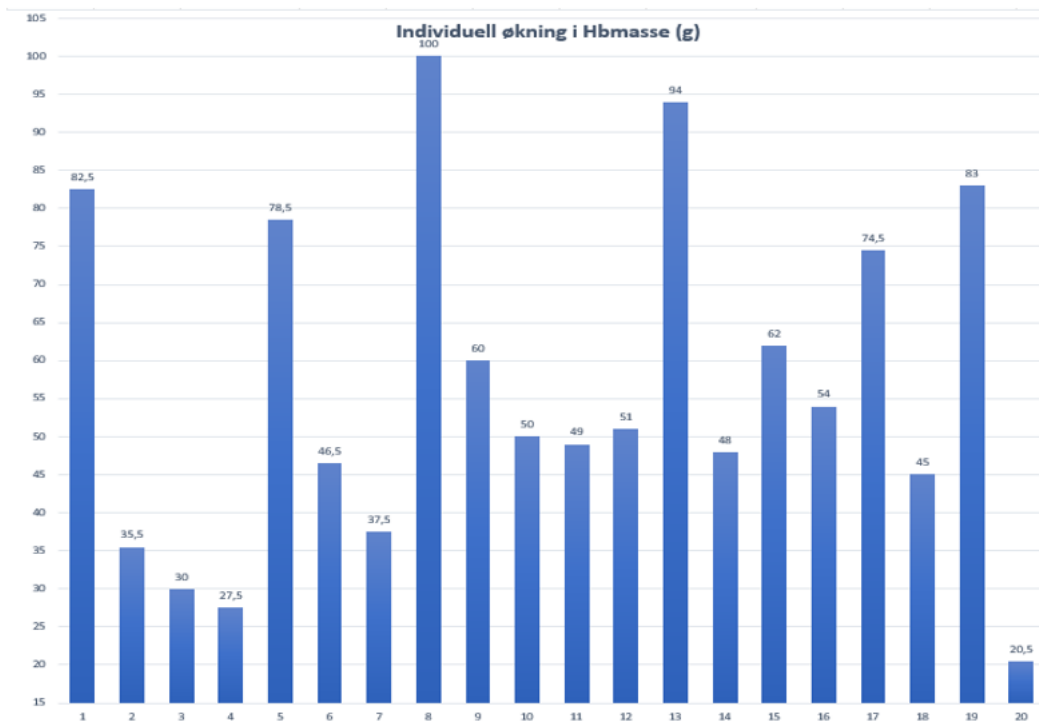


Fig. 4.2 Gjennomsnittlig diff i Blodvolum (BV), plasmavolum (PV) og volum av røde blodceller (RBCV) på gruppenivå fra laveste til høyeste måling.

Videre ble det ikke vist noen signifikant forskjell i resultatene mellom kvinnene og mennene i prosjektet ($p > 0,05$). For å få et bedre bilde av endringen i Hb_{masse} på individuelt nivå ble også alle forsøkspersonenes individuelle økning satt i et diagram for å gi en grafisk fremstilling av økningene. Dette vises i figur 4.3. Her vises det at individene har en varians som strekker seg fra 100 gram (12,3%) på øvre del av skalaen og 20,5 gram (2,8%) på den nedre del. Som vist i tabell 4.1 er disse endringene unntak fra gjennomsnittet da det ligger på henholdsvis 56,1 gram (24,9) for mennene og 51 gram (6,4) for kvinnene.



Figur 4.3 Individuell økning i Hb_{masse} oppgitt i gram.

5.0 Diskusjon

Hensikten med dette studiet var å måle Hb_{masse} og blodvolum hos eliteutøvere i utholdenhetsidrett over et tidsperspektiv på 8 måneder, for å finne den naturlige variansen i disse variablene. Ved å finne den naturlige variansen kunne man videre vurdere det i et antidoping øyemed og sette en grense for hva som kan regnes for en øvre naturlig varians før man kan begynne å mistenke doping. En slik type studie har relevans for antidopingarbeid da det kan føre til at Hb_{masse} potensielt kan bli en del av ABP for å detektere flere dopingtilfeller, i tillegg til å virke skremmende for utøvere som vurderer bloddoping da det kan øke sannsynligheten for å bli tatt.

5.1 Varians i Hb_{masse}

I dette studiet har vi fulgt 20 aktive utholdenhetsutøvere på høyt nasjonalt nivå over 8 måneder og målt deres Hb_{masse} ved bruk av CO-rebreathing metoden (Siebenmann et al., 1985). Disse målingene viste en endring gjennomsnittlig måling på 56 gram, som tilsvarer 6,3% på gruppenivå. Dette er langt lavere enn tallene som Prommer et al., (2008) la frem om at blodtransfusjon vil kunne øke den totale Hb_{massen} med cirka 60 gram for per enhet med blod, mens bruk av rhEPO vil kunne øke Hb_{massen} med opptil 13%. I samme artikkel legger Prommer et al., frem resultatene av en studie hvor de kartla Hb_{masse} hos toppidrettsutøvere over et år, hvor de kun så en økning på 2,2%. Den tilsynelatende store forskjellen på resultatene i denne studien og dette prosjektet kan forklares på flere vis. For det første kan nivået på utøverne spille en rolle her. Steiner et al., (2019) forklarte at godt trente utøvere vil kunne oppleve en mindre økning i Hb_{masse} sammenlignet med mindre trente. I tillegg har ikke dette prosjektet hatt noen oppfølging av treningssituasjonen til utøverne. Vi har derfor ikke tatt høyde for sykdom eller skader i vårt utvalg, noe som kan ha påvirket resultatene. Dette vil jeg likevel trekke frem som en styrke, fremfor en svakhet, i denne sammenhengen. Sykdom og skader kan oppstå for toppidrettsutøvere, og gir derfor et naturlig bilde av variansen. Oppstarten for prosjektet var i oppstarten av treningssesongen, slik at vi har fått oversikt over variasjonen hos utøvere i stigende form gjennom prosjektet. Dette gir et godt bilde på hvordan Hb_{massen} forandrer seg gjennom ulike treningsperioder med ulikt volum. Høyeste individuelle differanse målt av en mannlig utøver var på 100 gram, tilsvarende 12,3%. Hos kvinnene var den høyeste målte variasjonen på 60 gram, tilsvarende 7,5%. Til tross for at vi ikke kunne se en signifikant forskjell mellom kjønnene viste resultatene her en tendens til at menn kan variere noe mer i Hb_{masse} enn kvinner. Kvinnen med laveste økning økte med 7,3% mens

kvinnen med størst økning økte med 7,5%. Hos mennene så man en laveste økning på 2,8% og en høyeste økning på 12,3%. Den større spredningen kan naturligvis forklares med det lave antallet kvinner som deltok i prosjektet (n=4) sammenlignet med menn (n=16). Et mindre utvalg gir naturligvis et mindre godt sammenligningsgrunnlag med befolkningen, men det tegner likevel et bilde. Metoden som benyttes regnes for å ha en feilmargin på cirka 2%, men det er å forvente at denne feilmarginen jevnes ut i dette prosjektet, siden vi har utøverne inne til måling hver måned. En slik jevnlig måling vil styrke sannsynligheten for at endringene i Hb_{masse} skyldes biologisk variasjon, enten som følge av trening eller fravær av trening.

5.2 Varians i blodvolum

Blodvolum blir ofte nevnt som en mulig begrensende faktor for utholdenhetsprestasjon (Schmidt et al., 2002), og det var derfor interessant å se hvordan denne faktoren endret seg over en tidsramme på 8 måneder. Som følge av normalt lavere høyde og vekt har kvinner normalt et lavere totalt blodvolum enn menn, men til tross for dette var det interessant å se at den prosentvise endringen i blodvolum mellom kjønnene var tilnærmet lik, henholdsvis 11,9% for menn og 12,2% for kvinner. På gruppenivå ble det vist en signifikant økning i blodvolum fra laveste til høyeste måling ($p=0.002$). En slik økning vil være forventet, gitt at blodvolum i stor grad påvirkes av vekt (Sharma & Sharma, 2021). Over en periode på 8 måneder vil man oppleve naturlige svingninger i vekt hos idrettsutøvere. Blodvolum vil kunne påvirkes ganske kraftig av treningsstatus på kort tid som følge av endring i kroppssammensetning, samtidig som man kan oppleve en rask respons i økt plasmavolum (Convertino, 2007; Sawka et al., 2000). Ser vi dypere inn i det er det plasmavolumet som har hatt en tydelig endring, noe som gir mening sammenlignet med henvist litteratur hvor Montero et al., (2017) forklarer at plasmavolum er av de hematologiske verdiene som stiger raskest etter trening. Siden prosjektet ikke inneholdt noen kontroll over utøvernes treningshverdag kan for eksempel en treningsbolk hos flere av utøverne være årsaken til at det gjennomsnittlige blodvolumet øker signifikant fra laveste til høyeste måling. Som følge av at utøverne ble målt fra starten av sesongoppkjøringen og inn i sesong er det forventet at man opplever svingninger i blodvolum. Resultatene her kan, i likhet med Hb_{masse} , mulig være påvirket av perioder med sykdom og skader som gir lavere målinger, men det er å forvente at datainnsamlingen over en tidsramme på 8 måneder likevel gir en god fremstilling av naturlig varians.

4.3 Antidoping

Med disse resultatene som utgangspunkt er en viktig del av oppgaven å vurdere hvor mye naturlig varians man kan forvente i Hb_{masse} hos toppidrettsutøvere i utholdenhetsidrett. Først og fremst må mulige feilkilder i metoden vurderes. Pottgiesser et al., (2007) viste i en studie at CO-rebreathing metoden er svært treffsikker og at de i nevnte studie greide å måle en tydelig reduksjon i Hb_{masse} etter tapping av blod, samtidig som de målte verdier tett opp mot baseline dagen etter hvor blodet ble satt tilbake. Selve gjennomføringen av metoden er nøye testet og vurdert for å være den mest presise måten å måle Hb_{masse} på, og dermed ligger den største feilkilden hos oss som testledere. Sannsynligheten for feilmåling er utvilsomt til stede i en sånn type test, da fingerstikk og fylling av kapillærrør er en ferdighet som har lav feilmargin. For å redusere sannsynligheten for målefeil er testleder den samme ved alle tester, og vedkommende har masse erfaring med gjennomføring av testen. Det ble også målt duplikater av alle tester for å sikre en differanse på $<2\%$ mellom testene. Til tross for dette kan man aldri garantere for at testene er 100% reliable og det må derfor vurderes en feilmargin i resultatene fra prosjektet. Hele utvalget viste en gjennomsnittlig økning på 56 gram. Legger man til de 2% som regnes for å være feilmargin ved metoden får man 57,1 gram. På individuelt nivå ble det målt en økning på 100 gram hos en av utøverne. Denne økningen er betydelig høyere enn hva Prommer et al., (2008) la frem i sin studie, men som nevnt tidligere er det en mulig forskjell i nivået på utøverne som kan ha påvirkning på variansen. Med månedlige målinger uten store svingninger fra måling til måling som grunnlag er det troverdig å kunne si at en økning på 100 gram i Hb_{masse} i løpet av en periode på 8 måneder er å regne som naturlig varians. Økningen er tett opp mot det Prommer et al., (2008) hevdet at rhEPO eller blodtransfusjon ville kunne føre til, men effekten av disse dopingstrategiene vil være mer akutt. Dersom man detekterer en økning på >100 gram eller noe som tilsvarer 13% i Hb_{masse} over et mye mindre tidsrom enn det dette prosjektet gapet over, vil det være naturlig å kunne vurdere det som en unormal økning. Likevel skal man være forsiktig med å være for påståelig, da utvalget i denne studien ikke er tilstrekkelig til at man kan konkludere med noe. Ønskelig burde man hatt en kontrollgruppe med friske, ikke-aktive, personer slik at man kunne sammenlignet endringene og videre kunne konkludert enda klarer på hvor mye variasjon man faktisk kan forvente hos toppidrettsutøvere.

6.0 Konklusjon

Basert på resultatene fra dette prosjektet, og lignende studier som er gjort tidligere, virker Hb_{masse} å være relativt stabil over lengre tid. Flere studier med en større sample size bør nok gjennomføres før man konkluderer, men tendensen viser til at Hb_{masse} er noe som kan brukes i antidopingarbeid i fremtiden. Blodvolum er ikke stabil på samme måte, noe som er naturlig da det i større grad kan påvirkes av konsentrasjonsverdier som er lett manipulerbare. Skal man få noe utbytte av blodvolum-målingene bør de trolig settes i sammenheng med treningsvolum hos utøverne slik at man enklere kan forklare eventuelle endringer.

Litteratur

Convertino V. A. (2007). Blood volume response to physical activity and inactivity. *The American journal of the medical sciences*, 334(1), 72–79.

<https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318063c6e4>

Falz, R., Fikenzer, S., Hoppe, S., & Busse, M. (2019). Normal Values of Hemoglobin Mass and Blood Volume in Young, Active Women and Men. *International journal of sports medicine*, 40(4), 236–244. <https://doi.org/10.1055/a-0826-9235>

Fandrey J. (2004). Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(6), R977–R988. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00577.2003>

Jelkmann W. (2016). Erythropoietin. *Frontiers of hormone research*, 47, 115–127.

<https://doi.org/10.1159/000445174>

Koons, N. J., Suresh, M. R., Schlotman, T. E., & Convertino, V. A. (2019). Interrelationship Between Sex, Age, Blood Volume, and Vo_{2max} . *Aerospace medicine and human performance*, 90(4), 362–368. <https://doi.org/10.3357/AMHP.5255.2019>

Lacombe, C., & Mayeux, P. (1998). Biology of erythropoietin. *Haematologica*, 83(8), 724–732.

Lemmens, H. J., Bernstein, D. P., & Brodsky, J. B. (2006). Estimating blood volume in obese and morbidly obese patients. *Obesity surgery*, 16(6), 773–776.

<https://doi.org/10.1381/096089206777346673>

Lundby C, Robach P, Saltin B. The evolving science of detection of 'blood doping'. *Br J Pharmacol*. 2012 Mar;165(5):1306-15. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01822.x.

Lundby, C., Thomsen, J. J., Boushel, R., Koskolou, M., Warberg, J., Calbet, J. A. L., & Robach, P. (2006). Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. *The Journal of Physiology*, *578*(1), 309–314. doi:10.1113/jphysiol.2006.122689

Montero, D., Breenfeldt-Andersen, A., Oberholzer, L., Haider, T., Goetze, J. P., Meinild-Lundby, A. K., & Lundby, C. (2017). Erythropoiesis with endurance training: dynamics and mechanisms. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *312*(6), R894–R902. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00012.2017>

Mørkeberg, J., Sharpe, K., Bellhage, B., Damsgaard, R., Schmidt, W., Prommer, N., ... Ashenden, M. J. (2011). *Detecting autologous blood transfusions: a comparison of three passport approaches and four blood markers*. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *21*(2), 235–243. doi:10.1111/j.1600-0838.2009.01033.x

Oberholzer, L., Siebenmann, C., Mikkelsen, C. J., Junge, N., Piil, J. F., Morris, N. B., Goetze, J. P., Meinild Lundby, A. K., Nybo, L., & Lundby, C. (2019). Hematological Adaptations to Prolonged Heat Acclimation in Endurance-Trained Males. *Frontiers in physiology*, *10*, 1379. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01379>

Pottgiesser, T., Umhau, M., Ahlgrim, C., Ruthardt, S., Roecker, K., & Schumacher, Y. O. (2007). Hb mass measurement suitable to screen for illicit autologous blood transfusions. *Medicine and science in sports and exercise*, *39*(10), 1748–1756. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e318123e8a6>

Prommer, N., Sottas, P. E., Schoch, C., Schumacher, Y. O., & Schmidt, W. (2008). Total hemoglobin mass--a new parameter to detect blood doping?. *Medicine and science in sports and exercise*, *40*(12), 2112–2118. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181820942>

Prommer, N., Wachsmuth, N., Thieme, I., Wachsmuth, C., Mancera-Soto, E. M., Hohmann, A., & Schmidt, W. (2018). Influence of Endurance Training During Childhood on Total Hemoglobin Mass. *Frontiers in physiology*, *9*, 251. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00251>

Rønnestad, B. R., Hamarsland, H., Hansen, J., Holen, E., Montero, D., Whist, J. E., &

Lundby, C. (2021). Five weeks of heat training increases haemoglobin mass in elite cyclists. *Experimental physiology*, 106(1), 316–327. <https://doi.org/10.1113/EP088544>

Saugy, M., Lundby, C. & Robinson N. Monitoring of biological markers indicative of doping: the athlete biological passport. *British Journal of Sports Medicine* 2014;48:827-832.

Sawka, M. N., Convertino, V. A., Eichner, E. R., Schnieder, S. M., & Young, A. J. (2000). Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Medicine and science in sports and exercise*, 32(2), 332–348. <https://doi.org/10.1097/00005768-200002000-00012>

Schmidt, W., Heinicke, K., Rojas, J., Manuel Gomez, J., Serrato, M., Mora, M., Wolfarth, B., Schmid, A., & Keul, J. (2002). Blood volume and hemoglobin mass in endurance athletes from moderate altitude. *Medicine and science in sports and exercise*, 34(12), 1934–1940. <https://doi.org/10.1097/00005768-200212000-00012>

Sharma, R., & Sharma, S. (2021). Physiology, Blood Volume. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Siebenmann C, Keiser S, Robach P, Lundby C. CORP: The assessment of total hemoglobin mass by carbon monoxide rebreathing. *J Appl Physiol* (1985). 2017 Sep 1;123(3):645-654. doi: 10.1152/jappphysiol.00185.2017.

Solheim, S.A., Bejder, J., Breenfeldt Andersen, A. et al. *Autologous Blood Transfusion Enhances Exercise Performance—Strength of the Evidence and Physiological Mechanisms. Sports Med - Open* 5, 30 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40798-019-0204-1>

Steiner, T., Maier, T., & Wehrlin, J. P. (2019). Effect of Endurance Training on Hemoglobin Mass and $\dot{V}O_2\text{max}$ in Male Adolescent Athletes. *Medicine and science in sports and exercise*, 51(5), 912–919. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001867>

Widmaier, E. P., Raff, H. & Strang, K. T. (2019). *Vander's Human Physiology – The Mechanism Of Body Function* (15. utgave). Mc Graw Hill Education

