

운동선수들의 혈액분석을 통한 Erythropoietin 간접도핑검사

이정란 · 김소영 · 홍지연 · 김명수 · 최명자[#]

한국과학기술연구원 상체대사연구센터

(Received September 22, 2003; Revised December 8, 2003)

Blood Analysis for Indirect Doping Control of Erythropoietin in Sports

Jung Ran Lee, So Young Kim, Ji Youn Hong, Myungsoo Kim and Myung Ja Choi[#]

Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology,
39-1 Hawolgok-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

Abstract — The use of recombinant human erythropoietin (rhEPO), a stimulator of erythropoiesis, banned in sports because of the medical risk associated with thrombosis. Due to analytical difficulties to differentiate between natural human EPO (hEPO) and rhEPO, blood parameters of erythropoiesis such as contents of hemoglobin (cut-off value <17.5 g/dl for man, and <16.0 g/dl for women), hematocrit and reticulocytes (cut-off value <2.0%) were measured to focus the misuse of rhEPO. We conducted anti-doping test for 122 blood samples of the World Cup athletes. The mean values of key parameters are as follows; 14.5 ± 1.0 g/dl for hemoglobin, $41.7 \pm 2.8\%$ for hematocrit, and $1.3 \pm 0.4\%$ for reticulocyte. Blood sample was found to be stable up to 8 hours for the reticulocyte measurement. In addition, the soluble transferrin receptor and ferritin levels were measured by immunoassay methods using plasma samples (n=28) in which the mean value was 0.8 ± 0.5 μ g/ml and 54.6 ± 33.7 ng/ml, respectively. The results indicate that all samples tested were negative for the blood parameters of indirect anti-doping test for hEPO misuse. The statistical evaluation suggest that several other parameters such as red blood cell, mean corpuscular hemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and white blood cell could be considered as factors influencing hEPO function in addition to five parameters mentioned.

Keywords □ erythropoietin (EPO), blood doping, athletes

운동선수들의 금지약물테스트 중 혈액도핑이 처음으로 문제화된 것은 1970년대로서, 수혈을 통해 적혈구를 인위적으로 증가시키면 산소흡입량이 증가하며 따라서 내구력을 요하는 수영, 사이클링, 크로스컨트리스키와 같은 운동종목에서는 경기의 성적을 증진시키는 결과를 가져오는 것으로 보도된 이후부터이다. 그 후 1980년대 후반에 들어서는 수혈에 의한 도핑이 아니라 적혈구생성촉진인자인 인체에리트로포이에틴(human erythropoietin; hEPO)을 유전공학기법으로 개발한 재조합인체에리트로포이에틴(recombinant hEPO; rhEPO)을 투약하는 형태로 바뀌었다.

hEPO는 적혈구생성을 촉진시킬 뿐 아니라 내피세포와 혈소판을 활성화시켜 혈소판의 양을 증가시키는 것으로 알려졌다. 그러므로 운동선수들의 rhEPO 오남용은 경기 중의 수분손실과 함

께 적혈구용적비인 헤마토크리트(hematocrit; HCT)를 증가시키게 되며, 이는 점성의 혈액으로 혈전을 유발시켜 심장, 폐, 뇌에서 혈관폐색으로 사망할 수 있는 위험성을 내포하고 있다.¹⁾ hEPO는 골수에 적혈구생성을 자극하는 당단백질(MW 30.4 KDa)로서²⁾ 적혈구세포의 생성을 조절하는 주요인자로 작용하므로 신장장애로 인한 빈혈을 가진 환자를 의학적으로 치료하는 데 사용된다. 발표자료에 의하면 hEPO가 산소소비를 증가시켜서 운동효율을 강화시키므로 운동선수들이 이를 남용할 수 있음을 보여준다.³⁾

2000년 시드니올림픽 이후 금지약물목록에 hEPO가 추가되면서 약물로서 사용되는 rhEPO를 검색할 수 있는 방법들이 많이 연구되고 있다. rhEPO는 hEPO에서 클론화하여 생산하고 있다. rhEPO는 내인성의 hEPO와 인체내 작용은 동일하나 분자구조에서 당쇄부위인 sialic acid의 분자량과 결합부위가 다른 것으로 알려졌으며, rhEPO를 제조하는 회사에 따라 그 구조가 조금씩 차이가 나며 이에 따라 isoelectric point 값이 다른 것으로 알려졌다. 그러나 rhEPO를 투약한 후 대사과정을 거쳐 나타나

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-958-5062 (팩스) 02-958-5059
(E-mail) cmj474@kist.re.kr

는 대사체에 대해 내인성 hEPO와 rhEPO를 구별하는 것은 쉽지 않으며, 그 차별성을 검증하기 위해 많은 연구가 진행 중에 있다.

그리하여 2000년 시드니올림픽에서는 hEPO를 투약했을 때 나타나는 생리활성변화를 촉진시키는 parameter들을 측정함으로써 간접적으로 hEPO 투약 가능성의 지표로 활용하였다. 이는 혈구구성 및 혈액성분 parameter들로서 헤모글로빈농도 (HGB g/dl), 헤마토크리트용적비 (% HCT), 신생적혈구비율 (% Retic)을 측정하도록 규정하였다. 이와 같이 rhEPO를 혈액에서 간접 측정 후 양성으로 나타나면 뇨시료에서 isoelectrofocusing을 이용하여 hEPO 대사체를 직접 측정하도록 규정하고 있으며, 2001년 Salt Lake 동계올림픽에서는 이에 대한 양성반응이 3건이 나타난 바 있다. 따라서 2002년 FIFA 월드컵대회에서도 처음으로 hEPO 오남용검사를 위한 혈액도평검사가 실시되었다.

hEPO는 그 반감기가 몇 시간 정도로 매우 짧아, hEPO를 직접 검출하여 투약여부를 확인하는 것은 어렵다. 반면에, 간접적인 생리활성검사는 혈액속의 적혈구가 100일 이상 계속하여 상존하기 때문에 hEPO 투여가 중단된 이후에도 복용가능성을 검증할 수 있는 장점이 있다.⁴⁾ 신생적혈구(reticulocyte; Retic)는 미성숙적혈구이다. 성숙한 적혈구는 핵이 없는 원판모양의 세포이나, 새로이 형성된 미성숙 적혈구가 골수에서 벗어날 때는 분산된 핵 잔유물을 함유하며 이것이 적혈구로 성숙하면서 핵이 완전히 소멸된다. 그러므로 신생적혈구를 검출하는 데는 이 핵물질을 염색하여 flow cytometry에 의해 적혈구와 분리하여 신생적혈구만을 정량할 수 있다. 본 실험에서는 일반 혈액학적 변수를 측정하는데 hematology system을 사용하였다.

그 외에 rhEPO 약물검사의 지표인자들을 찾고자 수많은 시도가 있었다.⁵⁻⁸⁾ 이러한 것들은 새로운 혈구세포 생산에 관여하는 철인자 대사와 관련된 단백질 지표인자들로서 가용성트랜스페린수용체(soluble transferrin receptor; sTfR)와 ferritin을 들 수 있다. sTfR 검사는 조직세포 표면에 존재하는 트랜스페린수용체가 단백질분해 작용에 의해 절단되어 생성된 74 KDa의 유리형 sTfR를 혈장 중에서 측정하는 것이다.^{9,10)} 혈장 중 sTfR 농도는 적혈구 조혈의 활성도를 반영하고 조직 내 이용가능한 철분량을 반영한다. 이는 효소면역측정법 키트를 사용하여 측정하였다. 혈장 ferritin 농도는 일반적으로 체내 저장된 철 상태를 파악하는 검사로서 다른 골수검사를 통해 저장된 철 정도를 판정하는 것보다 용이하므로 혈장 중 ferritin 검출에 의존하는 경우가 많다.¹¹⁾ 자동화된 미립자효소면역법키트를 이용하여 측정하였다.

서울에서 실시한 2002 월드컵의 123명 운동선수들의 hEPO 약물검사를 위하여 혈액학적 지표인 헤모글로빈, 헤마토크리트와 신생적혈구를 평가하였고, sTfR과 ferritin의 혈장농도도 분석하였다. 또한 측정된 변수들에 대한 통계분석을 통해 그 외의 유용한 지표인자를 조사하였다.

실험방법

Hematology system(ADVIA 120; Bayer Diagnostics, Bayer Co., Tarrytown, NY, U.S.A.)과 시약

혈액시료에 대한 일반 혈액검사는 hematology 측정기기인 ADVIA 120을 이용하여 측정하였다. 이 기기에 사용하는 시약은 calibrator, control, 검사항목에 따른 특정시약들과 기기세척시약들로 구성되어 있다. Control은 3 level로 구성되어 있으며, 조류혈청을 matrix로 사용하였다. 검사항목에 따른 특정시약들은 complete blood cell 검사시약, differential cell 검사시약, reticulocyte 검사시약으로 구성되어 있다.

Soluble Transferrin Receptor Immunoassay Kit(IDEA[®] sTfR IEMA Kit; Orion Diagnostica, Orion Co., Espoo, Finland)과 시약

이 키트는 항체로 코팅한 microtiter plate와 효소접합항체를 적용한 샌드위치형식의 효소면역분석원리를 이용했으며, 수동형의 정량분석키트로써 혈장이나 혈청을 시료로 사용하여 분석하고 있다. 이 키트는 단일클론항체로 코팅된 microtitre strip(12 × 8 wells), standard, control(2 level), 효소접합항체, assay buffer, 농축효소기질액(p-nitrophenyl phosphate), 기질 buffer, 반응정지액, 시료희석액, 농축세척액으로 구성되어 있다. sTfR 표준액은 6 level(0, 0.4, 1.5, 2.8, 5.4, 9 µg/ml)로서 인간혈청을 사용하였다. 효소접합항체는 alkaline phosphatase를 sTfR 단일클론항체에 접합시켰다. 분석방법은 사용지침서를 따랐으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 얻었다.

Ferritin Microparticle Enzyme Immunoassay Kit(IMX Ferritin MEIA Kit; Abbott Labs., Abbott Park, IL, U.S.A.)과 시약

이 키트는 기기자동화된 미립자효소면역분석법(microparticle enzyme immunoassay; MEIA)을 이용하였다. 효소접합항체, 미립자접합항체가 시료 중 ferritin과 반응하여 샌드위치형식의 면역체복합체를 형성하면 이를 glass fiber matrix에 여과시킨 후 효소기질로 반응시켜 나타나는 형광물질의 생성율을 측정(Ex/Em=359~371 nm/450~455 nm)하여 정량 분석할 수 있다. 이 키트는 6 level의 calibrator(0, 10, 50, 250, 500, 1000 ng/ml), reagent pack, 3 level의 control로 구성되어 있으며, 혈장이나 혈청을 시료로 사용한다. Reagent pack은 미립자접합항체, alkaline phosphatase 접합항체, 효소기질(4-methylumbelliferyl phosphate), 시료희석액으로 구성되어 있다.

혈액시료, 혈장시료

시료는 3 ml용 vacutainer(K3E 7.5% 0.072 ml; BD, U.S.A.)

를 사용하여 채혈했으며, 운동선수들의 혈액은 경기 직후 채취하여 사용시까지 4°C에 보관하였다. Hematology system은 whole blood 상태의 시료를 사용하며, 분석 전에 시료를 실온으로 맞춘 후 rotator(Barnstead|Thermolyne, IA, U.S.A.)로 약 5분간 흔들어 균일한 상태로 만든 후 실험하였다. sTfR IEMA Kit과 Ferritin MEIA Kit에 사용한 혈장시료는 hematology system에서 실험한 직후 3,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 얻었다. 혈장은 -20°C로 보관했으며, 실온으로 맞춘 후 실험하였다.

Hematology system 방법

기기 사용법에 따라 실험하였으며, 결과측정은 cytochemical staining 값과 light scattering 값 및 흡광도를 상호 비교, 보정하여 사용하였다. 필요한 검체량은 최소 300 μ 이며, 3종류 control이 hematology parameter(HGB, HCT, Retic)들의 예상범위 내의 값을 갖는지를 체크한 후 각각의 시료에 대한 parameter를 평가하였다.

sTfR IEMA Kit 방법

항체로 코팅된 microtiter strip에 standard, control, 혈장시료를 각각 20 μ 씩 가하고 assay buffer(200 μ)를 가한 후 실온에서 1시간 동안 흔들어 주었다. 세척액(350 μ)으로 4번 세척한 후, 흡수지에 blotting하여 잔류용액의 물기를 완전히 없앴다. 즉시 조제한 효소접합항체(200 μ)를 가해 실온에서 1시간 흔들어 준 후, 위의 세척과정을 반복하였다. 효소기질용액(200 μ)을 가한 후 차광상태에서 30분간 실온에서 반응시켰으며, 반응정지액(50 μ)을 가하여 1~2분간 흔들어준 후, 405 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. Control 값들이 예상치 범위 내에 드는지를 확인 후 duplicate로서 시료를 평가하였다.

Ferritin MEIA Kit 방법

자동분석기기의 carousel에 reaction cell을 넣고 reagent pack을 사용하여 calibrator와 control에 대한 결과를 얻었다. 표준곡선이 적중범위 안에 들면, control과 시료(200 μ)를 사용하여 결과를 얻었다. control 값이 예상치 안에 드는지를 체크한 후, 각 시료를 평가하였다. 표준곡선은 duplicate assay로, 시료는 single assay로 수행하였다.

표준곡선 확립 및 시료값 계산

표준곡선수식(standard curve equation)은 sTfR IEMA kit의 경우, y축에 405 nm에서의 OD 값을, x축에 sTfR 농도(μ g/ml)를 log-log scale로 plot하여 직선식(linear regression equation)을 얻었으며, Ferritin MEIA kit의 경우, y축에 형광반응속도(fluorescence response rate)를 x축에 페리틴 농도(μ g/ml)를 log-log scale로 plot하여 직선식을 얻을 수 있었다.

통계분석(Statistical analysis)

일반 혈액학적 검사항목들과 철대사 지표(sTfR, ferritin)에 대해 각각의 상관관계를 조사하여 유의성을 비교하였다. 통계처리에는 SAS(V8.1) 통계프로그램을 이용하여 각 변수들에 대한 correlation과 regression을 시행하여 유의적인 변수를 조사하였고, 또한 각 항목별 상관관계를 구하여 $P < 0.05$ 를 유의한 것으로 분석하였다.

실험결과

일반 혈액학적 분석

hEPO 기능성에 대한 효과를 간접적으로 측정하기 위한 일반 혈액학적 검사항목으로서 헤모글로빈 농도(HGB g/dl), 헤마토크리트 용적비(% HCT), 신생적혈구 비율(% Retic)을 측정하였다. 예비시험으로서 일반 남여를 대상으로 진공채혈기(vacutainer)의 진공상태와 채혈경과시간에 따른 변화를 30분 간격으로 조사하였다. 그 결과 전반적으로 3시간 이후에 안정적인 수치를 나타냈으며, 성별에 따른 결과치에서 남자는 9시간, 여자는 8시간 정

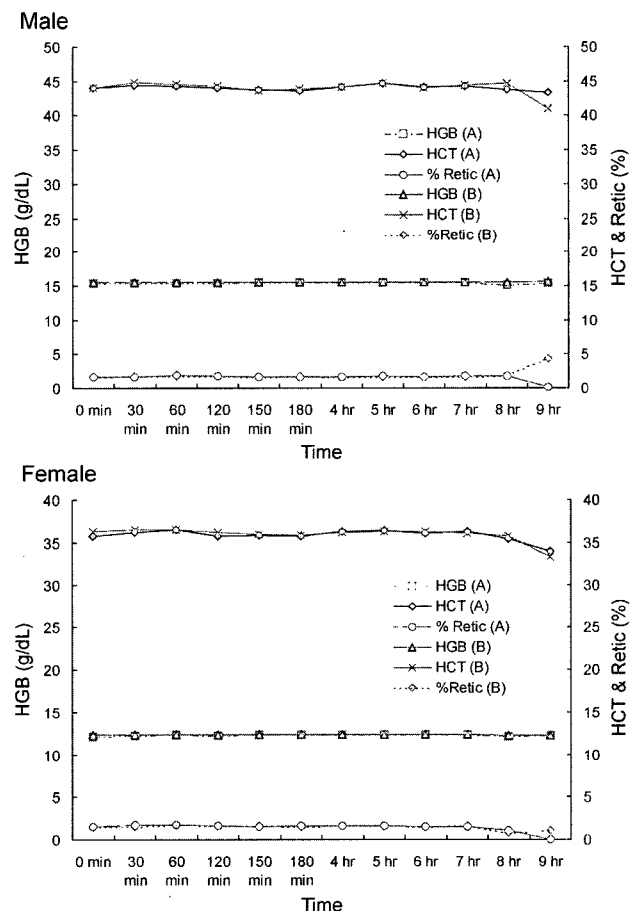


Fig. 1 – Stability of blood parameters in ADVIA 120 hematology system. A: with vacuum state, B: without vacuum state.

Table I – Intra-assay precision for controls of hemoglobin, hematocrit and reticulocyte

	HGB (g/dl)			HCT (%)			Retic (%)		
	C1 ^a	C2 ^b	C3 ^c	C1	C2	C3	C1	C2	C3
	N	23	23	23	23	23	23	23	23
Mean	5.9	12.5	17.4	16.9	35.4	47.5	8.1	4.0	1.1
SD	0.05	0.07	0.09	0.23	0.54	0.53	0.61	0.34	0.12
% CV	0.82	0.55	0.55	1.38	1.52	1.12	7.46	8.43	11.28

^aC1: Abnormal 1.

^bC2: Normal.

^cC3: Abnormal 2.

도까지 안정적인 수치를 나타냈다. 따라서 채혈 후 8시간 이내에 측정해야 하며, 진공채혈기의 진공상태는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

기기의 검체흡입모드를 선택하기 위해 control과 혈액시료를 대상으로 예비실험을 수행하였다. 검체흡입모드는 3가지 형태로써, 자동으로 흡입할 수 있는 automated closed tube(AC)와 수동식으로 manual open tube(MO), manual closed tube(MC)를 사용할 수 있었다. 감염의 위험성과 안전도, 시간절약 등을 고려하여 실시한 결과, control에서 AC와 MC의 결과가 별차이가 없으므로 편리성에서 AC를 선택하였다. 혈액시료에서도 모드별에 따른 값의 차이가 적어 MC를 선택했으며, 채취한 혈액량이 적은 경우 부득이하게 MO 방식으로 행하였다. 측정한 혈액시료 중 HGB 농도, % HCT, % Retic에 대해 책정한 판정기준에서 벗어나는 시료는 5번 이상 더 측정하였다. 특히, % Retic 값이 계속해서 낮은 값을 나타내면 혈장희석제를 사용했을 가능성이 있으며, 높은 값을 나타내면 hEPO 도핑이 의심스러우므로 잠정적으로 양성판정을 하였다.

Hematology system의 정도관리를 위해 3 level의 control을 사용하였다. 날짜에 따른 23 batch assay의 HGB 농도, % HCT, % Retic 값의 variation을 통계적으로 분석하여 intra-assay precision으로 표시하였다. HGB의 경우 control의 평균치 5.9,

Table II – Range of each blood parameter for athletes

Parameter	Normal		Total population			Out-lier (%)
	mean±SD	Range ^a	n	Min	Max	
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	9.3±3.4	2.6~15.9	122	2.9	19.5	0.8
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	4.8±0.4	4.2~5.3	122	3.4	5.9	5.7
HGB (g/dl)	14.5±1.0	12.8~16.1	122	10.8	17.8	4.1
HCT (%)	41.7±2.8	37.3~46.2	122	29.7	49.6	5.7
MCV (fl)	87.6±3.2	81.7~93.4	122	80.1	96.1	3.3
MCH (pg)	30.4±1.4	28.2~32.9	122	26.5	33.2	4.9
MCHC (g/dl)	34.7±0.9	33.1~36.3	122	32.2	37.6	4.9
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	231.0±45.0	148.7~308.8	122	133.0	393.0	3.3
Retic (%)	1.3±0.4	0.6~1.9	122	0.6	3.1	3.3
sTfR ($\mu\text{g/ml}$)	0.8±0.5	0.1~1.4	28	0.3	2.5	3.6
Ferritin (ng/ml)	54.6±33.7	-10.4~114.3	28	9.7	127.1	3.6

^aRange: 95% confidence limit.

12.5, 17.4 g/dl에서 변이계수(CV)가 0.55~0.82%이고, HCT는 평균치 16.9, 35.4, 47.5%에서 CV가 1.12~1.52%였으며, Retic은 평균치 8.1, 4.0, 1.1에서 CV가 7.46~11.28%이었다(Table I).

이를 바탕으로 혈액시료를 측정된 결과, 혈장희석제를 사용했을 가능성이 있는 시료는 5개였고, hEPO 도핑이 의심되는 시료는 1개(Retic 3.1%)였다. 따라서, 총 운동선수 123명의 시료 중 의심되는 1개의 시료를 제외한 122개의 혈액시료를 분석한 결과는 Table II와 같다. 따라서, 혈액시료 중 의심되는 1개 시료만을 제외한 122개의 혈액 시료를 분석한 결과, 모든 시료가 판정기준 범위이내의 값을 나타냈으므로 음성으로 판명되었다.

혈 지표에 대한 Soluble Transferrin Receptor와 Ferritin 분석

혈액시료에서 혈액학적 검사가 끝난 후, 혈장을 분리하여 sTfR와 철대사 지표인 페리틴을 면역학적 분석법으로 정량하였다.^{12,13)}

표준곡선 및 표준곡선 범위 – 키트마다 각각의 표준물질을 사용하여 보정한 calibrator를 사용했으며, sTfR IEMA kit는 0~10 $\mu\text{g/ml}$ 의 표준곡선범위를 사용하였고, Ferritin MEIA kit는 0~

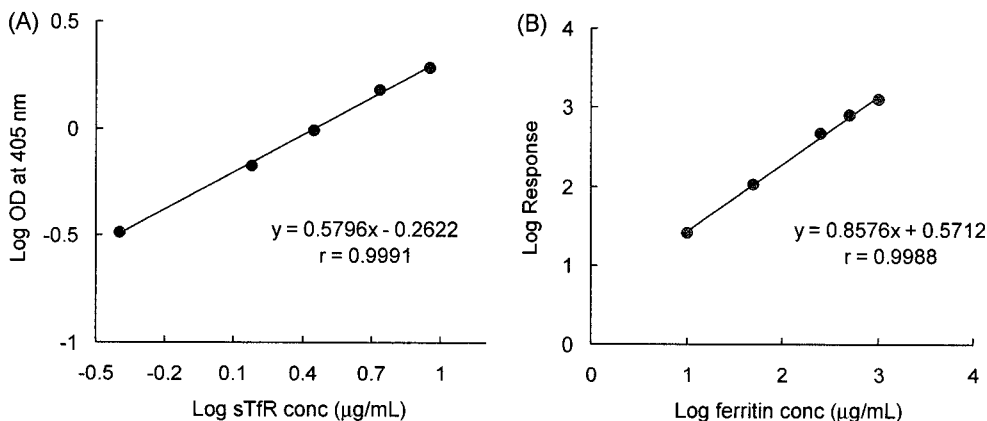


Fig. 2 – Typical calibration curves for soluble transferrin receptor and ferritin. A: sTfR IEMA kit, B: Ferritin MEIA kit.

1000 ng/ml 범위를 사용하였다. Calibrator에 사용한 matrix는 각각 달라서 sTfR IEMA kit는 인간혈청을, Ferritin MEIA kit는 인간비장 페리틴을 buffer matrix에 희석하여 사용하였다. 표준곡선은 log 농도를 x축으로 log 반응도를 y축으로 plot했을 때 직선식이 되었으며, 이 직선식에 의해 시료의 농도를 쉽게 구할 수 있었다(Fig. 2).

표준곡선의 재현성 및 intra-assay precision - 표준곡선의 재현성은 표준곡선의 직선식($\log y = a \log x + b$)에서의 변수인 a와 b의 변수정도를 통계처리하여 얻었다. 표준곡선의 평균직선식은 sTfR IEMA kit의 경우 $\log y = 0.6076 \log x - 0.2653$ ($r = 0.9973$, $n = 3$) 였으며, ferritin MEIA kit의 경우 $\log y = 0.8577 \log x + 0.5715$ ($r = 0.9988$, $n = 7$)로 나타났다. 직선식의 상관계수(r)의 경우 CV가 0.1% 이하로 나타났으므로 이 직선식에 의해 결과치를 쉽게 구할 수 있었다. sTfR IEMA kit의 경우 매 batch마다 표준곡선을 작성했으며, control 값을 매번 평가하여 결과를 얻었다.

본 실험을 통해 볼 때 두종류의 Kit 모두 표준곡선은 매우 안정적으로 나타났으며, control 값이 예상범위내에 있을 때만 시료값을 평가하였다. 그리고 이 표준곡선에서 얻은 정도관리용 control 값의 변화를 통계처리하여 intra-assay precision 값으로 적용하였다. 그 결과, 표준곡선 직선식의 기울기와 y축 intercept의 변이상수(coefficient of variation)가 매우 낮아 표준곡선의 재현성이 우수함을 알 수 있었다. 또한 intra-assay precision을 얻기 위해 low, medium, high range의 control에서 얻은 값을 통계처리하였을 때 %CV가 sTfR가 2.1~4.9%, ferritin이 2.7~4.9%를 나타내므로 분석법의 정확성이 매우 우수한 것으로 나타났다. 검출한계는 사용지침서에 의하면 sTfR IEMA kit의 경우 0.1 µg/ml이며, ferritin MEIA kit의 경우 1 ng/ml이었다. 그리하여, 28개 혈청시료를 분석한 결과는 Table II와 같다.

통계분석에 의한 변수들 간의 상관성 연구

일반 혈액검사 항목들과 sTfR 값, ferritin 값에 대한 11개 변수를 통계적 분석하여 변수들간의 유의적 관계를 조사하였다.¹⁴⁾ 먼저 기술통계에서 평균(mean), 표준편차(SD), 최저치(min), 최대치(max) 등을 알 수 있는 요약통계(univariate)를 실시하였다. HGB의 경우 95%의 신뢰도의 범위는 12.8~16.1 g/dl이며, 평균치는 14.5 ± 1.0 g/dl ($n = 122$), 최저치와 최대치는 각각 10.8과 17.8 g/dl이었다. HCT의 범위는 37.3~46.2%이며, 평균치는 41.7 ± 2.8 % ($n = 122$), 최저치와 최대치는 각각 29.7과 49.6%이며, Retic의 범위는 0.6~1.9%이며, 평균치는 1.3 ± 0.4 % ($n = 122$), 최저치와 최대치는 각각 0.6과 3.1%로 나타났다. 추가로 실험하여 얻은 sTfR의 경우 평균치가 0.8 ± 0.5 µg/ml ($n = 28$)로 나타났다. 이때 95% 신뢰도의 범위는 0.1~1.4 µg/ml였으며, 최저치와 최대치는 각각 0.3과 2.5 µg/ml로 나타났다. Ferritin의 경우 평균치

Table III - Correlation between blood parameters for athletes

Correlation parameters	r	p-value	
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	0.113	0.216
	HGB (g/dl)	0.160	0.078
	HCT (%)	0.153	0.092
	MCV (fl)	0.058	0.524
	MCH (pg)	0.057	0.530
	MCHC (g/dl)	0.012	0.899
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.240	0.008
	Retic (%)	0.273	0.002
	sTfR (µg/ml)	0.300	0.121
Ferritin (ng/ml)	0.229	0.241	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dl)	0.801	0.0001
	HCT (%)	0.875	0.0001
	MCV (fl)	-0.430	0.0001
	MCH (pg)	-0.480	0.0001
	MCHC (g/dl)	-0.227	0.012
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	-0.016	0.859
	Retic (%)	0.236	0.009
	sTfR (µg/ml)	0.333	0.083
	Ferritin (ng/ml)	0.169	0.390
HGB (g/dl)	HCT (%)	0.922	0.0001
	MCV (fl)	0.064	0.486
	MCH (pg)	0.138	0.129
	MCHC (g/dl)	0.147	0.106
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.006	0.948
	Retic (%)	0.254	0.005
	sTfR (µg/ml)	0.261	0.179
Ferritin (ng/ml)	0.175	0.373	
HCT (%)	MCV (fl)	0.059	0.519
	MCH (pg)	-0.097	0.287
	MCHC (g/dl)	-0.245	0.006
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.026	0.772
	Retic (%)	0.227	0.012
	sTfR (µg/ml)	0.314	0.104
	Ferritin (ng/ml)	0.265	0.173
MCV (fl)	MCH (pg)	0.807	0.0001
	MCHC (g/dl)	0.002	0.986
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.082	0.369
	Retic (%)	-0.058	0.524
	sTfR (µg/ml)	0.002	0.991
	Ferritin (ng/ml)	0.186	0.344
MCH (pg)	MCHC (g/dl)	0.591	0.0001
	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.032	0.728
	Retic (%)	-0.015	0.868
	sTfR (µg/ml)	-0.109	0.582
	Ferritin (ng/ml)	0.031	0.879
MCHC (g/dl)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	-0.054	0.553
	Retic (%)	0.063	0.492
	sTfR (µg/ml)	-0.147	0.455
	Ferritin (ng/ml)	-0.214	0.275
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Retic (%)	0.130	0.154
	sTfR (µg/ml)	0.427	0.023
	Ferritin (ng/ml)	0.424	0.025
Retic (%)	sTfR (µg/ml)	0.442	0.019
	Ferritin (ng/ml)	0.432	0.022
sTfR (µg/ml)	Ferritin (ng/ml)	0.236	0.228

r: correlation coefficient.

n=122, except sTfR & Ferritin (n=28).

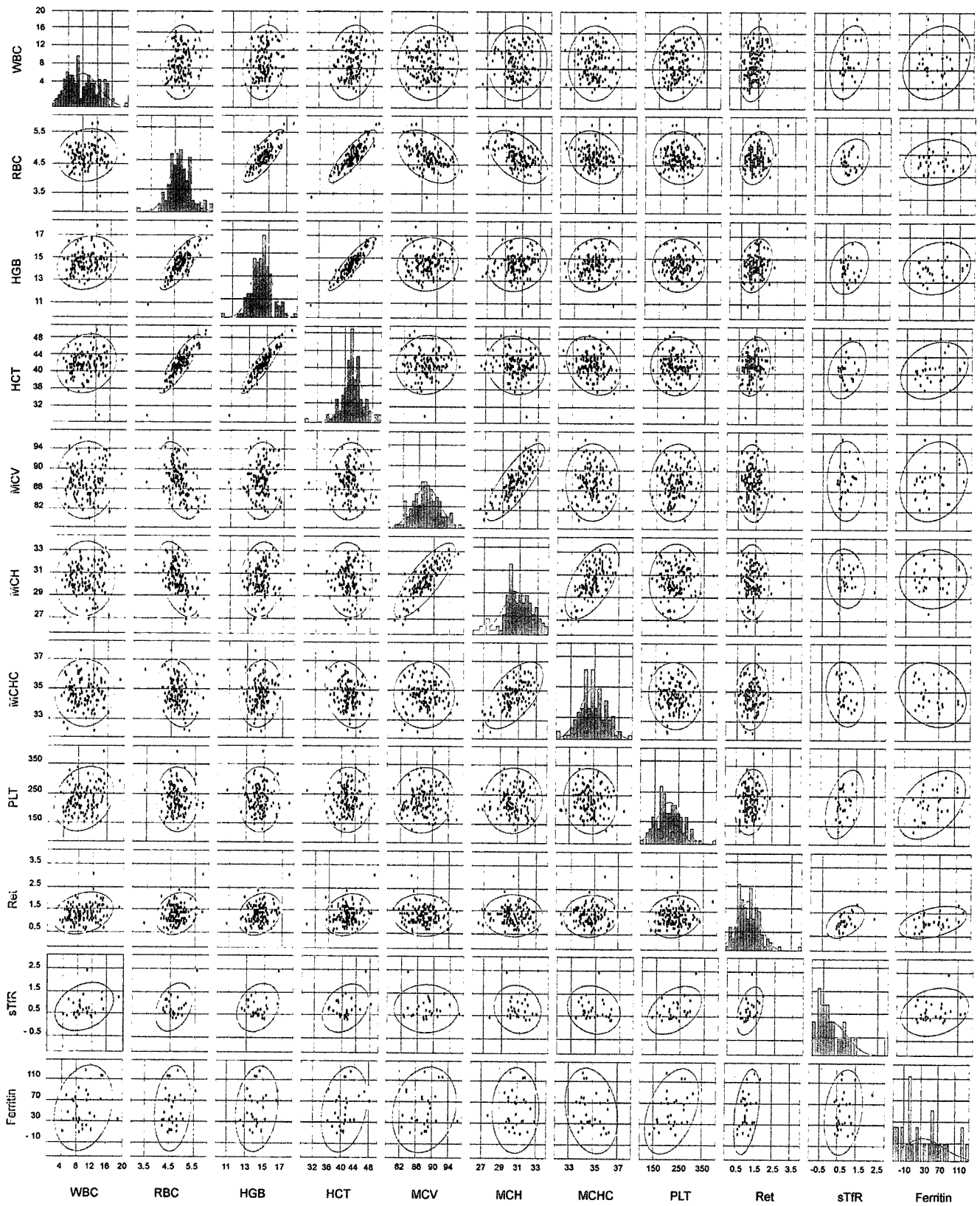


Fig. 3 – Correlation and distribution of blood parameters for athletes.

Table IV – Close relationship between two blood parameters

X	Y	Correlation equation (Y=aX+b)	Correlation coefficient (r)
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dl)	$Y=2.161X+4.173$	0.8007
	HCT (%)	$Y=6.843X+9.105$	0.8752
HGB (g/dl)	HCT (%)	$Y=2.670X+3.077$	0.9217
MCV (fl)	MCH (pg)	$Y=0.348X-0.078$	0.8070
MCH (pg)	MCHC (g/dl)	$Y=0.402X+22.483$	0.5907

는 $54.6 \pm 33.7 \text{ ng/ml}$ ($n=28$)이었고 범위는 $-10.4 \sim 114.3 \text{ ng/ml}$ 이였으며, 최저치와 최대치는 각각 9.7과 $12.7.1 \text{ ng/ml}$ 이었다. 또한, 각 변수들에 대하여 정상범위와 95% 신뢰도 밖에 속하는 outlier는 Table II와 같다. Out-lier 시료는 HGB가 5개, HCT는 7개, Retic은 4개로 나타났다.

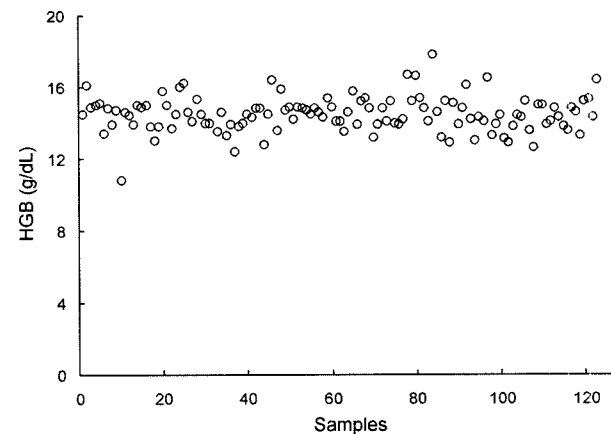
각 변수들간의 상관관계와 분포도는 SAS program을 이용하여 결과를 얻었으며, scatter plot에 의한 상관성과 막대그래프에 의한 분포도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 이때 두 변수간의 상관계수(r)와 p -value는 Table III과 같다.¹⁵⁾ 그 결과, HGB vs. HCT($r=0.922$)가 가장 밀접한 상관관계를 보여 주었으며, RBC vs. HCT($r=0.875$), RBC vs. HGB($r=0.801$)가 그 다음으로 관련성이 있었으며, MCV vs. MCH($r=0.807$), MCH vs. MCHC ($r=0.591$) 순서임을 알 수 있었다. 이에 반하여, 철 인자에 대한 변수인 sTfR과 ferritin간의 상관관계는 $r=0.236$, $p=0.228$ ($n=28$)로서 상호 관련된 의미를 찾지 못했다. 그 외 나머지 변수들 간에도 의미있는 상관관계를 관찰할 수 없었다.

위의 결과에서 상관성 있는 5가지의 경우, 변수들만을 가지고서 어느 정도의 상관관계가 있는지를 simple linear regression에 의하여 조사하였으며, 직선방정식($Y=aX+b$)과 상관계수(r)는 Table IV와 같다. 특히 HGB vs. HCT의 직선식 상관계수(r)가 0.9217로 의미있는 상관관계로 나타났다.

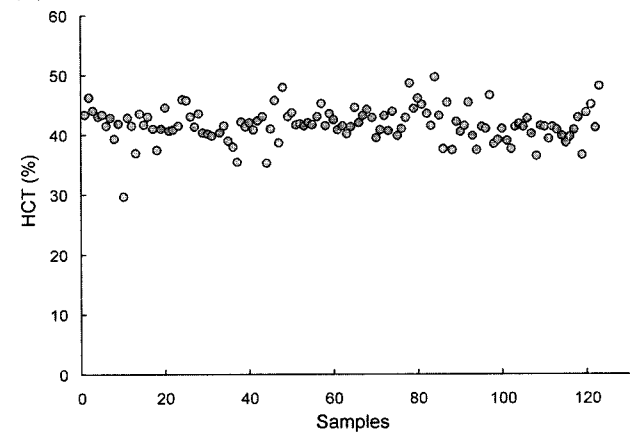
hEPO 도핑검사시, 정확한 기준이 되는 유의적인 변수를 알아보고자 가장 유력한 5개의 변수인 HGB, HCT, Retic, sTfR, ferritin에 대하여 모든 11개 변수와의 관계를 회귀분석 중 linear regression에 의해 실시하였다.¹⁶⁾ 먼저 다중공산분석(partial correlation)을 실시하였을 때, $Pr>F$ 의 수치가 0.05 이상으로 나타났으므로 유의적 모형을 설명하지 못하였다. 따라서 유의적 모형이라는 전제하에서 다시 분석하였다.¹⁷⁾ 그 결과, Table V에서 보는 바와 같이 종속변수인 5개에 대하여 각각 설명할 수 있었다. 이 변수들의 유의성은 Parameter estimate가 높고, $Pr>|t|$ 가 0.05보다 낮을수록, 그리고 variance inflation 수치가 0.1 이상으로 높을수록 의미있는 것으로 나타난다.¹⁸⁾

헤모글로빈(HGB)에서는 적혈구(RBC)가 가장 유의적인 변수이며, 다음으로 적혈구혈색소평균농도(mean corpuscular hemoglobin concentration; MCHC), 적혈구용적비(HCT), 적혈구평균용적(mean corpuscular volume; MCV) 순이었다. 적혈구

(A) HGB



(B) HCT



(C) Retic

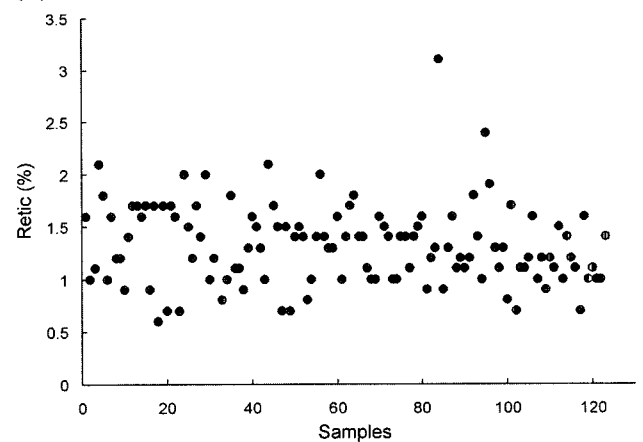


Fig. 4 – Day-to-day distribution for hemoglobin, hematocrit and reticulocyte in whole blood of athletes.

용적비의 경우도 RBC가 의미있는 변수였고, 헤모글로빈, 적혈구 평균혈색소량(mean corpuscular hemoglobin; MCH), 적혈구 평균용적 차례로 유의성을 나타냈다. Retic의 경우 백혈구(WBC)가 유의성이 있으며, sTfR와 ferritin의 경우 Retic이 의미있는 변수로 나타났다. 따라서, hEPO 도핑검사에서 HGB, HCT, Retic,

Table V – Linear regression for each of hemoglobin, hematocrit, reticulocyte, soluble transferrin receptor and ferritin in whole blood

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Retic (%)	sTfR ($\mu\text{g/ml}$)	Ferritin (ng/ml)	Const. ^b
HGB (g/dl)	-	1.48 ^a (488.10)	-	0.18 (494.79)	0.08 (159.50)	-	0.42 (1.27)	-	-	-	-	-21.64
HCT (%)	-	4.44 (398.49)	1.41 (409.00)	-	0.47 (2.38)	-0.65 (122.44)	-	-	-	-	-	-21.06
Retic (%)	0.05 (1.00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.74
sTfR ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.69 (1.00)	-	-	0.01
Ferritin (ng/ml)	-	-	-	-	-	-	-	50.44 (1.00)	-	-	-5.16	

^aParameter estimate (Variance inflation).

^bIntercept.

n=122, except sTfR & ferritin (n=28).

sTfR, ferritin의 5개 변수 이외에 유의적인 변수로서 RBC, MCHC, MCV, MCH와 WBC가 상관성이 있음을 알 수 있었다.

고찰 및 결론

운동선수 122명의 혈액시료를 날짜에 따라 23번의 batch로 분석했으며, 3 level의 control을 정도관리용으로 사용하여 그 결과를 얻었다. 일반혈액학 검사는 hematology system을 이용하여 혈액을 채취한 후 8시간 이내에 측정하였고, 철지표에 대한 sTfR와 ferritin의 검사는 28개의 혈액시료에서 혈장을 분리하여 면역분석법에 의해 정량분석을 실시하였다.

23 batch의 정도관리 결과를 통계적으로 분석했을 때, 3 control level에서 HGB 농도, % HCT, % Retic 값에 대한 CV는 10% 내외로서 분석결과를 판정하는데 적합했으며, 11개 항목에 대한 시료결과를 얻었다. 특히 주요 변수인자인 HGB 농도, % HCT, % Retic에 대한 각 시료의 값은 Fig. 4와 같다. 위 세변수의 결과관점으로서 hEPO 도핑에 대한 IOC 기준의 잠정적인 값은 다음과 같다. HGB의 경우, 남자는 <17.5 g/dl, 여자는 <16.0 g/dl 이고, Retic의 경우는 <2.0%이다.¹⁹⁾ 따라서, 모든 혈액시료에 대한 분석결과는 위의 판정기준보다 낮은 값을 나타냈으므로 hEPO 검사에 대해 음성으로 판명되었다.

위의 연구결과에서 얻은 11개 변수에 대한 통계적인 분석을 실시한 결과, 3개의 중요한 변수로서 HGB는 평균치 14.5 ± 1.0 g/dl(n=122)이었고, HCT는 $41.7 \pm 2.8\%$ (n=122), Retic은 $1.3 \pm 0.4\%$ (n=122)로 나타났다. 또한 sTfR의 평균치는 0.8 ± 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (n=28), ferritin는 54.6 ± 33.7 ng/ml(n=28)이었다.

변수들간의 상관성을 나타내는 것은 5가지로서, HGB vs. HCT (r=0.922)가 가장 밀접한 상관관계를 나타내었고, RBC vs. HCT (r=0.875), RBC vs. HGB(r=0.801)가 그 다음으로 관련성이 있었으며, MCV vs. MCH(r=0.807), MCH vs. MCHC(r=0.591) 순이었다. 그러나, 철 인자에 대한 sTfR과 ferritin간의 상관관계

(r=0.236)는 찾아볼 수 없었다. 이 외에 ferritin 농도변화와는 상관없이 sTfR과 Retic은 일정하게 나타났으며, Retic 또한 농도변화와 관련없이 모든 변수가 일정하게 나타났다. 즉, 다른 연구 결과와는 달리,²⁰⁾ sTfR과 ferritin은 다른 변수와의 상관관계를 발견할 수 없었다. 그 외에 고등통계적 분석에 의한 변수들 간의 상관관계를 조사한 결과, 5개의 변수(HGB, HCT, Retic, sTfR, ferritin)이외에 RBC, MCHC, MCV, MCH, WBC가 유의적인 지표로서 작용할 수도 있음을 확인할 수 있었다.

지금까지 보고된 바에 의하면, hEPO 도핑의 지표로서는 hEPO 이외에 여러 변수들이 관련된다는 것을 알 수 있다.^{5,21)} 그 중에서도 특히 HGB, HCT, RBC와 Retic이 관련된 변수이고, 그외 sTfR과 ferritin도 주요 인자로 작용한다는 것이 공통된 인식이었다.^{6,22,23)} 그리고 이들 연구에서 ferritin만이 rhEPO 투여 후 감소하는 경향을 보이며, 대부분 인자들은 증가하는 현상을 보여주었다.^{20,24)} Robinson *et al.*²⁵⁾은 rhEPO 투여 후 몇 개의 변수에 대하여 시간별로 조사하였는데, hEPO, Retic, sTfR, HCT 순으로 증가함을 보여주었으며, 그 중 hEPO는 평균 배출반감기가 약 42시간으로 어느 변수보다도 신속한 검사가 필요함을 제시하였다.²³⁾ 또한 Retic이 간접적인 지표로 작용한다는 보고에서는 그와 관련된 reticulocyte 갯수(# retic), RBC 헤모글로빈과 reticulocyte 헤모글로빈의 비율(rbcHb : retHb ratio), reticulocyte의 haemoglobin 양(retHb), reticulocyte의 hematocrit(retHct)의 변수들도 모니터해야 할 만큼 중요하다고 밝히고 있다.^{26,27)} 그 외 영향력이 있는 변수로는 MCV, percent macrocyte(% Macro), reticulocyte의 혈색소 함량(mean corpuscular volume; MCVr), percent hypochromic cells(% Hypo), reticulocyte 혈색소 함량 (cellular hemoglobin content of reticulocyte; CHr) 등이 있었으며,²⁸⁾ 이 중 MCVr과 CHr은 Retic과 관련된 인자인 retHct (=MCVr \times # retic)와 retHb(=CHr \times # retic)이 계산상에서 비롯되어 연관이 있음을 추정할 수 있었다.³⁾ 이러한 점은 rhEPO가 혈구생성과 철대사 사이에 연관이 깊으므로,²⁹⁾ 이 부분에 대

한 집중적인 연구에 의해 hEPO 도핑에 참조할 수 있는 변수들을 더 정확히 선택할 수 있으리라고 사료된다.

결론적으로 본 실험의 결과에 앞서 보고된 연구들과 비교했을 때 비슷한 경향을 나타내는 것은 예견한 바였지만, 지금까지 조사된 기존지표들 외에 MCHC, MCH, WBC도 hEPO 도핑에 유용한 지표가 될 수 있음을 제시하였다. 또한 이번 결과에서 언급한 유의적인 변수들에 대한 각각의 기준범위를 더 연구해서 hEPO 도핑의 지표로 사용할 수 있음을 고려할 수 있다.

문 헌

- 1) Choi, D., Kim, M. and Park, J. : Erythropoietin: physico- and chemical analysis. *J. Chromatogr. B.* **687**, 189 (1996).
- 2) Beutler, E., Lichtman, M. A., Coller, B. S., Kipps, T. J. and Seligsohn, U. : *Williams Hematology* 6th ed., McGraw-Hill Co., New York (2001).
- 3) Vergruggen, H., d'Onofrio, G., Brugnara, C., Stray-Gundersen, J., Parisotto, R. and Ashenden, M. : Hematological testing for blood doping in sports. *Bloodline Reviews* **1**, 2 (2001).
- 4) Gareau, R., Brisson, G. R., Ayotte, C., Dube, J. and Caron, C. : Erythropoietin doping in athletes: possible detection through measurement of fibrinolytic products. *Thrombosis & Haemostasis* **68**, 481 (1992).
- 5) Ashenden, M. : A strategy to deter blood doping in sport. *Haematologica* **87**, 225 (2002).
- 6) Casoni, I., Ricci, G., Ballarin, E., Borsetto, C., Grazi, G., Guglielmini, C., Manfredini, F., Mazzoni, G., Patracchini, M., De Paoli Vitali, E., Rigolin, F., Bartalotta, S., Franze, G. P., Masotti, M. and Conconi, F. : Hematological indices of erythropoietin administration in athletes. *Int. J. Sports Med.* **14**, 307 (1993).
- 7) Parisotto, R., Gore, C. J., Emslie, K. R., Ashenden, M. J., Brugnara, C., Howe, C., Martin, D. T., Trout, G. J. and Hahn, A. G. : A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* **85**, 564 (2000a).
- 8) Wide, L., Bengtsson, C., Berglund, B. and Ekblom, B. : Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med. Sci. Sports Exerc.* **27**, 1569 (1995).
- 9) Huebers, H. A., Beguin, Y., Pootrakul, P., Einspahr, D. and Finch, C. A. : Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* **75**, 102 (1990).
- 10) Yang, S. E., Park, C. J., Min, W. K. and Chi, H. S. : Diagnostic availability of the soluble transferrin receptor in iron deficiency anemia and anemia of chronic disease. *Korean J. Clin. Pathol.* **20**, 119 (2000).
- 11) Choi, J. W., Sun, K., Kim, S. K., Hyun, I. Y., Nahm, C. H. and Pai, S. H. : Difference of serum transferrin receptor (sTfR) level between healthy adults and children, and Correlation to serum ferritin level. *Korean J. Clin. Pathol.* **19**, 149 (1999).
- 12) Punnonen, K., Irjala, K. and Rajamaki, A. : Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* **89**, 1052 (1997).
- 13) Raya, G., Henny, J., Steinmetz, J., Herbeth, B. and Siest, G. : Soluble Transferrin Receptor (sTfR): Biological variations and reference limits. *Clin. Chem. Lab. Med.* **39**, 1162 (2001).
- 14) 송문섭, 조신섭 : SAS를 이용한 통계자료 분석, 자유아카데미, 서울 (2002).
- 15) Linnet, K., Petersen, P. H., Sandberg, S., Stockl, D., Thienpont, L., Remaley, A. T. and Ichihara, K. : Biostatistics for clinical chemists, Lim, Inc., Osaka (2002).
- 16) Rosner, B. : Fundamentals of biostatistics 5th ed., Duxbury Co., CA (2000).
- 17) 김충련 : SAS라는 통계상자, 증보판, 데이터플러스, 서울 (1994).
- 18) Tsumoto, S., Hirano S., Yasuda, A. and Tsumoto, K. : Analysis of amino-acid sequences by statistical technique. *Information Sciences* **145**, 205 (2002).
- 19) Tietz, N. W. : Textbook of Clinical Chemistry 2nd ed., Saunders Co., Philadelphia (1986).
- 20) Magnani, M., Corsi, D., Bianchi, M., Paiardini, M., Galluzzi, L., Gargiullo, E., Parisi, A. and Pigozzi, F. : Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **27**, 559 (2001).
- 21) Gareau, R., Audran, M., Baynes, R. D., Flowers, C. H., Duvallet, A., Senecal, L. and Brisson G. R. : Erythropoietin abuse in athletes. *Nature* **380**, 113 (1996).
- 22) Parisotto, R., Wu, M., Ashenden, M. J., Emslie, K. R., Gore, C. J., Howe, C., Kazlauskas, R., Sharpe, K., Trout, G. J., Xie, M. and Hahn, A.G. : Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* **86**, 128 (2001).
- 23) Souillard, A., Audran, M., Bressolle, F., Gareau, R., Duvallet, A. and Chanal, J. L. : Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 355 (1996).
- 24) Bressolle, F., Audren, M., Gareau, R., Pham, T. N. and Gomeni, R. : Comparison of a direct and indirect population pharmacodynamic model: application to recombinant human erythropoietin in athletes. *J. Pharmacokinetic Biopharm.* **25**, 263 (1997).
- 25) Robinson, N., Saugy, M., Buclin, T., Gremion, G. and Mangin, P. : The interpretation of secondary blood markers can get hazardous in case of a discontinuous rhEPO treatment. *Haematologica* **87**, ELT28 (2002).
- 26) Brugnara, C., Zelmanovic, D., Sorette, M., Ballas, S. K. and Platt, O. : Reticulocyte hemoglobin. An integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. *Am. J. Clin. Pathol.*

- 108, 133 (1997).
- 27) Parisotto, R., Gore, C. J., Hahn, A. G., Ashenden, M. J., Olds, T. S., Martin, D. T., Pyne, D. B., Gawthorn, K. and Bru gnara, C. : Reticulocyte parameters as potential discriminators of recombinant human erythropoietin abuse in elite athletes. *Int. J. Sports Med.* **21**, 471 (2000b).
- 28) Audran, M., Gereau, R., Matecki, S., Durand, F, Chenard, C., Sicart, M. T., Marion, B. and Bressolle, F. : Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med. Sci. Sports Exerc.* **31**, 639 (1999).
- 29) Schumacher, Y. O., Schmid, A. and Berg, A. : Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med. Sci. Sports Exerc.* **34**, 869 (2002).