

D. Schwenke, R. K. Müller

## Erythropoietin und Doping

Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie  
Kreischa

### Zusammenfassung

Erythropoietin zählt zwar zu den vom IOC verbotenen Dopingsubstanzen, aber der Nachweis eines Missbrauchs war in den letzten Jahren trotz intensiver Forschungen nicht möglich. Zur Zeit existieren ein indirekter Nachweis, der auf einer statistischen Auswertung von Parametern der Erythropoese basiert, und ein direkter Nachweis, der strukturelle Unterschiede zwischen rekombinantem und humanem Erythropoietin nutzt. Die wesentlichen, aktuellen Probleme betreffen die praktische Durchführung der Dopingkontrollen.

### Einleitung

Das Glykoproteinormon Erythropoietin (EPO) ist zweifellos eines der spektakulärsten Dopingmittel, weil ihm vielfach ein nahezu ubiquitärer Missbrauch vor allem in Ausdauerdisziplinen mit dem Ziel einer erhöhten Sauerstofftransportkapazität unterstellt wird. Die mangelnde Nachweisbarkeit stellt die gesamte Dopingkontrolle in Frage. Richtig ist, dass EPO als Peptidhormon bisher tatsächlich eine Schwachstelle der Dopinganalytik darstellte. Andererseits bleibt die Behauptung vorbereiteter Missbrauchs weitgehend Vermutung, wenn man von einzelnen zugegebenen Fällen und Sicherstellungen von Präparaten zur offensichtlich missbräuchlichen Verwendung im Sport absieht. Mit den neuesten Veröffentlichungen (3, 5) besteht die Möglichkeit eines schnellen Probenscreenings wie auch einer sicheren Bestätigung des Ergebnisses.

### Diagnostik

#### Indirekte Methode - Blutbild und Serumparameter - Screening

##### Hämatokrit

Als indirekter Parameter wird seit 1997 vom Internationalen Radsportverband (UCI) ein Grenzwert von 50% Hämatokrit verwendet. Bei Überschreiten dieses Wertes wird die Lizenz einbehalten, so dass ein Start des Athleten nicht möglich ist. Nach zwei Wochen kann eine Nachuntersuchung stattfinden. Diese Sperre gilt jedoch nicht als Dopingverstoß, sondern lediglich zum Schutz des Athleten aus gesundheitlichen Gründen. Neben den beträchtlichen individuellen Variationen des Hämatokritwertes, die sich bei Eliteathleten messen lassen, sind Höhentraining, Zeitpunkt und Modalitäten der Probenahme, Belastung und weitere Faktoren von Einfluss. Der Hämatokritwert allein kann daher nicht als Indikator für EPO-Doping akzeptiert werden. Es müssen weitere Parameter berücksichtigt werden, die einen direkten Bezug zur Erythropoese aufweisen.

##### Löslicher Transferrinrezeptor

Der Transport von Eisen mittels Ferritin erfolgt bei der Bildung der Erythrozyten über den Transferrinrezeptor, in diesem Prozess wird ein Teil des Transferrinrezeptors - der lösliche Transferrinrezeptor

(sTfR) - abgeschnitten und zirkuliert in der Blutbahn. Das Verhältnis löslicher Transferrinrezeptor zu Ferritin wurde zur Erfassung eines EPO-Missbrauchs schon 1996 von *Gareau* (2) vorgeschlagen. Bei einer Absättigung der Eisenspeicher (4) verändert sich das Verhältnis löslicher Transferrinrezeptor zu Ferritin nicht so drastisch, wie von *Gareau* beobachtet, so dass der beschriebene Grenzwert nicht überschritten wird.

##### Retikulozyten

Ein weiterer Parameter der Erythropoese sind die unreifen Erythrozyten (Retikulozyten). Da sich bei einer Steigerung der Erythrozytenproduktion nicht nur die Anzahl, sondern auch die Eigenschaften der freigesetzten Retikulozyten ändern, sollte dieser Parameter am besten geeignet sein, ein Doping mit EPO zu erfassen. Die Einteilung und Zählung geschieht meist noch aufwendig mit Hilfe des Mikroskops, wobei die Ergebnisse eine große Variation aufweisen und somit für eine Verwendung dieses Parameters in der Dopinganalytik nicht geeignet sind. Mit Hämatologieautomaten (Prinzip der Durchflusszytometrie) ist nunmehr nicht nur eine präzise und reproduzierbare Retikulozytenzählung möglich, es können ebenfalls verschiedene, weitere Zellindizes gemessen werden. *Brugnara et al.* (1) zeigten, dass insbesondere der Hämoglobingehalt der Retikulozyten zum Monitoring einer EPO-Therapie sinnvoll ist, und auch beim gesunden Probanden verwendet werden kann.

##### Kombination indirekter Parameter

Ein Parameter allein und auch die einfache Kombination mehrerer Grenzwerte ist zur sicheren Erfassung eines EPO-Dopings nicht ausreichend. Daher war ein statistisch gesichertes Modell notwendig, welches den Missbrauch von rekombinantem EPO sicher nachweist. Dieses Modell wurde vom Australian Institute of Sport entwickelt (5).

Aus der Datenanalyse ergaben sich die relevanten Parameter Retikulozythämatokrit, Erythropoietin, löslicher Transferrinrezeptor, Hämatokrit und Prozentanteil Makrozyten. Für die Erfassung eines akuten Missbrauchs mit dem sogenannten „ON“-Modell sind alle oben aufgeführten Parameter im Modell integriert. In der Abklingphase wurde ein anderes, das sogenannte „OFF“-Modell, angewandt, das nach einem Missbrauch von EPO den Athleten überführen soll. In diesem Modell sind Retikulozythämatokrit, Erythropoietin und Hämatokrit die entscheidenden Parameter.

Notwendig für die Anwendung der beiden Modelle ist jedoch die Messung der Vollblutproben mit einem vollautomatischen Hämatologiesystem (H\*3 oder ADVIA 120; Bayer Diagnostics). Nur bei diesen Automaten erfolgt eine Bestimmung der einzelnen Zellen und ermöglicht somit die Berechnung des Retikulozythämatokrit, der für die Anwendung beider statistischen Modelle notwendig ist.

##### Direkte Methode - Isoelektrische Fokussierung (IEF) - Bestätigung

Aufgrund der vereinzelt falsch-positiven Ergebnisse, der fehlenden Möglichkeit einer B-Probe wegen der geringen zeitlichen Stabilität der Vollblutprobe und des fehlenden, gerichtsfesten Beweises der Applikation von exogenem EPO ist die Sanktionierung nur auf der Basis der statistischen Modelle der indirekten Parameter noch unsicher.

Für den Beweis eines Dopings mit EPO wäre daher die Trennung zwischen rekombinantem und körpereigenem EPO notwendig. Die Methode von *Wide et al.* (6) ermöglichte zwar eine Trennung, konnte aber in keinem Labor reproduziert werden, zudem war sie extrem teuer und aufwendig und daher für den Einsatz in der Routine nicht

geeignet. Für großes Aufsehen sorgte daher die Veröffentlichung des französischen Dopinglabors (3), wonach mittels isoelektrischer Fokussierung eine Auftrennung der verschiedenen Isoformen des rekombinanten und des humanen EPO im Urin gelang. Bei mit EPO behandelten Patienten konnte das Bandenmuster des rekombinanten EPO wiedergefunden werden.

Nachteil der Methode ist der noch große Zeitaufwand (für zehn Proben drei Tage) verbunden mit hohen Kosten.

## Probleme der Dopingkontrolle in der aktuellen Situation

Zu den Olympischen Spielen 2000 in Sydney wurde sowohl die indirekte Methode (5) zum Screening als auch die direkte Analysenmethode (3) eingesetzt. Der große Vorteil der praktischen Einführung der Kontrollen war die hohe Anzahl Athleten in einem engen Umkreis, so dass die Vollblut- und Serumproben wie auch die Urinproben schnellstens in das analysierende Labor gelangten. Die zur Zeit weltweit bevorzugte Verfahrensweise besteht in der Analyse von Blut und Serum und der Anwendung der oben aufgeführten statistischen Modelle "ON" und „OFF“. Erst wenn durch eines der beiden Modelle eine Probe auffällig wird, erfolgt die Analyse der Urinprobe. Eine relativ große Anzahl an Proben kann somit schnell gescreent werden und die teure und aufwendige Prozedur des direkten Nachweises muss nur bei den wenigen auffälligen Proben angewandt werden. Die B-Probe eines positiven (auffälligen) Athleten könnte dann auch in einem anderen Labor und vor allem zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden.

Für die Probennahme stellen sich gegenwärtig noch mehrere, praktische Probleme. Bisher existiert noch keine allgemein gültige Regelung zur Entnahme von Blut für die Erfassung eines EPO-Dopings. Die Probennahme von Blut und Serum erfordert neben der Schulung des Personals (Ärzte oder Schwestern) einen wesentlich größeren Zeitaufwand als eine vergleichbare Urinprobe, da neben der Abnahme auch noch die Serumgewinnung durchgeführt werden muss. Auch an Probenlagerung und Transport werden größere Anforderungen gestellt: neben der Kühlung der Vollblutproben bei 4°C müssen die Serum- und auch vorzugsweise die Urinproben mittels Trockeneis tiefgefroren werden. Während die Serum- und Urinproben gefroren länger transportiert werden können, müssen die gekühlten Blutproben unverzüglich zum Labor gelangen und sofort gemessen werden. Für eine effektive Kontrollwirkung empfiehlt es sich, Probenabnahmen nicht nur bei Wettkämpfen, sondern analog den normalen Trainingskontrollen auch unangekündigt durchzuführen.

## Fazit

Es existiert bereits sowohl ein indirektes Verfahren zum Screening auf EPO als auch eine sichere Analytik zur Bestätigung der Ergebnisse. Das Verfahren war zwar einige Zeit umstritten, aber nach der Einführung der Methode in anderen Dopinglabors mit reproduzierbaren Ergebnissen ergibt es eindeutige analytische Aussagen. Probleme betreffen noch die Probennahme und standardisierte Festlegungen von IOC / WADA (Weltantidopingagentur), vor allem hinsichtlich der allgemeinen Verfahrensweise, damit das Verfahren rechtlich abgesichert ist.

## Literatur

1. *Brugnara C, Colella G, Cremins J, Langley RC, Schneider TJ, Rutherford CJ, Goldberg MA*: Effects of subcutaneous recombinant human erythropoietin in normal subjects: Development of decreased reticulocyte hemoglobin content and iron-deficient erythropoiesis. *J Lab Clin Med* 123 (1994) 660-667.
2. *Gareau R*: Erythropoietin abuse in athletes. *Nature* 380 (1996) 113.
3. *Lasne F, Ceauriz Jd*: Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405 (2000) 635.
4. *Magnani M*: Monitoring erythropoietin abuse in athletes. *Br J Haematol* 106 (1999) 260-261.
5. *Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden MJ, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG*: A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 85 (2000) 564-572.
6. *Wide L, Bengtsson C, Berglund B, Ekblom B*: Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc* 27 (1995) 1569-1576.

Korrespondenzadresse

Dirk Schwenke

Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie

Dresdner Str. 12, 01731 Kreischa

Fax: 035206/20620

E-Mail: Dirk.Schwenke@IDAS-Kreischa.de