

Indirekte und direkte Methoden zur Detektion des Erythropoietindopings

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Chem. Dirk Schwenke

geboren am 3. Mai 1972 in Dresden

Gutachter:	Prof. R. K. Müller Prof. R. Salzer Prof. B. Johannsen
Eingereicht am:	13.05.2004
Tag der Verteidigung:	19.10.2004

Danksagung

Ich danke dem Bundesinstitut für Sportwissenschaft, dem Internationalen Olympischen Komitee (European EPO Research Projekt) und dem Förderkreis Dopingfreier Sport für die finanzielle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. R. K. Müller danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine engagierte Unterstützung sowie seine Geduld und die gewährten Freiheiten bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Salzer möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der TU Dresden einzureichen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt A. Breidbach und B. Bialas (Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln) für die gemeinsame Durchführung und Organisation einzelner Teilstudien.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Dopinganalytik und Sportbiochemie in Kreischa für die freundliche Aufnahme, die Hilfe und Unterstützung sowie vor allem für das freundliche Klima während der gesamten Dauer meiner Arbeit und darüber hinaus. Besonders möchte ich mich bei Dr. D. Thieme für die Anleitung bei der Arbeit mit einem ESI-MS danken und die Durchsicht des Manuskripts.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Sie waren immer am meisten davon überzeugt, dass sich alle Probleme lösen lassen.

Ich danke allen Vertrauten, Verbündeten, Kritikern und der gesamten Familie für die Ratschläge, die Zusammenarbeit, ihre Geduld und vor allem ihren Humor und vieles weitere mehr.

Am meisten aber danke ich meiner Frau, denn ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit kaum möglich gewesen.

Danke Ina, für alles!

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Humanes Erythropoietin und biologische Wirkung	4
1.2	Rekombinantes Erythropoietin als Medikament und als Dopingsubstanz.....	6
1.2.1	Medizinische Verwendung	6
1.2.2	Missbrauch von rekombinantem Erythropoietin und Steigerung der Ausdauerleistung	6
1.3	Ansätze der Dopinganalytik für Erythropoietin.....	7
1.3.1	Indirekte Methode – Nachweis erhöhter Erythropoese	7
1.3.1.1	Grenzwerte zum Schutz der Gesundheit.....	7
1.3.1.2	Der lösliche Transferrinrezeptor	8
1.3.1.3	Kombination von Parametern	8
1.3.2	Direkter Nachweis von rekombinantem Erythropoietin	9
2	AUFGABENSTELLUNG	11
2.1	Indirekte Parameter zum Screening.....	11
2.1.1	Populationsstudie.....	11
2.1.2	Verlaufsuntersuchung	11
2.1.3	IOC-Teilprojekte	12
2.1.4	Verlaufsuntersuchung im Zehnkampf	12
2.1.5	Routineanalytik	12
2.2	Direkter Nachweis extrakorporaler EPO-Applikation als Bestätigungsanalyse	13
2.2.1	Direkter Nachweis - Isoelektrische Fokussierung	13
2.2.2	Versuche zum Nachweis mittels Massenspektrometrie.....	13
3	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1	Untersuchte Proben – Probennahme und Lagerung.....	14
3.1.1	Populationsstudie.....	14
3.1.2	Verlaufsuntersuchung	15
3.1.3	IOC-Projekte	15
3.1.3.1	Tagesstudie	15
3.1.3.2	Jahresstudie	16
3.1.3.3	Belastungsstudien	16

3.1.4	Verlaufsuntersuchung Zehnkampf	16
3.1.5	Routineanalytik	17
3.2	Hämatologische Untersuchungen.....	17
3.2.1	Parameter des roten Blutbildes und Retikulozyten	17
3.2.1.1	Hämoglobinbestimmung	18
3.2.1.2	Ausgesuchte Parameter der Erythrozyten und Retikulozyten.....	18
3.2.2	Hämatologiesysteme	20
3.2.2.1	Durchflussverfahren.....	20
3.2.2.2	CELL-DYN® 1300	20
3.2.2.3	Sysmex R3000	20
3.2.2.4	ADVIA 120.....	21
3.3	Immunologische Bestimmungen	22
3.3.1	Parameter Erythropoietin und Ferritin	22
3.3.2	Parameter löslicher Transferrinrezeptor	23
3.4	Massenspektrometer.....	23
3.4.1	Kombination HPLC und ESI-Triple-Quadrupol-MS.....	23
3.4.2	Nanospray und ESI-TOF-MS.....	23
3.5	Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien	23
3.6	Methoden.....	25
3.6.1	Messung der Vollblutproben	25
3.6.2	Messung von Serum- und Plasmaproben.....	26
3.6.3	Analytik von Urinproben.....	26
3.6.3.1	Anreicherung der Urinproben	26
3.6.3.2	Isoelektrische Fokussierung.....	26
3.6.3.3	Double Blot und Antikörperbindung.....	27
3.6.3.4	Visualisierung	28
3.6.4	Anreicherung mittels Magnetpartikeln.....	28
3.6.4.1	Beschichtung der Dynabeads.....	28
3.6.4.2	Anreicherung von Erythropoietin mittels Dynabeads	29
3.6.4.3	Gelelektrophorese und Färbung der Gele.....	29
3.6.5	Massenspektrometrische Analytik	30
3.6.5.1	Kombination von HPLC und Triple-Quadrupol-MS	30
3.6.5.2	Kombination von Nanospray und TOF-MS.....	30

4	ERGEBNISSE	31
4.1	Studien zur Parameterfindung	33
4.1.1	Populationsstudie.....	33
4.1.2	Verlaufsuntersuchung – DLV-Studie.....	38
4.2	Gesamtprojekt IOC-Studien	43
4.2.1	Tagesstudie – Zirkadiane Rhythmik der Parameter.....	43
4.2.2	Jahresstudie – Veränderung hämatologischer Parameter über den Zeitraum eines Jahres.....	50
4.2.3	Belastungsstudien.....	57
4.3	Verlaufsuntersuchung Zehnkampfteam	65
4.4	Anwendung in der Routine	68
4.5	Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	72
4.5.1	Reproduzierbarkeit immunologischer Messungen.....	72
4.5.2	Vergleichbarkeit von hämatologischen Bestimmungen mit verschiedenen Hämatologiesystemen	77
4.5.3	Vergleichbarkeit von hämatologischen Bestimmungen mit Hämatologiesystemen des gleichen Typs	79
4.5.4	Stabilität der Vollblutparameter.....	81
4.5.5	Reproduzierbarkeit der immunologischen Bestimmung der Serumparameter	84
4.6	Ergebnisse der direkten Methoden	87
4.6.1	Proteinreinigung und massenspektrometrische Analytik von Glykanen	87
4.6.1.1	Proteinisolierung mittels Magnetpartikeln.....	88
4.6.1.2	Vorexperimente zur Analytik von Glykanen mittels Kombination von HPLC-ESI-Triple-Quadrupol-MS und Nanospray-ESI-TOF-MS.....	89
4.6.2	Isoelektrische Fokussierung	98
5	DISKUSSION	101
5.1	Grenzwerte für hämatologische Parameter und Serumparameter	102
5.1.1	Parameterfindung	102
5.1.2	Einfluss der Abnahmezeit	118
5.1.3	Einfluss von Belastung auf die Parameter	121
5.2	Verwendung von Multiparametermodellen	125

5.3	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	128
5.3.1	Vergleich der immunologischen Bestimmungen.....	128
5.3.2	Vergleich der hämatologischen Messungen und Stabilität von Blutproben	130
5.4	Methodenkombination und Grenzwerte – Globale Strategie	134
5.5	Direkte Nachweismethoden von rhEPO und NESP	140
5.5.1	Experimente hinsichtlich eines Nachweises mittels Massenspektrometrie	140
5.5.2	Direkter Nachweis von EPO im Urin	141
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	143
7	LITERATUR	VII
ANHANG	XVI
Anhang 1	XVI
Anhang 2	XIX

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Ac	Acetat
ADK	Anti-Doping-Kommission
Aranesp	Handelsname für Darbepoetin alfa (NESP) von AMGEN Inc.
Asn	Asparagin
BRP	engl. <i>biological reference product</i> – biologische Referenzsubstanz
CV	engl. <i>coefficient of variation</i> – Variationskoeffizient
DB	Doppel-Blot
DLV	Deutscher Leichtathletikverband
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPC Biermann	Diagnostic Products Corp Biermann, Bad Nauheim
DSB	Deutscher Sportbund
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
uEPO	urinäres Erythropoietin
ESI-TOF-MS	engl. <i>electro spray ionisation-time of flight-mass spectrometry</i> – Flugzeit-massenspektrometer mit Elektrosprayionisation
FAB	engl. <i>fast atom bombardment</i> – schneller Atombeschuss
FIS	franz. <i>Fédération Internationale de Ski</i> – Internationaler Skiverband
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GlcNac	N-Acetylglucosamin
HCT	engl. <i>haematocrit</i> – Hämatokrit
HFR	engl. <i>high fluorescence reticulocyte</i> – hochfluoreszierende Retikulozyten
HGB	engl. <i>haemoglobin</i> – Hämoglobin
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> – Hochdruck-Flüssig-Chromatographie
HPLC-ESI-MS	engl. <i>high pressure liquid chromatography-electro spray ionisation-mass spectrometry</i> – Kopplung Hochdruck-Flüssig-Chromatographie und Massenspektrometer mit Elektrosprayionisation
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i> – Meerrettich-Peroxidase
IAAF	engl. <i>International Association of Athletics Federation</i> – Internationaler Leichtathletikverband
i.m.	intramuskulär

i.v.	intravenös
IDAS	Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie
IEF	isoelektrische Fokussierung
IOC	engl. <i>International Olympic Committee</i> – Internationales Olympisches Komitee
KG	Körpergewicht
LFM	engl. <i>low fat milk powder</i> – Milchpulver
LFR	engl. <i>low fluorescence reticulocyte</i> – niedrigfluoreszierende Retikulozyten
MALDI	engl. <i>matrix assisted laser desorption ionization</i> – Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
Man	Manose
Max	Maximum
Min	Minimum
MCV	engl. <i>mean corpuscular volume</i> – mittleres Zellvolumen
MCH	engl. <i>mean corpuscular hemoglobin</i> – mittleres Zellhämoglobin
MCHC	engl. <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i> – mittlere Zellhämoglobinkonzentration
MFR	engl. <i>middle fluorescence reticulocyte</i> – mittelfluoreszierende Retikulozyten
NESP	engl. <i>Novel Erythropoiesis Stimulating Protein</i>
NeuAc	engl. <i>N-acetylneuraminic acid</i> – Sialinsäure
NOK	Nationales Olympisches Komitee
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> – phosphatgepufferte Salzlösung
RBC	engl. <i>red blood cells</i> – Anzahl der Erythrozyten
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	Drehzahl
RSA	Rinderserumalbumin
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> – Natriumdodecylsulfat
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> – Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
sTfR	engl. <i>soluble transferrin receptor</i> – löslicher Transferrinrezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UCI	franz. <i>Union Cycliste Internationale</i> – Internationaler Radsportverband
WADA	engl. <i>World Anti-Doping Agency</i> – Welt Anti-Doping Agentur

1 Einleitung

Mit der Wiederbegründung der Olympischen Spiele 1896 begann die Wandlung der Sportarten von einer Amateurveranstaltung zu einem durchgeplanten und spezialisierten Hochleistungssport. Waren anfangs noch zwei bis drei Trainingsstunden pro Woche üblich, so musste das Training bald auf vier bis sechs Stunden täglich ausgedehnt werden, um international nennenswerte Leistungen zu erzielen. Die logische Konsequenz der Erhöhung der Trainingszeiten war die gleichzeitige Umkehr vom olympischen Amateur zum olympischen Professional, wobei diese Professionalisierung auch mit einer Kommerzialisierung verbunden war. Immer mehr Wettkämpfe wurden durchgeführt und die Regenerationszeiten zwischen den Veranstaltungen verkürzten sich entsprechend. Die Anpassung des Trainingsplanes an die wachsende Anzahl der Veranstaltungen führte wiederum zu einer steigenden Trainingsbelastung. Während immer mehr Sportarten eine Kommerzialisierung erfuhren, nahmen auch immer mehr Nationen an den internationalen Wettkämpfen teil, wodurch sich die Konkurrenz an der Weltspitze noch erhöhte.

Angesichts dieser Entwicklung war vorherzusehen, dass Hochleistungssportler nach zusätzlichen Möglichkeiten der Leistungssteigerung suchten und verschiedene Dopingsubstanzen anwendeten. Mit der Verfügbarkeit der heutigen Analysetechnik, Trennung mittels Gas- oder Flüssigchromatographie und massenspektrometrischer Detektion, ist der Nachweis der traditionellen Dopingmittel, wie Amphetaminen oder Anabolika, vom analytischen Standpunkt betrachtet, kaum ein Problem. In den letzten Jahren bzw. Jahrzehnten hat sich das Problemfeld der Dopinganalytik jedoch vergrößert, da von der pharmazeutischen Industrie eine Reihe von körpereigenen Substanzen gentechnisch hergestellt werden können. Die Differenzierung zwischen endogenen und exogenen Verbindungen erfordert andere Nachweismethoden und stellt die Dopinganalytik zum Teil vor erhebliche Schwierigkeiten.

Da die Ausdauerleistung eines Athleten im Wesentlichen von dessen Sauerstofftransportkapazität ($VO_2\text{max}$) bestimmt wird, wurde versucht diese durch gezieltes Training zu erhöhen. Die älteste und bekannteste Form ist das Höhenttraining ($> 2500\text{ m}$), was früher mit einem Training in der entsprechenden Höhe verbunden war. Mit der technischen Entwicklung ergaben sich auch für diesen Bereich neue Möglichkeiten, wie Unterdruckkammern oder Hypoxieräume mit einer zusätzlichen Stickstoffanreicherung der Atemluft. Aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten und der nur relativ kurzen Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität wurde auch hier versucht durch Manipulationen diese künstlich zu steigern.

Bereits 1976 gab es die ersten Diskussionen über den Missbrauch von Bluttransfusionen. Wegen der aufwendigen Prozedur der Blutentnahme, Aufbewahrung und Retransfusion und

nicht zuletzt wegen der Risiken bei Fremdbluttransfusionen konnte man davon ausgehen, dass diese nicht sehr verbreitet waren. Die Situation änderte sich grundlegend, als es möglich war, humanes Erythropoietin (hEPO) gentechnisch herzustellen. Mit der Zulassung 1989 als Medikament war das rekombinante humane Erythropoietin (rhEPO) weltweit erhältlich und wurde zunächst zur Behandlung von Patienten mit Nierenversagen eingesetzt. Gleichzeitig war es damit möglich, Effekte, die ein Sportler nur durch wochenlanges Höhentraining erreichen konnte, mittels weniger Injektionen von rhEPO zu erzielen und vor allem langfristig durch weitere Verabreichungen zu erhalten. Das Internationale Olympische Komitee (IOC) setzte 1989 die Klasse der Peptidhormone auf die Liste der verbotenen Wirkstoffe, aber erst 1992 wurde Erythropoietin unter den zu dieser Klasse gehörenden Substanzen explizit aufgeführt. Anders als für fast alle anderen verbotenen Substanzen gab es jedoch keinen analytischen Nachweis, um gentechnisch hergestelltes von körpereigenem Erythropoietin zu unterscheiden, auch wenn weltweit an Nachweismethoden geforscht wurde.

Die hier vorgestellte Arbeit wurde Ende 1997 begonnen, als dem Problem des Erythropoietindopings noch keine große Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Dies sollte sich mit dem Skandal während der Tour de France 1998 schlagartig ändern, als man feststellte, dass zumindest im Radsport Erythropoietin von einer großen Anzahl von Athleten missbraucht wurde. Um relativ schnell dieses Problem zu begrenzen, wurden hauptsächlich die indirekten hämatologischen Parameter favorisiert. Dabei war die Zielstellung, entsprechende Parameter zu finden, mit denen sich eindeutig eine anormal erhöhte Erythropoese feststellen lässt, wobei jeder der untersuchten Sportler mit Normalwerten diese Werte nicht überschreiten sollte. Im Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Kreischa (IDAS) wurde dazu erstmals bei Hochleistungssportlern der Parameter Retikulozyten untersucht.

Vor Beginn der Sommerolympiade 2000 in Sydney wurde eine mit großem Aufwand durchgeführte Studie von Parisotto et al. ^[1] vorgestellt, bei der mittels einer statistischen Auswertung ein Missbrauch von Erythropoietin mit hoher Sicherheit erkannt werden sollte. Gleichzeitig wurde in den Dopinglabors Köln, Oslo und Kreischa ein durch das IOC unterstütztes Projekt durchgeführt, wobei unterschiedliche Einflüsse auf die indirekten hämatologischen Parameter der statistischen Modelle ^[1] untersucht werden sollten. Alle hämatologischen Messungen der Teilprojekte wurden dabei in Kreischa durchgeführt. Ziel dieser Studien war es, analog zu den bereits vorher durchgeführten Untersuchungen, Grenzwerte zu finden, die eine Differenzierung zwischen der natürlichen Erythropoese und einer durch Erythropoietingabe gesteigerten Erythropoese, ermöglichen würden.

Für weltweites Aufsehen sorgte eine kurz vor Beginn der Sommerolympiade 2000 erschienene Veröffentlichung ^[2] über den direkten Nachweis von rekombinantem Erythropoietin. Mit der

Etablierung dieser zeit- und kostenaufwendigen Nachweismethode in einigen Dopinglabors, unter anderem auch in Kreischa, änderte sich die Aufgabenstellung für die indirekten Parameter. War es vorher erforderlich, die Grenzwerte so festzulegen, dass ein falsch positiver Befund auszuschließen wäre, mit dem Nachteil einen Missbrauch möglicherweise nicht zu erkennen, konnte nun eine große Anzahl Proben innerhalb kurzer Zeit unter Verwendung von niedrigeren Grenzwerten gescreent werden. Bei einem auffälligen Befund, d. h. Überschreiten der Grenzwerte, würde in jedem Fall die korrespondierende Urinprobe mittels der direkten Methode untersucht und erst mit dem Nachweis des rekombinanten Erythropoietins als positiv bewertet werden.

Da die Bestätigungsanalyse für einen positiven Befund immer mit Urinproben durchgeführt wird, stellt sich die Frage, ob ein vorheriges Screening der Blutproben sinnvoll ist oder die zusätzliche Abnahme von Blut durch einen Arzt, der anschließende schnelle, gekühlte Transport der Proben sowie das Screening selbst nicht nur zusätzliche Kosten verursachen. Dem steht als Argument entgegen, dass die Analyse von Urinproben zum einen sehr kostenintensiv ist und zum anderen einen wesentlich höheren Zeitaufwand erfordert, wodurch die Anzahl der bearbeitbaren Proben eingeschränkt wird. Die Auswahl der zu analysierenden Urinproben nach erfolgtem Screening der Blutproben ist daher bei einer größeren Probenzahl, z. B. bei Olympischen Spielen und Meisterschaften, unbedingt notwendig. Weiterhin ist in der Zukunft sowohl mit einer steigenden Anzahl von rekombinanten Erythropoietinpräparaten (z. B. DYNEPO) als auch mit der medizinischen Zulassung anderer Techniken ^[3] der Erythropoesestimulation zu rechnen. Mit diesen Fortschritten in der medizinischen Behandlung von hämatologischen Erkrankungen stellt sich die Frage, ob ein Missbrauch solcher neuen Präparate und Techniken noch mittels Urintest zu detektieren wäre. Im Gegensatz dazu ließe sich eine Veränderung der hämatologischen Parameter immer erkennen, da die Erythropoesestimulation das Ziel eines Missbrauchs wäre. Ein weiteres Problem sind die bisher meist nicht beachteten, künstlichen Sauerstoffträger auf Hämoglobinbasis, wie Hemopure[®], Hemolink[™], Oxyglobin[®] oder PEG-Hgb. Aufgrund ihrer Eigenschaften sind diese Substanzen ausschließlich im Blut nachweisbar und mit einem Urintest nicht zu erfassen. Hier besteht also in jedem Fall die Notwendigkeit von Blutproben, dabei ist die Bestimmung dieser Blut-Substituenten zurzeit schon mit dem ADVIA 120 (Methode extrazelluläres Hämoglobin) möglich. Das Problem des Dopings mit rhEPO bzw. vergleichbaren Substanzen ist daher nicht gelöst und es muss auch in Zukunft Forschungsarbeit geleistet werden, um das Ziel eines fairen und sauberen Sports zu erreichen.

1.1 Humanes Erythropoietin und biologische Wirkung

Das Hormon Erythropoietin ist ein Glykoprotein, das für die Reifung und Proliferation von Erythrozyten aus den pluripotenten Stammzellen verantwortlich ist. Die Bildung von Erythropoietin erfolgt beim Erwachsenen zum größten Teil in den kortikalen Tubuluszellen der Niere und zu einem geringen Teil in der Leber. Die Produktion von Erythropoietin wird durch einen Sauerstoffmangel im Gewebe (Hypoxie) reguliert. Erythropoietin ist der wichtigste erythropoesestimulierende Faktor; es ist essenziell für die erythroide Differenzierung der Zellen. Bei einer zusätzlichen Verabreichung – unabhängig vom Gesundheitszustand – wird sowohl die erythroide Differenzierung und Proliferation als auch die Hämoglobinbildung sowie die Ausschüttung von Retikulozyten, der direkten Vorläuferzellen der Erythrozyten, aus dem Knochenmark gesteigert ^[4-9].

Erythropoietin besitzt eine Polypeptidkette aus 166 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken zwischen den Aminosäuren 7 und 161 sowie 29 und 33. Die Glykane sind dreimal über N-Glykosilierungsstellen (Asn24, Asn38 und Asn 83) und einmal über eine O-Glykosilierungsstelle (Ser126) mit der Peptidkette verbunden ^[10-13]. Aufgrund der Mikroheterogenität der Oligosaccharide, d. h. der Strukturunterschiede (besonders der N-gebundenen Glykane), ergibt sich eine molare Masse von 30 bis 34 kDa.

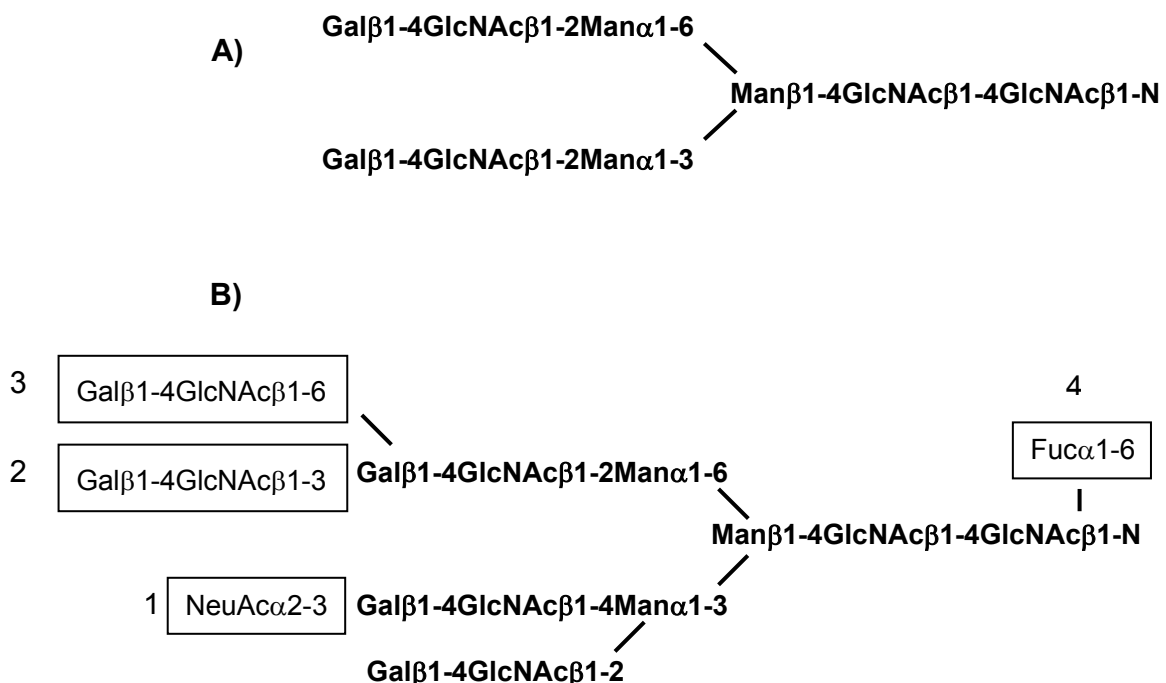


Abb. 1: Schematische Struktur von zwei komplexen N-Glykanen. **A)** diantennäre Basisstruktur, **B)** triantennäre Basisstruktur (fett gedruckt) mit terminaler Sialinsäure (1), zusätzlicher Lactosamineinheit (2), Lactosaminverzweigung (3) sowie proximaler Fucosylierung (4).

Die genaue Charakterisierung der Mikrostruktur im Serum ist bisher noch nicht gelungen. In fast allen veröffentlichten Untersuchungen, angefangen von der ersten Veröffentlichung 1977 von Miyake et al. ^[14] bis zu den letzten Veröffentlichungen ^[10, 15-18], in denen die Struktur von humanem Erythropoietin untersucht wurde, erfolgte die Reinigung des Proteins aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie, wobei zwischen 80-1860 l Urin aufgearbeitet wurden. Bisher gibt es lediglich eine Veröffentlichung ^[19], in der das Glykoprofil von humanem Erythropoietin einzelner Personen untersucht wurde. Dabei handelte es sich jedoch ebenfalls um Serumproben anämischer Patienten mit einer stark erhöhten Erythropoietinkonzentration (40.000 mU/ml vs. 15 mU/ml, Section for Doping Analysis, Hormone Laboratory, Aker University Hospital, Oslo, Norwegen, Venke Skibeli, persönliche Mitteilung).

Die charakteristischen Strukturen, die bei urinärem Erythropoietin (uEPO) gefunden wurden, sind sehr unterschiedlich. Der Großteil der gefundenen Glykostrukturen kann dem quatroantennären Typ ^[15, 16] zugeordnet werden (siehe dazu auch Struktur der Glykanstandards im Anhang 1). Einige Variationen dieser Grundstruktur besitzen zusätzlich sich wiederholende Einheiten von N-Acetylglucosamin (vgl. dazu **Abb. 1 B**) 2), die als Repeats bezeichnet werden. Diese Repeats können sich auch an unterschiedlichen Antennenarmen der Grundstruktur befinden, so dass sich eine erneute Variation ergibt. Ca. 80-97 % aller Glykostrukturen verfügen weiterhin über N-Acetylneuraminsäurereste (NeuAc, Sialinsäure, vgl. dazu **Abb. 1, B**) 1), die über eine α -2,3-Bindung verknüpft sind ^[16]. Die Unterschiede in der Antennenstruktur wirken sich auf die Halbwertszeit und damit die Aktivität in vivo aus. Generell kann gesagt werden, dass Erythropoietin mit stärker verzweigten Glykanen eine größere Halbwertszeit besitzt ^[20, 21]. Außerdem scheint auch der Anteil an Sialinsäure die Aktivität des Erythropoietins zu beeinflussen ^[13], wobei hier allerdings die Mechanismen noch nicht aufgeklärt sind. Insbesondere die größere Anzahl der Sialinsäuren wird als Ursache für die erhöhte Halbwertszeit des Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP, Darbeopietin alfa), eine gentechnisch modifizierte Variante von rhEPO, angenommen ^[22-25].

Die Glykosylierung ist dabei von dem jeweils exprimierenden Zellen abhängig, so dass sich besonders bei den gentechnisch hergestellten Proteinen die Strukturen je nach verwendeten Wirtszellen unterscheiden ^[26-28]. Um ein Doping mit Erythropoietin eindeutig zu beweisen, ist es daher notwendig, rekombinantes Erythropoietin von körpereigenem, humanem Erythropoietin zu unterscheiden.

1.2 Rekombinantes Erythropoietin als Medikament und als Dopingsubstanz

1.2.1 Medizinische Verwendung

Da Erythropoietin vorwiegend in der Niere synthetisiert wird, kommt es bei einem Nierenversagen zur Entwicklung einer renalen Anämie und damit zu einer Verminderung der Hämoglobinkonzentration. Seit 1988, als gentechnisch hergestelltes Erythropoietin (rhEPO) kommerziell verfügbar wurde, wird dieses zur Behandlung von Patienten mit chronischem Nierenversagen eingesetzt. Mit der Verabreichung von rhEPO kann die renale Anämie weitgehend korrigiert werden, womit sich Leistungsfähigkeit und Lebensqualität der Betroffenen erhöhen ^[29-31]. Neben der Verwendung bei Anämien wird Erythropoietin in zunehmendem Maße auch vor chirurgischen Eingriffen zur Eigenbluttransfusion angewandt ^[24, 32-35]. Die Einsatzgebiete von rhEPO haben sich in den letzten Jahren immer mehr erweitert und die zunehmende Bedeutung dieses Medikamentes ist allein an dem jährlichen Umsatz von zwei Milliarden US Dollar zu erkennen; zumal neue modifizierte Varianten erschienen sind (NESP) ^[22, 25, 36] oder sich in den letzten Phasen der klinischen Zulassung befinden (DYNEPO).

1.2.2 Missbrauch von rekombinantem Erythropoietin und Steigerung der Ausdauerleistung

Bereits 1976 kamen die ersten Diskussionen auf, dass Ausdauerathleten durch Bluttransfusionen eine Leistungssteigerung erzielen würden. Es war jedoch lange Zeit nicht geklärt und wird zum Teil auch heute noch bestritten, dass eine Erhöhung der Erythrozytenzahl bzw. der Hämoglobinmenge eine Leistungssteigerung bewirkt. Berglund et al. ^[37] zeigte 1987 mit zwei Gruppen gut trainierter Skilangläufer erstmals, dass durch die Reinfusion von 1350 ml Blut nach vier Wochen eine deutliche Leistungssteigerung (ca. 5 %) zu erreichen war. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Studien gefunden werden ^[38, 39]. Da diese Methode sehr aufwendig und nicht ganz ohne Risiko ist ^[40-43], wurde seit der Verfügbarkeit von rekombinantem Erythropoietin spekuliert, dass die Reinfusion keine Rolle mehr spielt.

Bisher gab es nur wenige Studien, die diese Leistungssteigerung bei Sportlern untersuchten. Die Wirkung von Erythropoietin auf die Ausdauerleistung wurde von Berglund und Ekblom an 15 gesunden männlichen gut trainierten Personen gezeigt ^[44]. Bereits durch eine Behandlung mit niedrigen Dosen rhEPO s.c. kam es zu einer Erhöhung der Hämoglobinkonzentration von 152 auf 169 g/l, was mit einer Steigerung der maximalen Sauerstoffaufnahme von 4,52 auf 4,88 l/min verbunden war. Diese Erhöhung entspricht etwa der, die durch die Infusion von drei Einheiten Erythrozyten erreicht werden kann. Erst 1992 wurde Erythropoietin explizit vom IOC

auf der Liste der verbotenen Wirkstoffe und Methoden aufgeführt, wobei zu diesem Zeitpunkt keine Nachweismethode für das rekombinante Protein etabliert war.

Die 2000 veröffentlichte Studie von Parisotto et al. ^[1] hinsichtlich der Kombination von indirekten Parametern zur Detektion eines EPO-Dopings beschäftigte sich auch mit dem Aspekt der Leistungssteigerung. Die untersuchten Sportler erhielten 50 U/kg Körpergewicht dreimal pro Woche und zusätzlich intravenöse oder orale Eisensubstitution. Zur Erfassung einer Ausdauersteigerung wurde neben der Gesamthämoglobinmenge auch die maximale Sauerstoffaufnahme gemessen. Bei beiden Athletengruppen, die EPO verabreicht bekamen, konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine Steigerung beider Parameter im Bereich von 6-12 % festgestellt werden.

Die Risiken, die bei dem Missbrauch von rhEPO auftreten können, bestehen weniger in einer immunologischen Reaktionen, da selbst bei der Untersuchung einer großen Zahl von Dialysepatienten anti-rhEPO-Antikörper nur in äußerst geringer Anzahl nachgewiesen werden konnten ^[45], sondern vielmehr in den kardiovaskulären Folgen einer erhöhten Erythrozytenzahl. Gerade bei gut trainierten gesunden Sportlern besteht im Fall eines Missbrauchs von EPO das Risiko in der Kombination von dauerleistungsbedingter Bradykardie und Hypotonie, was zu einer Thrombembolie führen kann. Aufgrund des durch die Belastung verursachten Flüssigkeitsverlustes kommt es insbesondere bei längerer Belastung (z. B. Radrennen oder Marathon) zu einer Erhöhung des Hämatokrits, teilweise bis zu Werten von über 60 % ^[46] und zu den damit verbundenen Risiken ^[47-51].

1.3 Ansätze der Dopinganalytik für Erythropoietin

1.3.1 Indirekte Methode – Nachweis erhöhter Erythropoese

1.3.1.1 Grenzwerte zum Schutz der Gesundheit

Da ein direkter Nachweis von rhEPO nicht möglich war, wurde versucht durch die Festlegung von Grenzwerten einen Missbrauch von Erythropoietin zu erkennen. Aufgrund der großen Schwankungsbreite der natürlichen Erythropoietinkonzentration ^[52] mussten jedoch korrelierende Parameter gefunden werden. Als Präventivmaßnahme wurden dabei von einigen Sportverbänden Parameter des kleinen Blutbildes (Hämatokrit, Hämoglobin) vor dem Wettkampf bestimmt und bei Überschreiten des festgelegten Grenzwertes zum Schutz der Gesundheit des Athleten dieser nicht zum Wettkampf zugelassen ^[46], was jedoch nicht als Dopingverstoß gewertet wird.

1.3.1.2 Der lösliche Transferrinrezeptor

Mit dem löslichen Transferrinrezeptor (sTfR) wurde bereits 1994 von Gareau et al. ein viel versprechender Parameter hinsichtlich der Verwendung in der Dopinganalytik untersucht ^[53]. In dieser Veröffentlichung wurden bei Hämodialysepatienten, die Erythropoietin verabreicht bekamen, erhöhte Werte des sTfR im Vergleich zu gesunden Hochleistungssportlern gefunden. Die Rolle des intakten Transferrinrezeptors besteht in der Anlagerung von Transferrin und dem Weitertransport des am Transferrin gebundenen Eisens in die Zelle. Der lösliche Transferrinrezeptor ist ein abgetrenntes Teilstück des ursprünglichen intakten Rezeptors. Warum eine Abtrennung erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es steht aber fest, dass beim Gesunden eine gesteigerte Erythropoese mit einer Erhöhung der sTfR-Konzentration im Serum korreliert. Es gibt jedoch auch eine Reihe von hämatologischen Erkrankungen, die ebenfalls zu einer Erhöhung der sTfR-Konzentration führen können ^[54].

Basierend auf den ersten Untersuchungen ^[53] wurde in einer späteren Studie ^[55] das Verhältnis aus sTfR und Ferritin als möglicher Indikator für einen Dopingnachweis vorgeschlagen.

1.3.1.3 Kombination von Parametern

In nachfolgenden Arbeiten ^[56] wurde die Kombination von mehreren Parametern zur Detektion eines Missbrauchs untersucht und als zusätzlicher Parameter ^[57] die Konzentration der Retikulozyten in die Grenzwertdiskussion mit einbezogen. Retikulozyten, die noch Reste des Zellkerns enthalten, sind die direkten Vorstufen der Erythrozyten. Sie sind für die Dopinganalytik von besonderem Interesse, da sich eine Stimulation der Erythropoese direkt auf die Zahl und die Reifestadien der Retikulozyten auswirkt ^[9, 58-63], so dass dieser Parameter besonders im klinischen Bereich zur Überwachung der Effizienz von rhEPO-Therapien eingesetzt wird ^[29, 33, 64, 65]. Dieser Ansatz eines Multiparametermodells, d. h. der Kombination aus kleinem Blutbild, Retikulozytenparametern und relevanten Serumparametern führte zur Entwicklung zweier statistischer Modelle ^[1, 66], die zur Olympiade 2000 in Sydney angewandt wurden. Einen weiteren Ansatz geben die Arbeiten von Schmidt et al. ^[67, 68] hinsichtlich der Erfassung der Gesamthämoglobinmasse und des Blutvolumens. Gut trainierte Ausdauersportler haben im Vergleich zu anderen Athleten und „normalen“ Personen ein wesentlich erhöhtes Blutvolumen und Gesamthämoglobin (30-40 %) ^[69], wobei die Steigerung durch Training und Höhengaufenthalt nur begrenzt möglich ist.

Ziel aller Arbeiten war es, Grenzwerte für diese Parameter zu finden, die auf eine abnormale Steigerung der Erythropoese hinweisen, jedoch so gewählt sind, dass gesunde Hochleistungssportler sie weder durch Belastung noch durch verschiedenste Trainingsmethoden überschreiten würden. Das war notwendig, da es keine Nachweismethode gab, die

es ermöglichte zwischen rekombinantem und humanem Erythropoietin zu unterscheiden. Der Nachteil der so gewählten Grenzwerte ist, dass ein „moderates“ Doping mit großer Wahrscheinlichkeit nicht nachgewiesen werden kann.

1.3.2 Direkter Nachweis von rekombinantem Erythropoietin

Aufgrund der strukturellen Unterschiede, die bei rekombinantem Erythropoietin verschiedener Zelllinien auftreten ^[70-72], war zu erwarten, dass Unterschiede zwischen humanem und gentechnisch hergestelltem EPO existieren. In einer der ersten Arbeiten ^[15] hinsichtlich der strukturellen Unterschiede wurden zwischen rekombinantem und urinärem Erythropoietin lediglich Unterschiede in dem Anteil an Sialinsäuren gefunden, während die Grundstrukturen identisch waren. Mit fortschreitender Entwicklung der Analytik sowie der Verwendung anderer Analysetechniken ^[17, 73-75] war es möglich mit sehr wenig Probenmaterial Aussagen über die Struktur zu erhalten. Gerade durch den Einsatz neuester Methoden und Geräte der Massenspektrometrie ^[26-28, 76-78] konnten detaillierte Aussagen über die Struktur der Glykanketten erhalten werden. Jedoch war das Ziel dieser Untersuchungen ausschließlich die genaue Charakterisierung von gentechnisch produziertem Erythropoietin aus verschiedenen Zelllinien, wobei für alle Untersuchungen große Mengen an Protein zur Verfügung standen. Eine Übertragung dieser Ergebnisse und Methoden auf humane Proben ist daher nicht ohne weiters möglich.

Für den direkten Nachweis von Erythropoietin gab es zwei prinzipielle Ansätze. Zum einen den selektiven Nachweis von Erythropoietin in der Urinmatrix nach Konzentration und zum anderen die Isolierung von Erythropoietin aus der Matrix mit nachfolgender Analytik. Der erste Artikel, der sich mit der Differenzierung von rekombinantem und humanem Erythropoietin aus dem Serum und dem Urin beschäftigt, wurde 1995 von Wide et al. ^[79] veröffentlicht und sorgte für viel Aufsehen. Der apparative Aufwand der Methode (Säulengelchromatographie), die Eichung mit radioaktiv markiertem humanem Albumin, der zeitliche Aufwand einer einzelnen Messung, vor allem aber der kommerziell nicht erhältliche Antikörper für die immunologische Bestimmung der EPO-Fractionen führten jedoch dazu, dass diese Ergebnisse in den folgenden Jahren in keinem anderen Labor bestätigt werden konnten.

Um so mehr sorgte die Veröffentlichung von Lasne und de Ceauriz ^[2] kurz vor Beginn der Olympiade in Sydney 2000 für Aufmerksamkeit. In diesem Artikel wurde nicht nur gezeigt, dass sich rhEPO und uEPO durch eine isoelektrische Fokussierung trennen lassen, sondern auch, dass sich das Bandenmuster des rhEPO bei damit behandelten Patienten wieder finden lässt. Um die Methode ^[80] als Nachweis in der Dopinganalytik zu validieren, wurde diese in weiteren Labors, darunter auch im IDAS Kreischa, aufgebaut. Wurden die Ergebnisse anfangs noch sehr

kontrovers diskutiert, gewann die Methode schlagartig weltweite Aufmerksamkeit, als damit der Missbrauch von NESP bei drei Athleten während der Olympiade 2002 in Salt Lake City bewiesen werden konnte.

Der Ansatz der Isolierung aus der Urinmatrix wurde aufgrund der Probleme der selektiven Isolierung von Erythropoietin und den aufwendigen Nachweismethoden nur von wenigen Labors verfolgt. Bisher gibt es lediglich eine Veröffentlichung^[19], die sich mit den Glykanprofilen des humanen Erythropoietins aus Proben anämischer einzelner Patienten beschäftigt. Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen dem Zuckerprofil des humanen und des rekombinanten Erythropoietins gefunden werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es notwendig, die Methoden an die wesentlich geringeren Erythropoietinkonzentrationen von gesunden Athleten zu adaptieren.

2 Aufgabenstellung

Mit Beginn der Dissertation 1997 bestand die allgemeine Aufgabe in der Problematik „Erythropoietin und Doping“ sowie der Fortsetzung der Mitte 1997 gestarteten Populationsstudie der Anti-Doping-Kommission (ADK). Da die indirekten Parameter die schnellste Anwendung versprachen und zudem solche Grenzwerte auch für andere Problemstellungen verwendet werden (Testosteron/Epitestosteron-Verhältnis), wurden diese favorisiert.

2.1 Indirekte Parameter zum Screening

2.1.1 Populationsstudie

Im Rahmen des Projektes „Blutkontrolle ADK“ sollten 200 Hochleistungssportler verschiedener Sportarten untersucht werden, um Referenzwerte für Erythropoietin und korrelierende Faktoren zu bestimmen. Dazu sollten neben den Blutproben auch Urinproben der Sportler gesammelt werden, um festzustellen, welche Matrix für die Detektion eines rhEPO-Missbrauchs besser geeignet ist. Die Bestimmung der hämatologischen Parameter sollte allein im IDAS Kreischa durchgeführt werden, die aller Serumparameter sowohl in Kreischa als auch im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln.

2.1.2 Verlaufsuntersuchung

Als Fortführung der oben aufgeführten Populationsstudie wurde mit dem Deutschen Leichtathletikverband (DLV) eine weitere Studie zur Ermittlung von Referenzwerten durchgeführt. Im Gegensatz zur ersten Studie wurden von jedem Athleten jedoch mehrere Proben über den Zeitraum eines halben Jahres gesammelt. Als neuer Parameter wurden zusätzlich die Retikulozyten der Blutproben bestimmt. Die Abnahme erfolgte analog den Trainingskontrollen durch die Firma PWC GmbH (PWC GmbH - Medizinische Testverfahren im Sport, Grünwald), um eine strikte Trennung zwischen Probennahme und Labor zu gewährleisten. Die hämatologischen Parameter wurden in Kreischa bestimmt, die Serumparameter wiederum in beiden Labors (Köln und Kreischa). Neben der Ermittlung allgemein gültiger Referenzwerte sollte ebenfalls untersucht werden, inwieweit sich individuelle Grenzwerte für jeden Athleten festlegen lassen und somit ein individueller „Blutpass“ erstellt werden könnte.

2.1.3 IOC-Teilprojekte

Im Rahmen einer vom IOC geförderten Kooperation zwischen den drei IOC-akkreditierten Labors Oslo, Köln und Kreischa sollten sowohl direkte Nachweismethoden für rhEPO entwickelt werden als auch die indirekten Parameter, die in den bis dahin durchgeführten Studien gefunden wurden, validiert werden. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen und Ergebnisse wurde dabei der Schwerpunkt auf die Untersuchung verschiedener Einflüsse, wie Belastung, Tagesvariation und Variation über einen längeren Zeitraum, auf die indirekten Parameter gelegt. Ein weiterer Aspekt war, die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse in unterschiedlichen Labors zu überprüfen. Durch die Verwendung eines neuen Hämatologiesystems war es ferner möglich zusätzliche Parameter in die Grenzwertbetrachtung einzubeziehen.

2.1.4 Verlaufsuntersuchung im Zehnkampf

Im Rahmen der Förderung der sportwissenschaftlichen Forschung 2001 wurde als direkte Fortsetzung der DLV-Verlaufsstudie eine „Blutstudie im Zehnkampf“ durchgeführt. Dabei sollten Athleten des deutschen Zehnkampfteams je dreimal untersucht werden. Die Studie sollte zum einen der Überprüfung der bereits gefundenen Grenzwerte dienen, zum anderen aber auch als Dopingkontrolle.

2.1.5 Routineanalytik

Ein wichtiger Aspekt der Arbeit betraf die routinemäßige Analytik von Blutproben auf Erythropoietin. Waren es zunächst nur Proben vereinzelter kommerzieller Veranstaltungen, so ist insbesondere mit der Verfügbarkeit des direkten Nachweises (siehe nachfolgenden Abschnitt) die Probenzahl weiter gestiegen und seit Ende 2002 werden nicht nur Proben von Wettkämpfen analysiert, sondern auch Trainingskontrollen bei Ausdauerathleten durchgeführt.

2.2 Direkter Nachweis extrakorporaler EPO-Applikation als Bestätigungsanalyse

2.2.1 Direkter Nachweis - Isoelektrische Fokussierung

Nachdem im Laboratoire National de Depistage du Dopage eine direkte Nachweismethode für rhEPO entwickelt worden war ^[2, 80], wurde diese ebenfalls im IDAS Kreischa etabliert. Die Unterscheidung rekombinanter Isoformen von humanen erfolgt dabei mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender Visualisierung. Mit der Verfügbarkeit von NESP wurde die Methode im Rahmen der Promotionsarbeit entsprechend angepasst, um dieses Präparat ebenfalls damit nachzuweisen.

2.2.2 Versuche zum Nachweis mittels Massenspektrometrie

Als zusätzliche Nachweismethode sollte vorzugsweise eine massenspektrometrische Methode entwickelt werden. Als Isolierungsmethode wurden eine Immunoextraktion mit Magnetpartikeln (Dynabeads) angewandt. Die ersten Versuche erfolgten mit der Kombination aus chromatographischer Trennung und Erfassung der Massenspektren mittels eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit Elektrosprayionisation. Aufgrund der geringen Probenmengen war es notwendig das Aufgabesystem entsprechend zu ändern, wobei die Kombination aus Nanospray als Quellensystem und massenspektrometrischer Detektion mittels Time-Of-Flight (TOF) am erfolgversprechendsten erschien.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchte Proben – Probennahme und Lagerung

3.1.1 Populationsstudie

Zur Ermittlung von Referenzwerten (Normalwerten) war es für die Populationsstudie notwendig Proben von Hochleistungssportlern zu erhalten. Die Organisation der Blutstudie erfolgte dabei durch die ADK (Herrn Barth). Alle untersuchten Sportler nahmen freiwillig an der Studie teil. Die Probenabnahme erfolgte meist durch den jeweiligen Verbandsarzt, die Proben wurden größtenteils nach dem Training bzw. Wettkampf abgenommen. Hinsichtlich der Aufgabenstellung wurden die untersuchten Sportler nach Geschlecht und Training eingeteilt (siehe **Tab. 1**).

Tab. 1: Anzahl der untersuchten Sportler der Populationsstudie, aufgliedert nach Training und Geschlecht.

Einteilung nach Training	Anzahl Männer	Anzahl Frauen
Kraftsportler	29	10
Kraftausdauersportler	38	22
Ausdauersportler	73	57

Die Probennahme erfolgte jeweils in Absprache mit dem Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln je nach Entfernung und zeitlicher Verfügbarkeit. Von den Sportlern wurden jeweils drei Blutproben, zweimal 10 ml für die Abtrennung des Serums (Monoject Serumentnahmeröhrchen 10ml, Sherwood Medical, Schwalbach) und einmal 3 ml für die Vollblutanalytik (Monoject Blutentnahmeröhrchen 3 ml – K3-EDTA, Sherwood Medical, Schwalbach), abgenommen. Das Serum wurde vor Ort durch Zentrifugation (10 min, 7000 U/min, Zentrifuge EBA 8S) abgetrennt und in Aliquoten von 1 ml bei -20 °C eingefroren transportiert. Die Vollblutproben wurden bei 8 °C gekühlt zum IDAS Kreischa versandt und sofort analysiert. Die restlichen eingefrorenen Proben wurden zwischen den Labors Köln und Kreischa aufgeteilt und bis zur Bestimmung bei -20 °C gelagert.

3.1.2 Verlaufsuntersuchung

Es nahmen insgesamt 26 gesunde Sportler an dieser Studie teil, davon 19 Männer und 7 Frauen. Die Wahl der Sportler erfolgte durch den DLV, wobei die jeweils besten Ausdauerathleten, die ihren normalen Trainingsplan weiter durchführten, ausgewählt wurden. Die Namen der Sportler waren dem Labor nicht bekannt; jeder Sportler erhielt eine Codenummer, mit der die Proben bei der Abnahme versehen wurden. Die Teilnahme an dieser Studie erfolgte auf freiwilliger Basis. Die Proben wurden von der Firma PWC GmbH, der auch die Organisation der Abnahme und der Versand der Proben oblagen, durchgeführt. Damit erfolgte die Probennahme analog den normalen Trainingskontrollen der ADK, d. h. unangekündigt. Die Serumproben (2 x 1 ml) wurden auf Trockeneis versendet und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Vollblutproben (3 ml) wurden bei 8 °C gekühlt zum IDAS Kreischa transportiert und sofort analysiert.

3.1.3 IOC-Projekte

3.1.3.1 Tagesstudie

Die Studie zur Untersuchung der täglichen Variation der untersuchten Parameter wurde durch das Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln (Frau Bialas) organisiert. Es nahmen 62 gesunde Athleten (32 Männer und 30 Frauen) im Alter von 18 bis 38 Jahren daran teil. Die Athleten wurden in zwei Gruppen unterteilt: 32 sehr gut trainierte und 30 durchschnittlich trainierte Athleten. Die Einteilung nach Sportart und Geschlecht ist in **Tab. 2** aufgeführt.

Tab. 2: Anzahl der an der Tagesstudie teilnehmenden Sportler aufgegliedert nach Training und Geschlecht.

Geschlecht	Sportart	Anzahl
Frauen	Ausdauerlauf	10
	Radsport	10
	Kraftsport	10
Männer	Ausdauerlauf	11
	Radsport	10
	Kraftsport	11

Die Blutentnahme erfolgte aus einer Armvene nach einer Ruhezeit von 5 min im Sitzen. Die Zeitpunkte für die Probennahmen waren: 8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 23:00 und 8:00 Uhr am Folgetag. Es wurden jeweils 9 ml Blut zur Abtrennung des Serums und 3 ml zur Vollblutanalytik abgenommen, die Gesamtabnahmemenge betrug damit 72 ml. Die Vollblutproben wurden gekühlt (8 °C) innerhalb von 24 h zum IDAS Kreischa transportiert und unverzüglich analysiert. Die Serumproben wurden in 1 ml Aliquoten bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

3.1.3.2 Jahresstudie

An der Studie zur Erfassung der Variation der Parameter über den Zeitraum eines Jahres nahmen die selben Athleten wie an der Studie zur Untersuchung der Tagesvariation teil (siehe Abschnitt 3.1.3.1). Die Probennahme, Lagerung und Messung erfolgten analog, wobei der Zeitpunkt der Blutabnahme auf 20:00 Uhr festgelegt wurde. Ausgehend von den 20:00 Uhr-Proben der Tagesstudie wurden über den Zeitraum eines Jahres von den Athleten neun weitere Proben abgenommen.

3.1.3.3 Belastungsstudien

Um den Einfluss einer längeren Belastung auf die untersuchten Parameter zu klären, wurden gut trainierte Athleten vor und nach einem Marathon sowie einem Radrennen (72 km Gesamtstrecke Männer, 42 km Gesamtstrecke Frauen) untersucht. An der Marathonbelastungsstudie nahmen 26 Männer und 25 Frauen, an der Radrennbelastungsstudie 28 Männer und 25 Frauen teil. Die Studien wurden durch das Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln (Frau Bialas) organisiert. Die Blutentnahme, der Transport sowie die Lagerung und Messung der Proben erfolgte wie schon in Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben.

3.1.4 Verlaufsuntersuchung Zehnkampf

An der Fortsetzung der Verlaufsuntersuchung des DLV nahmen neun männliche Athleten der Nationalmannschaft (A- und B-Kader) der deutschen Zehnkämpfer teil. Über einen Zeitraum von vier Monaten (April bis Juli 2001) wurden von jedem Athleten drei Blutproben genommen. Die Abnahme der Proben sowie deren Versand erfolgte wie bei der Verlaufsuntersuchung der DLV-Athleten, siehe Abschnitt 3.1.2, durch die Firma PWC GmbH. Die Serumproben (3 x 1 ml) wurden gefroren auf Trockeneis versendet und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Vollblutproben (3 ml) wurden bei 8 °C gekühlt nach Kreischa transportiert und im IDAS sofort analysiert.

3.1.5 Routineanalytik

Die erste routinemäßige Kontrolle von Blutproben auf rhEPO fand zum Hansaplast Marathon in Hamburg 2001 statt. Seitdem wurden bei verschiedenen Veranstaltungen (Hansaplast Marathon Hamburg, ISTAF Berlin, Berlin Marathon) routinemäßig Blutproben abgenommen. Seit Ende 2002 werden zusätzlich Trainingskontrollen durchgeführt, bei denen auch Blutproben mit abgenommen werden. Diese werden auf dem schnellstmöglichen Weg, bei 8 °C gekühlt transportiert und sofort gemessen. Im Gegensatz zu allen vorangegangenen Studien werden jedoch nur Vollblutproben genommen, so dass erst nach deren Messung das Plasma durch Zentrifugation (10 min, 7000 U/min, Zentrifuge EBA 8S) abgetrennt werden kann, welches anschließend bis zur Messung bei -20 °C gelagert wird.

3.2 Hämatologische Untersuchungen

3.2.1 Parameter des roten Blutbildes und Retikulozyten

In diesem Abschnitt soll kurz auf die Grundlagen der Parameter des roten Blutbildes und der Retikulozyten sowie der Messprinzipien der verwendeten Geräte eingegangen werden. Entscheidend für die Auswahl der Methoden und Geräte war vor allem die automatische und reproduzierbare Bestimmung der Parameter. Während in fast allen klinischen Labors die Aufgabe in der Erkennung von hämatologischen Veränderungen bzw. Erkrankungen besteht, welche sich meist eindeutig durch entsprechende morphologische Veränderungen feststellen lassen, kann man davon ausgehen, dass alle Spitzensportler gesund sind. Entsprechende Veränderungen der hämatologischen Parameter sind daher nur gering, so dass manuelle Methoden zur Bestimmung von Blutzellparametern wegen ihrer relativ großen Schwankungsbreite^[9] von Anfang an ausgeschlossen wurden.

1865 entdeckte Erb erstmals die Retikulozyten als Subpopulation der Erythrozyten in hämolysierten Blutproben^[9]. Erst nach Jahrzehnten wurde erkannt, dass Retikulozyten die direkten Vorstufen der Erythrozyten sind und im Gegensatz zu diesen noch Reste des Zellkerns, hauptsächlich Ribonukleotide, aufweisen. Die gegenwärtig für mikroskopische und automatisierte Retikulozytenbestimmungen verwendeten Supravitalfarbstoffe binden bevorzugt an RNS und DNS und bilden eine netzartige Struktur (rete, lat.= Netz). Dieses aus RNS sowie Organellenresten und Ribonukleoproteinkomplexen bestehende Netz wird als „Substantia reticulo-granulofilamentosa“ bezeichnet und prägte den Namen „Retikulozyt“. 1932 beschrieb Heilmayer^[9] erstmals die anhand der unterschiedlichen, durch Supravitalfarbstoffe sichtbaren Muster der verschiedenen Retikulozytenstadien, die sich durch ihren alters- und reifegradabhängigen Anteil der Substantia reticulo-granulofilamentosa unterscheiden. Anhand

dieser prägte er die noch heute gültigen „klassischen“ Reifestufen. Die Ausreifung des Retikulozyten zum Erythrozyten findet beim Menschen unter normalen Bedingungen überwiegend im Knochenmark statt und dauert drei Tage. Lediglich die letzten Stadien werden innerhalb eines Tages im peripheren Blutkreislauf durchlaufen. Dabei verringert sich der Durchmesser und der Hämoglobingehalt steigt, die Reste des Zellkerns degenerieren, so dass Erythrozyten durch die Farbstoffe nicht mehr angefärbt werden. Die Anfärbung der Zellen erfolgt in Abhängigkeit von ihrem RNS-Gehalt, d. h. junge Retikulozyten mit einem hohen RNS-Gehalt binden mehr Farbstoff ^[9].

Die konventionelle Methode zur Bestimmung der Retikulozyten besteht auch heute noch in der basophilen Anfärbung und anschließenden mikroskopischen Differenzierung von 500, 1000 oder 2000 Erythrozyten. Aufgrund der Einwirkung basophiler Farbstoffe, wie Brillantkresylblau, das am häufigsten Verwendung findet, kommt es zur charakteristischen Retikulumbildung und Anfärbung der Substantia reticulo-granulofilamentosa. Diese manuelle Methode besitzt jedoch eine erhebliche Fehlerrate ^[9], gerade bei gesunden Patienten (Athleten), die nur einen geringen Anteil an Retikulozyten im Blut aufweisen.

Erst mit der Verfügbarkeit automatischer Retikulozytenanalysatoren ^[81] war eine sichere und reproduzierbare Analytik möglich. Aufgrund der hohen Spezialisierung und der damit verbundenen Kosten sind selbst heute diese Geräte nur in klinischen Labors, deren Aufgabe in der Erfassung und Überwachung der Erythropoese von Patienten besteht, zu finden. Die verwendeten Grenzwerte zur Einstufung der Reifestadien sind dabei mit Heilmayer ^[9] vergleichbar. Da aber keine internationale Standardisierung besteht, differieren die Ergebnisse je nach Gerätehersteller.

3.2.1.1 Hämoglobinbestimmung

Hämoglobin ist einer der Parameter mit den stabilsten und reproduzierbarsten Ergebnissen, da er auf der direkten kolorimetrischen Messung von Methämoglobin basiert. Dabei werden die Blutzellen lysiert und das Hämoglobin der Zellen freigesetzt. Das Hämoglobin wird durch das Lysereagens in Cyanmethämoglobin transformiert und die Extinktion bei 540 nm ermittelt.

3.2.1.2 Ausgesuchte Parameter der Erythrozyten und Retikulozyten

Alle Parameter der Erythrozyten lassen sich aus der Bestimmung des Zellvolumens und der Zellzahl ableiten und in Verbindung mit der oben aufgeführten Hämoglobinbestimmung können alle relevanten Parameter berechnet werden. Die Bestimmung von Zellvolumen und Zellzahl basiert auf dem Prinzip der Durchflussverfahren. Die Erfassung und Auswertung der Werte

unterscheidet sich dabei erheblich je nach verwendetem Gerät, siehe dazu eine genauere Erläuterung im Abschnitt 3.2.2.

Die Zahl der Erythrozyten wird bei allen Verfahren direkt gemessen und in Million Zellen pro μl angegeben.

Das mittlere Zellvolumen (MCV) ist das Volumen eines durchschnittlichen Erythrozyten und wird aus der Verteilungskurve der Erythrozyten ermittelt.

Der Hämatokrit (HCT) ist der Volumenanteil der Erythrozyten im Plasma und wird als Prozentsatz des Vollblutvolumens angegeben. Der HCT wird aus der Erythrozytenzahl und dem mittleren Zellvolumen berechnet : $\text{HCT} = (\text{RBC} \cdot \text{MCV}) / 10$.

Aus der Volumenverteilung, d. h. der Darstellung Zellzahl gegenüber dem MCV der Erythrozyten, lassen sich die Parameter Makrozyten und Mikrozyten entnehmen. Mikrozyten sind Zellen mit einem Volumen kleiner als 60 fl, Makrozyten sind Zellen mit einem Zellvolumen größer als 120 fl.

Retikulozyten werden bei den entsprechenden Hämatologiesystemen in einem zusätzlichen Messzyklus bestimmt. Durch das Anfärben der Zellen mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff erfolgt die Unterscheidung zwischen Erythrozyten und Retikulozyten. Bei dem Sysmex R 3000 wird die Retikulozytenkonzentration durch die Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt, der Parameter prozentualer Anteil Retikulozyten ist der Anteil der Retikulozyten an der Gesamtzahl Erythrozyten und Retikulozyten. Die Alterseinstufung basiert auf der Messung der Fluoreszenzintensität der angefärbten Zellen und unterscheidet die Bereiche der niedrigfluoreszierenden (LFR), der mittelfluoreszierenden (MFR) und der hochfluoreszierenden Retikulozyten (HFR). Der Reifegrad der Zellen ist dabei indirekt proportional zur Fluoreszenzintensität, d. h. je reifer der Retikulozyt, desto geringer ist das gemessene Fluoreszenzsignal. Auch bei dem Hämatologiesystem ADVIA 120 erfolgt eine Anfärbung der Zellen, es wird jedoch die Absorption der aufgekugelten Zellen gemessen. Gleichzeitig wird durch die Messung des Streulichts das Volumen und der Hämoglobingehalt der Retikulozyten bestimmt. Das Prinzip der verwendeten drei Hämatologiesysteme ist im nachfolgenden Abschnitt 3.2.2 genauer beschrieben.

Durch die Möglichkeit der Volumen- und Hämoglobinbestimmung der einzelnen Retikulozyten beim ADVIA 120 ergeben sich eine Reihe neuer Parameter, die insbesondere Informationen über die momentane Erythropoese geben. Einer dieser Parameter ist der Retikulozythämatokrit,

der als Produkt aus dem mittleren Zellvolumen der Retikulozyten und der Retikulozytenkonzentration berechnet wird ^[1]. Der Retikulozythämatokrit entspricht daher, analog dem Hämatokrit, dem Volumenanteil der Retikulozyten.

3.2.2 Hämatologiesysteme

3.2.2.1 Durchflussverfahren

Die meisten hämatologischen Geräte arbeiten nach dem Durchflussverfahren, wobei das Blut eine winzige Messöffnung passiert und anschließend nach unterschiedlichen Prinzipien ausgewertet wird. Zu nennen sind hier die Impedanzmethode, die Fluoreszenzmessung und optoelektrische Messprinzipien. Um Messungenauigkeiten und -fehler zu vermeiden, ist es wichtig, dass die Messöffnung nur geringfügig größer ist als der Durchmesser der zu zählenden Zellen. Außerdem müssen im Softwareprogramm Schwellenwerte installiert sein bzw. manuell eingegeben werden können, um zu verhindern, dass zufällig entstehende Rauschimpulse als Zellen gezählt werden und um die verschiedenen Blutzellen korrekt zu differenzieren. Unter einem Schwellenwert versteht man dabei die kleinste Größe, die ein Partikel aufweisen muss, um als eine bestimmte Zelle registriert zu werden.

3.2.2.2 CELL-DYN[®] 1300

Die Vollblutproben der Populationsuntersuchung und der Verlaufsuntersuchung wurden mit einem CELL-DYN[®] 1300 Hämatologie-Analysensystem (Abbott GmbH Diagnostika, Wiesbaden-Delkenheim) analysiert. Als Messmethoden wurden die Impedanzmessung zur Zählung von roten und weißen Blutzellen sowie die modifizierte Cyanmethämoglobinmethode (3.2.1.1) zur Hämoglobinbestimmung verwendet. Bei der Impedanzmethode, auch als Coulter- bzw. konduktometrisches Prinzip bezeichnet, wird das mit einer Elektrolytlösung verdünnte Blut durch eine winzige Messöffnung gesaugt; der sich beim Durchtritt eines Partikels ändernde elektrische Widerstand wird gemessen und in ein Signal umgesetzt. Das Signal ist abhängig von dem Volumen und der Durchflusszeit des Partikels. Alle Parameter des roten Blutbildes werden aus diesen Messwerten entweder direkt bestimmt oder berechnet.

3.2.2.3 Sysmex R3000

Die Bestimmung der Retikulozytenparameter der Verlaufsuntersuchung erfolgte mit einem Sysmex R3000 (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt), dem einzigen zu dieser Zeit verfügbaren stand-alone Retikulozytenanalysator. Es wurden folgende Parameter bestimmt: die Erythrozyten-, die Thrombozyten- und die Retikulozytenkonzentration sowie eine

Altersklassifizierung der Retikulozyten vorgenommen. Die Bestimmung der Parameter erfolgt nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie (siehe **Abb. 2**).

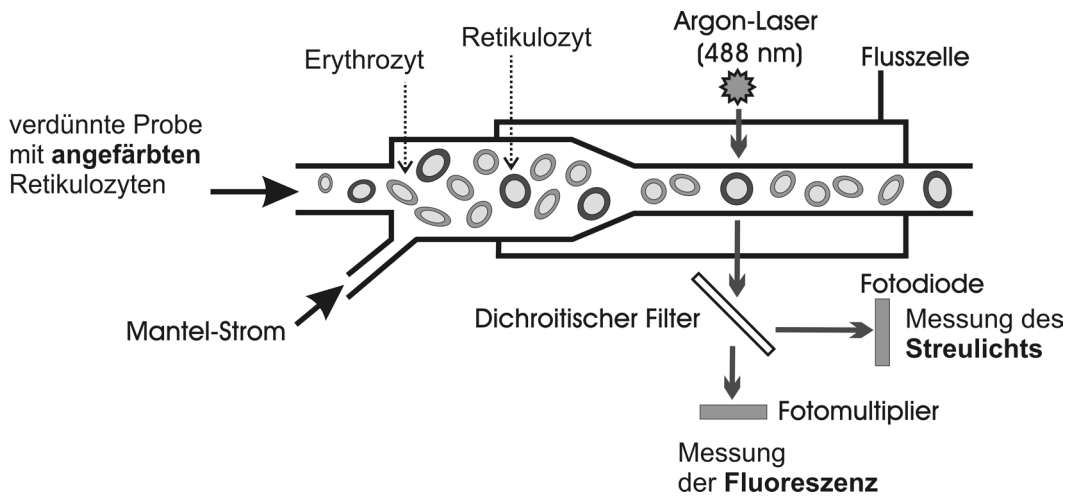


Abb. 2: Das Prinzip der Durchflusszytometrie des Sysmex R3000.

Dabei wird das angesaugte Vollblut mit dem Fluoreszenzfarbstoff Auramin-O versetzt, welcher an die noch vorhandenen RNS-Reste der Retikulozyten bindet. Die Probe wird verdünnt und hydrodynamisch fokussiert. Bei der Passage durch die Flusszelle wird jede Blutzelle durch einen Laserstrahl beleuchtet, wobei die Farbstoffmoleküle durch diesen angeregt werden. Die Lichtstreuung und die Fluoreszenz werden gemessen und als Indikator für Zellgröße und RNS-Gehalt verwendet. Die Vorwärtsstreuung ist von der Zellgröße und Zelldichte abhängig; die gemessene Fluoreszenz ist dem RNS-Gehalt der Zellen direkt proportional. Durch Auftragen der Streuung (Ordinate) gegenüber der Fluoreszenz (Abszisse) erhält man ein Scattergram der Zellen, anhand dessen sich diese in Erythrozyten, Retikulozyten und Thrombozyten einteilen lassen.

3.2.2.4 ADVIA 120

Beim optoelektrischen Messprinzip, das beim ADVIA 120 (Bayer Diagnostics, Fernwald) Verwendung findet, fließt das verdünnte Blut durch eine Küvette, die seitlich von einer Lichtquelle beleuchtet wird. Häufig findet dabei ein Laserstrahl Verwendung, da dieser ein intensives, monochromatisches Licht erzeugt. Danach unterscheidet man zwei verschiedene Methoden: die Streulichtmessung und das absorbimetrische Verfahren. Bei der Streulichtmessung wird das an den Partikeln vorbeigleitende Streulicht (scatter light) mittels eines Photomultipliers gemessen. Beim absorbimetrischen Verfahren hingegen wird die von den Zellen bewirkte Schwächung des Lichtstrahls gemessen und in Signale umgesetzt. Der große Vorteil des ADVIA 120 besteht in der Kombination beider Verfahren. Alle Zellen werden durch eine Reaktionslösung gekugelt und auf der Basis der Mie-Streulichttheorie^[82] werden

anschließend Volumen und Hämoglobingehalt jeder einzelnen Zelle gemessen (siehe dazu auch **Abb. 3**). Durch Anfärben der Retikulozyten mit dem Farbstoff Oxazin-750 kann zusätzlich zur Lichtstreuung die Absorption, die eine Aussage über deren Reifegrad liefert, gemessen werden. Trotz des Messprinzips der Absorption für die Einstufung der Retikulozyten werden diese aus Verständnisgründen auch weiterhin in LFR, MFR und HFR (siehe Abschnitt 3.2.2.3) eingeteilt.

Aus dem Zellvolumen und der Zellhämoglobinkonzentration werden die jeweiligen Werte der einzelnen Zellen berechnet und als Verteilungskurven angegeben. Im Gegensatz zum CELL-DYN®1300 werden die mittleren Werte also nicht nur aus den Gesamtwerten berechnet (siehe dazu Abschnitt 3.2.1.2), sondern zusätzlich aus den Verteilungskurven der Einzelwerte der Zellen entnommen und liefern durch den Vergleich beider Werte zusätzliche Informationen.

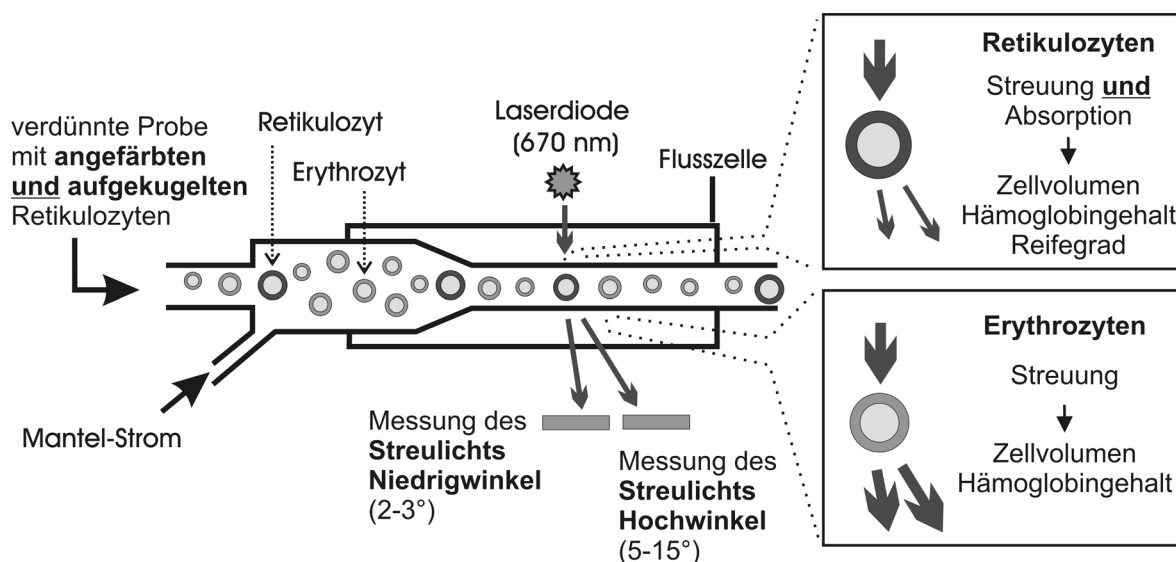


Abb. 3: Das Prinzip der Durchflusszytometrie des ADVIA 120.

3.3 Immunologische Bestimmungen

3.3.1 Parameter Erythropoietin und Ferritin

Für die Populationsstudie erfolgte die Bestimmung von Erythropoietin (Kat.-Nr. 60-4205) und Ferritin (Kat.-Nr. 60-4115) mit einem Chemilumineszenz-Immunoassay von Nichols (Nichols Institute Diagnostics, Bad Nauheim). Für die Verlaufsuntersuchung und alle nachfolgenden Untersuchungen wurden das Advantage™ Chemilumineszenz System (Nichols Institute Diagnostika GmbH, Bad Nauheim) und die entsprechenden Chemilumineszenz Immunoassays (Erythropoietin: Kat.-Nr. 62-7012, Ferritin: Kat.-Nr. 62-7023) von Nichols verwendet.

3.3.2 Parameter löslicher Transferrinrezeptor

Die Bestimmung des löslichen Transferrinrezeptors erfolgte für die Populationsstudie und die Verlaufsuntersuchung mit dem Quantikine IVD humans sTfR-Assay (Kat.-Nr. DTFR1) von R&D-Systems (R&D-Systems GmbH, Wiesbaden). Mit der Verfügbarkeit eines sTfR-Assays von Nichols für das Advantage™ Chemilumineszenz System wurde ein Teil der Proben der Verlaufsuntersuchung nochmals mit diesem gemessen. Aufgrund der guten Korrelation der Ergebnisse wurden alle weiteren Messungen für die IOC-Projekte, die Verlaufsuntersuchung Zehnkampf und die Routinemessungen mit dem sTfR-Assay (Kat.-Nr. 62-7028) für das Advantage™ Chemilumineszenz System (Nichols Institute Diagnostika GmbH, Bad Nauheim) durchgeführt.

3.4 Massenspektrometer

3.4.1 Kombination HPLC und ESI-Triple-Quadrupol-MS

Die ersten Untersuchungen zur Trennung der Glykane wurden mit Glykanstandards von Glyko (Glyko Inc., Novato, USA) und ECBio (ECBio, Porto Salvo, Portugal) durchgeführt. Für die chromatographische Trennung wurden die Hewlett Packard HPLC Serie 1100 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) und zur massenspektrometrischen Analyse ein API 2000 ESI-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer von Applied Biosystems (Applied Biosystems – PE Deutschland GmbH, Weiterstadt) verwendet. Die Trennung erfolgte mit einer PolyGLYCOPLEX A HPLC-Säule (200 x 2,1 mm; 5 µm; PolyLC Inc., Columbia, USA).

3.4.2 Nanospray und ESI-TOF-MS

Zur vollständigen Analyse von Glykanen wurde eine Kombination aus einer Nanosprayquelle und einem ESI-TOF-MS Mariner Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Für den Probeneinlass mittels Nanosprayquelle wurden Proteana Gold/Palladium-beschichtete Borsilikatglaskapillaren (MDS Proteomics, Odense M, Dänemark) verwendet.

3.5 Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien

AMGEN GmbH – München

Aranesp (Polysorbat-Lösung) 0,3 µg in 0,3 ml Lösung

Andreas Hettich GmbH & Co. KG – Tuttlingen

Zentrifugen: Universal 30 RF, Rotina 48, EBA 8S

Amersham Biosciences Europe GmbH (Amersham, Pharmacia) – Freiburg

Elektrophorese Einheit Mighty Small II SE 260, Elektrophorese Einheit Multiphor II + NovaBlot-Kit, Stromversorger EPS 300, Stromversorger EPS 3501 XL, Vakuum Gelrockner SE 1160 Drygel™ Sr.; Elektrodenstreifen, Filterpapier Novablott, Gelboundträgerfolie, Harnstoff (für Elektrophorese), Probenauftragsstücke

BIO-RAD Life Science – München

PowerPac 200, Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell

BIOSPA – Milano (Italien)

Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (HRP)

BOC Edwards GmbH – Kirchheim

Ölpumpe RV3

Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe

Brillant Blau R250, Bromphenolblau (Natriumsalz), 2-Mercaptoethanol, Milchpulver (Blotting Grade) - LFM, Natriumlaurylsulfat (ultra-pure), TEMED, Rotipure Gel A, Rotipure Gel B

CovalAb – Lyon (Frankreich)

Covalight

Dynal Biotech GmbH – Hamburg

Dynabeads M-450 – unkonjugiert/oberflächenaktiviert

European Pharmacopoeia Commission – Strasbourg (Frankreich)

Erythropoietin BRP batch 1

Glyko Inc – Novato (USA)

Reinigungssäulen: GlycoClean H, GlycoClean S, GlycoClean R

Glykanstandards: A1F, A2, NGA3, NA3, A3, NA4; PNGaseF-Kit (incl. Natriumphosphatpuffer, 2 % (w/v) SDS, 1 M β -Mercaptoethanol, 15 % (v/v) NP-40, N-Glycanase (2 U/ml in 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl und 50 % Glycerol)

Heto-Holten GmbH – Wetttenberg

Vakuumzentrifuge VR-1

ICN Biomedicals GmbH – Eschwege

EDTA (freie Säure), Formaldehyd, Silbernitrat, Tween 20, Natriumthiosulfat

Merk KGaA – Darmstadt

Acrylamid/Bisacrylamid-Fertigmischung für Elektrophorese, Ameisensäure, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Dithiotreitol (DTT), Essigsäure 96 %, Ethanol, Glycin, Methanol, KCl, NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaOH

Millipore GmbH – Schwalbach

Centricon Plus-20, Centricon YM-30, Durapore® Membran Filter (0,65 μm , PVDF-Material), Immobilon P Membran (0,45 μm , PVDF-Material), Sterilflip

NOVEX – San Diego (USA)

Mark 12™ Wide Range Protein Standard

Pierce Biotechnology – Rockford (USA)

Tween 80 (geringer Peroxidasegehalt)

Raytest Isotopenmessgeräte GmbH – Straubenhardt

Fuji LAS 1000Plus (CCD-Kamera) mit DarkBox II

R&D Systems – Wiesbaden-Nordenstadt

Anti-human Erythropoietin monoklonaler Antikörper AE7A5, rekombinantes Erythropoietin

Roche Molecular Biochemicals (ex Boehringer Mannheim Biochemicals) – Mannheim

Albumin (Fraktion V), Complete™ (Protease Inhibitor Cocktail)

SERVA Electrophoresis GmbH – Heidelberg

Servalyt 2-4, Servalyt 4-6, Servalyt 6-8

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH – Seelze

Ovalbumin

UMEX GmbH – Dresden

Reinstwasseranlage VARY Plus

VALBIOTECH – Paris (Frankreich)

Schaf-anti-Maus Antikörper (biotinyliert)

Winsor & Newton – London (Großbritannien)

Indian Ink

3.6 Methoden

3.6.1 Messung der Vollblutproben

Alle Blutproben wurden nach Erhalt sofort gemessen. Vor der Messung der Proben wurde die Kalibration des verwendeten Hämatologiesystems mit den entsprechenden Kontrollen des Herstellers geprüft (Abbott CELL-DYN® 1300: CD 16 TriLevel; Sysmex R3000: RetCheck II; ADVIA 120: ADVIA TESTpoint Hämatologiekontrollen, ADVIA TESTpoint Retikulozytenkontrollen). Eine Rekalibration des Hämatologiesystems wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wenn die gemessenen Werte der Kontrollen außerhalb der angegebenen Bereiche lagen. Die Blutproben wurden vor der Messung langsam bis auf Raumtemperatur erwärmt und danach mindestens 5 min mittels Rollenmischer für die Messungen mit dem CELL-DYN® 1300 bzw. dem R3000 oder mit dem automatischen Probengeber für Messungen mit dem ADVIA 120 gemischt.

3.6.2 Messung von Serum- und Plasmaproben

Alle Serum- oder Plasmaproben wurden bis zur Messung bei -20 °C gelagert und erst unmittelbar davor aufgetaut. Die Bestimmung der Parameter Erythropoietin, Ferritin und sTfR erfolgte aus dem selben Probenröhrchen, alle Messungen wurden direkt nacheinander durchgeführt, so dass alle Proben nur einmal aufgetaut wurden. Die Durchführung der Messungen erfolgte nach Anleitung des Herstellers und in Doppelbestimmung, wobei die in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2. angegebenen Immunassays verwendet wurden.

3.6.3 Analytik von Urinproben

Die Detektion von rhEPO im Urin basiert auf einer vom Laboratoire National de Depistage du Dopage veröffentlichten Methode ^[2] und wurde entsprechend den Anforderungen modifiziert. Eine Anpassung der Methode war notwendig, um neben rhEPO auch NESP (gentechnisch modifiziertes Erythropoietin - ARANESP[®], Amgen GmbH, München) nachweisen zu können. Die verwendete „Double-Blot“-Methode ist ein patentiertes Verfahren¹ und ist für die Anwendung in akkreditierten Dopinglabors freigegeben.

3.6.3.1 Anreicherung der Urinproben

Von den Urinproben wurden 20 ml abgenommen, mit 2 ml 3,75 M Tris-HCl (pH 7,4) und 400 µl Complete™ Proteaseblocker versetzt und für 10 min bei 2700 RCF zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Steriflip mit 0,22 µm Porendurchmesser filtriert und das Filtrat mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Dazu wurde dieser 20 min in Millipore Centricons Plus-20 bei 3000 RCF zentrifugiert, die überschüssige Lösung verworfen und nach Zusatz von 20 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) und 400 µl Complete™ Proteaseblocker die Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde die konzentrierte Lösung nach Anleitung des Herstellers durch vierminütige Zentrifugation bei 1000 RCF im Recovery-Cup aufgefangen und für den nächsten Ultrazentrifugationsschritt in Centricons YM30, MWCO 30000 überführt. Es wurde bei 3900 RPM und 8 °C für 1 h zentrifugiert (Kühlzentrifuge Universal 30 RF). Die Überstände wurden in Aliquoten von 20 µl bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

3.6.3.2 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde ein Polyacrylamidgel (T=5 %, C=3 %) mit 7 M Harnstoff und 5 % (w/v) Saccharose verwendet. Der pH-Gradient des 1 mm dicken Gels betrug

¹ Die Double-Blot-Methode ist patentiert (2 786 273) durch das „Hospices Civils de Lyon“, 3, quai des Celestins B.P. 2251 69229, Lyon, Frankreich.

2-6 (Servalyt® 2-4 und Servalyt® 4-6). Als Kathodenelektrolyt fand 5 % (v/v) Servalyt® 6-8, als Anodenelektrolyt 0,5 M Phosphorsäure Verwendung. Eine Präfokussierung des Gels erfolgte 30 min bei 250 V in einer Multiphor II-Elektrophoresekammer. Die Urinproben wurden nach dreiminütigen Erhitzen bei 80 °C und anschließender Zugabe von 2,2 µl Tween 80 mittels Probenauftragsstücken auf das Gel geladen. Als Standard wurden 40 µl einer 0,1 µg/ml BRP-Referenz-Standard-Lösung mit 140 µl 1 % Rinderserumalbumin (RSA) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) eingesetzt. Diese Lösung wurde ebenfalls drei Minuten bei 80 °C erhitzt und nach Abkühlen auf RT und Zugabe von 10 µl 0,25 µg/ml ARANESP und 10 µl Tween 80 analog den Proben auf das Gel aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einer Leistung von 0,8 W/cm Gellänge, $V_{\max} = 2000$ V bis zu einem Endpunkt von 4000 Vh bei 8 °C.

3.6.3.3 Double Blot und Antikörperbindung

Nach der Fokussierung und dem Waschen des Gels in Tris-Glycin-Puffer (50 mM Tris, 192 mM Glycin) wurden die Proben mittels der Semi-Dry-Methode in Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Immobilon P) unter Verwendung eines Durapore-Membran-Filters transferiert. Die Membran wurde zuvor nach Angaben des Herstellers 15 s in Methanol aktiviert, mit Wasser gewaschen und in Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin) equilibriert. Der erste Blot wurde mit einer Nova-Blot-Einheit durchgeführt, wobei der Transfer innerhalb von 30 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranfläche erfolgte. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran waren zwei Schritte notwendig. Zuerst erfolgte eine Inkubation mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS: 130 mM NaCl; 3 mM KCl; 6,4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,5 mM NaH₂PO₄ x H₂O; pH 7,4), die 5 mM DTT enthielt, für 1 h bei 37 °C und danach mit einer Blockingreagenzlösung (5 % Milchpulver (LFM) in PBS) für 45 min bei Raumtemperatur. Nach anschließendem Waschen der Membran mit PBS wurde diese mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper AE7A5 (1 : 1000 verdünnt (1 µg/ml) in PBS incl. 1 % LFM) über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch sechsfaches Waschen der Membran mit 0,5 % LFM in PBS entfernt.

Um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers zu vermeiden, erfolgte der Transfer des primären Antikörpers auf eine zweite Immobilon P-Membran durch einen erneuten Semi-Dry-Elektroblot, den so genannten Double-Blot.

Diese zweite Membran wurde ebenfalls 15 s mit Methanol aktiviert, mit Wasser gewaschen und dann in 0,7 % Essigsäure konditioniert. Unter erneuter Verwendung eines Durapore Membranfilters wurde sie auf die erste Membran gelegt und zwischen zwei Stapel Filterpapier, die in Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin) getränkt waren, platziert. Der Transfer erfolgte in einer Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell von BIO-RAD unter Verwendung eines PowerPac 200 innerhalb von 10 min mit einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranfläche. Die

zweite Membran wurde sofort in einer Blockinglösung (5 % LFM in PBS; 0,1 % Indian Ink) bei 4 °C für 1 h inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, Ziege-anti-Maus Antikörper (1 : 4000) in 1 % LFM in PBS, wurde bei 8 °C für 18 h durchgeführt.

3.6.3.4 Visualisierung

Im Anschluss an die Antikörperbehandlung wurde die Membran sechsmal mit 0,5 % LFM in PBS gewaschen und danach mit dem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (HRP), der 1 : 2000 in 1 % LFM in PBS verdünnt wurde, für 1 h inkubiert. Nach einem erneuten sechsfachen Waschschrift mit PBS erfolgte die Entwicklung der Membran mit dem Chemilumineszenzsubstrat Covalight nach Angaben des Herstellers. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte mit einer Fuji LAS 1000Plus mit der Gerätesoftware Image Reader LAS-1000Pro V2.3. Zur Auswertung der Proben wurde das Programm Aida Image Analyser v.3.11 verwendet, wobei die Positionen der Banden des rekombinanten Erythropoietinstandards mit denen des urinären Erythropoietins verglichen wurden.

3.6.4 Anreicherung mittels Magnetpartikeln

3.6.4.1 Beschichtung der Dynabeads

Die Dynabeads-Suspension wurde durch zweiminütiges vortexen resuspendiert und die zu beschichtende Menge an Dynabeads in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Waschen der Beads mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS II 0,1 M Phosphatpuffer: pH 7,4; 0,081 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,019 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) und Abtrennen mittels Magnethalterung (Dynal Biotech GmbH, Hamburg) wurden diese im PBS II resuspendiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und anschließend wurden die Beads in PBS II aufgenommen, so dass 8×10^8 Beads pro ml Puffer enthalten waren. Um eine maximale Bindungskapazität zu erreichen, wurde für die Beschichtung eine Antikörpermenge von $10 \mu\text{g}$ pro 10^7 Beads verwendet. Die resuspendierten Beads wurden mit der Antikörperlösung (1 mg/ml monoklonaler Antikörper AE7A5 in PBS II) bei einer Konzentration von 4×10^8 Beads pro ml Lösung für 24 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde nach Absetzen der Dynabeads in der Magnethalterung abpipettiert und die beschichteten Beads zweimal mit 0,1 % RSA in PBS II bei 8 °C für 5 min gewaschen. Um alle noch freien Tosylgruppen abzublocken, wurden die gewaschenen Beads im Anschluss 4 h mit Blockingpuffer (0,2 M Tris; 0,1 % (w/v) RSA; pH 8,5) bei 37 °C geschüttelt und danach mit 0,1 % RSA in PBS II bei 8 °C für 5 min erneut gewaschen. Die fertig beschichteten Beads wurden bei 8 °C in 0,1 % RSA in PBS II gelagert.

3.6.4.2 Anreicherung von Erythropoietin mittels Dynabeads

Die beschichteten Beads wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und die überschüssige Lösung nach zweiminütigem Stehen in der Magnethalterung entfernt. Nach Waschen mit PBS II wurde die Probe dazugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass die Extraktionskonzentration 10^7 - 10^8 Beads pro ml Probenlösung betrug. Die anschließende Inkubation der Mischung bei 8 °C für 2 h erfolgte unter ständigem Schütteln. Die überschüssige Lösung wurde nach vierminütigem Stehen in der Magnethalterung entfernt und die Beads mit dem gebundenen Protein zweimal 5 min mit 0,1 % Tween 20 in 0,1 % RSA in PBS II sowie einmal mit 0,1 % RSA in PBS II gewaschen.

3.6.4.3 Gelelektrophorese und Färbung der Gele

Für die gelelektrophoretische Auftrennung nach dem Molekulargewicht wurde die SDS-PAGE angewandt, wobei nach einer modifizierten Methode nach Lämmli ^[83] vorgegangen wurde. Die Proben sowie die Markerproteine wurden in Ladepuffer (200 mM DTT; 100 mM Tris-HCl; pH 6,8; 2 % SDS) aufgenommen, so dass ein Volumen von 15 µl vorhanden war, und anschließend 4 min bei 100 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2 µl Bromphenolblaulösung (1 % Bromphenolblau in Ladepuffer) zugesetzt und alle Proben in die Taschen des 10 x 10,5 cm Gels in einer Mighty Small II SE 260 Elektrophoresekammer geladen. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug 12,5 % (Crosslinking 2,6 %; Trenngelpuffer: 0,375 M Tris-HCl, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,8) und im Sammelgel 4 % (Crosslinking 2,6 %; Sammelgelpuffer: 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % (w/v) SDS, pH 6,8). Die Elektrophorese erfolgte mit 20 mA solange die Bromphenolblaufront noch im Sammelgel war, danach mit 35 mA und wurde beendet, sobald der Bromphenolblaumarker das untere Ende des Gels erreicht hatte. Als Elektrodenpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris-HCl; 0,2 M Glycin) mit 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Zur Proteingrößenbestimmung wurde der „Mark 12™ Wide Range Protein Standard“, gelöst in Probenpuffer, eingesetzt.

Aufgrund der niedrigen Konzentration der verwendeten Proteinlösungen erfolgte die Visualisierung des Gels mit einer modifizierten (TU Dresden, Institut für Biochemie, T. Wage, persönliche Mitteilung) Silberfärbung nach Blum et al. ^[84]. Das Gel wurde 1 h mit Fixierlösung (40 % (v/v) Methanollösung, 10 % (v/v) Essigsäure) behandelt, anschließend dreimal 20 min mit 30 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer einminütigen Inkubation in 0,02 % (w/v) Thiosulfatlösung wurde das Gel dreimal intensiv mit Wasser gewaschen und 20 min mit einer Silbernitratlösung (0,2 % (w/v) AgNO₃, 0,02 % (v/v) Formaldehyd) behandelt. Die Visualisierung mittels einer frisch hergestellten Entwicklungslösung (6 % (w/v) Na₂CO₃; 0,05 % (v/v) Formaldehyd; 0,08 (w/v) Na₂S₂O₃) erfolgte unter ständiger Aufsicht und bei Erreichen der

gewünschten Schwärzung wurde das Gel durch Abgießen des Entwicklers und Inkubation in einer 0,5 %igen EDTA-Lösung für 10 min fixiert. Nach einstündigem Waschen des gefärbten Gels mit Wasser wurde dieses zwischen zwei Zellophanfolien mittels des SE 1160 Drygel™-Trockners nach Anleitung des Herstellers im Vakuum getrocknet und konnte anschließend mit einem HP Scanjet 5300C gescannt werden.

3.6.5 Massenspektrometrische Analytik

3.6.5.1 Kombination von HPLC und Triple-Quadrupol-MS

Zur chromatographischen Auftrennung wurden jeweils 5 µl Probenmaterial auf die PolyGLYCOPLEX A Säule aufgegeben. Die Säule wurde bei einem Fluss von 0,3 ml/min mit einem Gradienten unter Verwendung von 2 mM Ammoniumacetatlösung in Acetonitril (ACN) inkl. 1 % (v/v) Essigsäure betrieben (Laufmittel A: 5/95 Ammoniumacetatpuffer/ACN; Laufmittel B: 95/5 Ammoniumacetatpuffer/ACN). Der Gradient begann mit einem zweiminütigen Lauf von 80/20 ACN/Puffer und lief dann innerhalb von 35 min auf 50/50 ACN/Puffer, das Spülen der Säule erfolgte mit einem 3 minütigen Lauf von 90/10 ACN/Puffer. Der HPLC-Strom wurde splitlos mittels der Turbolon-Quelle in das API 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer geleitet, die Trocknung erfolgte bei einer Temperatur von 200 °C und einem Gasstrom von 15 l/min. Das Declustering Potential war auf 200 V eingestellt, um eine maximale Anzahl an Fragmentationen zu erhalten.

3.6.5.2 Kombination von Nanospray und TOF-MS

Die zu vermessenden Proben wurden in 50/50 2 mM Ammoniumacetatlösung in Acetonitril inkl. 1 % (v/v) Essigsäure gelöst und mit einer Pipette in die Gold/Palladium-beschichteten Nanospray-Glaskapillaren gefüllt. Die Spitze der Kapillare wurde nach Öffnung mittels der Nanospray-Ionenquelle direkt vor die Eingangsöffnung des ESI-TOF-Massenspektrometers platziert und nach Anlegen der jeweiligen Spannung (siehe dazu Abschnitt 4.6.1.2) die Fullscanspektren aufgenommen.

4 Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit vorgestellten Studien wurden mit der Zielstellung durchgeführt, Parameter zu finden, mit denen ein Missbrauch von rekombinantem Erythropoietin nachweisbar wäre. Zuerst werden die entsprechenden Studien behandelt, in denen nach solchen Parametern gesucht wurde, anschließend Studien, die sich hauptsächlich mit der Validierung dieser Parameter und deren Anwendung in der Praxis befassen. Dabei wird in einem gesonderten Abschnitt auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors sowie auf die Stabilität der Proben eingegangen. Der Abschnitt 4.6 befasst sich mit Modifikationen der direkten Nachweismethode und Experimenten hinsichtlich der Reinigung mittels Magnetpartikel sowie dem massenspektrometrischen Nachweis von Glykanen.

Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit der Software OriginLab 7G SR4 (OriginLab Cooperation, Northampton, USA) und STATISTICA für Windows (StatSoft GmbH, Hamburg). Um zu prüfen, ob die Daten normal verteilt waren, wurde ein Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks W-Test) mit einem Entscheidungswert von $p < 0,05$ durchgeführt. Bei einer Normalverteilung der Daten wurden diese mittels Varianzanalyse (T-Test bei zwei Gruppen; Varianzanalyse bei mehreren Gruppen) analysiert. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurden nichtparametrische Testverfahren (Mann-Whitney U-Test bei zwei Gruppen; Kruskal-Wallis ANOVA bei mehreren Gruppen) verwendet. Für den Fall, dass bei dem Vergleich mehrerer Gruppen mindestens eine nicht normalverteilt war, erfolgte die Analyse immer mit einem nichtparametrischen Verfahren. Alle Tests wurden mit einem Entscheidungswert von $p < 0,05$ durchgeführt.

Bei Studien mit Mehrfachproben der Probanden (alle Zeitstudien sowie Belastungsstudien – Abschnitte 4.1.2, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 und 4.3) wurde neben dem Vergleich der Daten als unabhängige Gruppen (siehe oben) auch der Vergleich als abhängige Gruppen durchgeführt, um direkte Effekte zu erfassen. Dabei wurde der T-Test für gepaarte Stichproben verwendet, wenn die Daten normalverteilt waren. War dies nicht der Fall, wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben bzw. Friedman ANOVA für mehrere Gruppen angewandt. Der Grund für diese Verfahrensweise war, dass die Daten auf die Problematik Dopingkontrolle anwendbar sein sollten. Da davon ausgegangen werden konnte, dass nur einzelne Proben für eine Kontrolle untersucht werden und auch nicht mehrere Proben in einem definierten Zeitraum vorliegen, stellte sich die Frage, ob die untersuchten Einflüsse so gravierend sind, dass bei der unabhängigen Betrachtung der Daten ein statistisch signifikanter Effekt beobachtet werden kann.

Um die Korrelation von Messdaten hinsichtlich verschiedener Parameter (siehe Abschnitt 4.5, Vergleich zwischen Messungen in Köln und Kreischa, Einfluss unterschiedlicher Immunoassays) zu untersuchen, wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen die klassische Darstellung der Daten und Berechnung des Korrelationskoeffizienten und zum anderen die Methode nach Bland-Altman. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte lediglich, um einen Wert für den Grad der Übereinstimmung zu erhalten. Eine einfachere und statistisch bessere Methode ist die Methode nach Bland-Altman ^[85, 86], die jedoch den Nachteil aufweist, dass man keinen Zahlenwert, sondern eine grafische Darstellung erhält. Da diese Methode in der verwendeten Software nicht implementiert war, wurde dafür das Programm MedCalc[®] 7.2.0.0 (www.medcalc.be) genutzt.

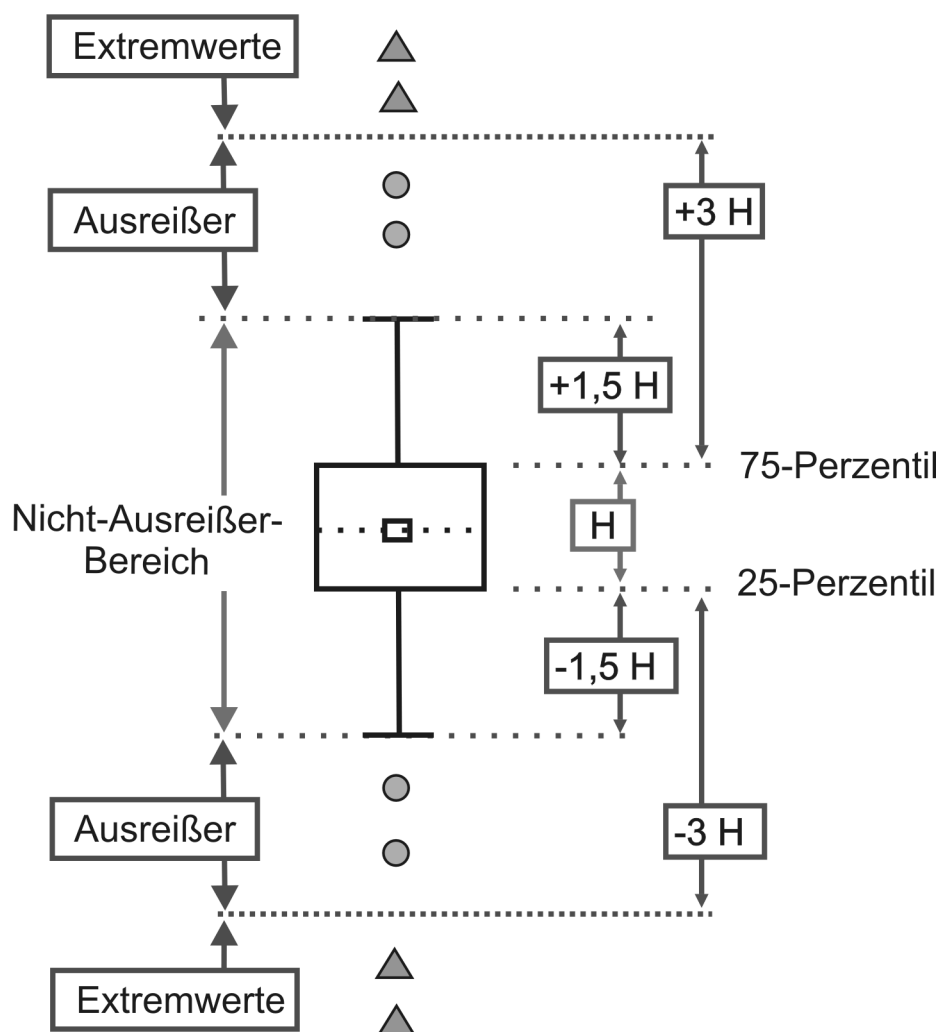


Abb. 4: Erläuterung der Symbole der verwendeten Box-Whisker-Plots und Definition der Begriffe „Ausreißer“ und „Extremwerte“, entnommen aus dem Handbuch der Software STATISTICA. Zur genaueren Definition der Begriffe siehe den Abschnitt über der Abbildung.

Zur deskriptiven Statistik wurden die Verteilungsdaten in modifizierten Box-Whisker-Plots ^[87, 88] dargestellt, wobei als mittlerer Wert immer der Median angegeben wurde, da dieser weniger

von Extremwerten beeinflusst wird ^[89]. Als Grenzen des Box-Plots wurden das 25- und 75-Perzentil verwendet, welches jeweils den Wert darstellt, unterhalb dessen 25% bzw. 75% aller Werte der entsprechenden Variablen liegen. Ausreißer und Extremwerte sind als Werte definiert die „weit“ vom Mittelwert der Verteilung liegen.

Für die grafische Darstellung der Boxplots sind Ausreißer als Datenpunkte definiert, die folgende Bedingung erfüllen:

Datenwert $> 75\text{-Perzentil} + 1,5 \times (75\text{-Perzentil} - 25\text{-Perzentil})$

oder

Datenwert $< 25\text{-Perzentil} - 1,5 \times (75\text{-Perzentil} - 25\text{-Perzentil})$.

Als Extremwerte werden die Datenpunkte eingestuft, die wie folgt definiert sind:

Datenwert $> 75\text{-Perzentil} + 3 \times (75\text{-Perzentil} - 25\text{-Perzentil})$

oder

Datenwert $< 25\text{-Perzentil} - 3 \times (75\text{-Perzentil} - 25\text{-Perzentil})$.

Die **Abb. 4** zeigt die Bereiche der „Ausreißer“ und „Extremwerte“ in einem klassischen Box-Whisker-Plot, wobei der untere Box-Wert dem 25-Perzentil, der obere Box-Wert dem 75-Perzentil entspricht. Die Box enthält somit 50 % aller Datenwerte, wobei die Mittellinie der Box mit dem Symbol (kleines, schwarzes Rechteck) den Medianwert zeigt.

4.1 Studien zur Parameterfindung

Bei den ersten Studien stellte sich die Frage, welche hämatologischen Parameter überhaupt geeignet wären, um ein mögliches Doping mit Erythropoietin zu erkennen. Erschwerend kam hinzu, dass bei Blutproben keine Lagerung möglich ist, so dass diese nur mit den zum jeweiligen Zeitpunkt verfügbaren Hämatologiesystemen gemessen werden konnten. Der generelle Ansatz dieser Studien war daher immer die Erfassung aller Daten und die Suche nach verwendbaren Grenzwerten.

4.1.1 Populationsstudie

Die durch die Anti-Doping-Kommission des DSB und NOK initiierte Untersuchung von nationalen Leistungssportlern hatte das Ziel, Merkmale im Blutbild und relevanten Serumparametern zu finden, anhand derer Ausdauerathleten von anderen Athleten zu unterscheiden wären. Falls Unterschiede existieren sollten, stellte sich die Frage, inwieweit diese als Grenzwerte verwendet werden könnten. Da bekannt war, dass die Blutparameter von Männern und Frauen verschieden sind, war es notwendig, die Auswertung der Daten geschlechtsspezifisch durchzuführen.

Zur besseren Übersicht sind bei den Parametern des roten Blutbildes lediglich die Werte für Hämoglobin und Hämatokrit tabellarisch zusammengefasst (**Tab. 3**) bzw. graphisch dargestellt (**Abb. 5**).

Tab. 3: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit und Hämoglobin der Populationsstudie, getrennt nach Training und Geschlecht. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt.

Geschlecht	Training	Hämatokrit [%]		Hämoglobin [g/dl]	
		Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max
Männer	Kraft	44,9 (43,0-46,0)	39,6-48,2	14,9 (14,2-15,3)	13,1-16,1
	Kraftausdauer	44,6 (43,3-45,4)	39,9-50,3	15,2 (14,7-15,5)	13,4-17,0
	Ausdauer	44,6 (43,5-46,1)	40,3-50,0	14,9 (14,6-15,4)	13,5-17,2
Frauen	Kraft	41,7 (38,8-42,6)	38,3-44,0	13,4 (13,2-13,7)	12,8-14,2
	Kraftausdauer	39,9 (39,0-40,9)	35,1-46,8	13,5 (13,0-13,9)	11,9-15,5
	Ausdauer	<i>41,0 (38,8-42,7)</i>	<i>29,5-45,8</i>	13,8 (13,0-14,3)	11,6-15,6

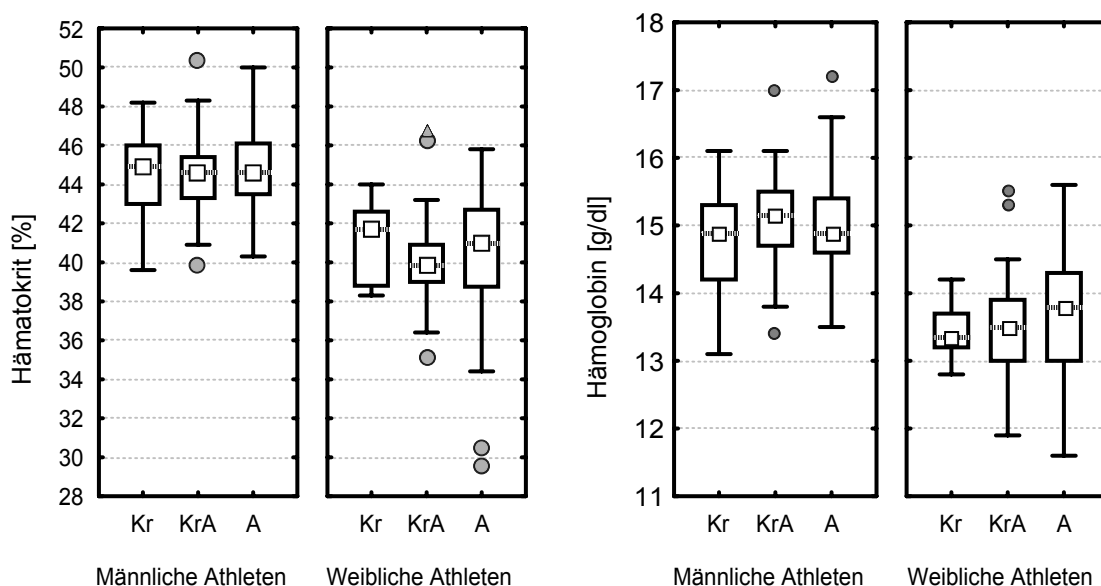


Abb. 5: Box-Whisker-Plots der Parameter Hämatokrit und Hämoglobin aller Sportler der Populationsuntersuchung, getrennt nach Geschlecht und Training (Kr-Kraftsportler, KrA-Kraftausdauersportler, A-Ausdauersportler).

Wie bereits in der Literatur ^[52, 90-92] bei Spitzensportlern beschrieben, waren sowohl die Hämatokrit- als auch die Hämoglobinwerte von männlichen Athleten signifikant höher als die

der weiblichen Athleten. Mit Kruskal-Wallis ANOVA und Median Test ließen sich bei beiden Parametern keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Trainingsausrichtung finden.

Alle drei in der Studie gemessenen Serumparameter, Erythropoietin, sTfR und Ferritin, sind in **Tab. 4** aufgeführt bzw. in den jeweiligen Grafiken (**Abb. 6** und **Abb. 7**) dargestellt. Auffallend ist, dass ein Großteil der Serumproben eine Erythropoietinkonzentration aufwies, die unterhalb der Nachweisgrenze des Immunoassays (< 2 mU/ml) lag.

Tab. 4: Zusammenfassung der Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin der Athleten der Populationsstudie, eingeteilt nach Training und Geschlecht. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Mit ✕ markierte Werte unterscheiden sich signifikant mit $p < 0,05$.

Geschlecht	Training	Erythropoietin [mU/ml]		sTfR [nmol/l]		Ferritin [ng/ml]	
		Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max
Männer	Kraft	7,0 (0-19,0)	0-90,0	16,3 (14,0-17,5)	9,4-23,4	70 (45-107)	23-197
	Kraft- ausdauer	15,9 (7,4-27,8)	0-137,0	16,8 (14,9-19,0)	10,7- 23,8	57 (42-96)	22-226
	Ausdauer	10,8 (0-19,5)*	0-69,4	19,6 (16,8-22,7)*	11,8- 36,2	69 (47-119)	15-209
Frauen	Kraft	31,9 (20,8-39,6)	4,0-69,8	15,3 (13,6-17,7)	9,7-23,2	47 (27-72)	18-132
	Kraft- ausdauer	20,8 (12,0-41,2)	0-75,0	13,7 (11,4-16,8)	9,6-24,4	33 (26-45)	9,122
	Ausdauer	0 (0-18,1)*	0-80,0	20,5 (16,1-23,4)*	10,5- 33,4	40 (29-54)	3-536

Damit stellte sich die Frage, inwieweit sich dieser signifikante Unterschiede der Erythropoietinkonzentration auf die Anzahl an Erythrozyten auswirkt. Bei Athleten mit einer Erythropoietinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Immunoassays (2 mU/ml) zeigte sich eine zu den Athleten mit einem höheren EPO-Gehalt analoge Verteilung der Hämoglobinwerte (**Abb. 8**). Der durchgeführte statistische Vergleich (T-Test für unabhängige Gruppen) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Athleten bestanden allerdings signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis ANOVA und Median Test) bezüglich der Parameter Erythropoietin und sTfR. Mann-Whitney U-Tests zeigten, dass sich jeweils die Gruppe der Ausdauerathleten bei beiden Parametern signifikant unterschied.

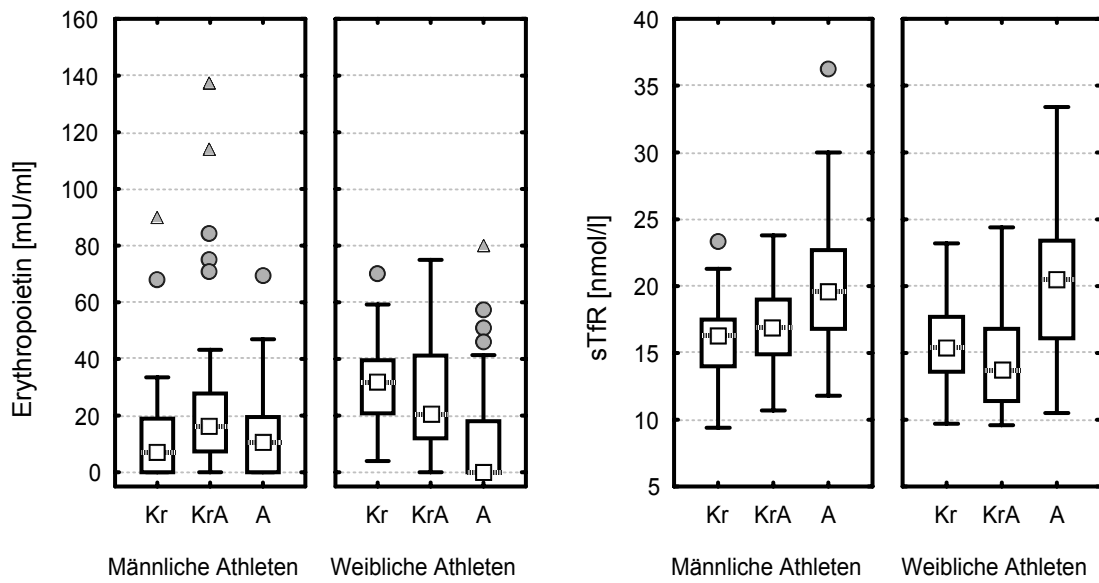


Abb. 6: Box-Whisker-Plots der Parameter Erythropoietin und sTfR aller Sportler der Populationsuntersuchung, getrennt nach Geschlecht und Training (Kr-Kraftsportler, KrA-Kraftausdauersportler, A-Ausdauersportler).

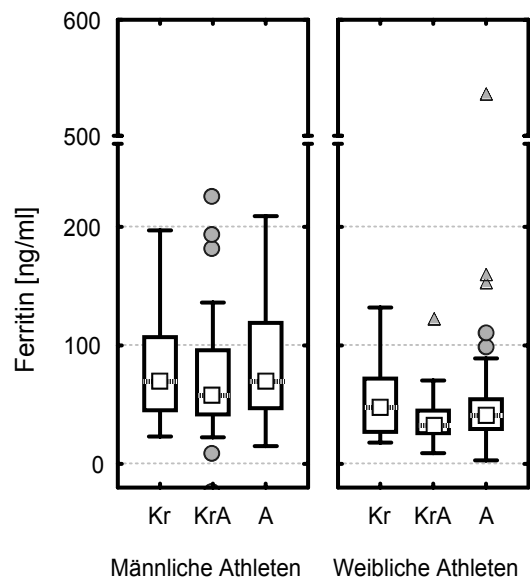


Abb. 7: Box-Whisker-Plots der Ferritinkonzentrationen aller Sportler der Populationsuntersuchung, getrennt nach Geschlecht und Training (Kr-Kraftsportler, KrA-Kraftausdauersportler, A-Ausdauersportler).

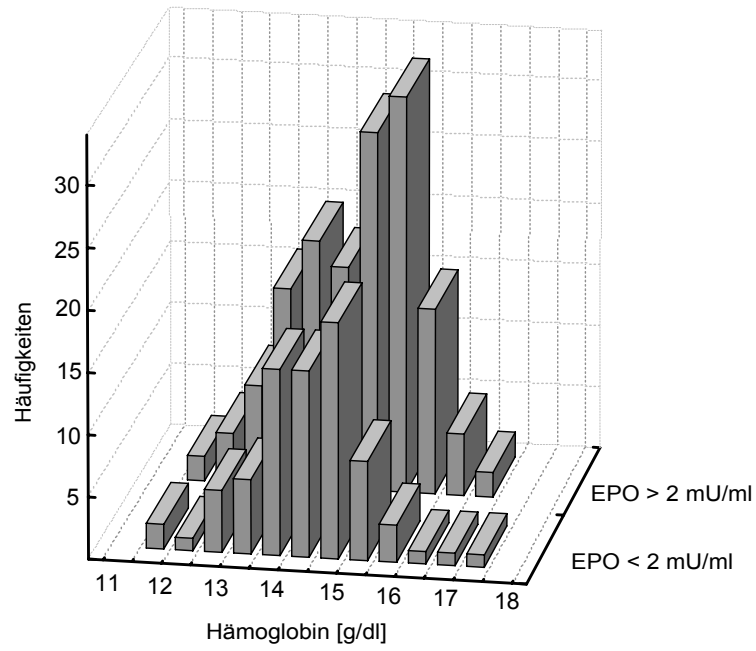


Abb. 8: Verteilung der Hämoglobinwerte der Athleten der Populationsstudie mit Erythropoietinwerten kleiner als 2 mU/ml, verglichen mit denen größer als 2 mU/ml.

4.1.2 Verlaufsuntersuchung – DLV-Studie

Ziel der Verlaufsuntersuchung war die erstmalige Untersuchung von Retikulozytenparametern und der individuellen Variation von hämatologischen Parametern bei Hochleistungssportlern. Durch die Teilnahme der besten Ausdauerathleten des DLV und eine den Trainingskontrollen analoge Probennahme konnte die geplante Probenzahl von fünf Proben nicht von jedem Athleten innerhalb des Studienzeitraumes erreicht werden. Dadurch entsprachen auch die Zeitpunkte der Probennahmen nicht einer standardisierten Studie, sondern eher der routinemäßig durchgeführten Dopingkontrolle. Zudem war zu Beginn der Studie der Retikulozytenanalysator noch nicht verfügbar, so dass nicht zu jeder Probe ein kompletter Datensatz erstellt werden konnte. Als Bezugspunkt für die Auswertung wurde deshalb die Anzahl der Probennahmen verwendet. Neben der statistischen Auswertung der Daten als unabhängige Gruppen (Kruskal-Wallis ANOVA und Median Test), d. h. zu dem jeweiligen Abnahmezeitraum, wurden auch die individuellen Veränderungen jedes Athleten untersucht (Friedman ANOVA). Die Unterteilung der Daten erfolgte analog zur Populationsuntersuchung in männliche und weibliche Athleten. Eine Zusammenfassung aller Daten über den gesamten Zeitraum ist in **Tab. 5** gegeben.

Tab. 5: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin sowie der Retikulozyten- und Serumparameter der Verlaufsuntersuchung, getrennt nach Geschlecht. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Bei mit * markierten Werten (unabhängige Gruppen) existieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Verlauf der Studie.

Parameter	Männer		Frauen	
	Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max
Hämatokrit [%]	45,8 (43,7-48,2)	37-53,1	41,8 (40,5-46,2)	36,4-49,0
Hämoglobin [g/dl]	15,8 (15,1-16,6)	13,0-17,8	14,0 (13,5-15,0)	12,6-16,2
Retikulozyten [%]	1,0 (0,8-1,3)	0,4-2,1	1,0 (0,9-1,2)	0,5-1,8
Retikulozyten [$10^9/l$]	48,2 (39,1-60,0)	23,5-114,3	44,8 (37,6-52,6)	25,1-81,9
HFR [%]	0,7 (0,3-1,4)	0,1-3,3	1,2 (0,4-2,2)	0,1-3,2
Erythropoietin [mU/ml]	12,7 (10,7-16,3)	5,7-26,1	10,2 (8,6-12,5)	3,5-23,0
sTfR [nmol/l]	19,7 (16,4-22,5)	7,4-36,3	13,8 (12,0-16,7)	7,1-28,5
Ferritin [ng/ml]	66,7 (37,7-105,8)*	11,2-270,0	54,2 (22,8-122,6)	12,7-1711,0

Wie die Daten dieser Studie zeigen, bestanden auch bei den sehr gut trainierten Ausdauersportlern Unterschiede bezüglich der Parameter Hämatokrit (**Abb. 9**) und Hämoglobin (**Abb. 10**) zwischen den männlichen und weiblichen Athleten, jedoch traten keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Studie auf.

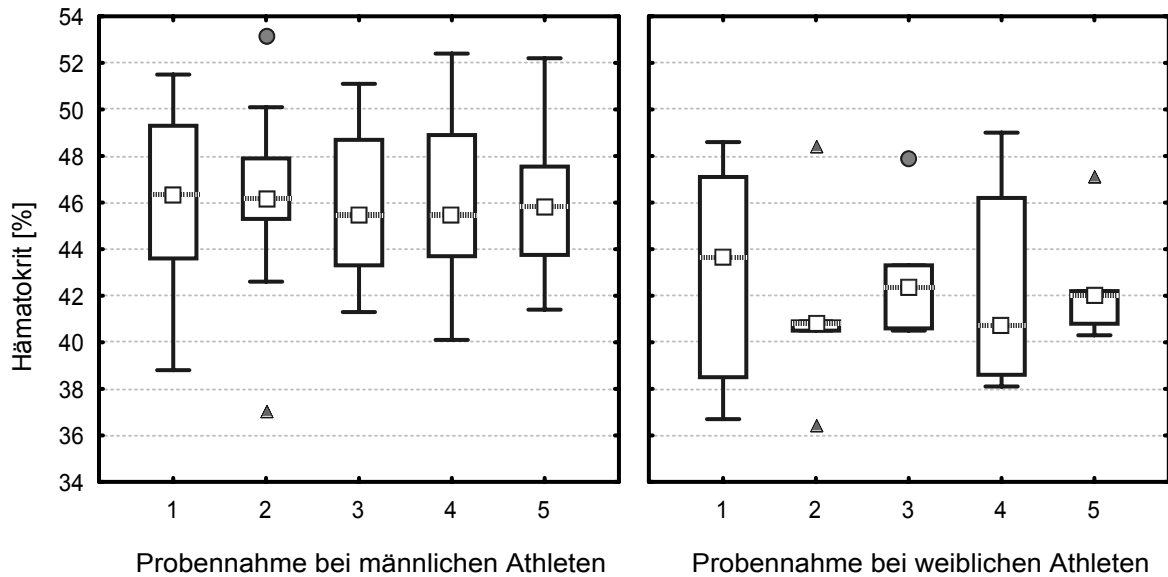


Abb. 9: Variation des Hämatokritwertes innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

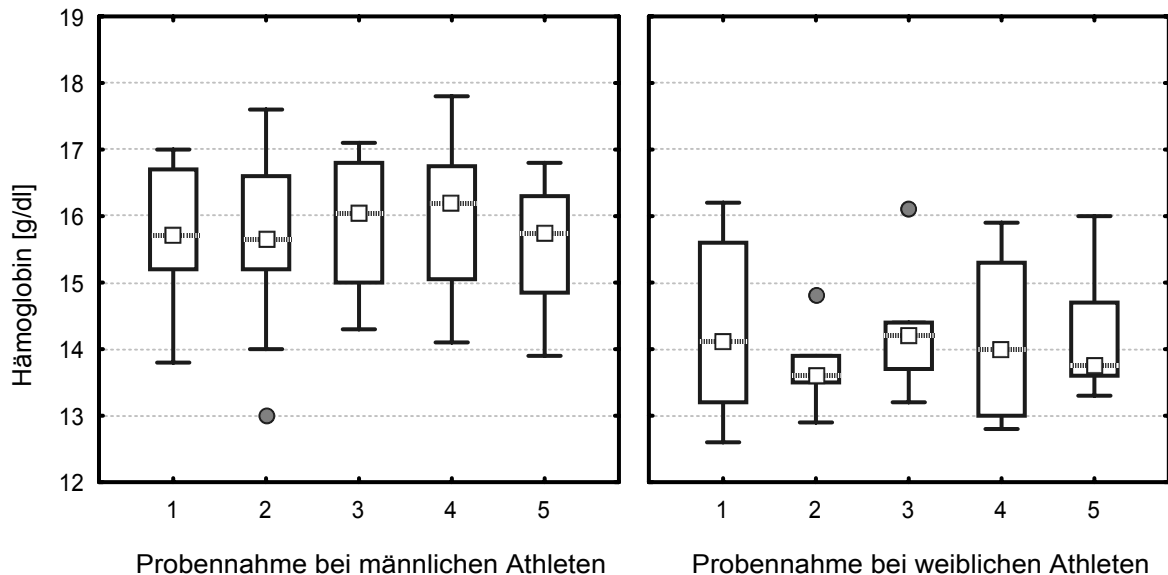


Abb. 10: Variation des Hämoglobinwertes innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

Der prozentuale Anteil der Retikulozyten (**Abb. 11**) und die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 12**) beschreiben beide den gleichen Zellparameter, die Anzahl an Retikulozyten, jedoch

mit unterschiedlichem Bezugssystem. Während sich die Retikulozytenkonzentration auf die Anzahl an erkannten und als Retikulozyten eingestuftem Zellen pro Volumeneinheit bezieht, ist die Grundlage für die prozentuale Angabe der Retikulozyten die Gesamtzahl aus Erythrozyten und Retikulozyten. Bei einer höheren Zahl an Erythrozyten ist also bei identischer Retikulozytenkonzentration der prozentuale Anteil an Retikulozyten kleiner.

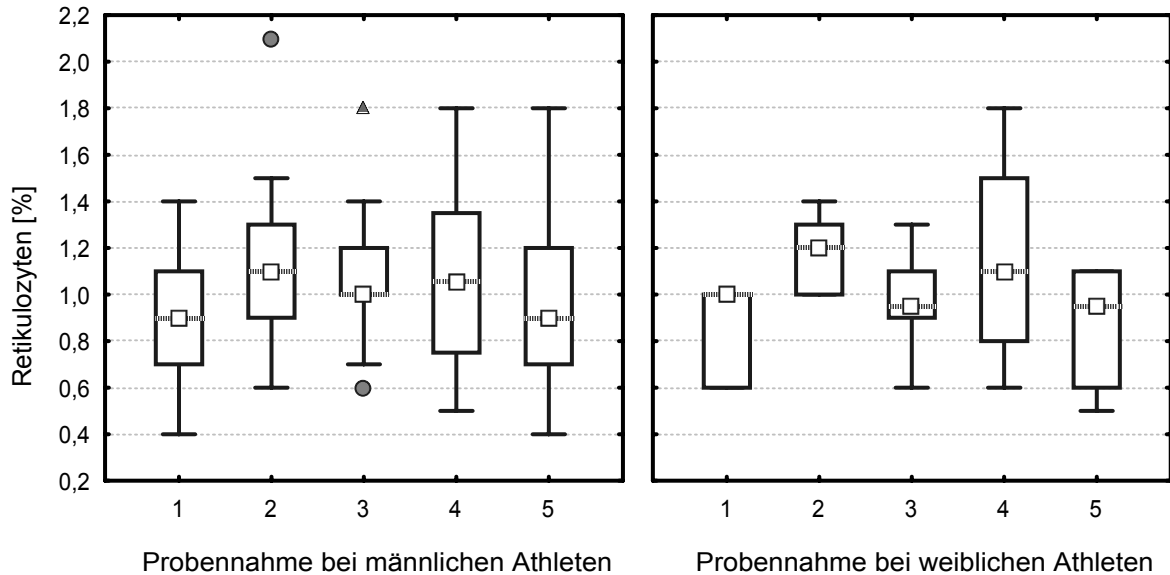


Abb. 11: Variation des Retikulozytenwertes (prozentualer Anteil Retikulozyten an der Gesamtzellenzahl) innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

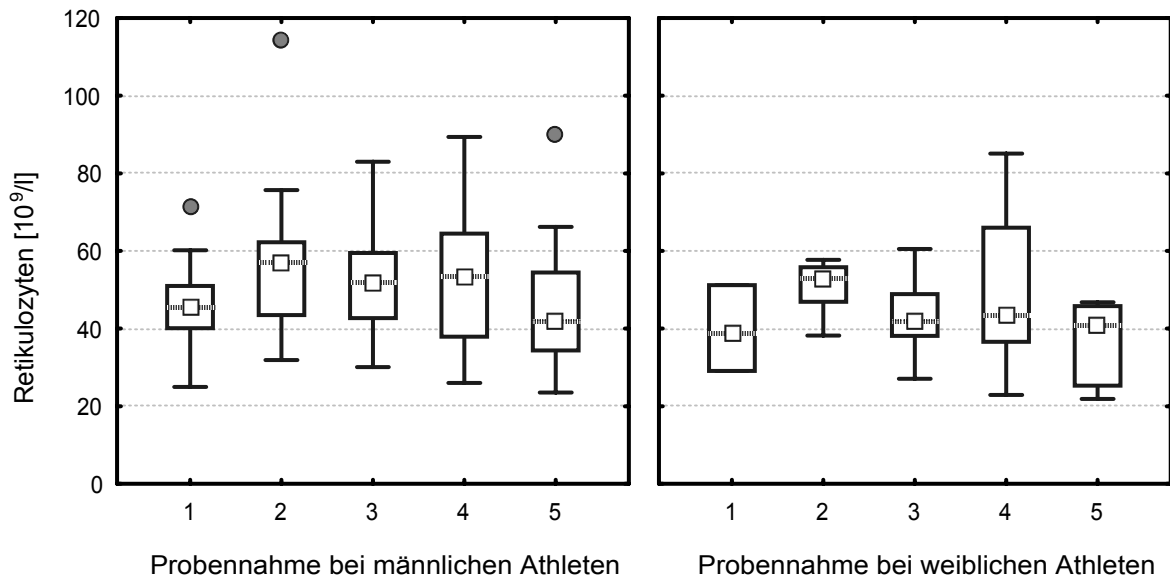


Abb. 12: Variation der Retikulozytenkonzentration innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

Zwar bestand eine enge Abhängigkeit beider Parameter, für den Fall des Missbrauchs von Erythropoietin ergaben sich jedoch Unterschiede, auf die im Abschnitt 5.1.1 genauer eingegangen werden soll. Wie stark sich dies bemerkbar machen kann, lässt sich anhand der in **Tab. 5** aufgeführten Daten erkennen, wenn man die Medianwerte dieser Parameter bei Männern und Frauen vergleicht.

Im Zeitraum der ersten Probennahme war keine Einteilung der Retikulozyten nach der Fluoreszenzintensität, d. h. dem Reifegrad der Zellen, möglich. Aus Gründen der Übersicht wurde lediglich der Anteil an hochfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 13**) angegeben, die auch für die Erfassung einer veränderten Erythropoese eine größere Bedeutung besitzen als die Parameter mittel- und niedrigfluoreszierende Retikulozyten.

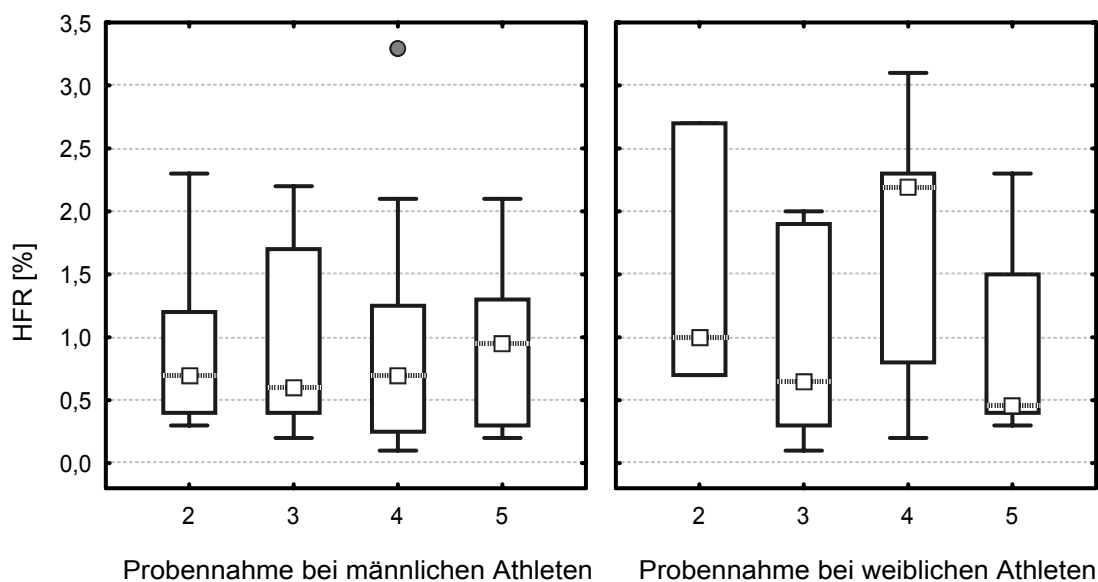


Abb. 13: Variation des Anteils an hochfluoreszierenden Retikulozyten innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

Im Gegensatz zu den Athleten der Populationsuntersuchung ließen sich bei allen DLV-Sportlern Erythropoietinwerte oberhalb der Nachweisgrenze des Immunoassays messen (**Abb. 14**). Die Ergebnisse für den löslichen Transferrinrezeptor (**Abb. 15**) waren für männliche Athleten vergleichbar, weibliche Athleten hatten geringere Werte als die der Populationsstudie. Möglicherweise bestand ein Zusammenhang mit den bei zwei Athletinnen stark erhöhten Ferritinwerten (**Abb. 16**), was bei der geringen Probandenzahl von sieben Athletinnen zu einer Verschiebung der Medianwerte führen konnte.

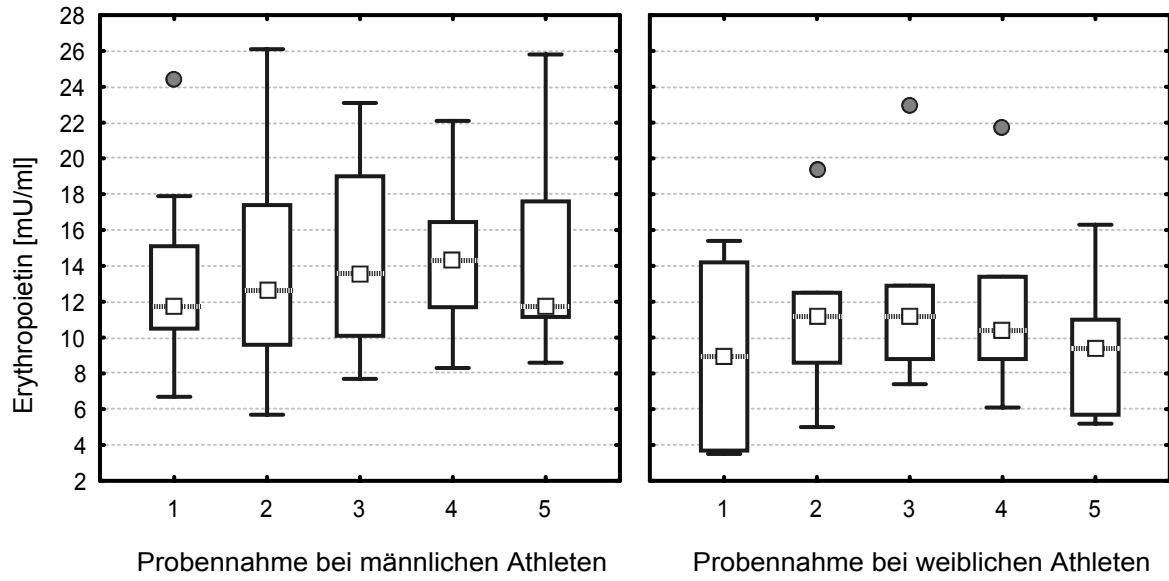


Abb. 14: Variation der Erythropoietinkonzentration innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme

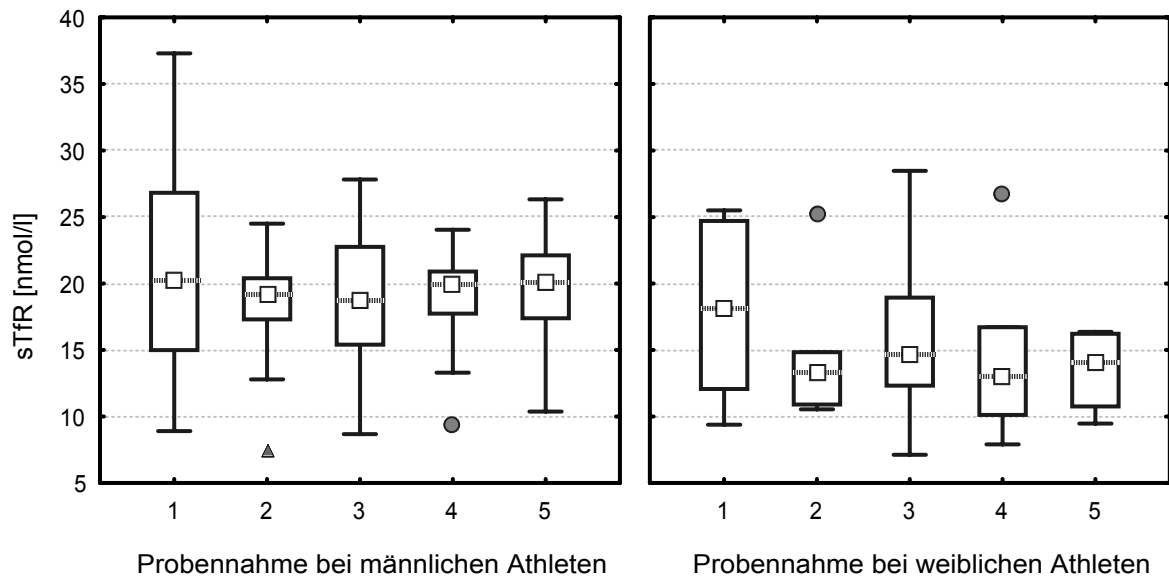


Abb. 15: Variation der Konzentration des sTfR innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

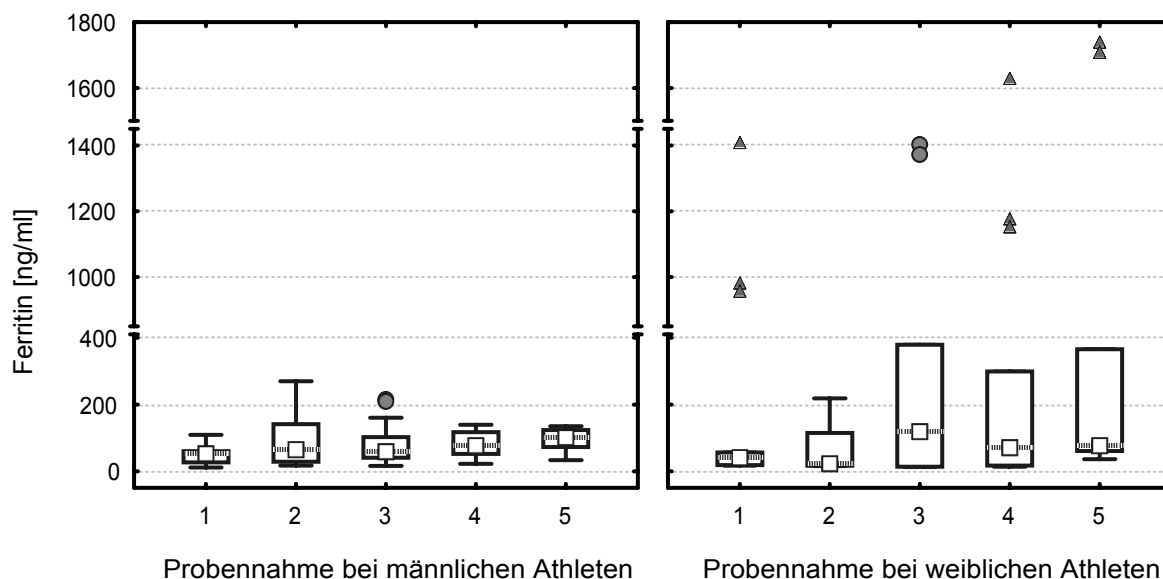


Abb. 16: Variation der Ferritinkonzentration innerhalb des Zeitraums der Studie bei männlichen und weiblichen Athleten, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

4.2 Gesamtprojekt IOC-Studien

Das Ziel der im Rahmen des IOC-Projektes durchgeführten Studien war die Untersuchung von Einflüssen auf die Blutparameter, die für den indirekten Nachweis eines Missbrauchs von Erythropoietin verwendet werden sollten. Mit dem für diese Studien zur Verfügung stehenden Hämatologiesystem ADVIA 120 war es möglich, eine Reihe neuer Parameter zu bestimmen, die insbesondere Informationen hinsichtlich der akuten Erythropoese liefern. Gleichzeitig sollten die in den vorherigen Studien (Populationsstudie und Verlaufsuntersuchung) ermittelten Parameter hinsichtlich ihrer Eignung für die Routineanalytik untersucht und zusätzliche Einflüsse geklärt werden. Dabei galt das Interesse besonders solchen Einflussfaktoren, auf die in bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten Studien nicht eingegangen wurde. Dies betraf unter anderem den Zeitpunkt der Probennahme (tägliche Variation und Jahresvariation) sowie den Einfluss von Belastung auf die verwendeten Parameter. Aber auch das Problem der Probenstabilität sollte untersucht werden, da in jedem Fall die Blutproben vom Abnahmeort bis zum Labor transportiert werden müssen. Weiterhin sollten unterschiedliche und widersprüchliche Aussagen der Literatur überprüft werden, um die verwendeten Parameter abzusichern.

4.2.1 Tagesstudie – Zirkadiane Rhythmik der Parameter

Im Gegensatz zu allen bisher veröffentlichten Studien [1, 35, 44, 53, 55, 66, 93-97], bei denen die Probennahme zu einem definierten Zeitpunkt erfolgte, ist dies für eine routinemäßige Probennahme im Rahmen der Dopingkontrolle nicht möglich. Während eine Probennahme bei Trainingskontrollen im Laufe des ganzen Tages stattfinden kann, werden für

Wettkampfkontrollen diese hauptsächlich am späten Nachmittag oder abends genommen. Ziel dieser Studie war es daher den Einfluss des Zeitpunktes der Probennahme zu untersuchen. Dazu kam, dass in der Literatur unterschiedliche, die zirkadiane Rhythmik einzelner Parameter, besonders Erythropoietin, betreffende Aussagen existierten. Analog zu der statistischen Auswertung der Verlaufsuntersuchung erfolgte sowohl der Vergleich der Gruppen (d. h. Messdaten zur jeweiligen Abnahmezeit) unabhängig von den Probanden als auch der Vergleich der Probanden untereinander, um individuelle Veränderungen festzustellen. Hinsichtlich der Trainingsausrichtung und Intensität des Trainings (vergleiche **Tab. 2**) konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, so dass sich bei der Darstellung der Daten auf die Unterscheidung hinsichtlich des Geschlechts beschränkt wurde.

Tab. 6: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Makrozyten sowie der Retikulozyten- und Serumparameter aller Proben der Tagesstudie, getrennt nach Geschlecht. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Bei mit * markierten Werten (unabhängige Gruppen) und mit ‡ markierten Werten (abhängige Gruppen) existieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Verlauf der Studie.

Parameter	Männer		Frauen	
	Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max
Hämatokrit [%]	43,4 (42,1-45,4) [‡]	32,8-50,1	39,3 (38,2-40,7) [‡]	32,8-47,6
Hämoglobin [g/dl]	15,5 (14,8-15,9) [‡]	11,2-17,8	13,4 (13,0-13,9) [‡]	10,8-15,8
Makrozyten [%]	0,2 (0,1-0,5) [‡]	0,0-3,1	0,4 (0,1-0,6)	0,0-7,5
Retikulozyten [%]	1,2 (1,0-1,5)	0,5-2,2	1,2 (1,0-1,4)	0,5-2,7
Retikulozyten [$10^9/l$]	61,8 (51,2-72,3)	24,2-116,2	53,9 (45,4-61,8)	21,9-109,1
HFR [%]	1,0 (0,6-3,4)	0,0-13,3	1,4 (0,6-4,1) [‡]	0,0-10,5
Retikulozythämatokrit [%]	0,65 (0,54-0,75)	0,26-1,08	0,57 (0,47-0,64)	0,24-1,17
Erythropoietin [mU/ml]	11,1 (8,3-13,7) ^{*‡}	2,8-22,8	12,4 (9,2-16,5) ^{*‡}	3,3-46,8
sTfR [nmol/l]	17,2 (15,1-19,6) [‡]	10,7-28,6	17,6 (15,2-20,1) [‡]	10,9-39,8
Ferritin [ng/ml]	64,9 (43,4-104,7) [‡]	14,2-205,9	24,5 (14,8-37,9) [‡]	2,7-62,4

Auch bei den an dieser Studie teilnehmenden Athleten waren die Hämatokrit- (**Abb. 17**) und Hämoglobinwerte (**Abb. 18**) der männlichen Athleten höher als die der weiblichen Athleten. Die Variation über den untersuchten Zeitraum war nur gering, so dass bei der Auswertung der Gruppenvariation bei männlichen und weiblichen Sportlern keine Veränderung festgestellt werden konnte. Es ließen sich bei beiden Parametern lediglich statistisch signifikante individuelle Unterschiede feststellen (**Tab. 6**).

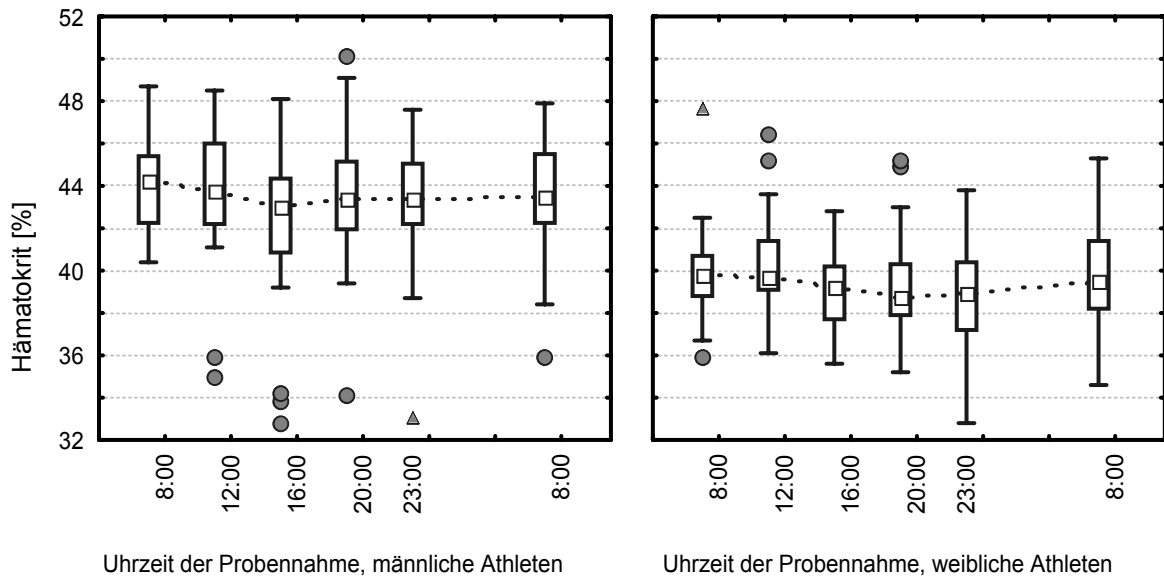


Abb. 17: Variation des Hämatokritwertes innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

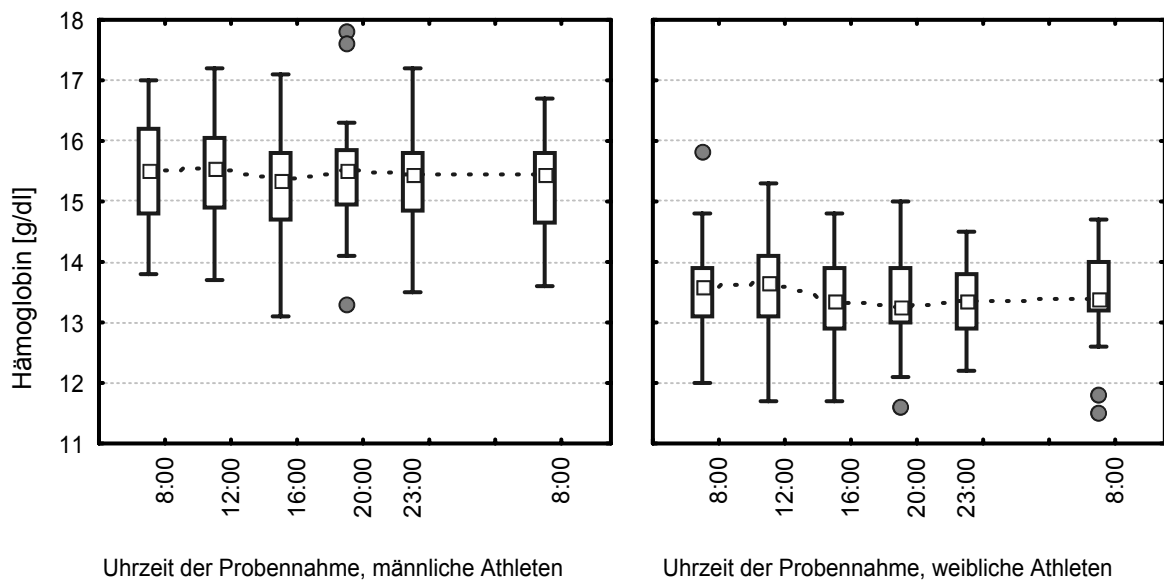


Abb. 18: Variation der Hämoglobinkonzentration innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

Die Bestimmung des Parameters Makrozyten (**Abb. 19**), d. h. der Erythrozyten mit einem Zellvolumen, das größer als 120 fl ist, war erst mit dem für diese Studie zur Verfügung stehenden Hämatologiesystem möglich. Auffallend ist, dass es eine Anzahl weiblicher Athleten gibt, die durchgängig hohe Makrozytenwerte aufwiesen. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Eisenmangelversorgung sein. Die Problematik des Eisenmangels bei weiblichen Leistungssportlern ist bekannt. Üblicherweise wird als Indikator dafür der Parameter Ferritin verwendet, wobei Ferritinkonzentrationen unterhalb von 20 ng/ml eine Eisenmangelversorgung anzeigen. Ein besserer Indikator für eine Eisenmangelerscheinung ist jedoch der Makrozytenwert. Das zeigte auch diese Studie, in der eine Reihe von Athletinnen deutlich geringere Ferritinwerte als 20 ng/ml aufwiesen, ohne auffällige Makrozytenwerte. Im Verlauf der untersuchten 24 h traten signifikante individuelle Unterschiede jedoch nur bei männlichen Athleten auf.

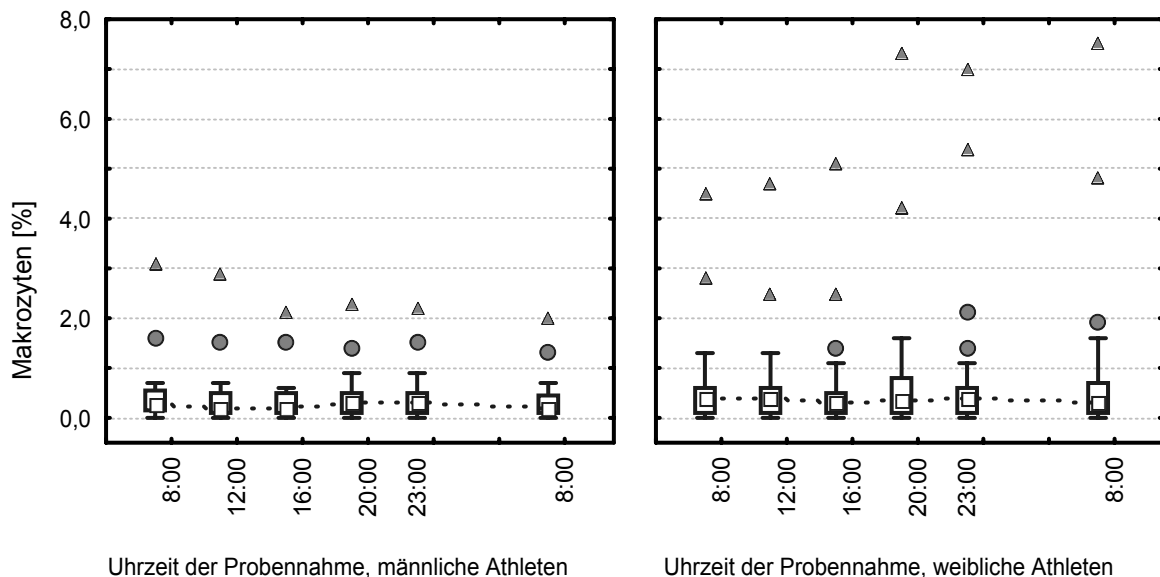


Abb. 19: Variation des prozentualen Anteils von Makrozyten (Zellen > 120 fl) innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

Während bei den Parametern der reifen Zellen signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen existierten, wiesen die Parameter der Zellbildung, wie der prozentuale Anteil an Retikulozyten (**Abb. 20**), die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 21**) und die hochfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 22**), keine Unterschiede bezüglich des Geschlechts auf. Der Parameter Retikulozythämatokrit (**Abb. 23**) ist das Produkt aus dem Zellvolumen und der Retikulozytenkonzentration und ermöglicht daher eine quantitative Aussage über das Volumen des Retikulozytenpools. Die einzige signifikante Veränderung der Parameter hinsichtlich deren zirkadianer Abhängigkeit, wurde nur für den Parameter HFR bei den weiblichen Sportlern

beobachtet, wenn diese nicht als unabhängige Gruppe, sondern individuell betrachtet wurden. Alle anderen Parameter zeigten keinen zirkadianen Rhythmus.

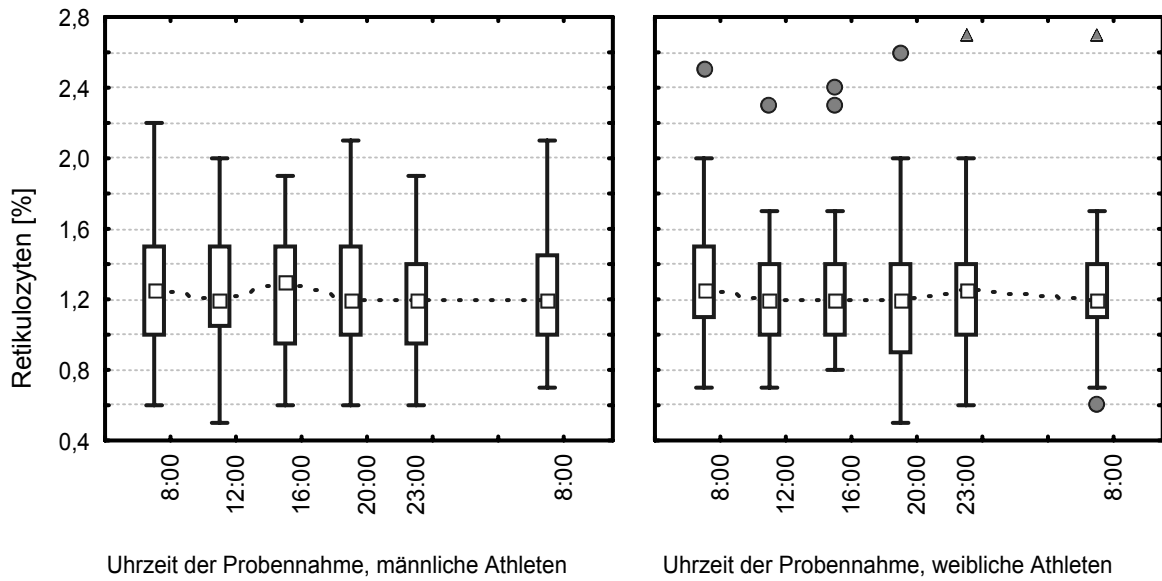


Abb. 20: Variation des prozentualen Anteils der Retikulozyten an der Gesamtzellenzahl innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

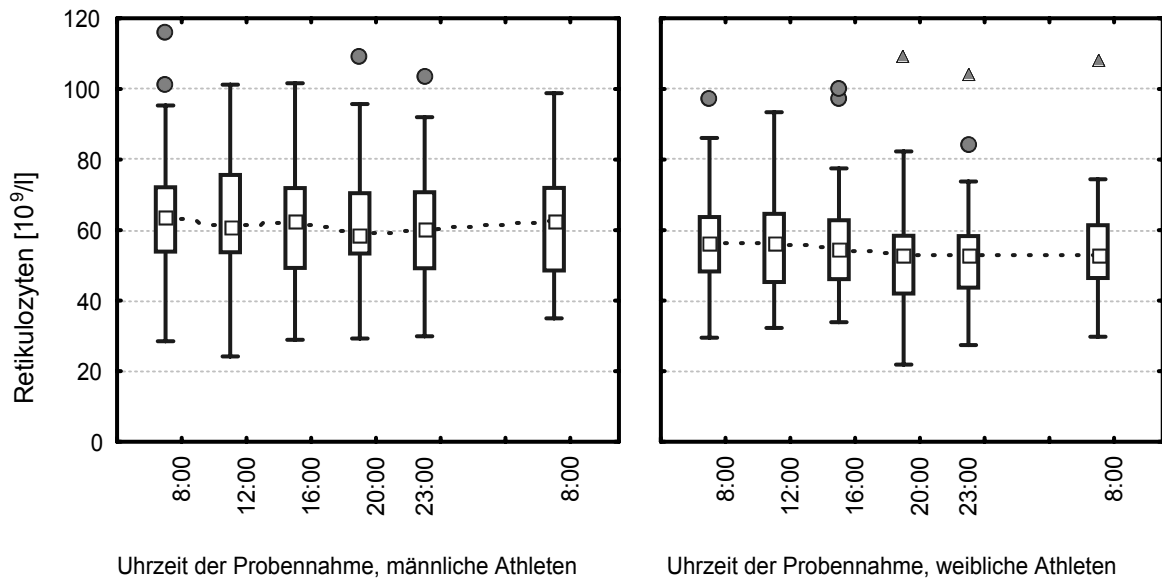


Abb. 21: Variation der Retikulozytenkonzentration innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

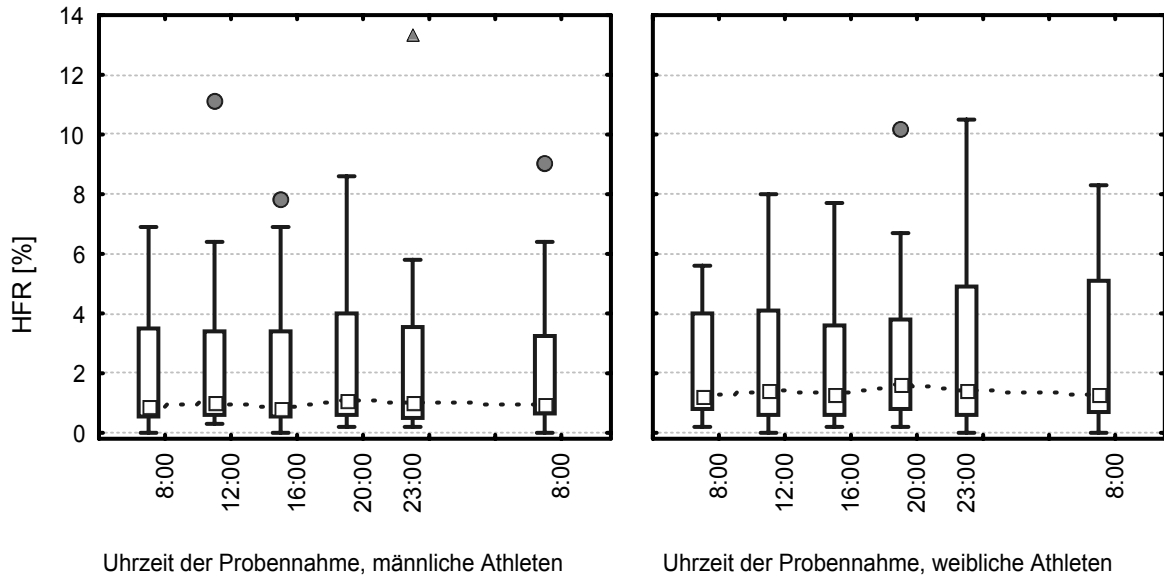


Abb. 22: Variation des Anteils an hochfluoreszierenden Retikulozyten (HFR) innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

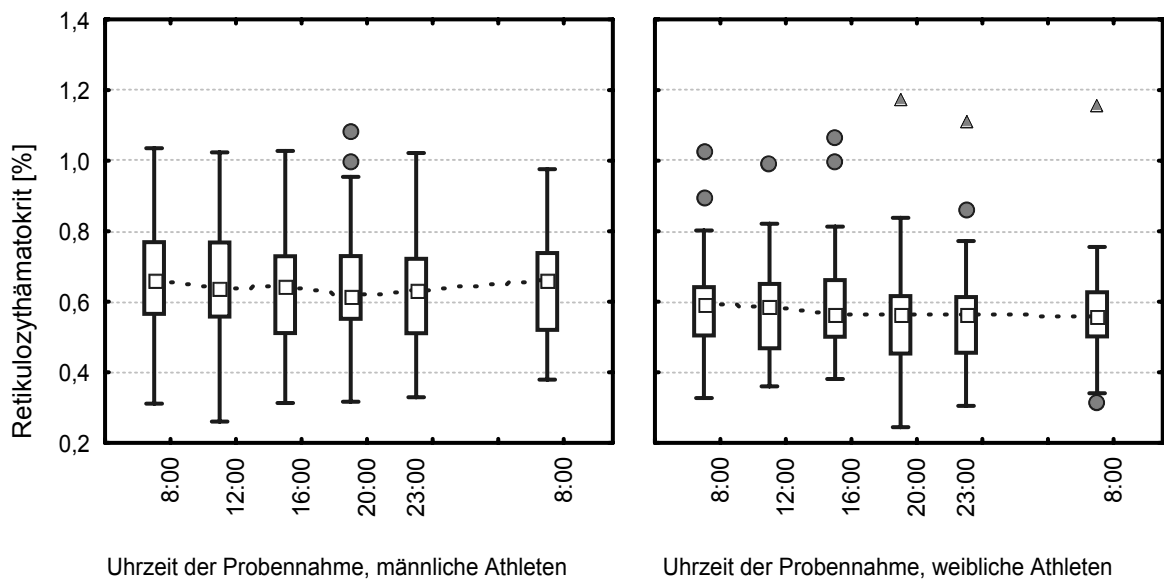


Abb. 23: Variation des Retikulozythämatokritwertes innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

Erythropoietin (**Abb. 24**) war der einzige Parameter, bei dem signifikante Unterschiede sowohl bei dem individuellen Vergleich als auch bei der Betrachtung der Werte als unabhängige Gruppen gefunden wurden, und wies somit einen eindeutigen zirkadianen Rhythmus auf. Das Maximum lag bei allen Athleten in den späten Abendstunden, im Bereich 20:00 bis 23:00 Uhr.

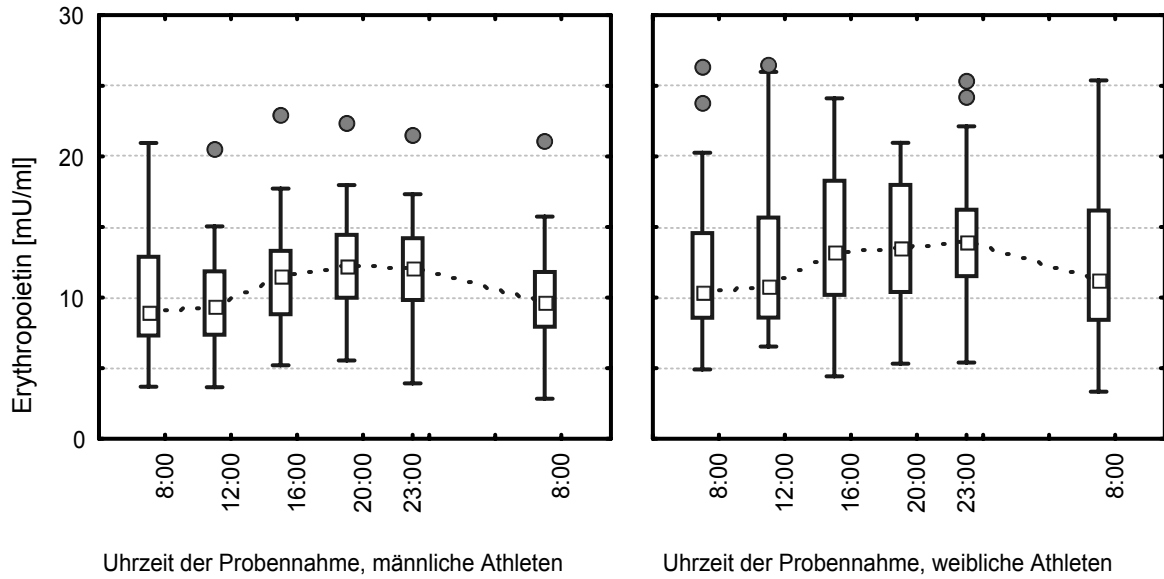


Abb. 24: Variation der Erythropoietinkonzentration innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

Beide Parameter, sTfR (**Abb. 25**) und Ferritin (**Abb. 26**), zeigten im Gegensatz zu Erythropoietin lediglich eine signifikante Veränderung der individuellen Werte über den untersuchten Zeitraum von 24 h. Auffällig ist, dass alle weiblichen Sportler nur sehr geringe Ferritinwerte aufwiesen. Gerade bei den Athletinnen mit sehr hohen Werten für den löslichen Transferrinrezeptor (> 30 nmol/l) konnten gleichzeitig äußerst geringe Ferritinkonzentrationen (< 10 ng/ml) festgestellt werden.

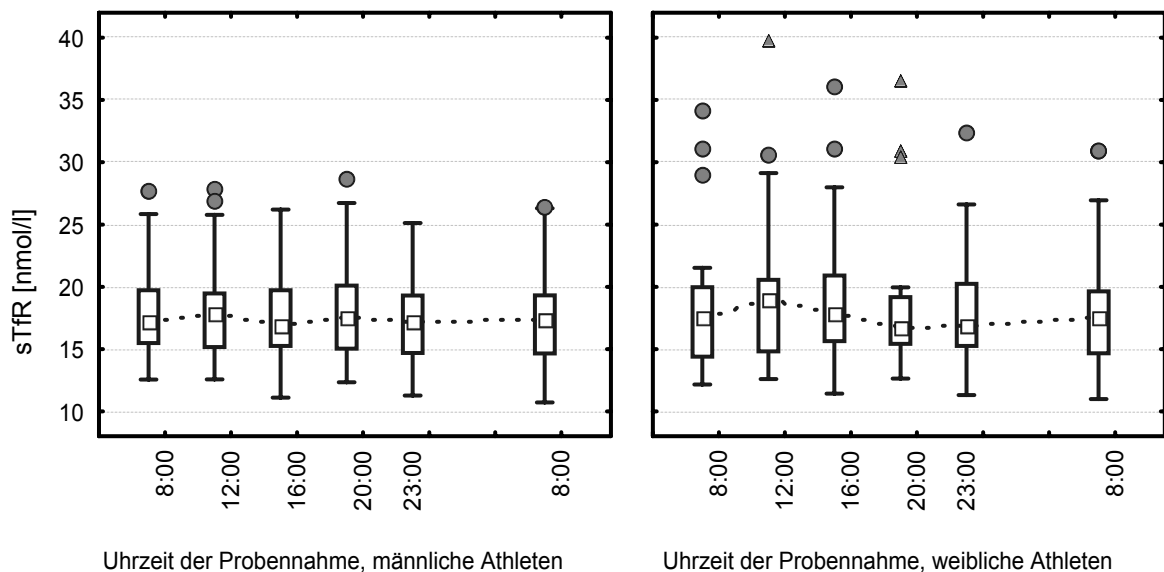


Abb. 25: Variation des sTfR innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

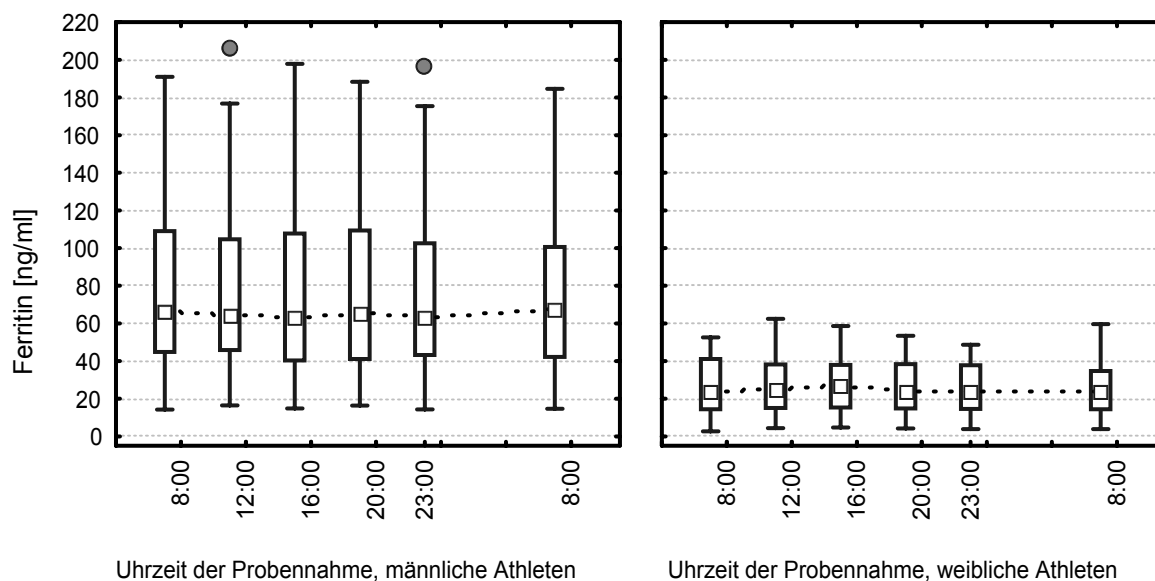


Abb. 26: Variation der Ferritinkonzentration innerhalb eines Zeitraums von 24 h bei männlichen und weiblichen Athleten.

4.2.2 Jahresstudie – Veränderung hämatologischer Parameter über den Zeitraum eines Jahres

Ein möglicher Ansatz zur Erkennung eines Dopings mit Erythropoietin bestand in der Erstellung eines individuellen Werteprofiles von hämatologischen und anderen mit der Erythropoese verknüpften Parametern – einem so genannten „Blutpass“ – was bereits in der Verlaufsuntersuchung der DLV-Athleten verfolgt wurde. Bei diesem Ansatz stellten sich die Fragen, ob für einen Sportler ein individuelles Profil besteht, das über einen längeren Zeitraum nur geringfügigen Schwankungen unterworfen ist, und ob sich aus den Daten dieses individuellen Profils individuelle oder allgemeine Grenzwerte festlegen lassen.

Da die Athleten bereits an der Tagesstudie teilgenommen hatten, wurden für die erste Abnahme Daten aus dieser Studie verwendet. Aus logistischen Gründen wurde dazu die Abnahme um 20:00 Uhr gewählt. Für die statistische Auswertung erfolgte sowohl der Vergleich der Gruppen (d. h. Messdaten zur jeweiligen Abnahme) unabhängig von den Probanden als auch abhängig von den Probanden, um individuelle Veränderungen festzustellen. Der Zeitraum der Studie betrug 12 Monate; von jedem Probanden wurden in dieser Zeit zehn Proben genommen. Für die Auswertung der Daten wurde als Bezugssystem die Nummer der Abnahme verwendet. Die Durchschnittswerte der gesamten Studie sind in **Tab. 7** aufgeführt.

Analog der zirkadianen Untersuchung konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Trainingsausrichtung und -intensität der Probanden gefunden werden, so dass auch für diese Studie die Daten geschlechtsspezifisch dargestellt wurden.

Tab. 7: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Makrozyten sowie der Retikulozyten- und Serumparameter aller Proben der Jahresstudie getrennt nach Geschlecht. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Bei mit * markierten Werten (unabhängige Gruppen) und mit ‡ markierten Werten (abhängige Gruppen) existieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Verlauf der Studie.

Parameter	Männer		Frauen	
	Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max
Hämatokrit [%]	44,3 (42,5-46,5)*‡	34,1-52,6	40,8 (38,7-42,6)*‡	33,9-47,8
Hämoglobin [g/dl]	15,1 (14,4-16,0)*‡	12,6-19,1	13,6 (13,0-14,1)*‡	11,1-16,3
Makrozyten [%]	0,3 (0,2-0,5)*‡	0,0-3,4	0,5 (0,2-0,8)*‡	0,0-7,3
Retikulozyten [%]	1,4 (1,2-1,7)*‡	0,6-2,8	1,5 (1,2-1,8)*‡	0,5-3,3
Retikulozyten [$10^9/l$]	73,8 (59,2-88,2)*‡	29,3-160,0	67,8 (57,3-79,2)*‡	21,9-133,7
HFR [%]	1,0 (0,7-1,6)*‡	0,0-8,6	1,1 (0,7-2,1)*‡	0,0-10,2
Retikulozythämatokrit [%]	0,75 (0,61-0,88)*‡	0,31-1,54	0,69 (0,59-0,80)*‡	0,25-1,43
Erythropoietin [mU/ml]	11,3 (8,6-14,4)	3,9-37,6	13,0 (9,4-18,0)	2,4-39,9
sTfR [nmol/l]	18,2 (14,8-25,5)*	10,2-43,8	18,1 (15,3-22,4)*‡	8,8-55,4
Ferritin [ng/ml]	62,1 (39,6-88,5)*‡	7,7-272,3	20,7 (13,4-30,9)*‡	1,6-92,2

Im Gegensatz zur Verlaufsuntersuchung der DLV-Athleten konnten sowohl für die Hämatokritwerte (**Abb. 27**) als auch die Hämoglobinkonzentrationen (**Abb. 28**) signifikante Unterschiede bei der Betrachtung als unabhängige Gruppen sowie bei der Betrachtung der individuellen Werte bei männlichen und weiblichen Athleten gefunden werden.

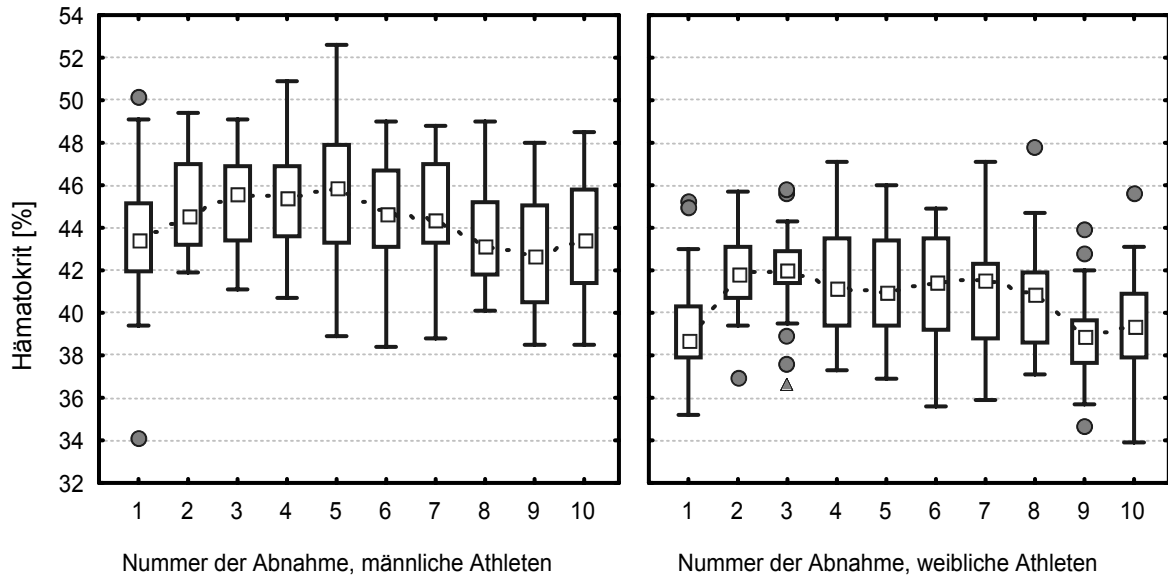


Abb. 27: Variation des Hämatokritwertes innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

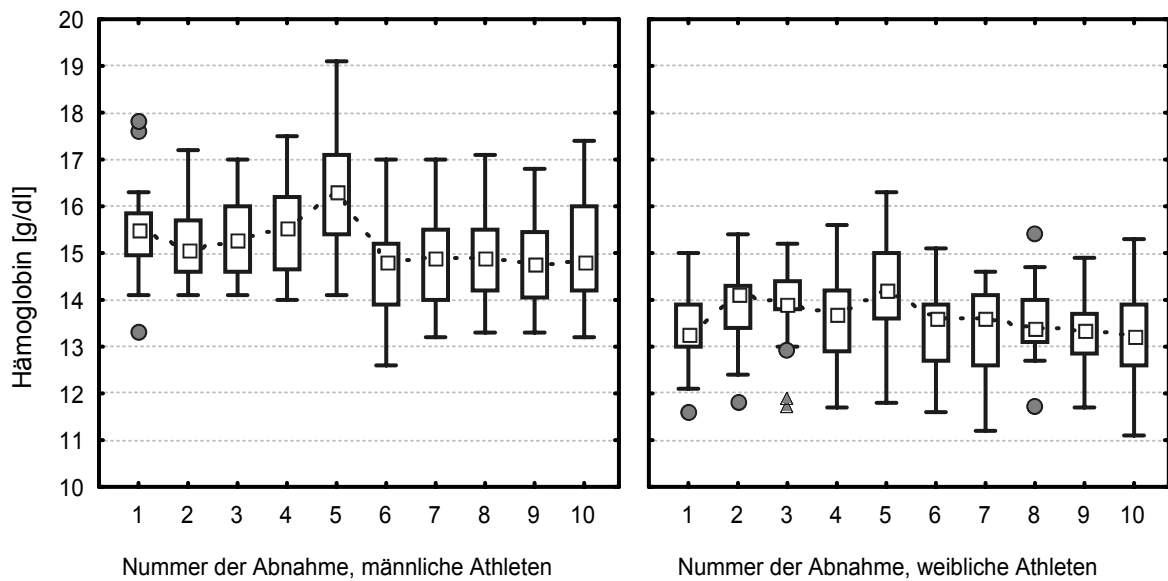


Abb. 28: Variation der Hämoglobinkonzentration innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

Wie schon bei der Tagesstudie gefunden wurde, gab es eine geringe Anzahl von Athleten, die einen ständig erhöhten Makrozytenwert aufwiesen (**Abb. 29**). Die Werte der weiblichen Athleten waren generell höher als die der männlichen Athleten; beide Gruppen zeigten jedoch signifikante Unterschiede bei der Auswertung als unabhängige Gruppenwerte oder individuelle Einzelwerte. Lediglich zwei Sportlerinnen mit Makrozytenwerten $> 1\%$ hatten Ferritinwerte unter 20 ng/ml, so dass eine „klassische“ Eisenmangelerscheinung nicht die Ursache dafür sein konnte.

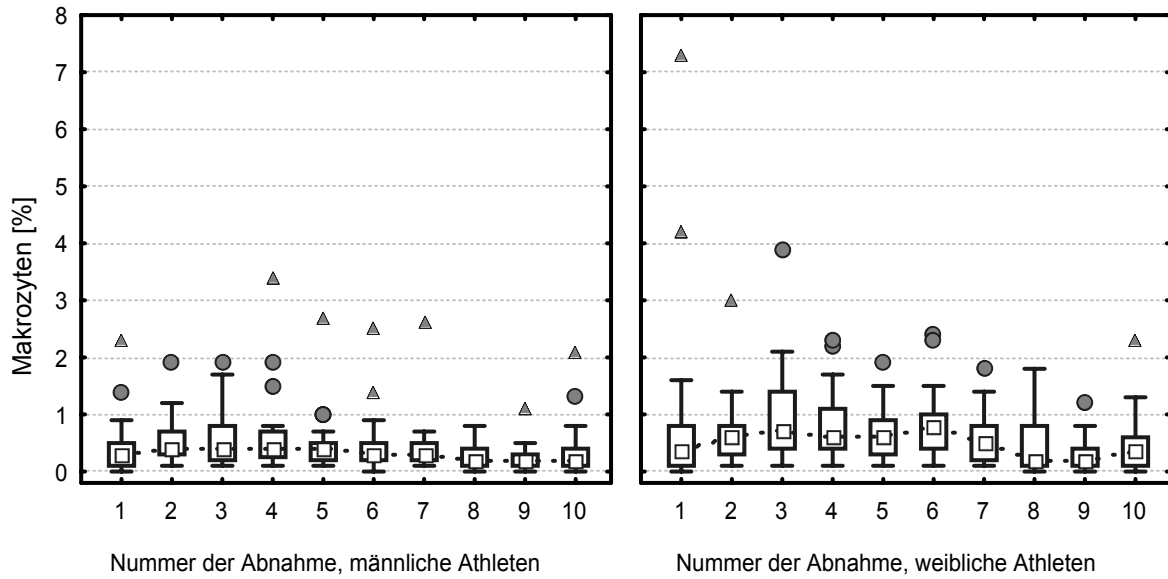


Abb. 29: Variation des Anteils an Makrozyten innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

Alle Parameter der Retikulozyten, d. h. der prozentuale Anteil der Retikulozyten (**Abb. 30**), die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 31**), der Anteil an hochfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 32**) und der Retikulozythämatokrit (**Abb. 33**), zeigten eine signifikante Veränderung bei den männlichen und weiblichen Athleten über den untersuchten Zeitraum eines Jahres, sowohl bei der Datenauswertung als unabhängige Gruppen als auch bei individueller Betrachtung der Daten.

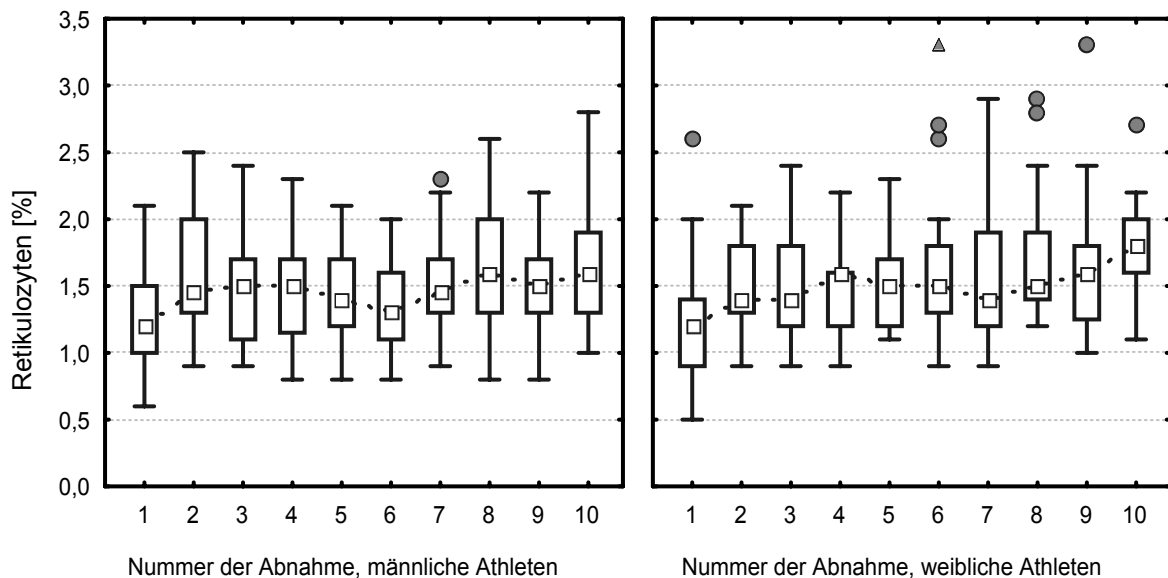


Abb. 30: Variation des prozentualen Anteils der Retikulozyten an der Gesamtzellenzahl innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

Vergleicht man die Veränderung der Werte über den Zeitraum, so fällt auf, dass die Daten der ersten Probennahme, d. h. des Zeitpunkts 20:00 Uhr der Tagesstudie, sich von allen weiteren Probennahmen unterscheiden. Mögliche Ursachen werden in Abschnitt 5.1.2 diskutiert.

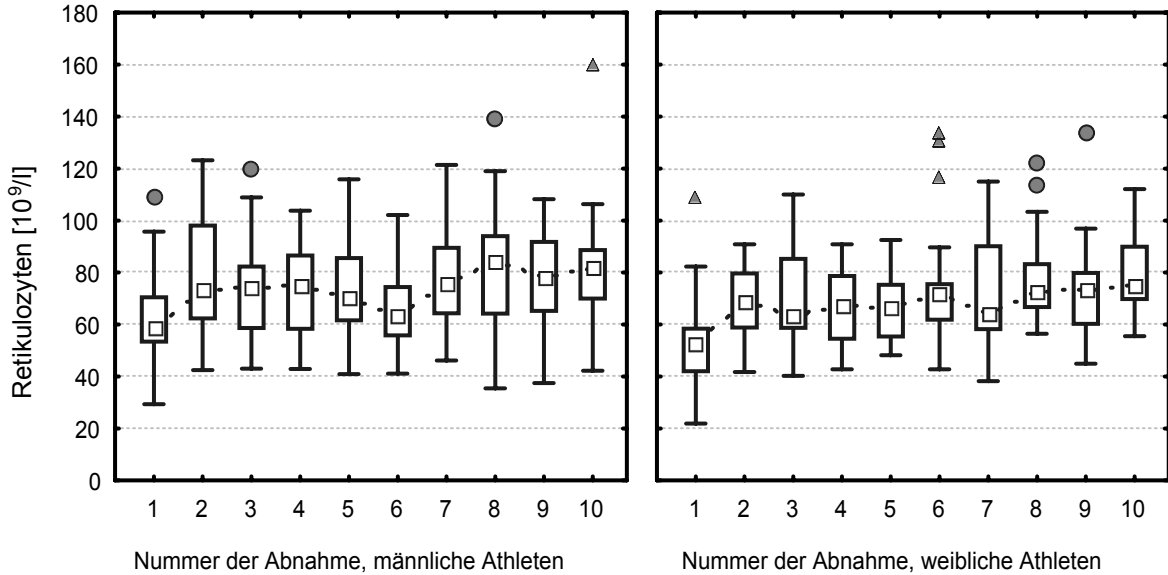


Abb. 31: Variation der Retikulozytenkonzentration innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

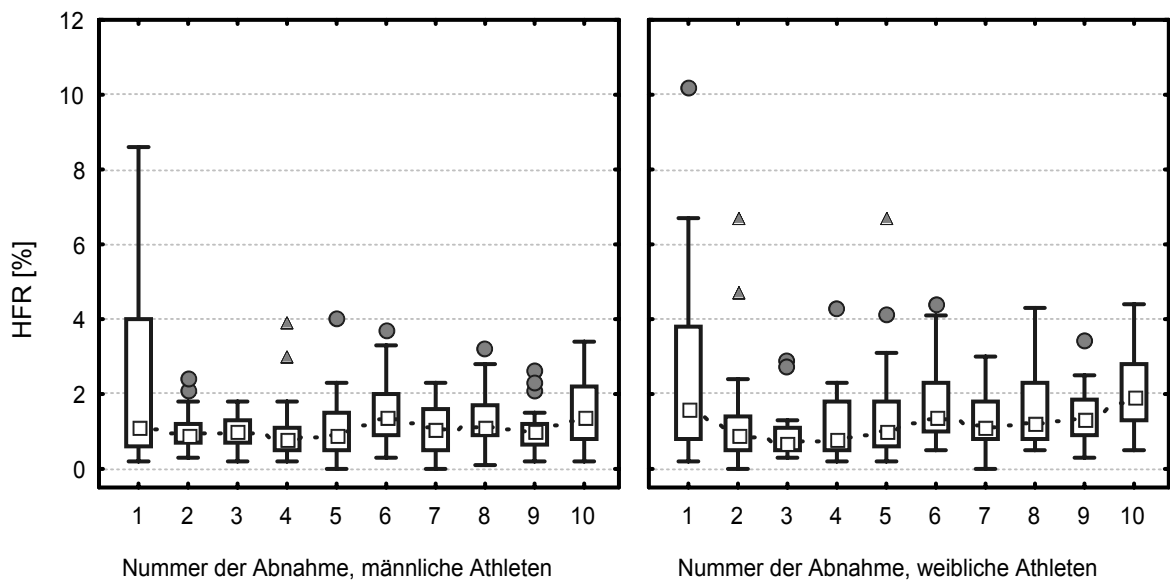


Abb. 32: Variation des Anteils von HFR an der Gesamtretikulozytenzahl innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

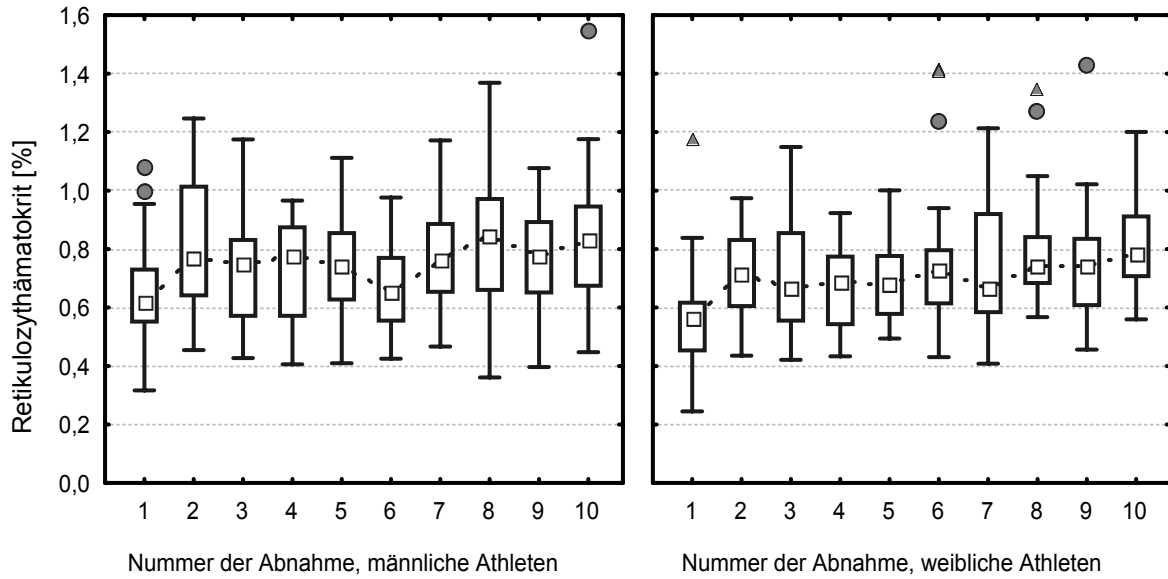


Abb. 33: Variation des Retikulozythämatokritwertes innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

Der Parameter Erythropoietin, der als einziger einen signifikanten zirkadianen Rhythmus aufwies (Abschnitt 4.2.1), war in der Jahresstudie der einzige Parameter, der sich stabil über den untersuchten Zeitraum verhielt (**Abb. 34**). Ganz gegensätzlich dazu sahen die Ergebnisse des löslichen Transferrinrezeptors (**Abb. 35**) aus. Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Athleten gab es im Studienverlauf signifikante Unterschiede bei der Betrachtung als unabhängige Gruppen oder der Auswertung der individuellen Abhängigkeiten.

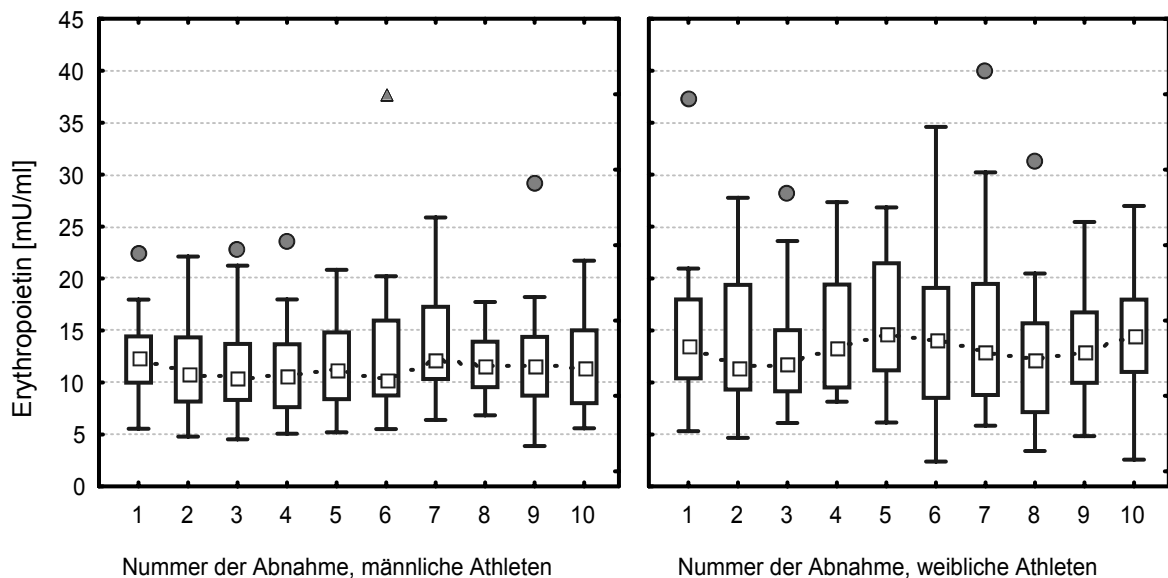


Abb. 34: Variation der Erythropoietinkonzentration innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

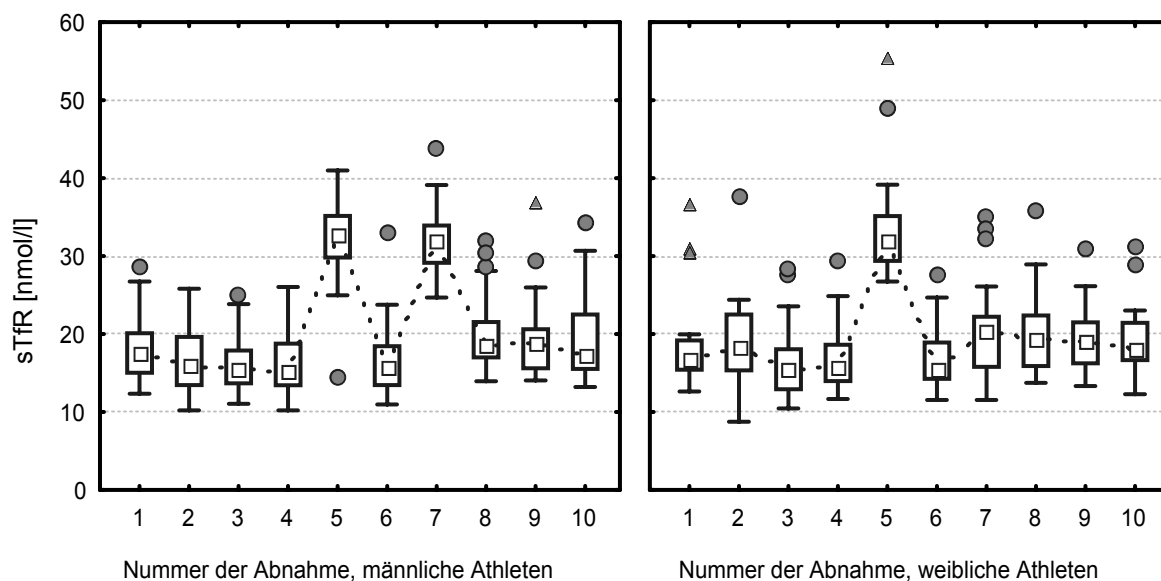


Abb. 35: Variation der Konzentration des sTfR innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

Auffällig ist, dass bei der fünften Abnahme bei Männern und Frauen und bei der siebenten Abnahme nur bei den Männern die Werte für den sTfR erhöht waren. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung ganzer Messreihen könnten Veränderungen bei den verwendeten Immunoassays, meist Chargenwechsel, sein. Die Werte der bei den Messungen mitgeführten Poolproben (siehe dazu Abschnitt 4.5.5) zeigten zu diesem Zeitpunkt jedoch keine gravierende Veränderung, so dass dies als Ursache ausgeschlossen werden konnte.

Ferritin (**Abb. 36**) zeigte, wie fast alle anderen Parameter (**Tab. 7**), ebenfalls eine signifikante Veränderung bei männlichen und weiblichen Athleten innerhalb des untersuchten Zeitraums, sowohl bei der Auswertung als unabhängige Gruppen als auch bei der individuellen Abhängigkeit der Daten. Die Werte der weiblichen Athleten blieben über den gesamten Zeitraum der Untersuchung sehr niedrig und unterschieden sich deutlich von denen der männlichen Athleten.

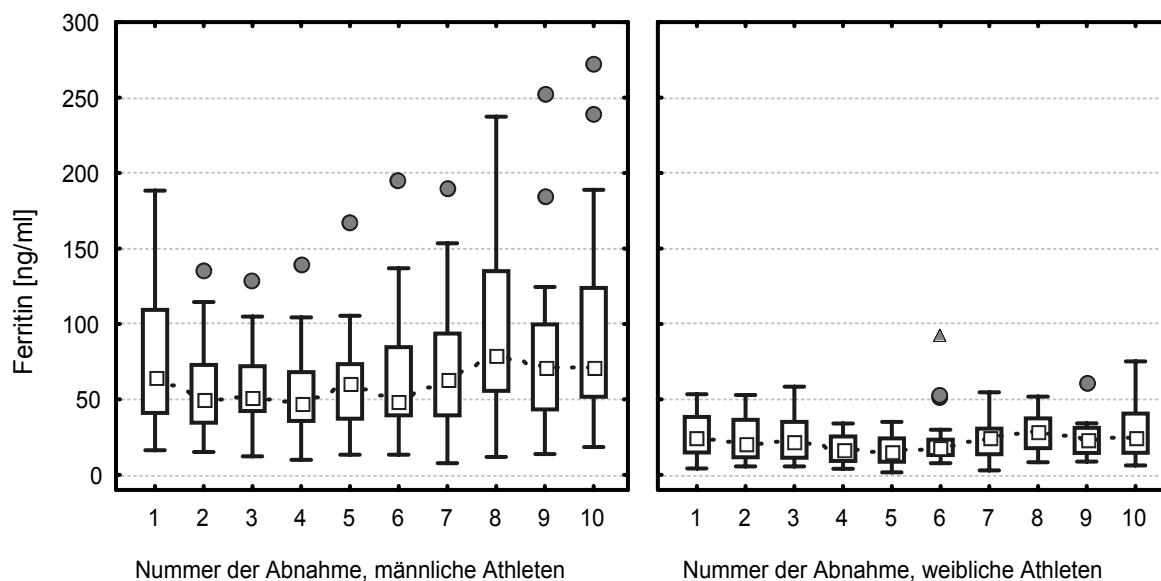


Abb. 36: Variation der Ferritinkonzentration innerhalb des Zeitraums von einem Jahr bei männlichen und weiblichen Athleten.

4.2.3 Belastungsstudien

Der größte Unterschied zwischen der Probennahme bei einer Studie und einer realen Dopingkontrolle ist, dass letztere meist nach der Belastung der Athleten durchgeführt wird, während Proben für Studien bisher immer im unbelasteten Zustand genommen wurden. Deshalb sollte untersucht werden, ob Belastung zu einer Veränderung der hämatologischen Parameter führt. In der Literatur ^[98, 99] besteht eine generelle Übereinstimmung darüber, dass es bei einer intensiven Belastung (maximal oder submaximal) zu einem Anstieg der Blutviskosität kommt, dem zwei separate Mechanismen zugrunde liegen. Der erste Mechanismus beruht auf einer Veränderung der Plasmaviskosität und des Hämatokrits, der zweite auf einer Veränderung der physiologischen Eigenschaften der Erythrozyten. Basierend darauf stellte sich die Frage, welchen Einfluss somit eine Belastung auf die angewandten Grenzwerte hat, z. B. ob nach einem Marathon der Hämatokritwert durch Flüssigkeitsverlust oder andere Faktoren so erhöht wäre, dass der Grenzwert überschritten würde.

Diese Fragestellung steht vor allem bei Wettkampfkontrollen, bei denen die Abnahme überwiegend nach dem Wettkampf erfolgt, aber auch bei Trainingskontrollen, wenn die Probennahme unmittelbar nach dem Training oder während dessen durchgeführt wird. Um diese Veränderung zu erfassen wurden vor und nach einem Marathon sowie einem Radrennen Blutproben von gut trainierten männlichen und weiblichen Athleten analysiert.

Die Daten der männlichen Athleten sind im Überblick in **Tab. 8** und die der weiblichen Athleten in **Tab. 9** aufgeführt.

Tab. 8: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Makrozyten sowie der Retikulozyten- und Serumparameter aller männlichen Athleten vor und nach der Belastung (Marathon und Radrennen). Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Bei mit * markierten Werten (unabhängige Gruppen) und mit ‡ markierten Werten (abhängige Gruppen) existieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Verlauf der Studie.

Parameter	Männer-Marathon		Männer-Radrennen (72 km)	
	Median (25-75 %) vor Belastung	Median (25-75 %) nach Belastung	Median (25-75 %) vor Belastung	Median (25-75 %) nach Belastung
Hämatokrit [%]	48,1 (45,8-49,9)	47,6 (45,9-49,4)	46,2 (44,4-48,7)	47,1 (44,7-48,6)
Hämoglobin [g/dl]	15,6 (14,9-16,2)	15,6 (15,0-15,9)	15,9 (15,1-16,7)	15,7 (15,1-17,2)
Makrozyten [%]	1,2 (0,9-1,9) [‡]	1,4 (1,1-1,9)	0,7 (0,5-1,4) [‡]	0,9 (0,6-1,9)
Retikulozyten [%]	1,4 (1,2-1,5) ^{*‡}	1,6 (1,4-1,8)	1,4 (1,2-1,7)	1,5 (1,4-1,7)
Retikulozyten [$10^9/l$]	65,8 (61,4-76,4) ^{*‡}	76,3 (72,3-94,0)	67,9 (63,2-87,0)	74,1 (65,9-84,4)
HFR [%]	1,1 (0,8-1,9) ^{*‡}	2,3 (1,9-3,0)	0,8 (0,6-1,2) ^{*‡}	1,4 (1,2-1,6)
Retikulozythämatokrit [%]	0,69 (0,64-0,83) ^{*‡}	0,80 (0,75-0,95)	0,72 (0,66-0,91)	0,78 (0,71-0,91)
Erythropoietin [mU/ml]	15,1 (13,3-18,5)	15,0 (12,4-17,8)	9,5 (6,6-12,4)	9,0 (6,7-12,1)
sTfR [nmol/l]	16,0 (13,2-18,0)	16,5 (14,5-18,5)	16,5 (14,5-18,2) [‡]	17,8 (15,0-19,6)
Ferritin [ng/ml]	97,1 (44,3-129,4) [‡]	115,4 (70,2-163,1)	56,7 (35,2-93,6) [‡]	61,3 (40,7-104,0)

Tab. 9: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Makrozyten sowie der Retikulozyten- und Serumparameter aller weiblichen Athleten vor und nach der Belastung (Marathon und Radrennen). Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Bei mit * markierten Werten (unabhängige Gruppen) und mit ‡ markierten Werten (abhängige Gruppen) existieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Verlauf der Studie.

Parameter	Frauen-Marathon		Frauen-Radrennen (42 km)	
	Median (25-75 %) vor Belastung	Median (25-75 %) nach Belastung	Median (25-75 %) vor Belastung	Median (25-75 %) nach Belastung
Hämatokrit [%]	44,0 (42,7-45,2) [‡]	41,7 (41,0-43,8)	44,6 (44,0-45,8)	44,6 (43,9-46,1)
Hämoglobin [g/dl]	13,9 (13,6-14,2) [‡]	13,8 (13,5-14,1)	15,2 (14,6-15,5)	15,1 (14,6-15,6)
Makrozyten [%]	1,6 (1,1-4,3)	2,0 (1,0-3,8)	1,2 (0,7-2,4)	1,0 (0,7-2,3)
Retikulozyten [%]	1,3 (1,1-1,5) [‡]	1,4 (1,2-1,7)	1,4 (1,2-1,6)	1,5 (1,2-1,5)
Retikulozyten [$10^9/l$]	58,5 (48,0-64,8) [‡]	60,0 (54,8-73,0)	63,3 (55,5-74,6)	70,1 (59,9-75,5)
HFR [%]	1,4 (1,0-1,8) [‡]	1,8 (1,2-2,3)	0,7 (0,5-1,0) ^{*‡}	1,5 (1,0-1,9)
Retikulozythämatokrit [%]	0,62 (0,53-0,72) [‡]	0,65 (0,58-0,79)	0,70 (0,60-0,81)	0,74 (0,62-0,82)
Erythropoietin [mU/ml]	10,6 (8,1-12,6) ^{*‡}	15,2 (13,1-18,2)	9,0 (8,1-11,8) [‡]	9,5 (8,2-14,2)
sTfR [nmol/l]	16,3 (13,7-20,1)	15,5 (13,9-19,2)	16,3 (14,9-18,6)	16,9 (15,4-18,8)
Ferritin [ng/ml]	16,7 (7,9-35,2) [‡]	29,5 (16,2-49,0)	14,9 (9,7-27,9) [‡]	18,9 (10,3-30,4)

Vor allem beim Marathon wurde eine extreme Veränderung der Blutparameter erwartet. Betrachtet man die Werte für Hämatokrit (**Abb. 37**) und Hämoglobin (**Abb. 38**), so fällt auf, dass lediglich bei den weiblichen Athleten nach dem Marathon eine Veränderung stattgefunden hat, alle anderen waren unverändert. Der Anteil an Makrozyten (**Abb. 39**) veränderte sich lediglich signifikant beim direkten Vergleich der individuellen Daten der männlichen Athleten nach dem Marathon. Da alle anderen Parameter des roten Blutbildes unverändert blieben, ist unklar warum eine Veränderung der Makrozyten festgestellt werden konnte, auch ein direkter Vergleich der mittleren Zellvolumenwerte (Daten nicht gezeigt) lässt keine signifikante Veränderung durch die Belastung erkennen.

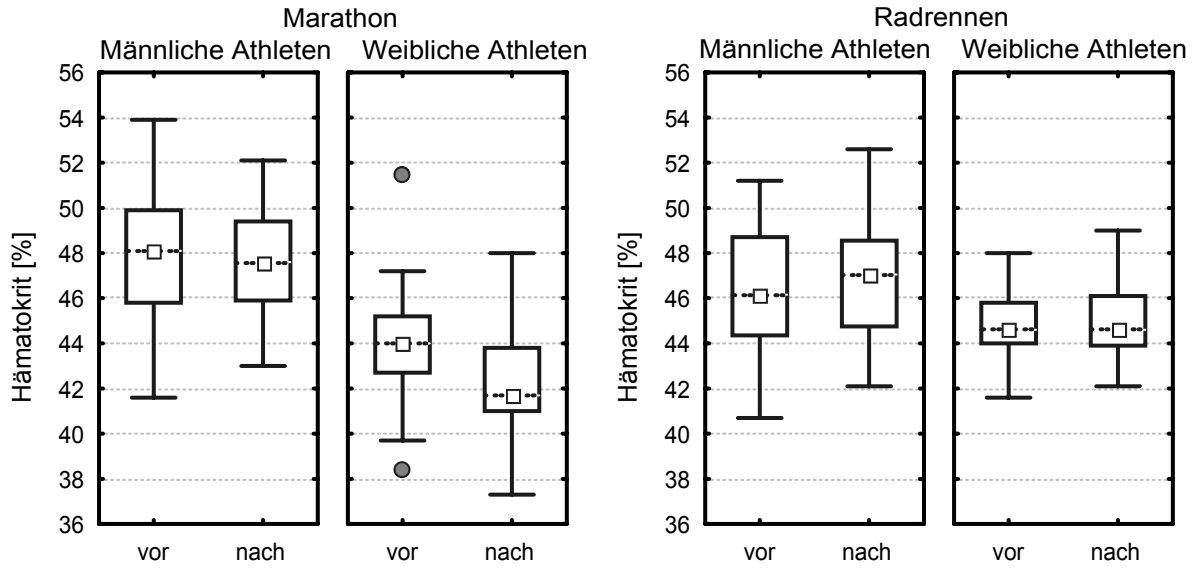


Abb. 37: Veränderung des Hämatokritwertes durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

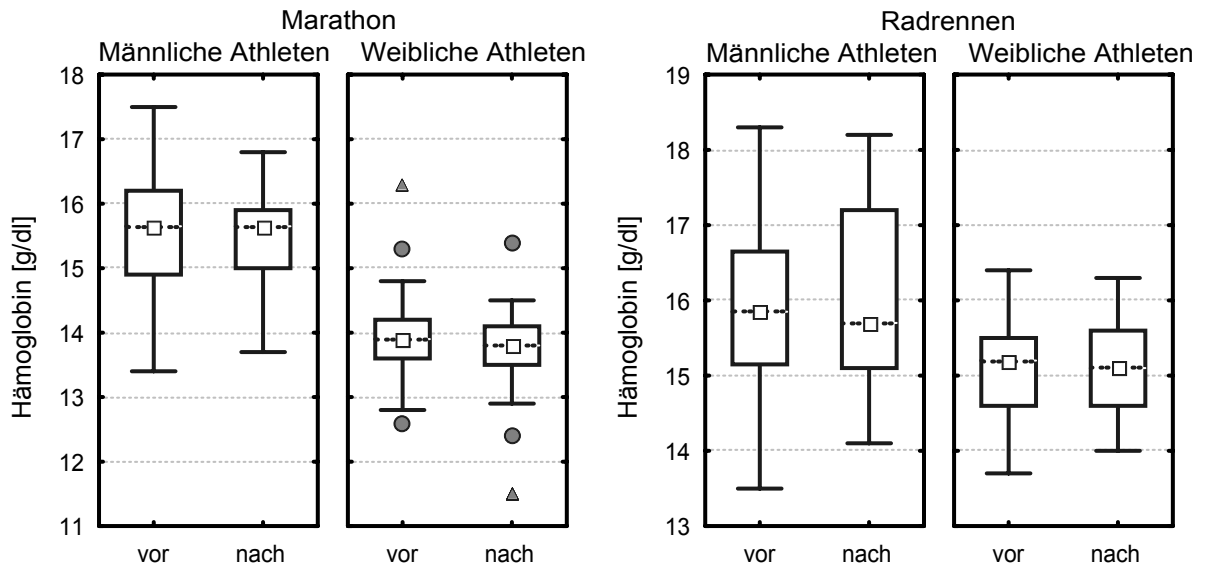


Abb. 38: Veränderung der Hämoglobinkonzentration durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

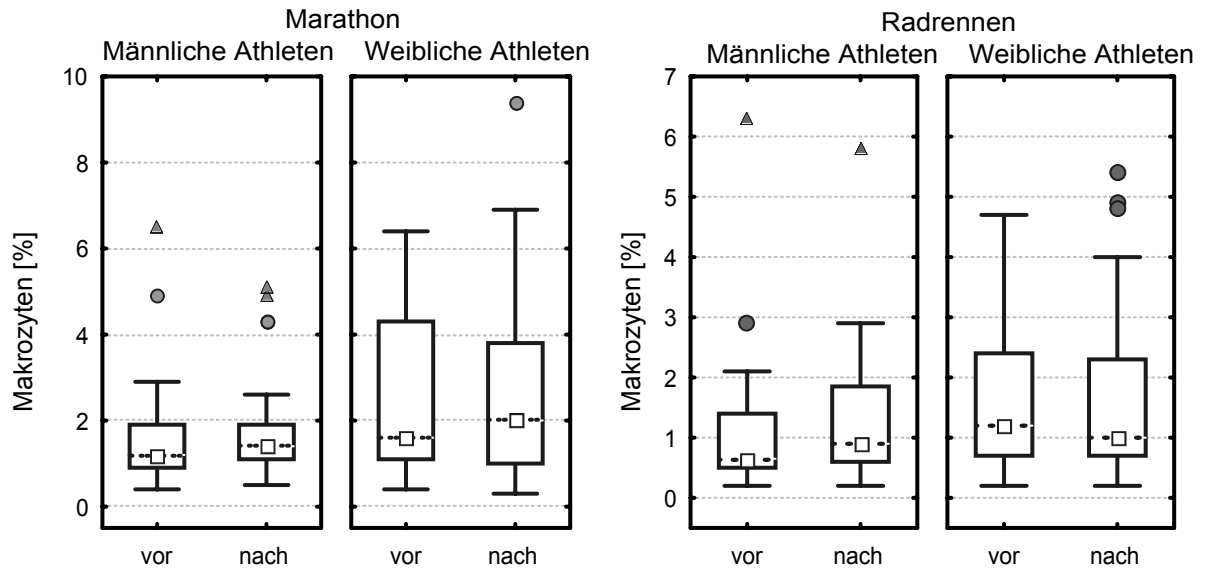


Abb. 39: Veränderung des Anteils an Makrozyten durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

Der prozentuale Anteil der Retikulozyten (**Abb. 40**) und die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 41**) waren nach dem Marathon erhöht. Bei den weiblichen Athleten jedoch nur, wenn man die individuelle Veränderung der Daten betrachtet. Bei den männlichen Athleten war der Einfluss des Marathons so stark, dass auch Unterschiede bei der Betrachtung der Daten als unabhängige Gruppen festgestellt werden konnten. Die Belastung durch das Radrennen war anscheinend geringer, da sich beide Parameter dadurch nicht signifikant veränderten.

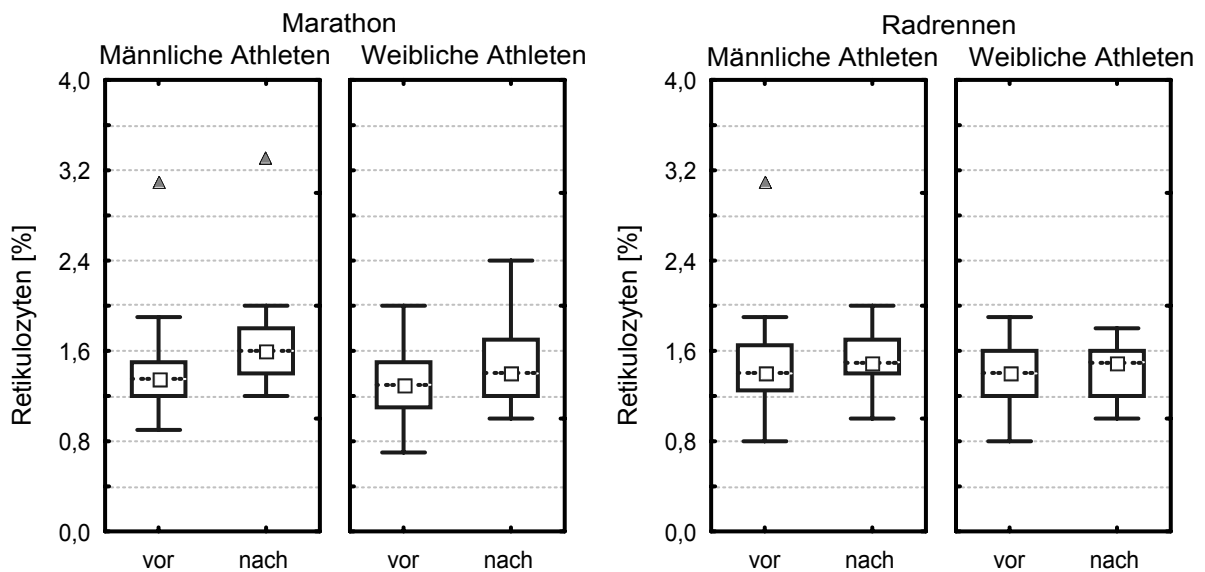


Abb. 40: Veränderung des prozentualen Anteils der Retikulozyten an der Gesamtzellenzahl durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

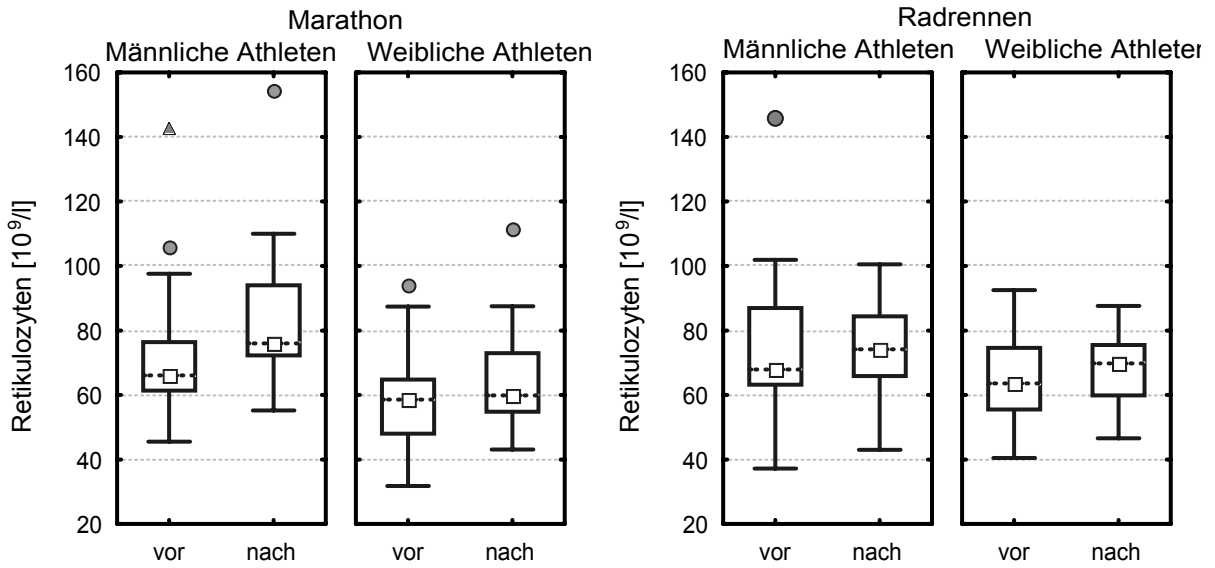


Abb. 41: Veränderung der Retikulozytenkonzentration durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

Auch bei weiteren Parametern der Retikulozyten verursachte Belastung eine Veränderung. Der Anteil an jungen, hochfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 42**) änderte sich bei den Sportlern durch die Belastung so signifikant, dass sowohl individuelle Unterschiede als auch Veränderungen bei der Auswertung als unabhängige Gruppen gefunden wurden. Lediglich bei den weiblichen Athleten führte der Marathon nur zu einer individuellen Veränderung. Da die jungen Retikulozyten das größte Volumen aller roten Blutzellen aufweisen, könnte dies mit hoher Wahrscheinlichkeit die Hauptursache für die Erhöhung des Makrozytenwertes sein.

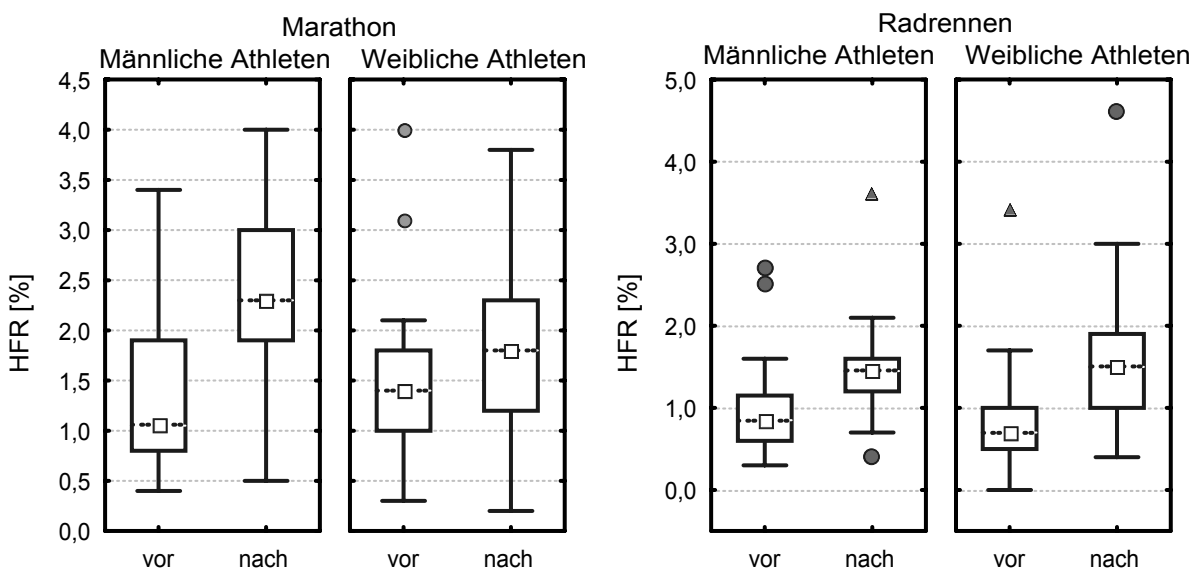


Abb. 42: Veränderung des Parameters HFR durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

Der Einfluss einer Belastung wirkte sich unterschiedlich stark auf die Retikulozytenparameter aus. So war der Retikulozythämatokrit (**Abb. 43**) nur bei den männlichen Sportlern signifikant erhöht. Dabei zeigten die Werte der männlichen Radfahrer nur individuelle Unterschiede, während die der männlichen Marathonläufer auch bei der Auswertung als unabhängige Gruppen signifikant verändert waren.

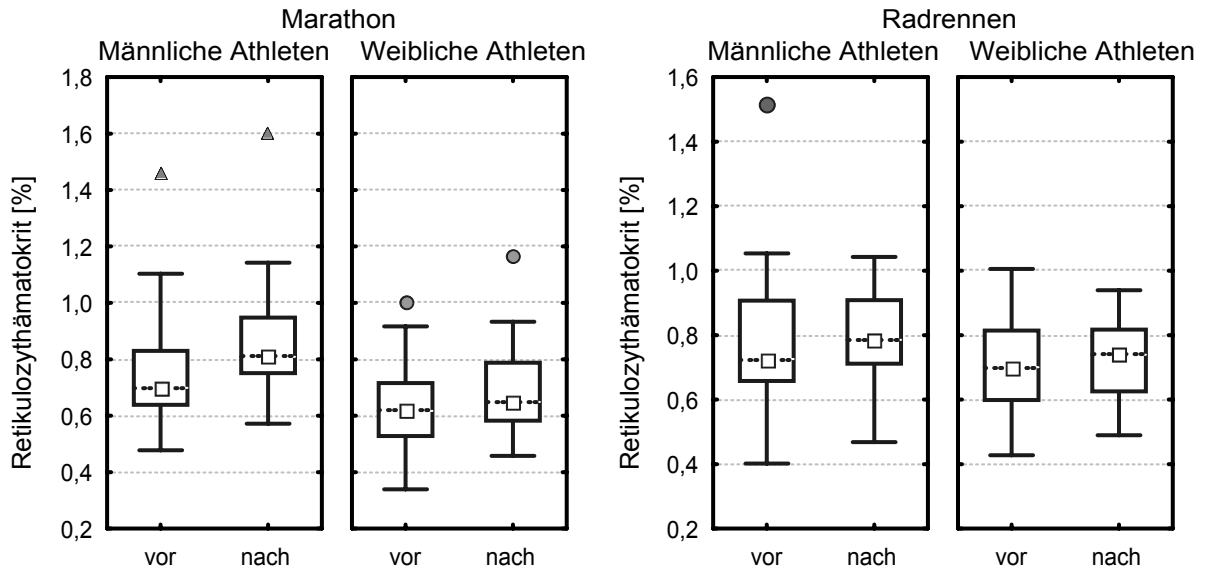


Abb. 43: Veränderung des Retikulozythämatokrits durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

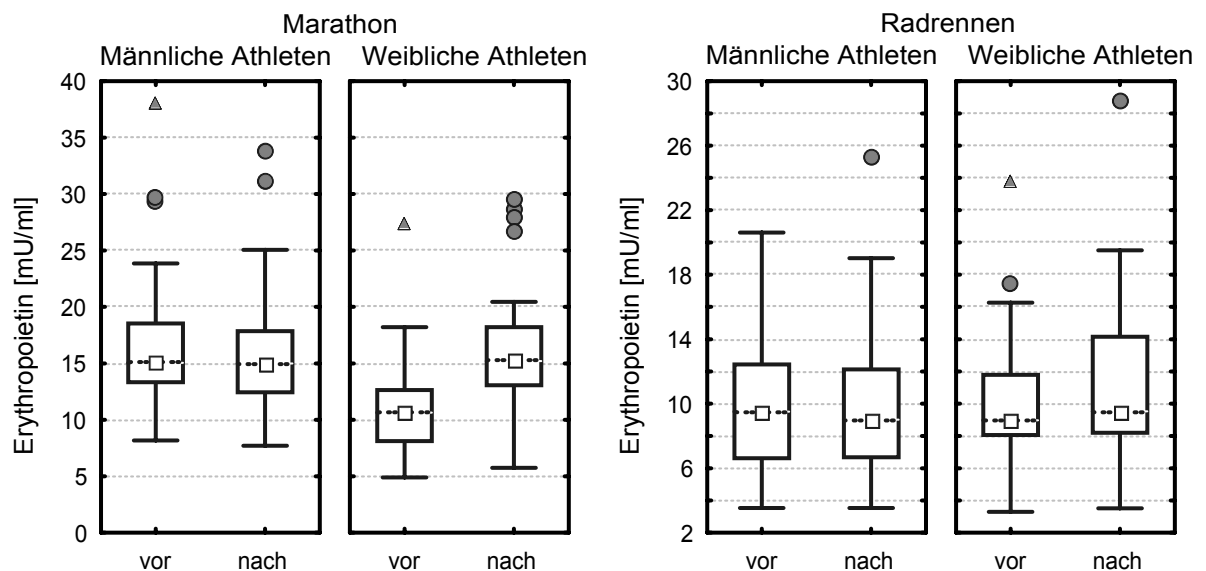


Abb. 44: Veränderung der Erythropoietinkonzentration durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

Während die hämatologischen Parameter bei den männlichen Athleten die größten Veränderungen zeigten, waren bei den weiblichen Athleten durch die Belastung eher die Parameter Erythropoietin (**Abb. 44**), sTfR (**Abb. 45**) und Ferritin (**Abb. 46**) verändert. Die Erythropoietinwerte der männlichen Athleten zeigten lediglich individuelle Veränderungen (siehe **Tab. 9**), die der Marathonläuferinnen dagegen waren so stark erhöht, dass signifikante Unterschiede bei der Auswertung als unabhängige Gruppen gefunden werden konnten.

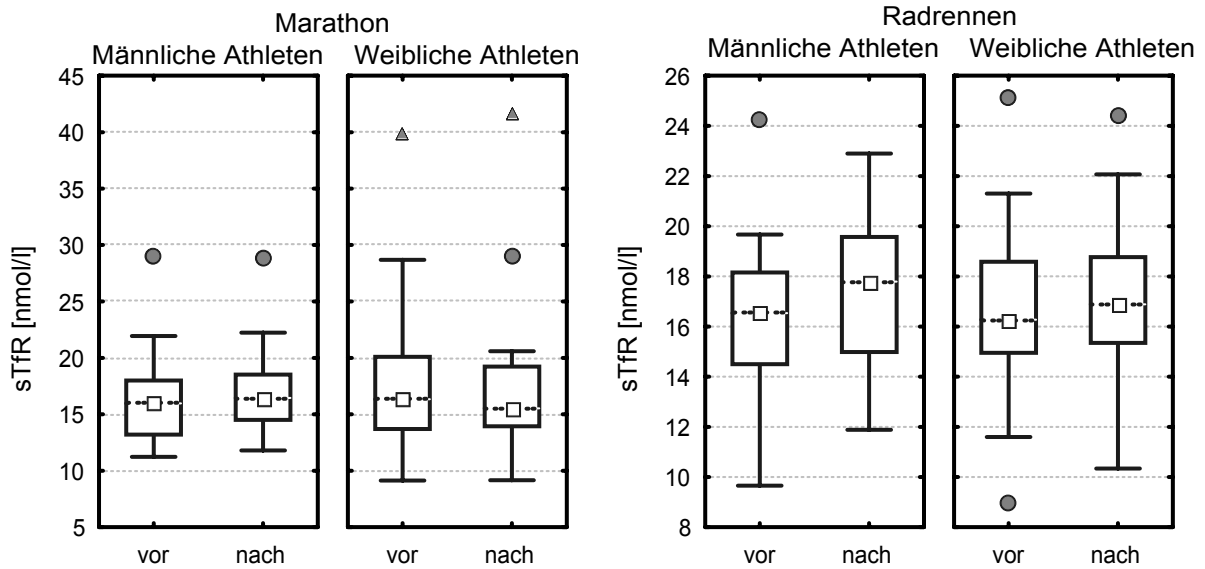


Abb. 45: Veränderung der Konzentration des sTfR durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

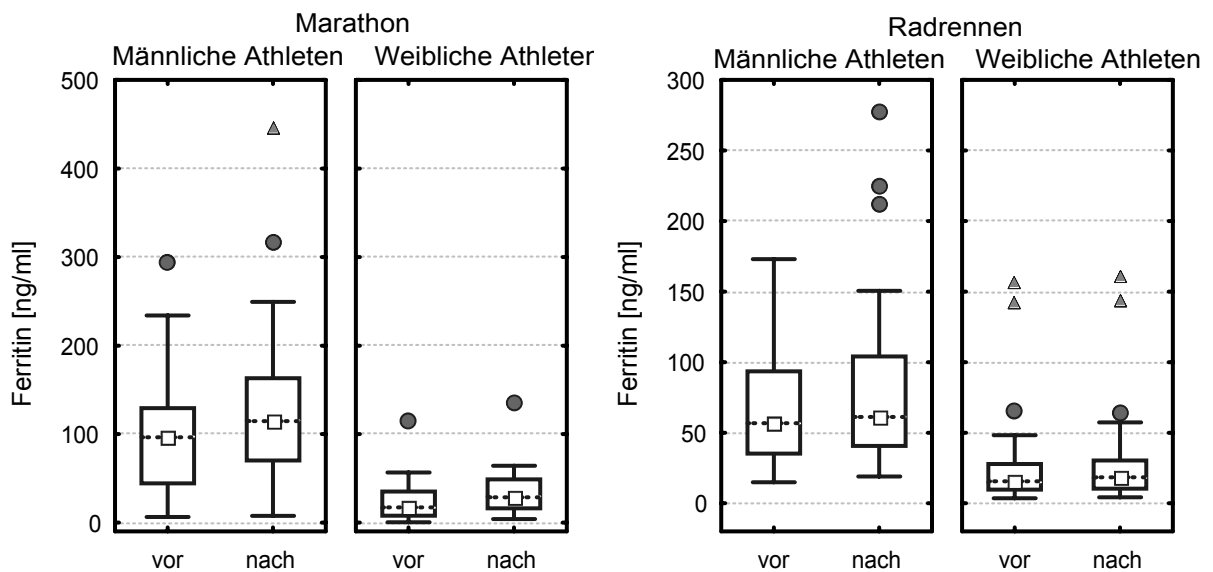


Abb. 46: Veränderung der Ferritinkonzentration durch Belastung bei männlichen und weiblichen Athleten (links Marathon, rechts Radrennen).

4.3 Verlaufsuntersuchung Zehnkampfteam

Als direkte Fortsetzung der Verlaufsuntersuchung von DLV-Athleten (Abschnitt 4.1.2) nahmen Athleten des deutschen Zehnkampfteams auf freiwilliger Basis an Blutuntersuchungen teil. Dabei wurden von jedem Athleten innerhalb des Zeitraums vom 03.04.2001 bis 24.07.2001 je drei Blutproben abgenommen. Da es trotz der geringen Probandenzahl nicht möglich war, die entsprechende Probennahme von allen Athleten an einem Tag durchzuführen, wurde analog den vorherigen Studien die Nummer der Probennahme als Bezugspunkt gewählt, wobei der zeitliche Abstand der Probennahme aller Athleten nur wenige Tage betrug. Der Abstand zwischen der ersten und zweiten Abnahme betrug ca. 7 Wochen, zwischen der zweiten und dritten Abnahme ca. 4 Wochen. Die Werte dieser Probandengruppe sind in **Tab. 10** zusammengefasst.

Tab. 10: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Makrozyten sowie der Retikulozyten- und Serumparameter der Athleten des deutschen Zehnkampfteams über den gesamten Studienzeitraum. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt. Bei mit **×** markierten Werten (unabhängige Gruppen) und mit **‡** markierten Werten (abhängige Gruppen) existieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Verlauf der Studie.

Parameter	Zehnkampfteam	
	Median (25-75 %)	Min-Max
Hämatokrit [%]	48,6 (49,8-50,9) [‡]	42,1-56,2
Hämoglobin [g/dl]	15,3 (14,7-16,0) [‡]	13,0-16,9
Makrozyten [%]	1,6 (0,9-4,1) ^{×‡}	0,4-6,7
Retikulozyten [%]	1,1 (1,0-1,2)	0,5-1,8
Retikulozyten [$10^9/l$]	55,1 (49,8-50,9)	26,9-86,5
HFR [%]	2,2 (1,4-3,9) ^{×‡}	0,0-5,6
Retikulozythämatokrit [%]	0,57 (0,51-0,69)	0,29-0,88
Erythropoietin [mU/ml]	13,6 (11,9-15,7)	7,7-30,7
sTfR [nmol/l]	15,1 (13,6-17,2)	12,2-20,2
Ferritin [ng/ml]	59,6 (41,7-91,2) ^{×‡}	26,7-157,7

Die Parameter Hämatokrit und Hämoglobin (**Abb. 47**) zeigten nur individuelle Veränderungen der Athleten über den Studienverlauf, die Werte der Makrozyten veränderten sich dagegen wesentlich stärker. Auffallend ist vor allem, dass ein Teil der Athleten Hämatokritwerte, die deutlich über dem Wert von 50 % lagen, aufwies und auch die Hämoglobinkonzentration überdurchschnittlich hoch waren. Während sich der Hämatokritwert nach der ersten Abnahme insgesamt deutlich verringerte, blieb die Hämoglobinkonzentration über den gesamten Zeitraum der Studie sehr hoch. Auch der prozentuale Anteil der Makrozyten war bei der ersten Abnahme bei einigen Athleten sehr stark erhöht und verringerte sich im Studienverlauf drastisch.

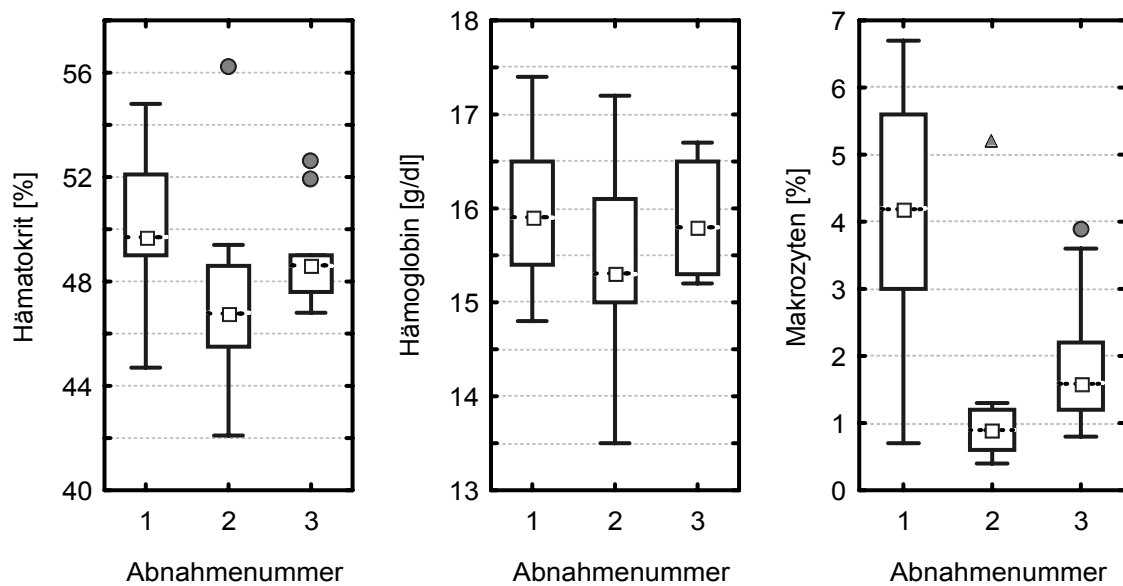


Abb. 47: Variation der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin und Makrozyten innerhalb des Studienzeitraums bei den Athleten des deutschen Zehnkampfteams, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

Die Retikulozytenparameter, d. h. der prozentuale Anteil der Retikulozyten, die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 48**) und der Retikulozythämatokrit (**Abb. 49**, rechts), zeigten im Zeitraum der Untersuchung keine signifikante Veränderung. Der einzige Parameter der Retikulozyten, der sich sowohl individuell als auch bei der Auswertung als unabhängige Gruppe signifikant veränderte, war der Anteil an HFR (**Abb. 49**, links). Zudem wurden bei den Zehnkämpfern sehr hohe Werte dieses Parameters gefunden, nur bei der zweiten Abnahme waren diese niedriger.

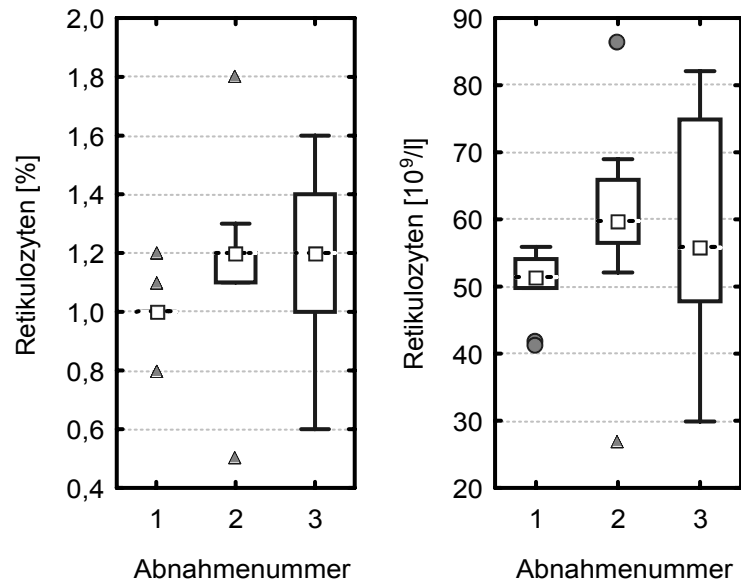


Abb. 48: Variation des prozentualen Anteils der Retikulozyten an der Gesamtzellenzahl und der Retikulozytenkonzentration innerhalb des Studienzeitraums bei den Athleten des deutschen Zehnkampfteams, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

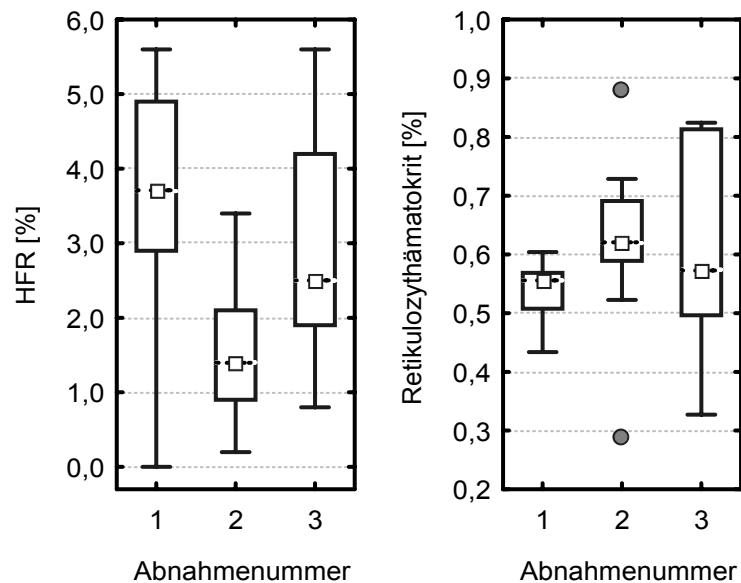


Abb. 49: Variation des Parameters HFR und des Retikulozythämatozrits innerhalb des Studienzeitraums bei den Athleten des deutschen Zehnkampfteams, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

Die Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin (**Abb. 50**) waren im Zeitraum der Studie bei der Auswertung als unabhängige Gruppen stabil, lediglich beim Ferritin traten individuelle Schwankungen auf.

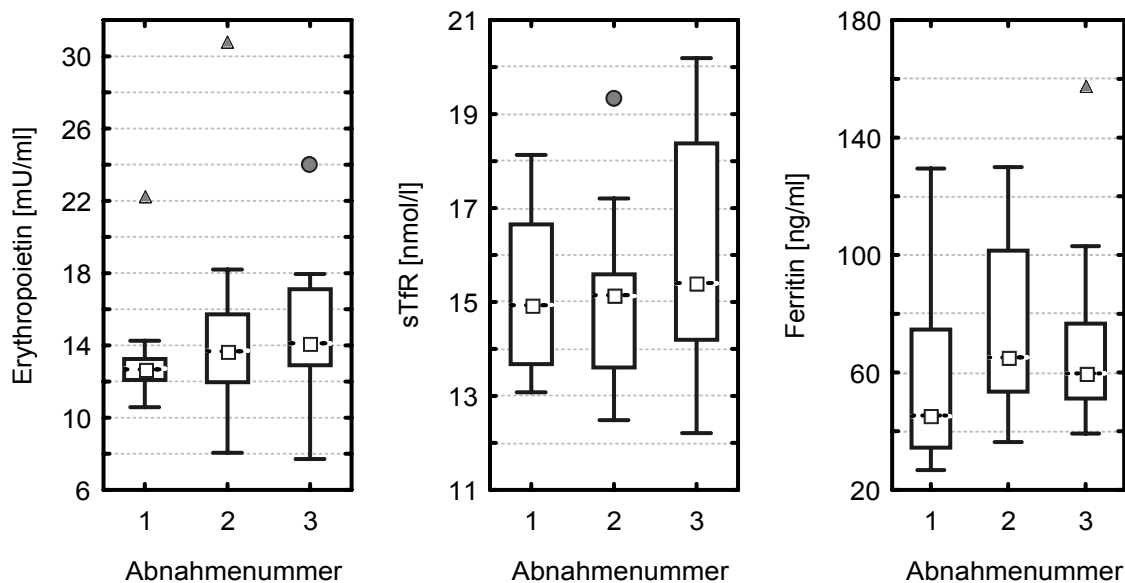


Abb. 50: Variation der Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin innerhalb des Studienzeitraums bei den Athleten des deutschen Zehnkampfteams, unterteilt nach durchgeführter Probennahme.

4.4 Anwendung in der Routine

Erstmal zu den Olympischen Spielen 2000 in Sydney wurde Blutparameter angewandt, um Proben von Hochleistungssportlern hinsichtlich eines Missbrauchs von rhEPO zu untersuchen. Trotz der Verfügbarkeit aller instrumentellen Voraussetzungen (Geräte) im IDAS Kreischau wurden die ersten Blutproben als „reale“ Dopingkontrollen jedoch erst ab April 2001 untersucht. Dabei erfolgte die Probennahme hauptsächlich bei kommerziellen Veranstaltungen, wie dem Hamburg Marathon, dem Berlin Marathon und der ISTAF in Berlin. Aber erst Ende 2002 wurden im Auftrag der WADA und verschiedener Verbände Blutproben und/oder Urinproben als Trainings- oder Wettkampfkontrollen auf Erythropoietin analysiert. Die Werte der untersuchten Proben sind in **Tab. 11** zusammengestellt. Da die Anzahl der Proben gering war, wurden alle Daten im Zeitraum April 2001 bis April 2003 zusammengefasst. Zudem sind nur die Proben aufgeführt, die sich eindeutig männlichen oder weiblichen Athleten zuordnen ließen, da in diesem Zeitraum auch Blutproben gemessen wurden, für die keine weiteren Informationen vorlagen, so dass sie nicht in die Statistik einfließen konnten.

Wichtig war zum einen die Anwendung der statistischen Modelle ^[1] zum primären Screening, um im Falle eines auffälligen Befundes die korrespondierende Urinprobe zu untersuchen, aber vor allem die Einbeziehung der untersuchten Blutproben für die Festlegung der laboreigenen Grenzwerte (siehe Abschnitt 5.4). Besondere Bedeutung besaß dabei die untersuchte Athletenpopulation, da diese Athleten zu den weltbesten Ausdauersportlern gehörten und demzufolge die ermittelten Blutparameter eine größere Relevanz besaßen als die Werte von gut trainierten Sportstudenten (IOC-Projekte).

Tab. 11: Zusammenfassung der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, Makrozyten sowie der Retikulozyten- und Serumparameter von Routinekontrollen im Zeitraum April 2001 bis April 2003. Kursiv dargestellte Werte sind nicht normalverteilt.

Parameter	Männer		Frauen	
	Median (25-75 %)	Min-Max	Median (25-75 %)	Min-Max
Hämatokrit [%]	43,7 (41,3-46,5)	37,9-55,2	39,2 (37,4-40,6)	32,6-49,6
Hämoglobin [g/dl]	15,2 (14,8-16,0)	13,5-17,6	13,5 (12,9-14,1)	11,1-16,6
Makrozyten [%]	0,1 (0,1-0,3)	0,0-1,3	0,2 (0,1-0,8)	0,0-3,0
Retikulozyten [%]	1,4 (1,2-1,7)	0,8-2,4	1,5 (1,1-1,9)	0,5-2,8
Retikulozyten [$10^9/l$]	74,2 (61,5-90,4)	39,0-123,9	67,1 (53,3-81,2)	24,8-127,6
HFR [%]	0,9 (0,6-1,5)	0,3-4,8	1,0 (0,6-1,6)	0,0-3,4
Retikulozythämatokrit [%]	0,74 (0,62-0,91)	0,41-1,28	0,71 (0,54-0,88)	0,26-1,21
Erythropoietin [mU/ml]	10,0 (6,9-11,3)	3,5-22,4	10,9 (7,4-15,0)	2,6-27,2
sTfR [nmol/l]	19,4 (17,4-24,3)	12,5-39,6	17,9 (15,2-21,6)	5,4-43,8
Ferritin [ng/ml]	128,4 (89,5-260,1)	17,8-1352,5	75,9 (33,7-154,2)	9,2-2816,8

Im Gegensatz zu den bereits durchgeführten Studien, in denen eine streng begrenzte Population Elitesportler (Abschnitte 4.1.2 und 4.3) oder „nur“ gut trainierte Athleten (Abschnitte 4.2.1, 4.2.2 und 4.2.3) untersucht wurden, stellen die gemessenen Blutwerte somit einen repräsentativen Querschnitt der weltbesten Eliteausdauerathleten dar. Auf der anderen Seite war weder etwas über die Belastung der Athleten bekannt, obwohl bei Wettkampfproben davon ausgegangen werden kann, dass diese nach einer Belastung genommen wurden, noch gab es je Sportler mehrere Proben mit zeitlichem Abstand.

Die Werte für Hämatokrit und Hämoglobin (**Abb. 51**) waren, wie erwartet, bei männlichen Athleten höher als bei weiblichen. Während der von vielen Sportverbänden verwendete Grenzwert von 50 % Hämatokrit bei Männern von mehreren Athleten überschritten wurde, lag lediglich eine Athletin über dem bei Frauen verwendeten Wert von 47 % Hämatokrit.

Die Makrozytenwerte waren wiederum bei den weiblichen Sportlern höher, ohne dass es eine erkennbare Ursache dafür gab. Eine Eisenmangelerkrankung, die in anderen Studien plausibel erschien (Abschnitt 4.2.1), kann nicht die alleinige Ursache sein, da sich nur bei einer geringen Zahl der Sportlerinnen niedrige Ferritinwerte finden ließen .

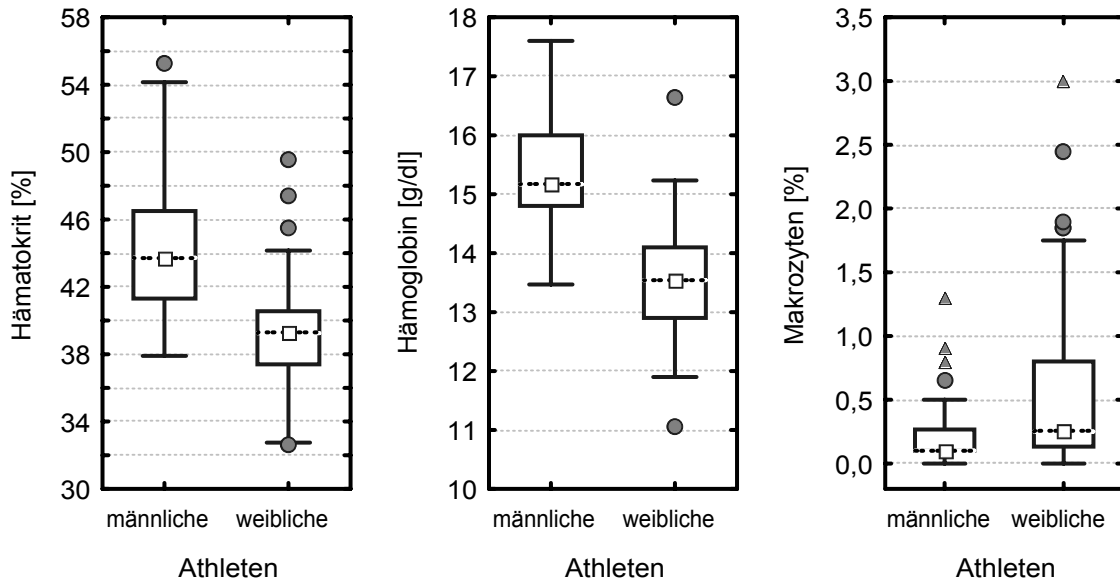


Abb. 51: Variation der Parameter Hämatokrit, Hämoglobin und Makrozyten von den Routinekontrollen des Zeitraums April 2001 bis April 2003, unterteilt nach Geschlecht.

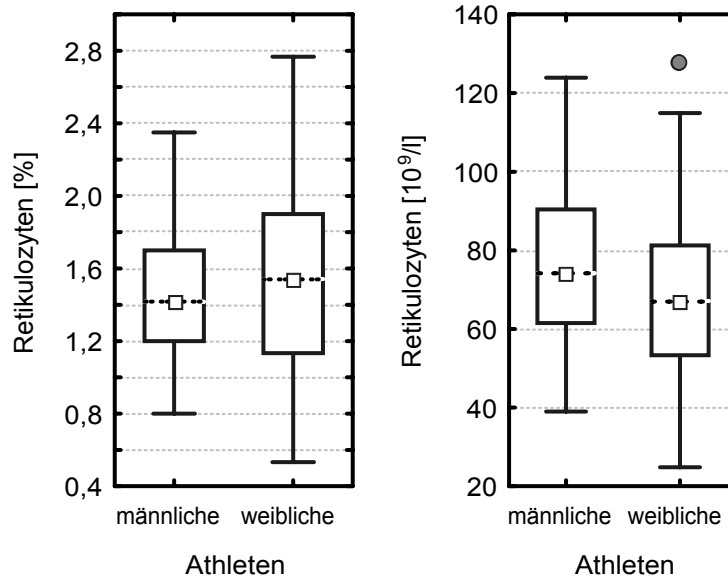


Abb. 52: Variation des prozentualen Anteils der Retikulozyten an der Gesamtzellenzahl und der Retikulozytenkonzentration von den Routinekontrollen des Zeitraums April 2001 bis April 2003, unterteilt nach Geschlecht

Die Retikulozytenparameter prozentualer Anteil an Retikulozyten, Retikulozytenkonzentration (**Abb. 52**), HFR und Retikulozythämatokrit (**Abb. 53**) zeigten keine Auffälligkeiten, wie z. B. die hohen HFR-Werte bei den Zehnkampfathleten (**Abb. 49**). Allerdings wurde der von der WADA verwendete Grenzwert von 2 % Retikulozyten von einigen männlichen und weiblichen Athleten überschritten.

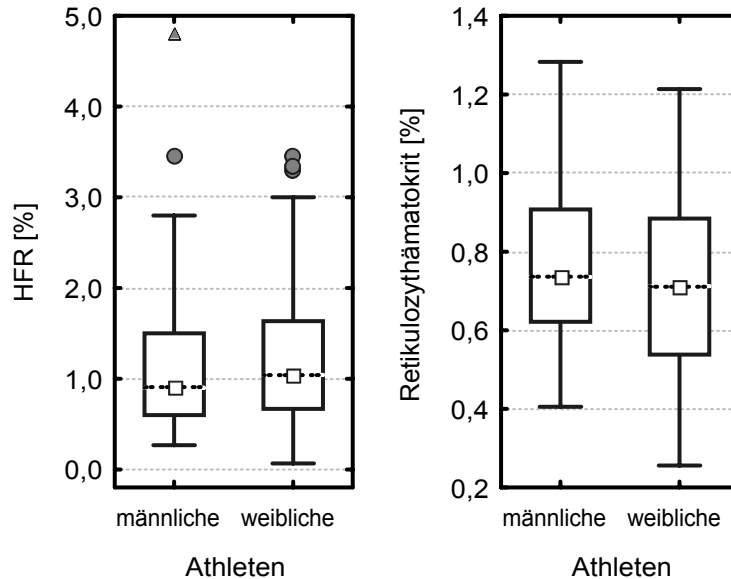


Abb. 53: Variation des Parameters HFR und des Retikulozythämatokrits von den Routinekontrollen des Zeitraums April 2001 bis April 2003, unterteilt nach Geschlecht.

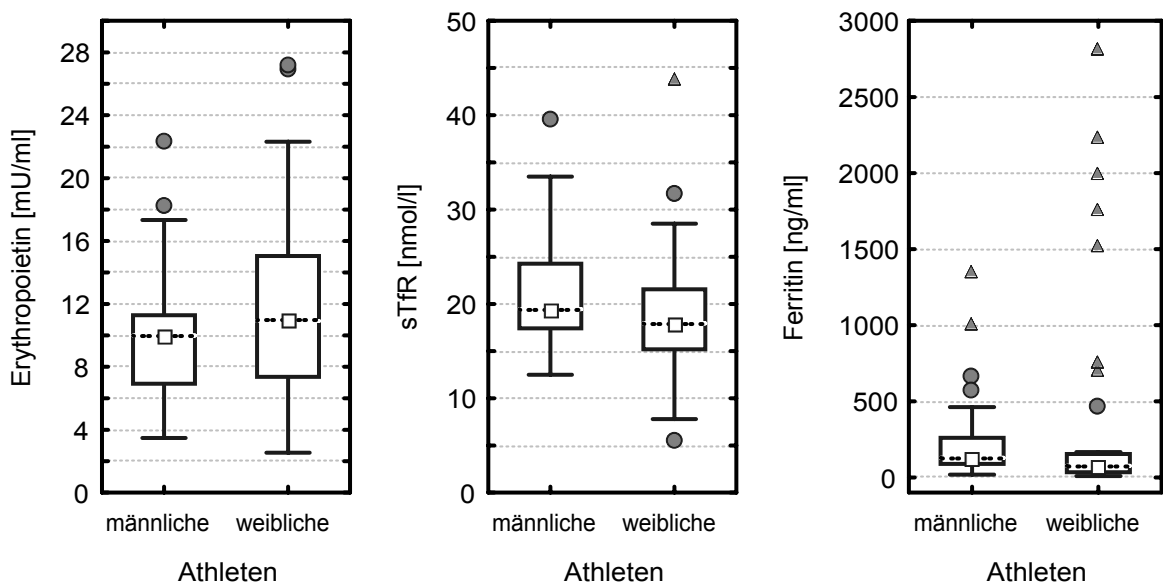


Abb. 54: Variation der Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin von den Routinekontrollen des Zeitraums April 2001 bis April 2003, unterteilt nach Geschlecht.

Während die Parameter Erythropoietin und sTfR (**Abb. 54**) keine Auffälligkeiten zeigten, waren die Ferritinwerte beim Großteil der männlichen Athleten sehr hoch, verglichen mit den Werten anderer männlicher Hochleistungssportler (**Abb. 16** und **Abb. 50**). Der Großteil der weiblichen Athleten wies wesentlich niedrigere Werte auf, allerdings gab es eine Anzahl von Sportlerinnen, deren Ferritinwerte extrem überhöht waren. Diese hohen Werte lassen sich nur durch eine zusätzliche Eisensubstitution erklären, wobei selbst eine alleinige orale Aufnahme von Eisenpräparaten nicht ausreichen würde, um Ferritinwerte über 1000 ng/ml zu erreichen.

4.5 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Welche Parameter und Grenzwerte auch verwendet werden, um Doping mit Erythropoietin zu erfassen, wichtig ist der Aspekt der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors. Für die Anwendung in der Dopinganalytik ist es absolut notwendig, dass die Kontrolle einer Probe in unterschiedlichen Labors zu den gleichen Ergebnissen führt.

Zusätzlich stellte sich bezüglich der Blutproben die Frage der Probenstabilität, speziell der Stabilität der Retikulozyten, da in jedem Fall ein Transport vom Ort der Probenahme zum jeweiligen Labor erfolgen muss.

4.5.1 Reproduzierbarkeit immunologischer Messungen

Für sehr viele, klinisch relevante Parameter stellen Immunoassays die einzige Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung dar. Bei diesen Messungen steht jedoch weniger die Ermittlung einer genauen Konzentration im Vordergrund, vielmehr ist der Hauptzweck die Bestätigung oder Ablehnung einer gestellten Diagnose. Die Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin werden in der klinischen Diagnostik u. a. zur Erfassung von Anämieerkrankungen, Eisenmangelerscheinungen, Störungen der Erythropoese, aber auch zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit nach Transplantationen eingesetzt. Für Messungen im Bereich der Dopinganalytik wirkt sich erschwerend aus, dass besonders bei den oben aufgeführten Erkrankungen die Werte für Erythropoietin und Ferritin sehr groß sein können und der Immunoassay daher möglichst den gesamten Bereich, angefangen bei den niedrigen Werten von gesunden Patienten bis zu den hohen Werten, die bei erkrankten Patienten gefunden werden können, erfassen soll. Die Werte der Hochleistungssportler lagen aber fast ausschließlich im niedrigen Normalbereich. Ein weiterer Faktor, der oft nicht beachtet wird, sind Matrixeffekte. Man kann davon ausgehen, dass sich die Matrix der zu untersuchenden Patienten, für die der Immunoassay entwickelt wurde, von der gesunder Hochleistungssportler unterscheidet.

Wie gravierend die Differenzen zwischen in verschiedenen Labors ermittelten Ergebnissen sein können, zeigt **Abb. 55**, in der alle Erythropoietinbestimmungen der ersten durchgeführten Populationsstudie (siehe Abschnitt 4.1.1), jeweils im Kölner und Kreischaer Labor gemessen, aufgeführt sind. Trotz der Standardisierung des Assays auf den World Health Organization Recombinant DNS-derived Human Erythropoietin 1st International Standard (WHO 87/684) und der Verwendung von Kontrollen unterschieden sich die Ergebnisse signifikant.

Anhand des Bland-Altman-Plots (**Abb. 55**) zeigt sich deutlich der Trend, dass für alle Messungen im niedrigen Konzentrationsbereich (bis ca. 20 mU/ml) im Kölner Labor höhere Werte gefunden wurden als in Kreischa, während die Messwerte für höhere Konzentrationen in Köln niedriger ausfielen. Eine nachträgliche Vergleichsmessung von identischen Proben mit Immunoassays aus dem gleichen Produktionsbatch zeigte identische Ergebnisse in Köln und Kreischa (Daten nicht aufgeführt).

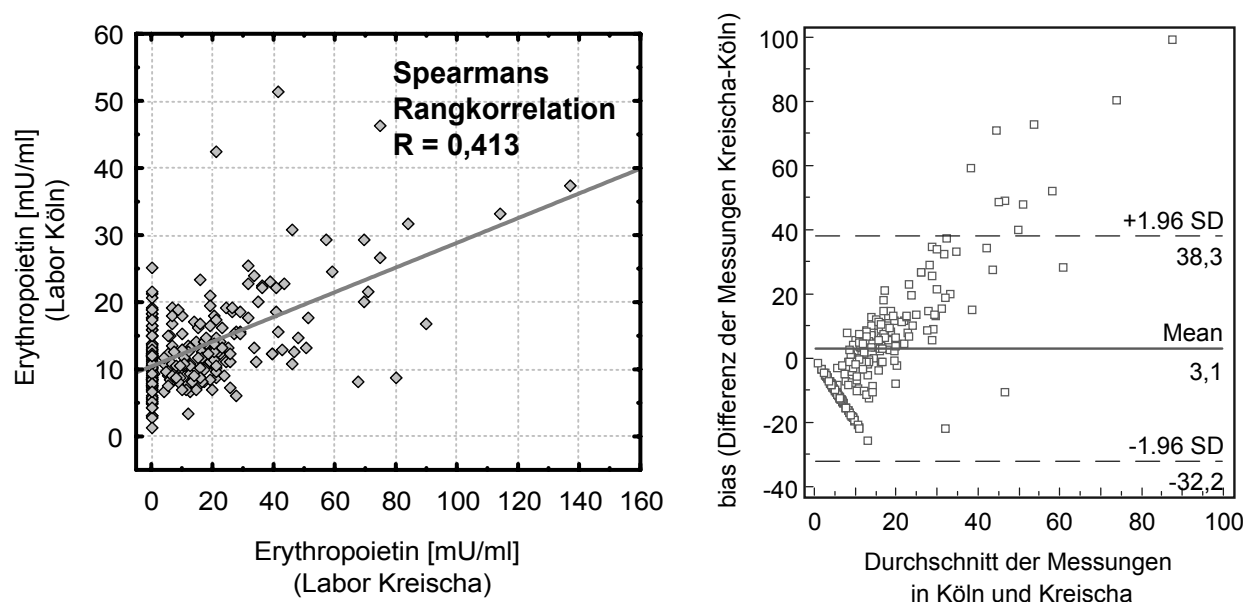


Abb. 55: **Linke Grafik:** Scatterplot der Erythropoietinbestimmungen aller Proben der Populationsuntersuchung (4.1.1), gemessen in Kreischa und verglichen mit den Ergebnissen aus Köln (Wilcoxon-Test $p = 0,524$). Die Bestimmung erfolgte mit dem manuellen Assay von Nichols Institute Diagnostics, Bad Nauheim.

Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Erythropoietinbestimmungen in Kreischa und Köln.

Diese Unterschiede in den Messungen veranlassten, dass eigene Kontrollproben (Poolproben) hergestellt wurden, indem Serumproben gesammelt wurden. Darauf wird noch einmal ausführlich, auch in Hinsicht auf die Problematik der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Serumparameter, in Abschnitt 4.5.5 eingegangen.

Um die durch manuelle Bearbeitung entstehenden Fehler zu minimieren, wurde für die Bestimmung der Proben der Verlaufsuntersuchung für Erythropoietin und Ferritin ein vollautomatisches Chemilumineszenzsystem, das Advantage (Nichols Institute Diagnostics,

Bad Nauheim), verwendet. Der Vergleich der Messdaten (**Abb. 56**) zeigt, dass eine sehr gute Korrelation zwischen den Ergebnissen für Erythropoietin, die in Köln und Kreischa bestimmt wurden, besteht.

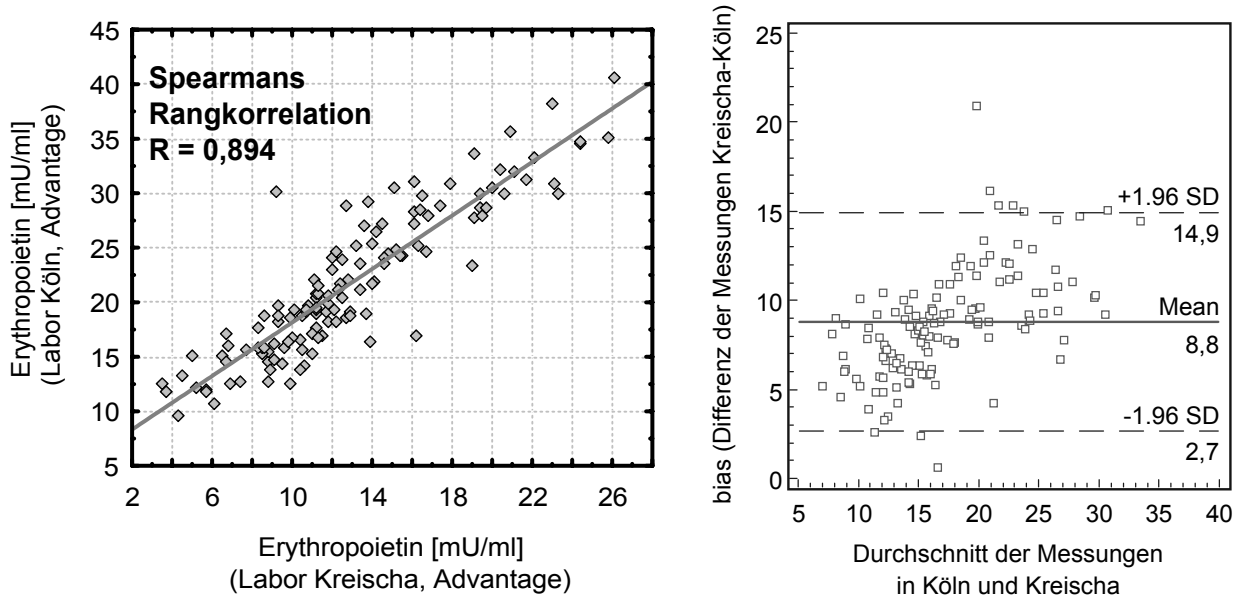


Abb. 56: **Linke Grafik:** Scatterplot der Erythropoietinbestimmung aller Proben der Verlaufsuntersuchung (4.1.2), gemessen in Kreischa und verglichen mit den Ergebnissen aus Köln (Wilcoxon-Test $p < 0,001$). Die Bestimmung erfolgte mit dem Chemilumineszenz-vollautomat Advantage von Nichols Institute Diagnostics, Bad Nauheim.
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Erythropoietinbestimmungen in Kreischa und Köln.

Dass trotz der signifikanten Übereinstimmung der Messdaten ein Unterschied besteht, lässt sich anhand des Bland-Altman-Plots (**Abb. 56**, rechts) erkennen. Die im Kölner Labor ermittelten Messwerte waren generell höher. Dabei ist erkennbar, dass je höher die Erythropoietinkonzentration der Probe war, desto größer war auch die Differenz der Messwerte zwischen beiden Labors. Die Ursache für die Unterschiede lag in den verwendeten Immunoassays. So erfolgte die Bestimmung im Kölner Labor zu einem späteren Zeitpunkt, ab dem der bis dahin im Assay verwendete polyklonale primäre Antikörper durch einen monoklonalen ersetzt wurde. Obwohl sich laut Angaben des Herstellers der Wechsel des Antikörpers nicht auf die Resultate auswirken sollte, traten im niedrigen Konzentrationsbereich die gemessenen Unterschiede auf.

Zusätzlich zu der Messung mit dem Advantage konnte der Parameter Erythropoietin für die Proben der Verlaufsuntersuchung im Kölner Labor mit einem weiteren Vollautomaten (DPC Biermann, Bad Nauheim) bestimmt werden. Vergleicht man die damit ermittelten Werte mit denen, die mit dem Advantage System bestimmt wurden (**Abb. 57**), so kann nur eine sehr geringe Korrelation der Daten festgestellt werden.

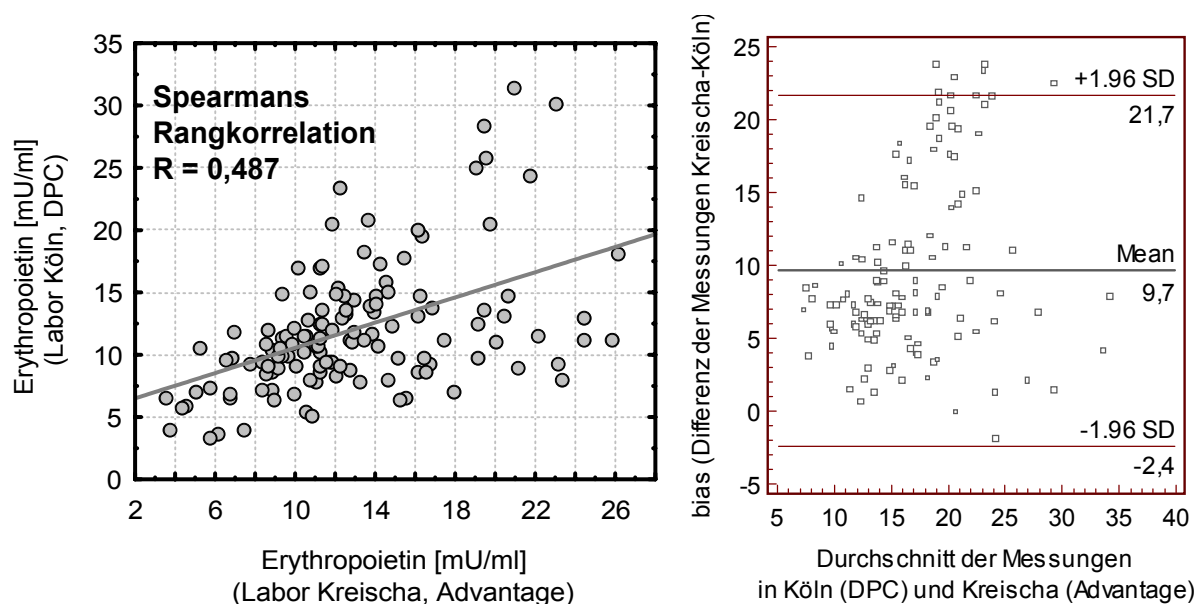


Abb. 57: Linke Grafik: Scatterplot der Erythropoietinbestimmung aller Proben der Verlaufsuntersuchung (4.1.2), gemessen in Kreischa (Vollautomat Advantage) und verglichen mit den Ergebnissen aus Köln (Vollautomat DPC) (Wilcoxon-Test $p = 0,227$).

Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Erythropoietinbestimmungen in Kreischa und Köln.

Für den Parameter sTfR stand der Testassay von Nichols Institute Diagnostics erst am Ende der Verlaufsstudie zur Verfügung, so dass damit nur ein Teil der Proben gemessen werden konnte, die Bestimmung dieses Parameters erfolgte für die Populations- und die Verlaufsstudie mit dem manuellen Quantikine-Assay. Obwohl hier ein manueller Assay zum Einsatz kam, zeigt der Vergleich der Werte (**Abb. 58**) eine gute Korrelation zwischen den Messungen in Köln und Kreischa, vergleichbar mit der vollautomatischen Erythropoietinbestimmung mittels des Advantage Systems. Allerdings bestätigt der Bland-Altman-Plot (**Abb. 58**, rechts) auch hier, dass die im Kölner Labor ermittelten Ergebnisse, systematisch höher waren als die in Kreischa gemessenen.

Mit der Freigabe des Immunoassays zur quantitativen Bestimmung des löslichen Transferrinrezeptors für das Chemilumineszenzsystem Advantage wurde bei einem Teil der Proben der Verlaufsuntersuchung dieser Parameter erneut bestimmt und die Werte mit denen der manuellen Bestimmung verglichen (**Abb. 59**). Im Gegensatz zu der schlechten Korrelation bei der Erythropoietinbestimmung mit zwei verschiedenen Assays (**Abb. 57**) gibt es zwischen der sTfR-Bestimmung mit dem Advantage und dem Quantikine-Assay eine gute Korrelation der Werte. Der Bland-Altman-Plot (**Abb. 59**, rechts) zeigt, dass der mittlere Unterschied zwischen den beiden Bestimmungen null ist, d. h. dass keine systematische Verzerrung zwischen den beiden Methoden existiert. Auch der Bereich von zwei Standardabweichungen über und unter der mittleren Differenz, der ein Maß für die Abweichung der beiden Bestimmungen voneinander ist ^[86], ist relativ klein. Man kann daher schlussfolgern, dass beide Assays bei der Bestimmung des Parameters löslicher Transferrinrezeptor vergleichbare Resultate liefern. Wichtig war dieser

Aspekt vor allem, da bei der Entwicklung der statistischen Modelle von Parisotto et al. [1] der Parameter sTfR einer der angewandten Parameter war und dieser mit dem Quantikine-Assay bestimmt wurde, für alle weiteren Studien und den Einsatz in der Routine (Abschnitte 4.2, 4.3 und 4.4) aber der Assay für das Chemilumineszenzsystem Advantage verwendet werden sollte.

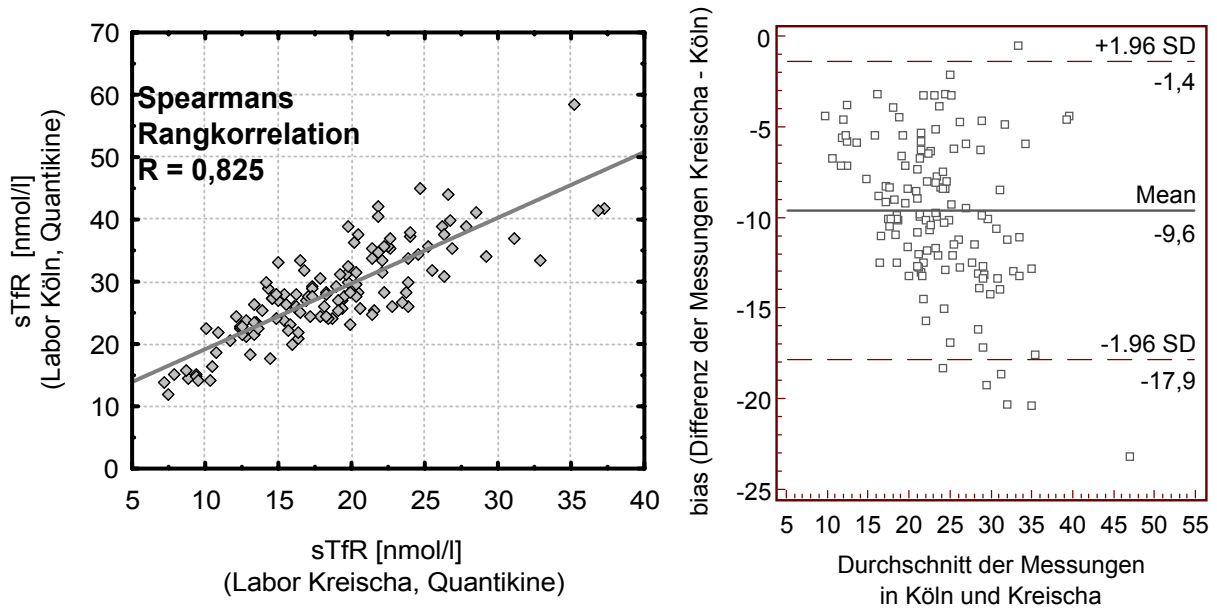


Abb. 58: **Linke Grafik:** Scatterplot der Werte des sTfR aller Proben der Verlaufsuntersuchung (4.1.2), gemessen in Kreischa und verglichen mit Ergebnissen aus Köln (Wilcoxon-Test $p < 0,001$). Die Bestimmung erfolgte mit dem manuellen Assay (Quantikine).
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der sTfR-Bestimmung in Kreischa und Köln.

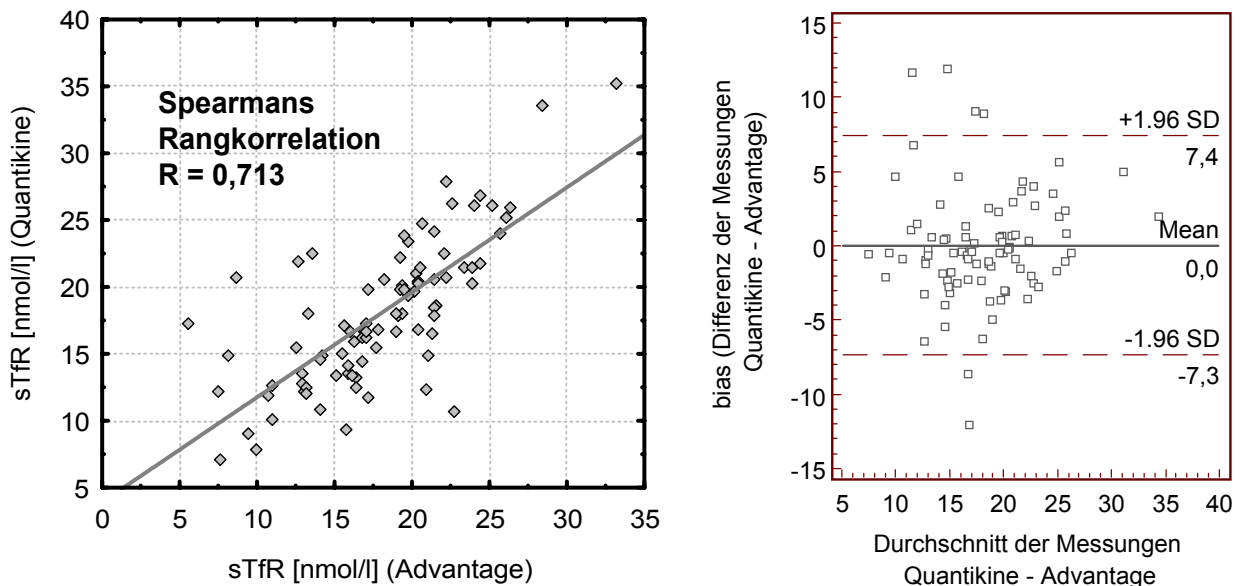


Abb. 59: **Linke Grafik:** Scatterplot der Werte des sTfR von Proben der Verlaufsuntersuchung (4.1.2), gemessen in Kreischa (Vollautomat Advantage) und verglichen mit Ergebnissen der manuellen Bestimmung in Kreischa (Quantikine), Wilcoxon-Test $p = 0,525$.
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Bestimmungen des sTfR manueller Assay - Vollautomat.

4.5.2 Vergleichbarkeit von hämatologischen Bestimmungen mit verschiedenen Hämatologiesystemen

Im Gegensatz zu einem Massenspektrometer, dessen Massenachse sich mit Hilfe von Standardsubstanzen genau kalibrieren lässt, ist eine Kalibrierung für die meisten hämatologischen Parameter wesentlich schwieriger. Besonders wenn verschiedene Hämatologiesysteme einen Parameter mittels unterschiedlicher Verfahren bestimmen (vergleiche dazu **Abb. 2** und **Abb. 3**, hinsichtlich des Funktionsprinzips für Zellparameter). Eine der wenigen Ausnahmen ist der Parameter Hämoglobin, da dessen Bestimmung bei allen Geräten identisch verläuft (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Bei fast allen Studien steht für die Analyse der Proben nur ein Hämatologiesystem zur Verfügung und auch bei den im IDAS Kreischa durchgeführten Studien standen lediglich für einen kurzen Zeitraum zwei Systeme, das ADVIA 120 und der R3000, zur Verfügung. Aufgrund des Funktionsprinzips des R3000 konnten nur einige Retikulozytenparameter, wie der prozentuale Anteil an Retikulozyten (**Abb. 60**), die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 61**) und die hochfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 62**), verglichen werden.

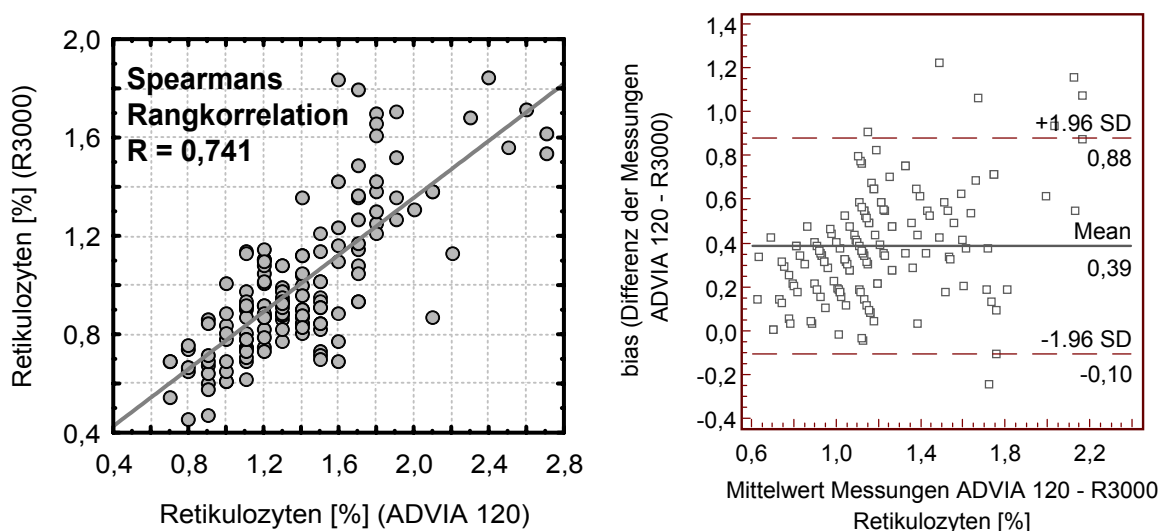


Abb. 60: **Linke Grafik:** Scatterplot der prozentualen Retikulozytenwerte von Proben der Tagesstudie (4.2.1), gemessen mit dem ADVIA 120, verglichen mit der Messung am R3000 (t-Test gepaarte Stichproben $p < 0,001$).

Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der prozentualen Retikulozytenwerte ADVIA 120 - R3000.

Die Frage nach solchen Vergleichen stellt sich insbesondere bei der Verwendung einer eingeschränkten Anzahl an Grenzwerten, wie Hämatokrit, Hämoglobin und dem prozentualen Anteil an Retikulozyten, wie sie z. B. bei den Achten Leichtathletik-Weltmeisterschaften in Edmonton (Kanada) von der Agentur "International Doping Tests & Management" (IDTM) unter Verwendung des transportablen Retikulozytenanalysators Sysmex R500 benutzt wurden

(Prof. Dr. P. Hemmersbach, Medizinische Kommission des IOC, persönliche Mitteilung). Sowohl der prozentuale Anteil an Retikulozyten (**Abb. 60**) als auch die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 61**) zeigten eine gute Korrelation zwischen den Bestimmungen mit dem ADVIA 120 und dem R3000. Bei dem Vergleich der Werte mittels Bland-Altman-Plot stellt man jedoch fest, dass bei beiden Parametern die Messung mit dem ADVIA 120 eine systematische Tendenz zu höheren Werten aufwies.

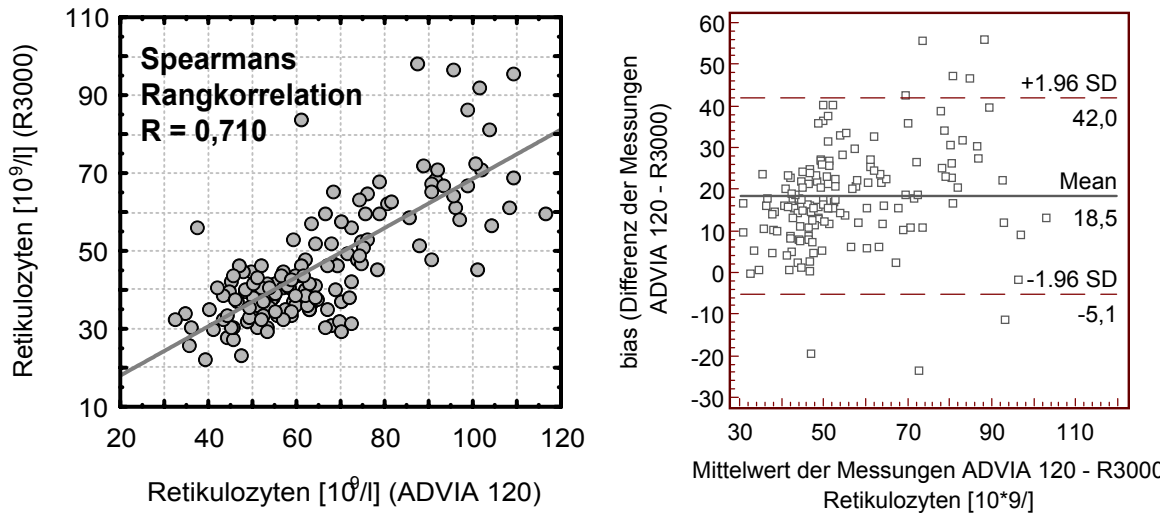


Abb. 61: Linke Grafik: Scatterplot der Retikulozytenkonzentration von Proben der Tagesstudie (4.2.1), gemessen mit dem ADVIA 120 und verglichen mit Messung am R3000 (t-Test gepaarte Stichproben $p < 0,001$).
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Retikulozytenkonzentration ADVIA 120 - R3000.

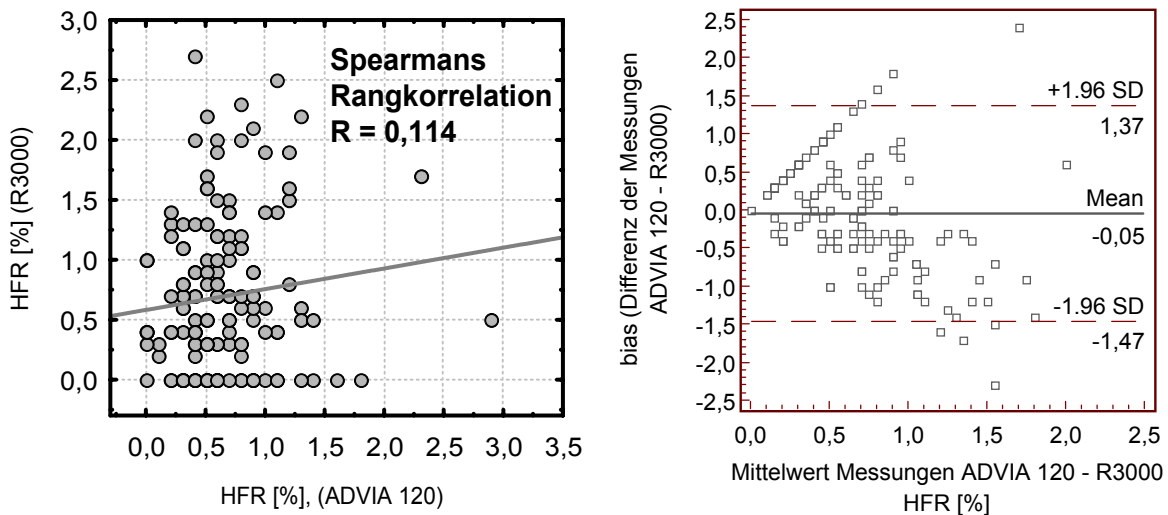


Abb. 62: Linke Grafik: Scatterplot des Parameters HFR von Proben der Tagesstudie (4.2.1), gemessen mit dem ADVIA 120 und verglichen mit der Messung am R3000 (t-Test gepaarte Stichproben $p = 0,387$).
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot des prozentualen Anteils an hochfluoreszierenden Retikulozyten ADVIA 120 - R3000.

Während bei der Bestimmung des prozentualen Anteils an Retikulozyten und der Retikulozytenkonzentration eine relativ gute Korrelation zwischen beiden Messgeräten bestand, traf dies für die hochfluoreszierenden Retikulozyten nicht zu (**Abb. 62**). Sowohl beim direkten Vergleich der Werte als auch beim Bland-Altman-Plot konnte man keinerlei Übereinstimmung dieses Parameters erkennen. Ursache ist zum einen, dass dieser Parameter in den Kontrollproben nicht mitbestimmt wurde, und zum anderen, dass die Grenzen für die ReifeEinstufung der Retikulozyten von jedem Gerätehersteller relativ willkürlich eingestellt werden.

4.5.3 Vergleichbarkeit von hämatologischen Bestimmungen mit Hämatologiesystemen des gleichen Typs

Wie der vorherige Abschnitt zeigte, ergaben sich bei der Bestimmung hämatologischer Parameter mit verschiedenen Systemen unterschiedliche Ergebnisse. Diese Differenzen traten besonders in dem für gesunde Athleten interessierenden Bereich der Parameter auf. Demzufolge stellte sich die Frage der Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Verwendung von Hämatologiesystemen des gleichen Typs, in diesem Fall dem ADVIA 120. Um das zu überprüfen, wurden die Proben der letzten Abnahme der Jahresstudie (Abschnitt 4.2.2) in Köln und Kreischa jeweils am ADVIA 120 gemessen. Für die Parameter Hämatokrit (**Abb. 63**) und Hämoglobin (**Abb. 64**) konnte eine sehr gute Korrelation der Werte gefunden werden. Der Bland-Altman-Plot beider Parameter zeigt, dass die Werte, die in Kreischa gemessen wurden, systematisch etwas erhöht sind. Bei beiden Parametern ist die Differenz jedoch wesentlich geringer als die Schwankungsbreite der Hämatologiekontrollproben.

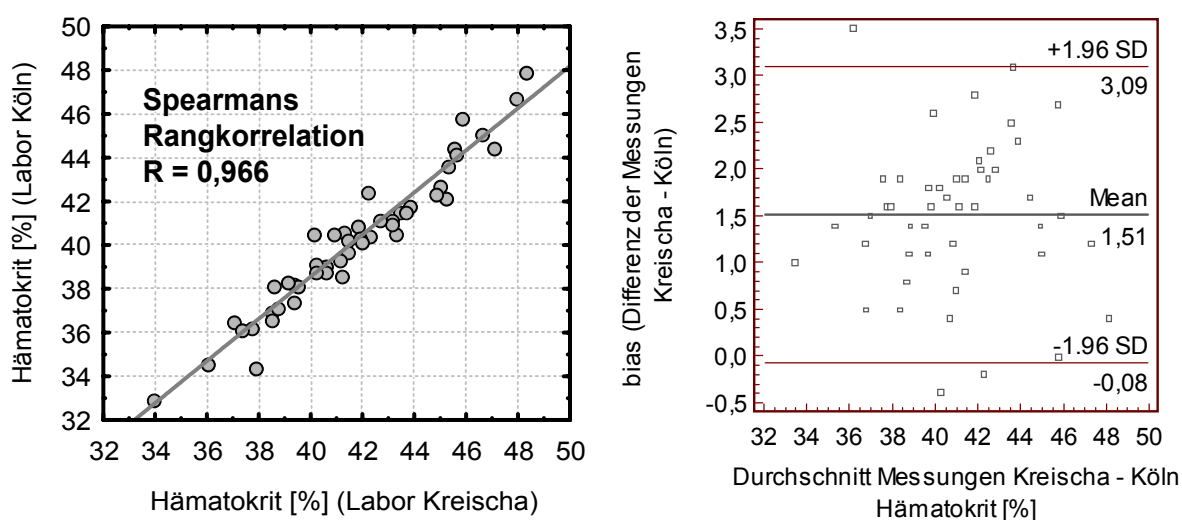


Abb. 63: Linke Grafik: Scatterplot der Hämatokritwerte der letzten Probennahme der Jahresstudie (4.2.2), gemessen in Kreischa und verglichen mit den Ergebnissen der Messung in Köln (t-Test gepaarte Stichproben $p < 0,001$).
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Hämatokritmessungen in Kreischa und Köln.

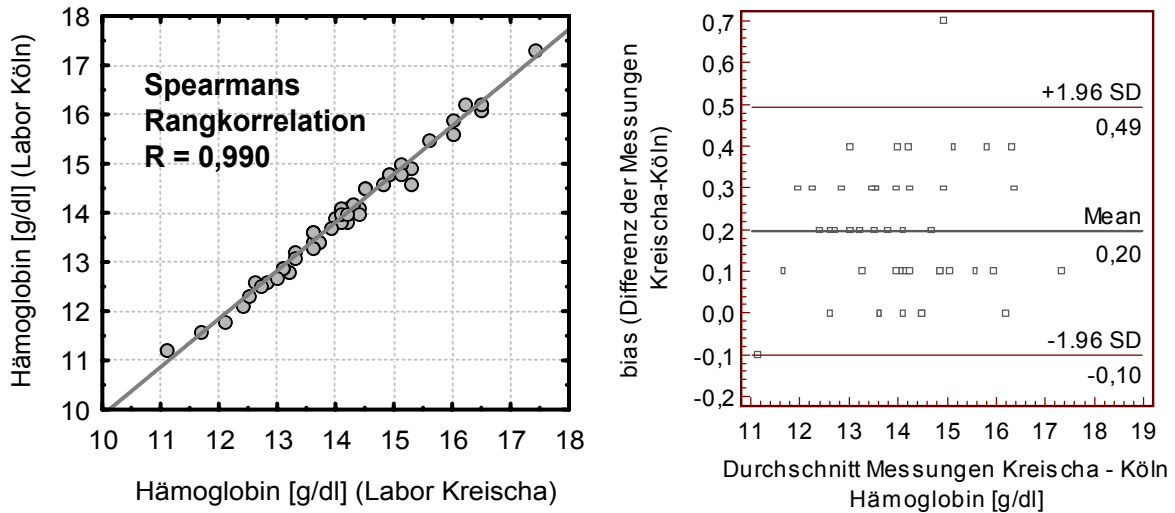


Abb. 64: **Linke Grafik:** Scatterplot der Hämoglobinwerte der letzten Probennahme der Jahresstudie (4.2.2), gemessen in Kreischa und verglichen mit den Ergebnissen der Messung in Köln (t-Test gepaarte Stichproben $p < 0,001$).
rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Hämoglobinmessungen in Kreischa und Köln.

Sowohl die Makrozytenwerte (**Abb. 65**) als auch die Retikulozytenkonzentrationen (**Abb. 66**) zeigten eine schlechtere Übereinstimmung der Werte zwischen den Messungen in Köln und Kreischa als die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte, lagen aber immer noch innerhalb des Schwankungsbereichs der Hämatologiekontrollen.

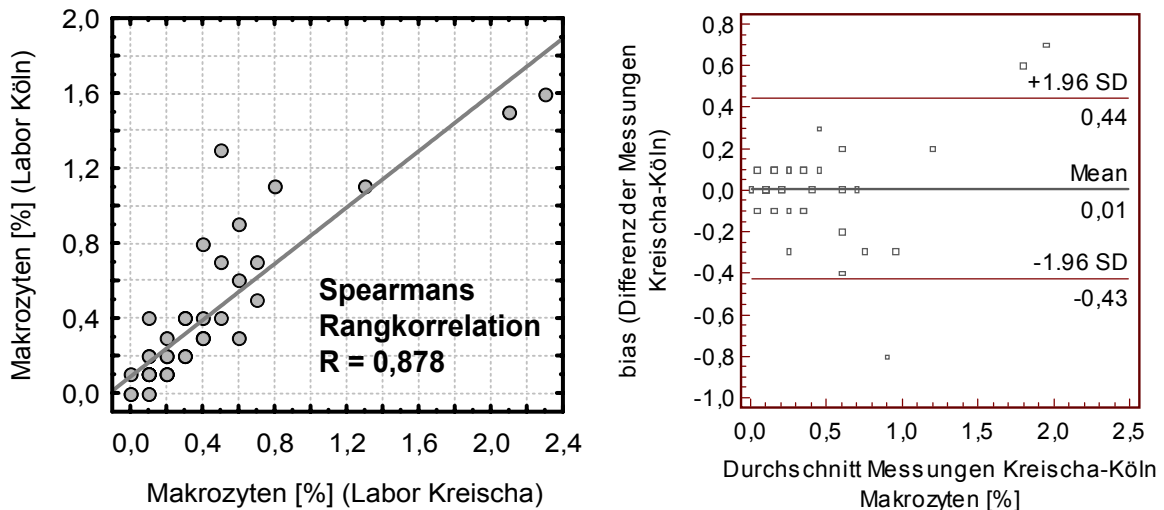


Abb. 65: **Linke Grafik:** Scatterplot der Makrozytenwerte der letzten Probennahme der Jahresstudie (4.2.2), gemessen in Kreischa und verglichen mit den Ergebnissen der Messung in Köln (Wilcoxon-Test $p = 0,638$).
Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Makrozytenmessungen in Kreischa und Köln.

Der Bland-Altman-Plot beider Parameter zeigt, dass keine systematische Verzerrung existiert. Die schlechtere Übereinstimmung lässt sich aufgrund rein statistischer Betrachtungen erklären.

Während bei der Hämatokrit- und Hämoglobinmessung einer Probe die Einzelwerte von ca. 30.000 bis 40.000 Zellen einfließen, werden als Makrozyten oder Retikulozyten lediglich 1-2 % aller roten Blutzellen während der Messung, also 300 bis 600 Zellen, erfasst. Die auftretenden systematischen Fehler haben bei diesen Parametern so einen wesentlich größeren Einfluss.

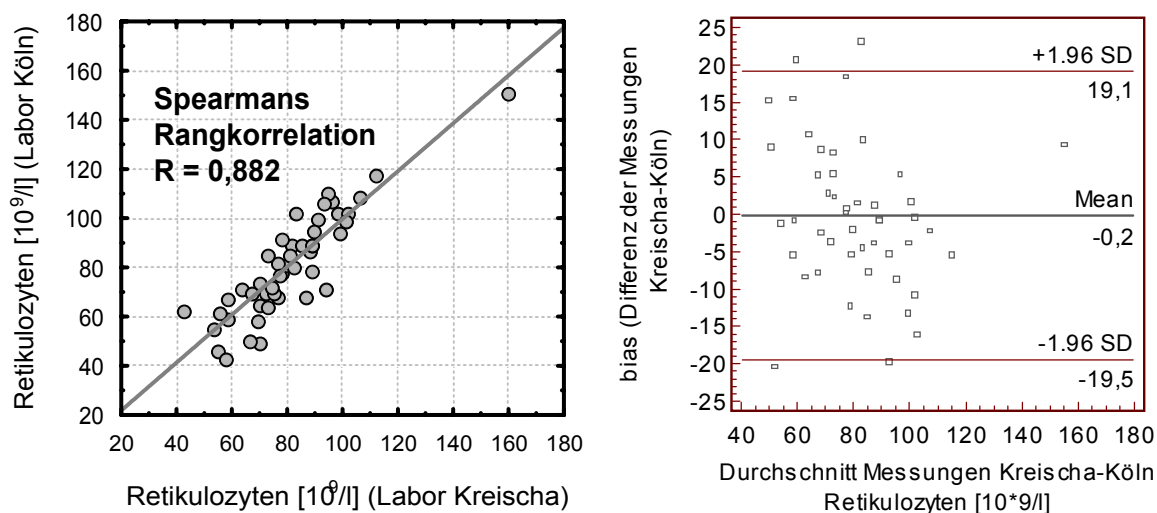


Abb. 66: Linke Grafik: Scatterplot der Retikulozytenkonzentration der letzten Probenahme der Jahresstudie (3.1.3.2), gemessen in Kreischa und verglichen mit den Ergebnissen der Messung in Köln (Wilcoxon-Test $p = 0,685$).

Rechte Grafik: Bland-Altman-Plot der Retikulozytenmessungen in Kreischa und Köln.

4.5.4 Stabilität der Vollblutparameter

Mit der Verwendung von Blutparametern zur Erfassung eines Dopings mit Erythropoietin bzw. dem Screening von Blutproben stellte sich ein ganz neues Problem dar – der Probentransport. Während dieser Aspekt für die Dopinganalyse von Urinproben kaum eine Rolle spielt und der Transport meist ungekühlt mittels Kurierdienst erfolgt, sollte der Transport und die Messung von Blutproben so schnell wie möglich und gekühlt erfolgen. Zudem besteht bei Blutproben keine Möglichkeit der Konservierung, während Urinproben bei -20 °C eingefroren und Monate später problemlos analysiert werden können, ist dies bei Blut nicht der Fall. Im Extremfall (Transport im Winter) muss dafür gesorgt werden, dass die Proben nicht unter 4 °C gekühlt werden. Als erstmalig Blutproben zur Dopingkontrolle genommen wurden, bei den Olympischen Spielen 2000 in Sydney, trat dieses Problem nicht auf, da sich dort zum einen alle Athleten in einem örtlich eng begrenzten Gebiet aufhielten und sich die benötigten Hämatologiesysteme vor Ort befanden, die Proben also in weniger als 24 h gemessen werden konnten. Für die klinische Analytik stellt sich diese Frage ebenfalls nicht, da sich die entsprechenden Geräte entweder im Klinikbereich befinden oder mittels Kurierdienst ein Sammeltransport zu Großlabors erfolgt. Demzufolge war bisher die Thematik der Probenstabilität nur von geringem Interesse, so dass in entsprechenden Artikeln meist nur generelle Aussagen ohne eine Darstellung der Daten

erfolgen. Deshalb sollte hier untersucht werden, wie stabil die für die Problematik EPO-Doping relevanten Parameter sind.

Anhand des Kurvenverlaufs für Hämatokrit und Hämoglobin (**Abb. 67**) lässt sich erkennen, dass sich die Alterung der Zellen unterschiedlich auf die jeweiligen Parameter auswirkt. Das Anschwellen der Erythrozyten durch das Antikoagulum EDTA führte zu einer Volumenvergrößerung und dadurch zu einem Anstieg des Hämatokritwertes. Die Hämoglobinkonzentration konnte dagegen über den gesamten Zeitraum fast unverändert gemessen werden. Da dieser Parameter erst nach der Lyse der Erythrozyten bestimmt wird (Abschnitt 3.2.1.1), haben die Zelleigenschaften nur einen geringen Einfluss.

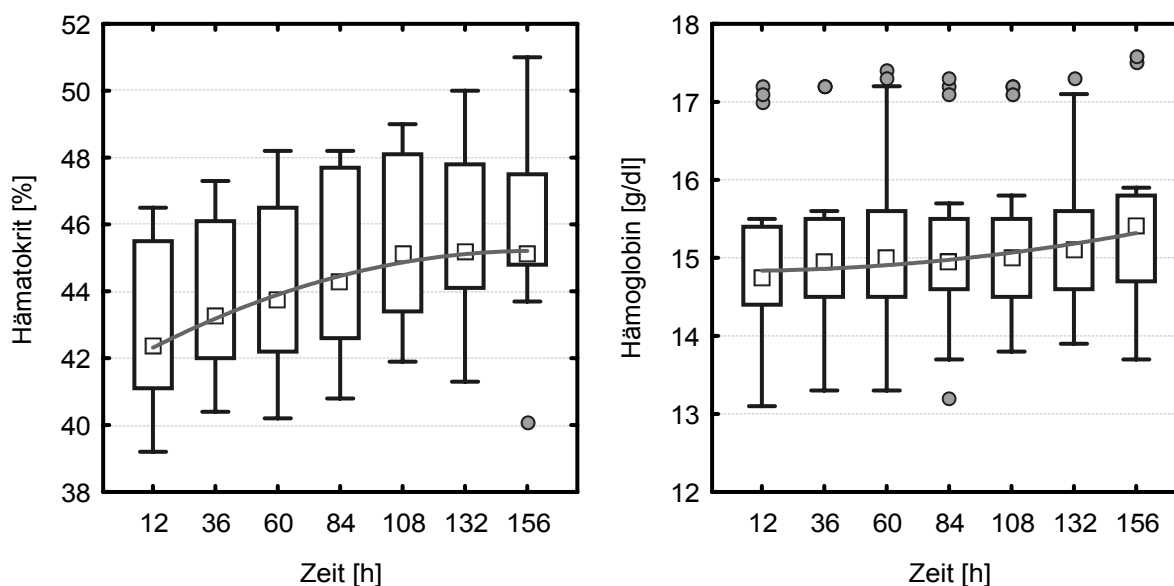


Abb. 67: Zeitliche Veränderung der Parameter Hämatokrit (links) und Hämoglobin (rechts) während der Lagerung der Proben bei ca. 8 °C.

Einen wesentlich größeren Einfluss hatte die Zeitdauer der Lagerung auf den Parameter Makrozyten (**Abb. 68**, links) und alle Retikulozytenparameter (**Abb. 68** rechts, **Abb. 69** und **Abb. 70**). Durch das Anschwellen der Erythrozyten kam es zu einer Verschiebung des Volumens zu höheren Werten, wodurch von der Auswertesoftware mehr Zellen als Makrozyten (Erythrozyten mit einem Zellvolumen größer als 120 fl) eingestuft wurden.

Bei den Retikulozyten dagegen lassen sich die Veränderungen während der Lagerung nicht nur durch ein vergrößertes Volumen erklären. Der wichtigste Unterschied zwischen Erythrozyten und Retikulozyten, der zur Einstufung der jeweils analysierten Zelle führt, ist deren RNS-Gehalt. Sowohl der prozentuale Anteil der Retikulozyten (**Abb. 68**, rechts) als auch die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 69**, links) nahmen im Verlauf der Lagerung ab. Da jedoch

keine Zerstörung der Zellen erfolgte, ist dies nur mit einer Verringerung ihres RNS-Gehalts erklärbar, so dass diese den Farbstoff nicht mehr binden konnten und somit nicht als Retikulozyten klassifiziert wurden. Daten, die für diese Erklärung sprechen, sind der abnehmende prozentuale Anteil an niedrigfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 69**, rechts), d. h. Zellen die den geringsten Gehalt an RNS aufweisen, sowie die sinkende absolute Zellenzahl (Daten nicht gezeigt).

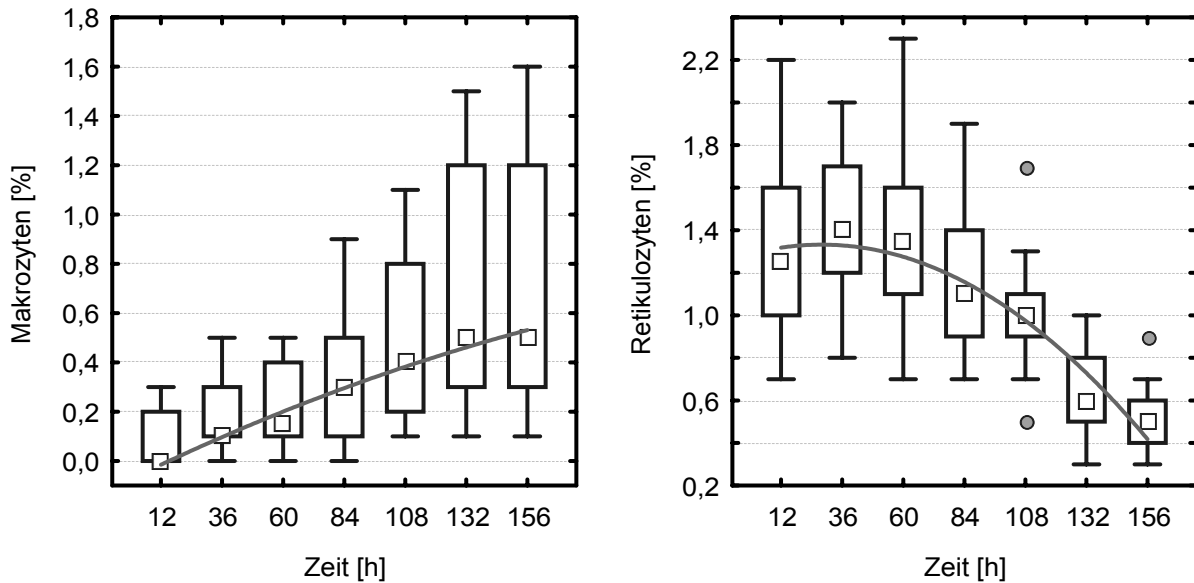


Abb. 68: Zeitliche Veränderung der Parameter Makrozyten (links) und des prozentualen Anteils der Retikulozyten (rechts) während der Lagerung der Proben bei ca. 8 °C.

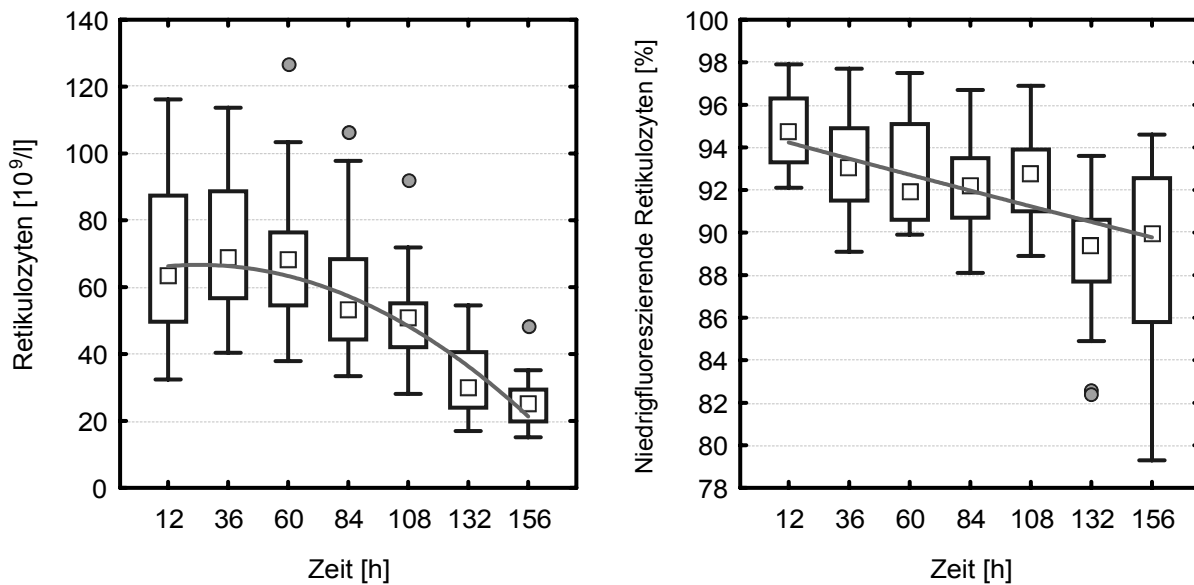


Abb. 69: Zeitliche Veränderung der Parameter Retikulozytenkonzentration (links) und des Anteils an niedrigfluoreszierenden Retikulozyten (rechts) während der Lagerung der Proben bei ca. 8 °C.

Durch die stattfindende *in vitro* Reifung der niedrigfluoreszierenden Retikulozyten und die gleichzeitige Stabilität der hochfluoreszierenden Zellen (**Abb. 70**, links) erhöhte sich deren prozentualer Anteil nach 60 h signifikant. Da die niedrigfluoreszierenden Zellen den größten Anteil an der Gesamtheit der Retikulozyten haben, trägt deren Reifung zu Erythrozyten auch am meisten zur Verringerung des Retikulozythämatokrits (**Abb. 70**, rechts) bei. Es stellte sich bei der Betrachtung aller Daten jedoch die Frage, warum sich während des Zeitraums von 60 h die Retikulozytenkonzentration und der prozentuale Anteil an Retikulozyten nicht verringerten, obwohl der Anteil niedrigfluoreszierender Retikulozyten abnahm.

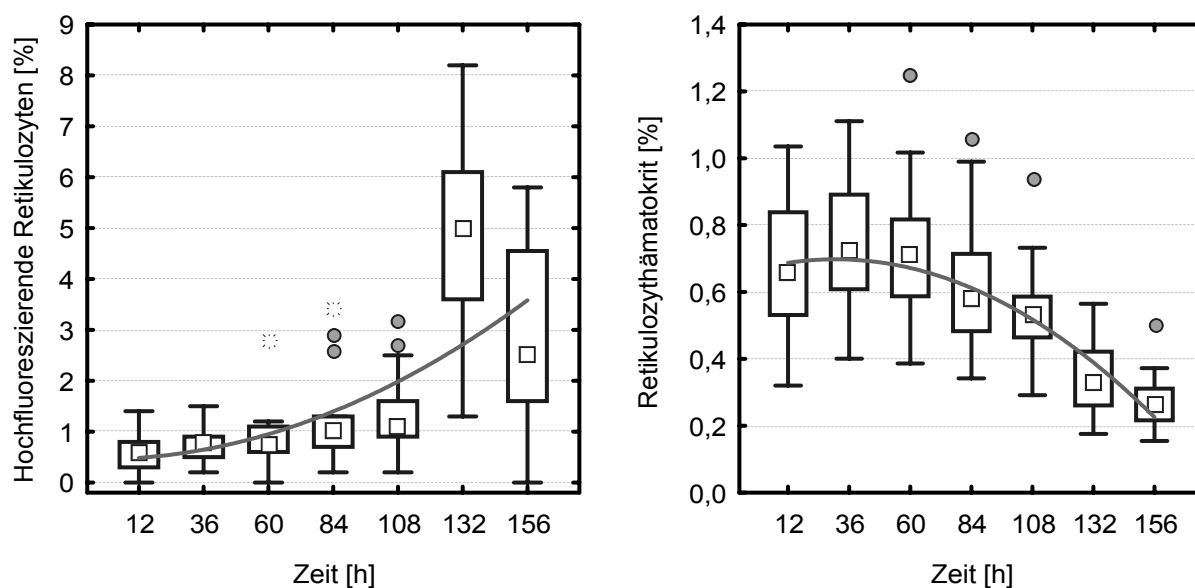


Abb. 70: Zeitliche Veränderung der Parameter hochfluoreszierende Retikulozyten (links) und Retikulozythämatokrit (rechts) während der Lagerung der Proben bei ca. 8 °C.

4.5.5 Reproduzierbarkeit der immunologischen Bestimmung der Serumparameter

Während bei der Betrachtung der hämatologischen Parameter das Problem einer möglichen Veränderung des Probenmaterials bei der Lagerung im Vordergrund stand, war bei der Bestimmung der Serumparameter (Erythropoietin, Ferritin, sTfR) gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der mittels immunologischer Messung erhaltenen Ergebnisse zu untersuchen, da sich bei der Verwendung von Immunoassays verschiedener Produktionsbatches möglicherweise Unterschiede ergeben könnten, im Gegensatz zu dem unveränderten physikalischen Messprinzip eines Hämatologiesystems (Abschnitt 3.2.2). Wie gravierend sich die Ergebnisse, die mit Immunoassays aus unterschiedlichen Produktionsbatches bestimmt wurden, unterscheiden, zeigt **Abb. 55** (siehe Abschnitt 4.5.1). Ein weiteres Problem waren vom Hersteller vorgenommene Veränderungen bei den verwendeten Immunoassays. Ein Beispiel

dafür ist der Assay von Nichols Diagnostics für Erythropoietin, bei dem der enthaltene polyklonale Antikörper durch einen monoklonalen ersetzt wurde; die daraus resultierende Verschiebung der Messwerte sieht man in **Abb. 56**. Damit gestaltete sich die Festlegung von absoluten Grenzwerten problematisch.

Die von den Herstellern angebotenen Kontrollen waren insofern weniger von Nutzen, da sich mit ihnen lediglich ein Parameter bestimmen lässt, die Kontrollen in den meisten Fällen keine humane Matrix aufwiesen und vor allem auf den jeweiligen Assay sowie einen wesentlich größeren Konzentrationsbereich, der für den Einsatz in der klinischen Analytik von Bedeutung ist, optimiert waren.

Um reale Kontrollproben für die untersuchten Parameter zu erhalten, wurden Poolproben durch Vereinigen humaner Seren hergestellt, wodurch vor allem die Konzentrationen der Parameter im interessierenden Bereich lagen. Die Poolproben wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Messungen wurde jeweils ein Aliquot aufgetaut und der Probenrest nach der Messung verworfen. Aufgrund der Anzahl an Messreihen war es notwendig für die Studien des IOC-Projektes und alle weiteren Untersuchungen neue Poolproben herzustellen; die in **Abb. 71** und **Abb. 72** aufgeführten Proben Pool 1 und Pool 3 respektive Pool 2 und Pool 4 sind daher nicht identisch.

Die Daten der Erythropoietinbestimmung sind in **Abb. 71** dargestellt. Die Bestimmung dieses Parameters erfolgte immer mit dem Advantage-Assay, wobei für die 1999 durchgeführten Messungen der Assay mit dem polyklonalen und für alle Messungen ab dem 01.12.2000 der Assay mit dem monoklonalen Antikörper eingesetzt wurde. Die geringe Erhöhung der Erythropoietinwerte der Pool 1-Proben lässt sich auf diese Änderung zurückführen, auf die niedrig konzentrierten Pool 2-Proben war kein Einfluss erkennbar. Die Bestimmung des Parameters sTfR erfolgte für die ersten Pool-Proben während der Verlaufsuntersuchung noch mit dem manuellen Quantikine-Assay (**Abb. 72**, Messungen 1999). Während dieses Zeitraums konnte ein Anstieg der Konzentration beobachtet werden, die Ursache dafür ist nicht geklärt. Das gleiche Verhalten konnte auch bei der Bestimmung mit dem Advantage-Assay festgestellt werden, allerdings waren die absoluten Werte mit diesem wesentlich geringer (**Abb. 72**; Messungen ab dem 01.12.2000). Der zweite Ansatz von Poolproben (Pool 3 und Pool 4) zeigte dagegen keinen Konzentrationsanstieg, die Werte streuten jedoch wesentlich mehr.

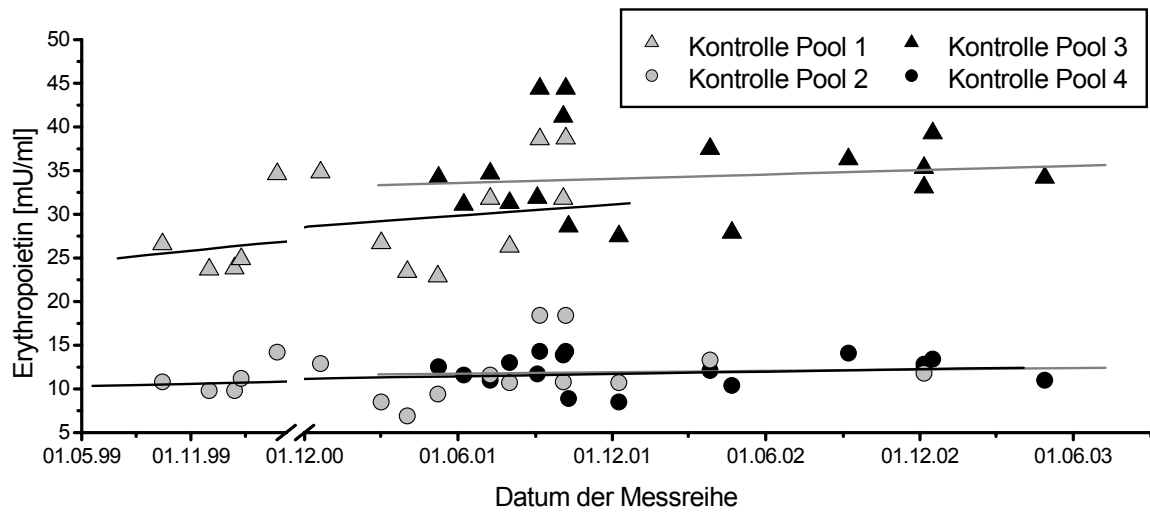


Abb. 71: Erythropoietinkonzentrationen der mitgeführten Kontrollproben Pool 1 bis Pool 4. Alle Bestimmungen wurden mit dem Advantage (Nichols Institute Diagnostics, Bad Nauheim) durchgeführt.

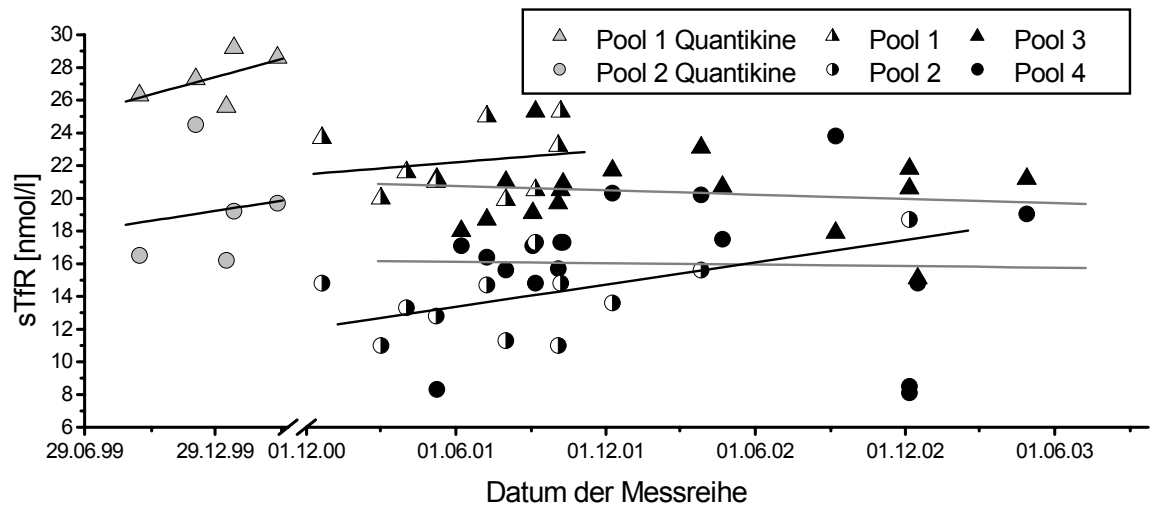


Abb. 72: Konzentrationen des sTfR der mitgeführten Kontrollproben Pool 1 bis Pool 4. Die ersten fünf Bestimmungen erfolgten mit dem manuellen Quantikine-Assay, alle weiteren mit dem Advantage (Nichols Institute Diagnostics, Bad Nauheim).

4.6 Ergebnisse der direkten Methoden

4.6.1 Proteinreinigung und massenspektrometrische Analytik von Glykanen

Die massenspektrometrische Analytik von Proteinen ist im letzten Jahrzehnt fast zu einem Standardverfahren geworden, wobei sich sowohl die Methoden zur Probenaufarbeitung als auch die analytischen Verfahren und Geräte rasant entwickelt haben. Die in der Literatur beschriebenen massenspektrometrischen Untersuchungen ^[18, 26, 27, 76, 78, 100-102] wurden entweder mit gentechnisch hergestelltem Erythropoietin und Substanzmengen im Milligrammbereich oder humanem urinärem Erythropoietin, wobei dieses aus mehreren 100 l bis 1000 l Urin aplastischer Anämiepatienten konzentriert und abgetrennt wurde, durchgeführt. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten zum einen die Anreicherung von EPO und zum anderen entsprechende massenspektrometrische Verfahren untersucht werden. Dabei wurden zwei prinzipielle Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz bestand in der Trennung der abgespaltenen Glykane mittels HPLC und der Erfassung relevanter Markerionen mit einem Triple-Quadrupol-MS, der zweite in der unmittelbaren Aufgabe des Glykangemisches mittels einer Nanosprayquelle, wobei durch die Unterscheidung der Signale durch die wesentlich höhere Auflösung des verwendeten ESI-TOF-MS erreicht werden sollte. Die generelle Strategie ist in **Abb. 73** dargestellt.

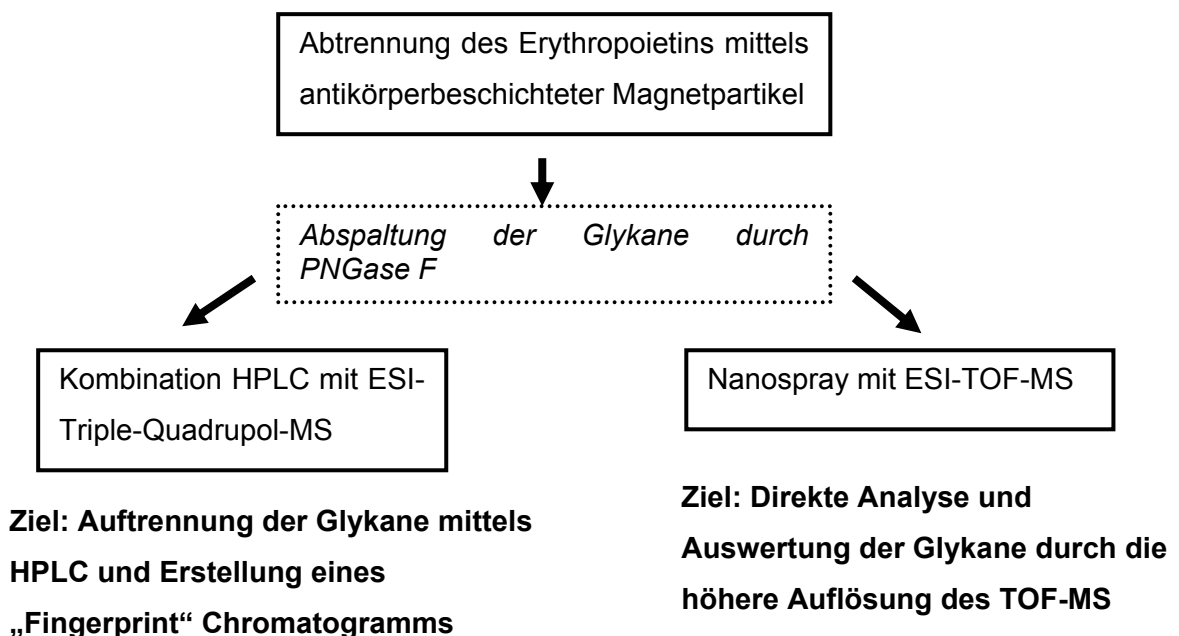


Abb. 73: Strategie zur Isolierung des Erythropoietins und der massenspektrometrischen Untersuchung und Auswertung der Glykane.

4.6.1.1 Proteinisolierung mittels Magnetpartikeln

Vorraussetzung für eine spätere Proteinanalytik ist die Isolierung des zu untersuchenden Proteins. Um Erythropoietin aus geringen Probenmengen für die nachfolgende massenspektrometrische Analytik zu isolieren, fanden antikörperbeschichtete Magnetpartikel (Dynabeads) Verwendung. Die tosylaktivierte Dynabeads wurden mit einem spezifischen Antikörper von R&D-Systems beschichtet, der nach Angaben der Section for Doping Analysis (Hormone Laboratory, Aker University Hospital, Oslo, Norwegen, Venke Skibelli, persönliche Mitteilung) die geringste Kreuzaktivität und beste Selektivität aufwies.

Da zum damaligen Zeitpunkt lediglich ein SDS-PAGE-System zur Verfügung stand, wurden damit Erythropoietin-Standardlösungen, Lösungen des verwendeten Antikörpers und des mittels Dynabeads isolierten Erythropoietins untersucht. In **Abb. 74** ist eindeutig zu erkennen, dass eine Isolierung von Erythropoietin mittels antikörperbeschichtete Dynabeads möglich war. Ein Großteil des isolierten Erythropoietins war jedoch noch rein physikalisch an den Dynabeads gebunden, da sich die Intensität der EPO-Bande verringerte, wenn die Dynabeads mit dem gebundenen EPO mit einer 0,1 % Tween 20-Lösung gewaschen wurden. Der nächste Schritt sollten in der Optimierung dieser Technik für die entsprechende Matrix Urin/Blut, die Abspaltung der Glykane und die Präparation dieser für die nachfolgende Analytik (siehe Abschnitt 4.6.1.2) bestehen.

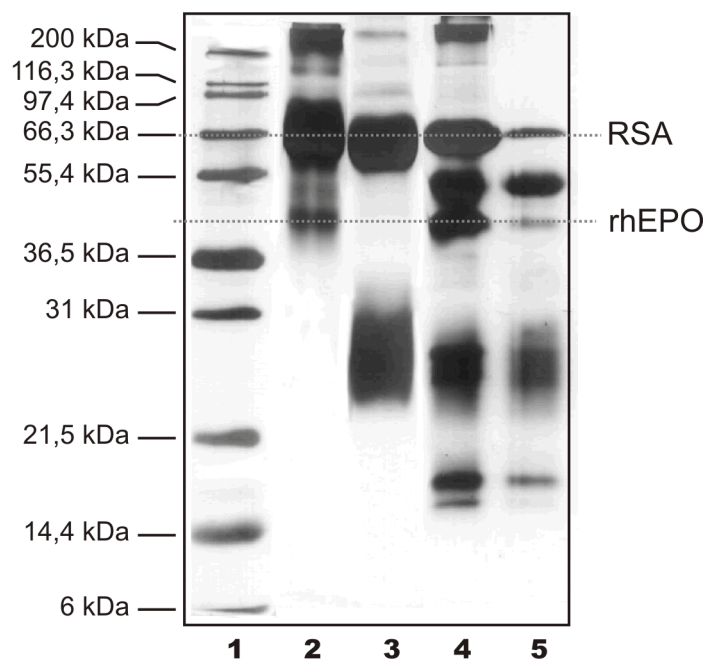


Abb. 74: SDS-PAGE der Erythropoietinisolierung mittels Dynabeads (Silberfärbung). Bahn 1: Marker, Bahn 2: rhEPO-Standard (stabilisiert mit RSA), Bahn 3: zur Beschichtung verwendeter monoklonaler EPO-Antikörper, Bahn 4: isoliertes rhEPO (Beads mit gebundenem EPO, ungewaschen), Bahn 5: isoliertes rhEPO (Beads mit gebundenem EPO, einmal mit 0,1 % Tween 20 gewaschen).

Dass die Isolierung von EPO mit dieser Technik möglich ist, konnte später auch von Skibeli et al. ^[19] gezeigt werden. Allerdings wurden hier die abgespaltenen Glykane mit einem Fluoreszenzmarker versehen und mittels HPLC analysiert, während für die Analytik im IDAS Kreischa vorzugsweise massenspektrometrische Verfahren angewandt wurden. Aufgrund der Einführung von isoelektrischer Fokussierung, Double-Blotting und Visualisierung von Erythropoietin aus Urinproben (Abschnitt 4.6.2) - einer Methode, die seit 2002 als Routineanalytik im IDAS Kreischa mit ständig steigenden Probenzahlen etabliert wurde - konnten lediglich Vorexperimente hinsichtlich der massenspektrometrischen Analytik von Glykanen durchgeführt werden (siehe den folgenden Abschnitt).

4.6.1.2 Vorexperimente zur Analytik von Glykanen mittels Kombination von HPLC-ESI-Triple-Quadrupol-MS und Nanospray-ESI-TOF-MS

Mit dem im Institut installierten ESI-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 2000 existierte die Möglichkeit Glykane mittels Massenspektrometrie zu untersuchen. Für die Erstellung von MS- und HPLC-Methoden wurden verschiedene Glykanstandards (**Tab. 12**) untersucht. Als untersuchte Glykane wurden zwei-, drei- und vierantennige Grundstrukturen, Glykane mit proximaler Fucosylierung, Lactosamin-Repeat und terminalen Sialinsäuren verwendet (zu den genauen Strukturen siehe Anhang 1). Vergleicht man die durch die Ionisierung mittels Elektrospray bevorzugt gebildeten Ionen (**Tab. 12**), lassen sich vor allem im positiven Modus viele mehrfach geladene Molekülionen finden, wobei neben den protonierten Ionen auch immer Natrium- und Kaliumaddukte gebildet wurden.

Durch den Zerfall konnte bei allen Glykanen das Oxoniumion 204 (HexNac)⁺ als „Markerion“ ^[103, 104] und bei den meisten zusätzlich das Ion 366 (HexHexNac)⁺ im positiven Modus gefunden werden, während die entsprechenden Molekülionen nicht immer zu finden waren (**Tab. 12**, StF und StM). Dabei ist ungeklärt, ob diese Glykane während der Ladungsübertragung im Elektrospray zerfielen oder sich aufgrund der Struktur im positiven Modus keine Ladung auf diese Glykane übertragen lässt, der Effekt ist in beiden Fällen identisch.

Tab. 12: Übersicht der bevorzugt gebildeten Molekülonen und Fragmente der verwendeten Glykanstandards

Standard (MWG)	Struktur-Typ	Anzahl Sialinsäuren	bevorzugt gebildete Ionen (mittels ESI) im positiven und negativen Modus
StA (1788)	diantennär, proximale Fucosylierung	0	positiv: 905,5 (M+H+Na) ²⁺ ; 894,3 (M+2H) ²⁺ ; 366,1 (HexHexNac) ⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ negativ: 892,85 (M-2H) ²⁻
A1F (2078)	diantennär, proximale Fucosylierung	1	positiv: 1062,4 (M+2Na) ²⁺ ; 1051,4 (M+H+Na) ²⁺ ; 1040,4 (M+2H) ²⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ negativ: 1038,4 (M-2H) ²⁻ ; 290,2 (NeuAc) ⁻
A2 (2224)	diantennär	2	positiv: 1135,0 (M+2Na) ²⁺ ; 1124,0 (M+H+Na) ²⁺ ; 1113,1 (M+2H) ²⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ Negativ: 1111,0 (M-2H) ²⁻ ; 290,2 (NeuAc) ⁻
NGA3 (1520)	triantennär	0	positiv: 1542,4 (M+Na) ⁺ ; 1520,8 (M+H) ⁺ ; 1339,4 (M-HexNac+Na) ⁺ ; 1317,5 (M-HexNac+H) ⁺ ; 782,9 (M+2Na) ²⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ negativ: 1518,5 (M-H) ⁻
NA3 (2007)	triantennär	0	positiv: 1663,6 (M-HexHexNac+Na) ⁺ ; 1641,7 (M-HexHexNac+H) ⁺ ; 1026,4 (M+2Na) ²⁺ ; 1004,5 (M+2H) ²⁺ ; 366,1 (HexHexNac) ⁺ negativ: 1002,0 (M-2H) ²⁻
A3 (2881)	triantennär	3	positiv: 1462,7 (M+2Na) ²⁺ ; 1440,6 (M+2H) ²⁺ ; 1004,5 (M+2H) ²⁺ ; 366,1 (HexHexNac) ⁺ negativ: 1449,8 (M-3H+Na) ²⁻ ; 1438,7 (M-2H) ²⁻ ; 959,1 (M-3H) ³⁻ ; 290,2 (NeuAc) ⁻
StD (2518)	tetraantennär, proximale Fucosylierung	0	positiv: 1277,0 (M+2NH ₄) ²⁺ ; 1268,4 (M+H+NH ₄) ²⁺ ; 867,3 (M+K+2Na) ³⁺ ; 366,1 (HexHexNac) ⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ negativ: 1257,7 (M-2H) ²⁻ ; 838,3 (M-3H) ³⁻
StF (3235)	tetraantennär, proximale Fucosylierung, Lactosamin-Repeat	0	positiv: 366,1 (HexHexNac) ⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ negativ: keine Ionen oder Fragmente
StM (4047)	tetraantennär, proximale Fucosylierung, Lactosamin-Repeat	4	positiv: 366,1 (HexHexNac) ⁺ ; 204,2 (HexNac) ⁺ negativ: 1010,9 (M-4H) ⁴⁻ ; 290,2 (NeuAc) ⁻

Generell konnte festgestellt werden, dass Glykane mit terminalen Sialinsäuren eine deutlich bessere Ionisation, d. h. Signalintensität, zeigten und dass das bevorzugt gebildete Molekülon, d. h. Zahl der Ladung, im negativen Modus immer der Zahl der Verzweigungen entsprach. Als Markerion für diese Glykane konnte dabei zusätzlich im negativen Modus das Ion 290 (NeuAc)⁻ für die Sialinsäure gefunden werden. Um die Signalintensität sowohl für die Markerionen 204 und 366 im positiven und 290 im negativen Modus als auch für die Molekülonen zu erhöhen, wurde eine Methode mit unterschiedlichen Einstellungen für die Ionisation erstellt. Durch die maximale Einstellung für das Declustering Potential erfolgte eine starke Fragmentierung der

Glykane und eine Erhöhung der Signalintensität für die Markerionen sowohl im positiven Modus (**Abb. 75 A, C, E**; Ionen 204 und 366) als auch im negativen Modus (**Abb. 76 A**, Ion 290), während nachfolgend mit einem gerampten Declustering Potential im niedrigen Bereich eine hohe Signalintensität für die mehrfach geladenen Molekülionen (**Abb. 75 B, D, F** und **Abb. 76 B**) erreicht wurde.

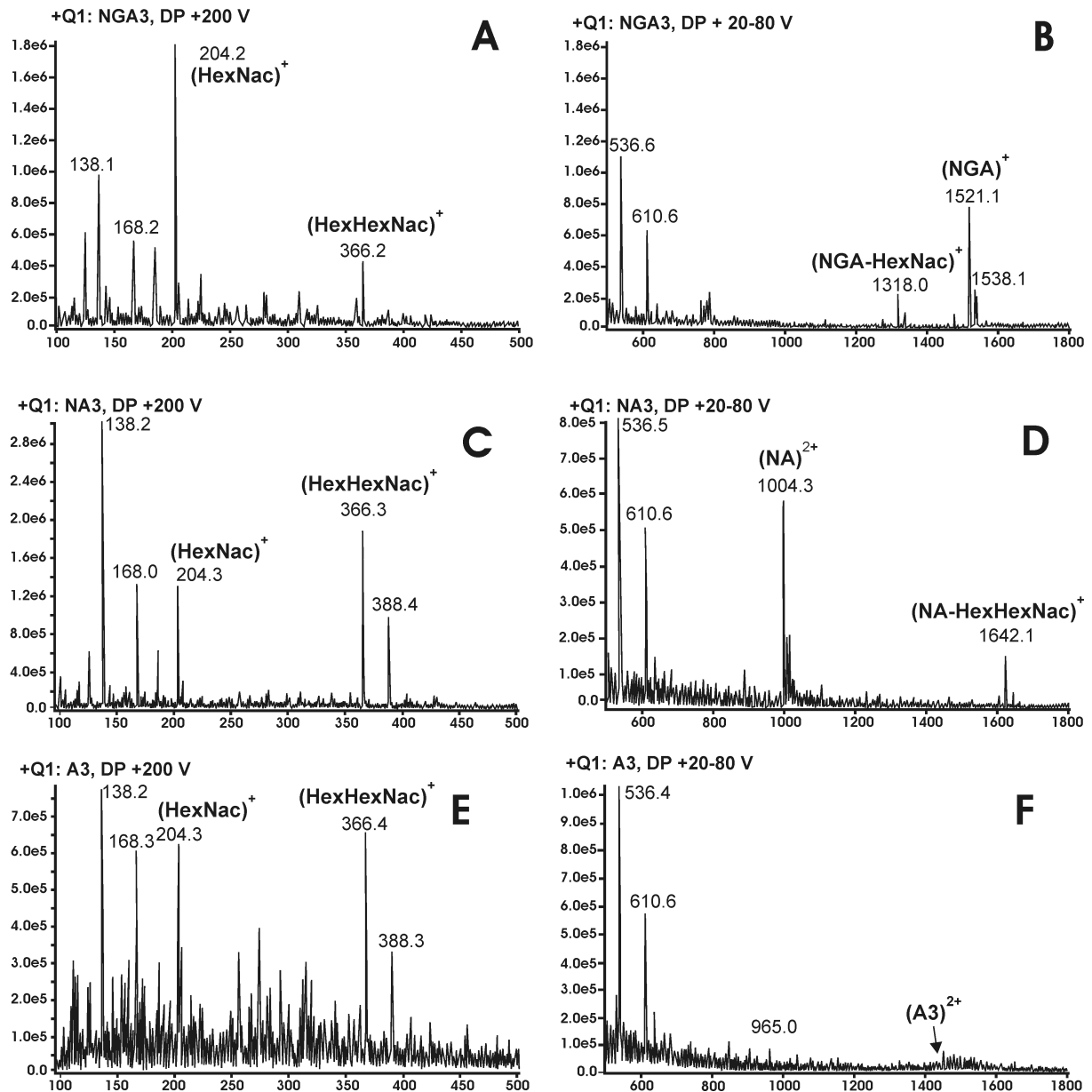


Abb. 75: Elektrospray-Massenspektren im positiven Modus mit ESI-Triple-Quadrupol-MS, Fluss 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, Konzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 2 mM NH_4Ac 50/50 Acetonitril/Wasser. Aufnahme Standard NGA3 im Massenbereich 100-500 mit Declustering Potential (DP) +200 V für 1 s (**A**), im Massenbereich 500-1800 mit gerampten DP +20-80 V in 4 s (**B**); Aufnahme Standard NA3 im Massenbereich 100-500 mit DP +200 V für 1 s (**C**), im Massenbereich 500-1800 mit gerampten DP +20-80 V in 4 s (**D**); Aufnahme Standard A3 im Massenbereich 100-500 mit DP +200 V (**E**), im Massenbereich 500-1800 mit gerampten DP +20-80 V in 4 s (**F**).

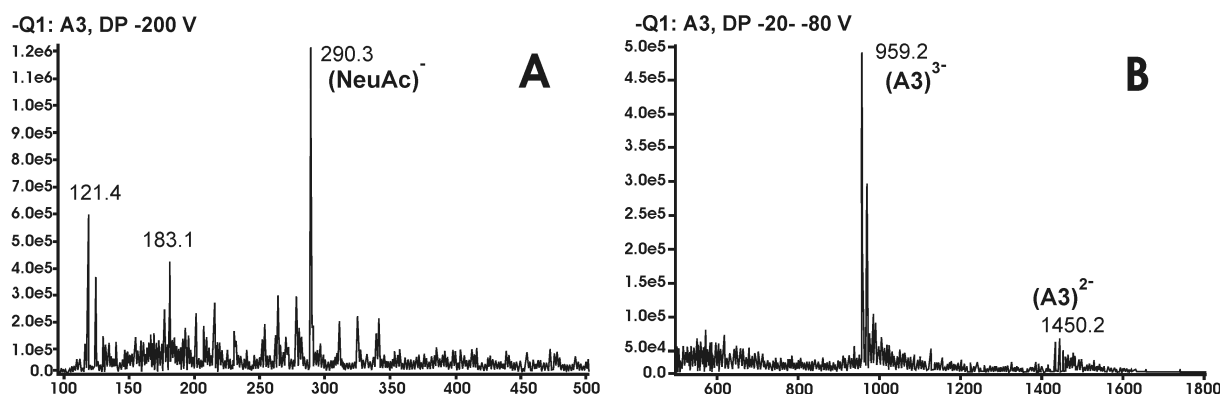


Abb. 76: Elektrospray-Massenspektren im negativen Modus mit ESI-Triple-Quadrupol-MS, Fluss 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, Konzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 2 mM NH_4Ac 50/50 Acetonitril/Wasser. Aufnahme Standard A3 im Massenbereich 100-500 mit DP -200 V (**A**), im Massenbereich 500-1800 mit gerampten DP -20 bis -80 V in 4 s (**B**)

Kombiniert mit dieser massenspektrometrischen Methode wurden Experimente zur Trennung mittels HPLC durchgeführt. Erschwerend kam hinzu, dass kommerziell keine HPLC-Säule erhältlich ist, die für eine Trennung von Glykanen mit und ohne terminalen Sialinsäuren konzipiert ist. Die verwendete PolyGLYCOPLEX A-Säule ermöglichte eine relativ gute Trennung der verwendeten Standards, jedoch war die Aufnahme der Massenspektren mittels der vorher erstellten zweistufigen Methode nicht anwendbar, da die Signalintensität durch den Wechsel des Declustering Potentials zu gering war. Die Verringerung der Zeitdauer für den Wechsel des Declustering Potentials, um sowohl die Markerionen als auch die Molekülonen innerhalb einer kurzen Zeitspanne zu erfassen, führte zu einer drastischen Signalverschlechterung. Ein Wechsel zwischen dem positiven und dem negativen Modus innerhalb eines HPLC-Laufs, wie ursprünglich geplant, um gleichzeitig die Ionen +204, +366 und -290 zu erfassen, lies sich mit dem API 2000 nicht durchführen.. Daher wurde mit einem konstanten Declustering Potential in einem Ladungsmodus gearbeitet. Die Trennung der verwendeten Glykanstandards ist in **Abb. 77** dargestellt.

Die damit erzielten Signalintensitäten waren jedoch nicht ausreichend, um bei den vergleichsweise geringen Stoffmengen, die bei realen Proben verfügbar wären, Ergebnisse zu erhalten. Für die vollständige Strukturaufklärung wäre zudem die Erfassung der Molekülonen notwendig, was durch die zahlreichen Addukte erschwert wurde. Auch war durch die geringe Auflösung des API 2000 keine Aussage über die Mehrfachladung der Ionen möglich.

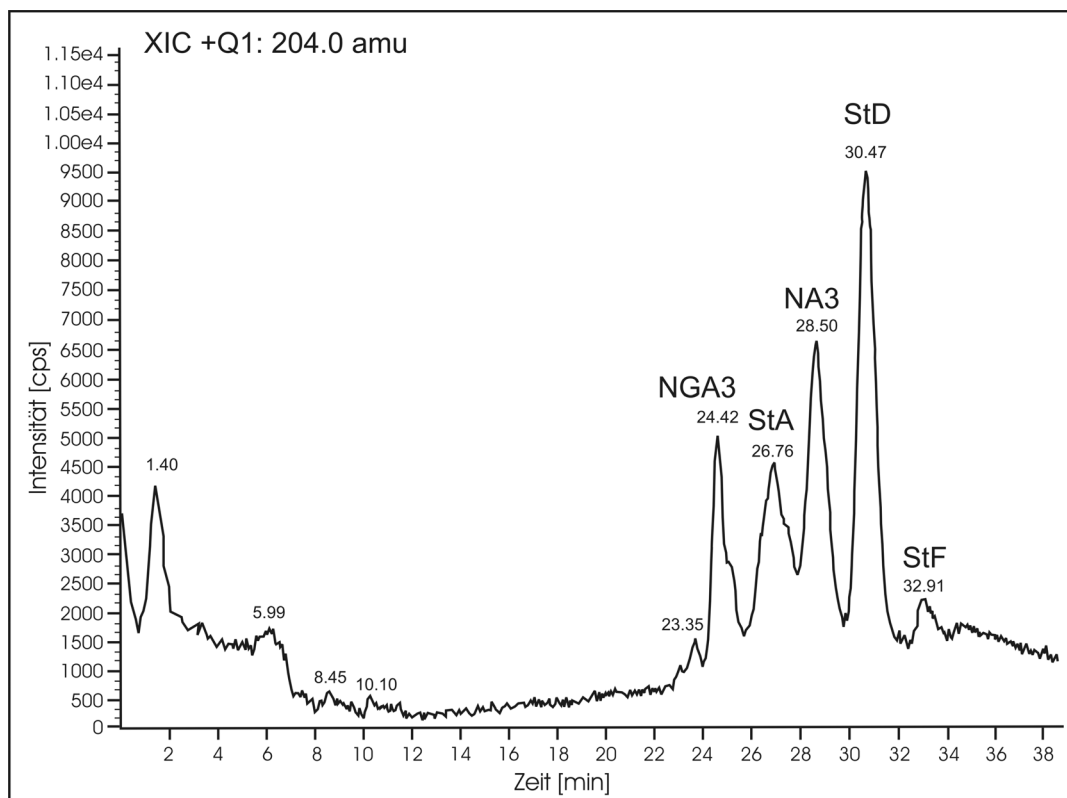


Abb. 77: HPLC-ESI-MS (Turbolon-Elektrosprayquelle) der Glykanstandards NGA3, StA, NA3, StD und StF. Extrahiertes Ionenchromatogramm von m/z +204 (HexNAc)⁺ bei einem konstanten Declustering Potential von 200 V.

Mit der Installation eines Time-Of-Flight (TOF) Massenspektrometers mit einer Nanosprayquelle bestand die Möglichkeit, zum einen wesentlich niedrigere Stoffmengen zu erfassen und zum anderen durch die höhere Auflösung eine Aussage über die Mehrfachladung und damit die Molekülmasse zu erhalten.

Da die verwendeten Nanospray-Glaskapillaren nach dem Befüllen mit der Analytlösung noch geöffnet werden mussten, war die erhaltene Öffnung und der Durchfluss durch die Kapillare je nach Experiment unterschiedlich und lag im Bereich von 160 bis 500 nl/min, teilweise konnten noch geringere Flussraten erreicht werden. Der Glykanstandard A3 wurde zweimal um den Faktor 10 verdünnt und gemessen (**Abb. 78**), so dass bei der geringsten Konzentration während einer Scanaufnahme 0,4 bis 1,2 fmol Glykan analysiert wurden (**Abb. 78 C**). Die erfasste Stoffmenge lag somit im Bereich der Konzentrationen, die bei realen Proben zu erwarten sind.

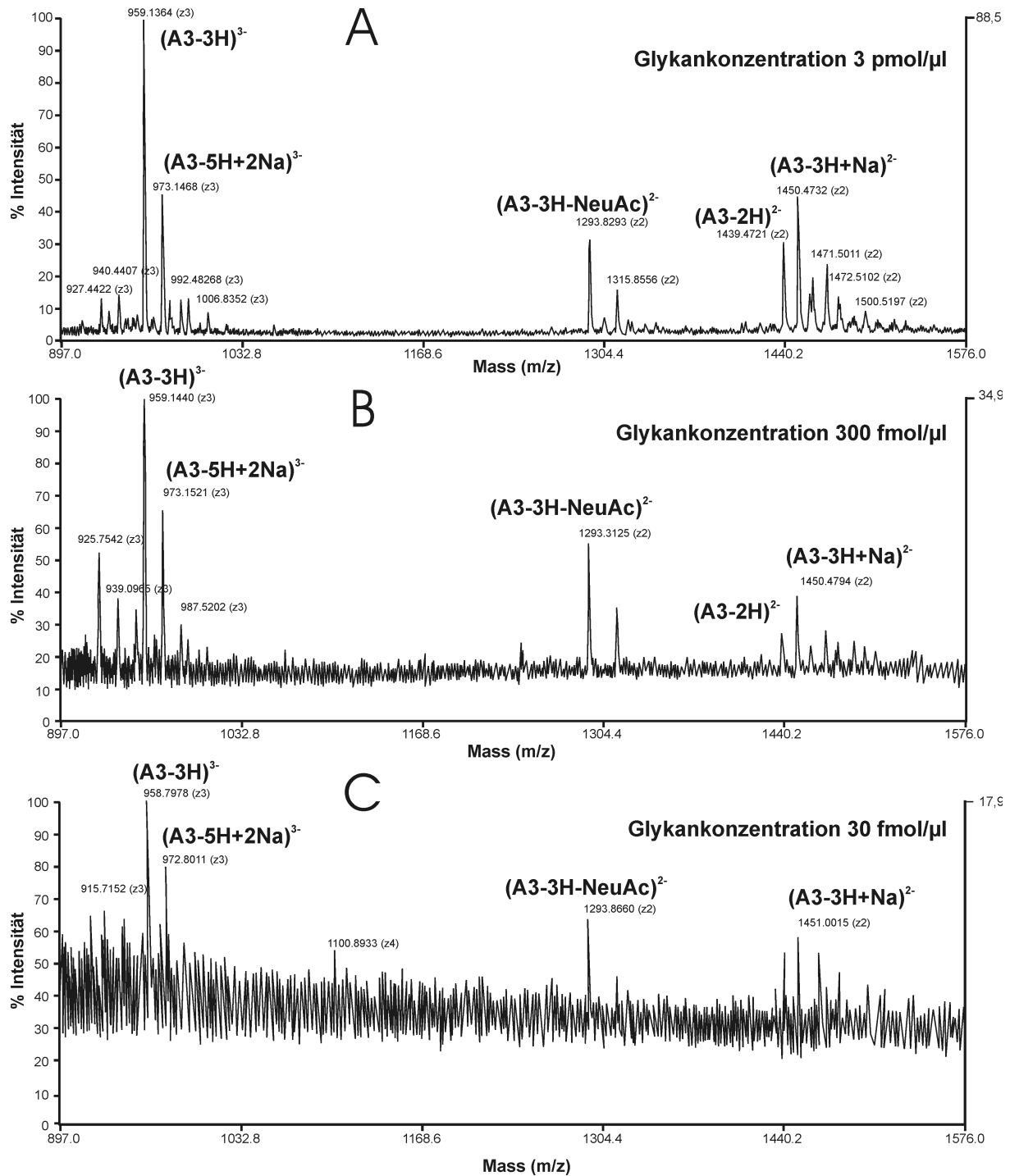


Abb. 78: Massenspektren des Glykanstandards A3, Aufnahme mittels Nanosprayquelle am ESI-TOF-MS im negativen Modus, Aufnahmebereich 40-2000 amu, Scanzeit 5 s, Durchfluss der beschichteten Nanospray Glaskapillaren 160-500 nl/min, Konzentrationen **(A)** 3 pmol/μl entspricht 39-123 fmol Glykan pro aufgenommenen Scan, **(B)** 300 fmol/μl entspricht 4-12 fmol Glykan pro aufgenommenen Scan, **(C)** 30 fmol/μl entspricht 0,4-1,2 fmol Glykan pro aufgenommenen Scan.

Die erzielte Signalerhöhung ließ sich sowohl auf die verwendete Nanosprayquelle, und damit die Erfassung einer größeren Anzahl von ionisierten Molekülen, als auch auf die höhere Empfindlichkeit des TOF-Massenspektrometers zurückführen. Da selbst bei der Messung eines

geringen Probenvolumens von 1 µl und einer großen Durchflussrate von 500 nl/min mindestens 2 min zur Fullscanaufnahme zur Verfügung standen, waren in diesem Zeitraum sowohl die Aufnahmen im positiven als auch im negativen Modus durchführbar. Deshalb wurde die ursprünglich geplante HPLC-Trennung der Glykane verworfen und die Strukturaufklärung sollte aufgrund der wesentlich besseren Auflösung aus der Fullscanaufnahme durchgeführt werden. Um die Auswertung zu erleichtern, wurde untersucht, welchen Einfluss der pH-Wert auf die Bildung der Addukte besitzt. Die Verringerung der Natrium- und Kaliumaddukte sollte zu einer Erhöhung der Signalintensität der protonierten Ionen führen. Außerdem sollte die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Molekülonen durch die Verringerung der Adduktbildung vereinfacht sein. Da die Veränderung der Massenspektren im positiven und im negativen Aufnahme-modus untersucht werden sollte, wurden die Zusätze so gewählt, dass eine Protonierung bzw. Deprotonierung der Ionen unterstützt werden sollte. Eine Übersicht der verwendeten Zusätze und der dadurch erzielten pH-Werte bei einer 50/50 Mischung von Wasser und Acetonitril ist in **Tab. 13** gegeben.

Tab. 13: Die pH-Werte der Glykanlösung in Abhängigkeit vom verwendeten Zusatz.

verwendeter Zusatz	gemessener pH-Wert
Trifluoressigsäure (0,1 %)	2,1
Ameisensäure (1 %)	2,8
Essigsäure (1 %)	3,6
kein Zusatz	5,5
NH ₃ -Lösung (10 %)	8,0

Durch den Zusatz von Ameisensäure wurde ein pH-Wert von 2,8 erreicht, wodurch im positiven Modus (**Abb. 79**) sowohl die größten absoluten Signalintensitäten gemessen werden konnten als auch die geringste Bildung von Natrium- und Kaliumaddukten beobachtet wurde, im Vergleich zu allen anderen pH-Werten der Glykanmischung, bei denen ebenfalls gemessen wurde. Bei der Verwendung von 0,1 % TFA wurde zwar ein noch geringerer pH-Wert (pH 2,1) erreicht, jedoch konnte durch diesen Zusatz kein stabiles Nanospray aufgebaut werden. Der große Vorteil der Messung im negativen Modus (**Abb. 80**) war im Vergleich zur Messung im positiven Modus, dass kaum zusätzliche Addukte gebildet wurden.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sich durch die Wahl des entsprechenden Zusatzes, d. h. Einstellen eines bestimmten pH-Wertes, drastische Signalveränderungen ergeben. Der beste Kompromiss, um mit der selben Probe sowohl im positiven als auch im negativen Modus akzeptable Ergebnisse zu erzielen, war die Zugabe von Essigsäure, d. h. die Einstellung eines pH-Wertes von 3,6.

Ergebnisse

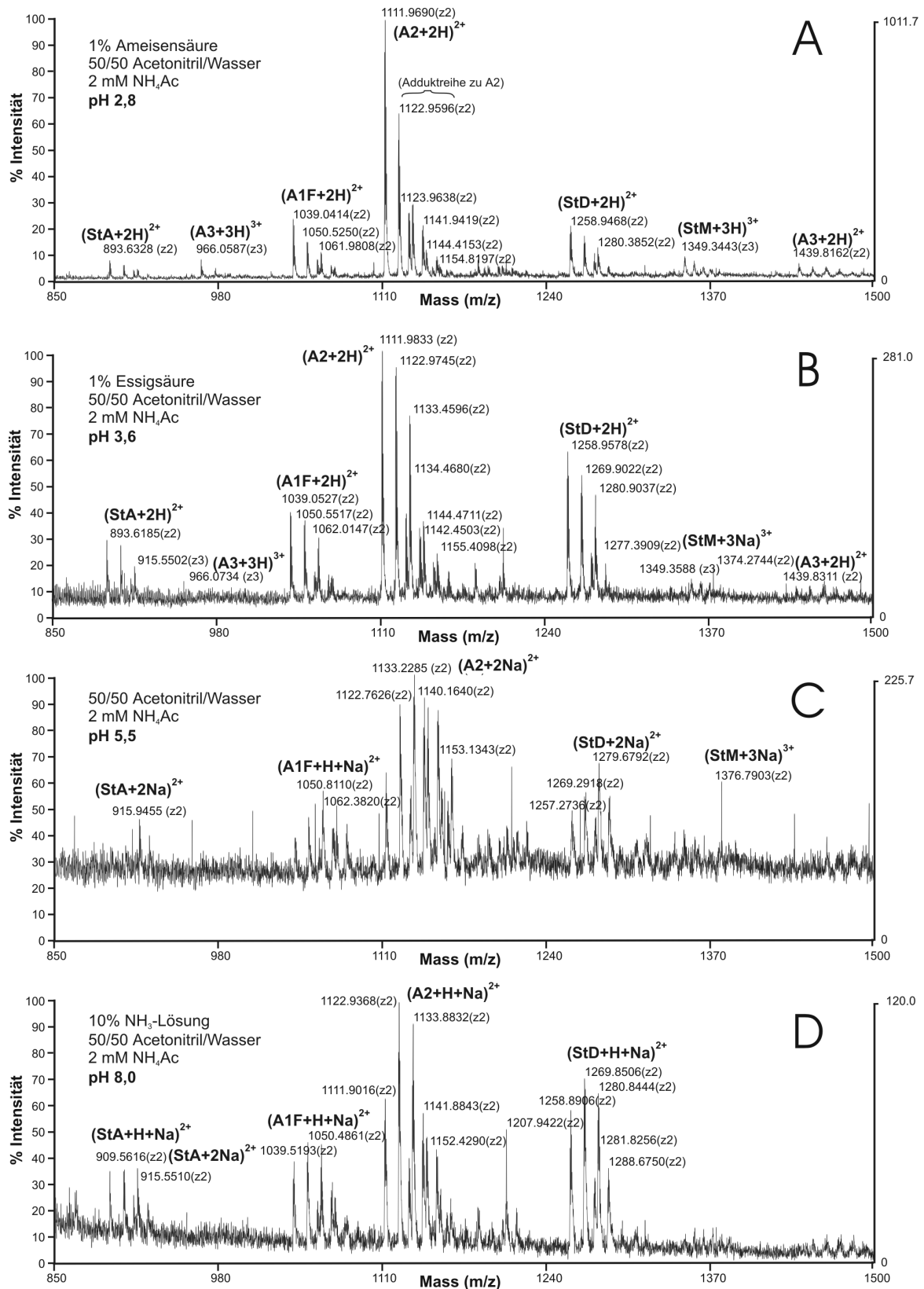


Abb. 79: Massenspektren der Glykanstandards StA, A1F, A2, A3, StD und StM (Konzentration je 0,83 µg/ml in 2 mM NH₄Ac 50/50 Acetonitril/Wasser) im positiven Modus mittels Kombination Nanospray und ESI-TOF-MS, Aufnahmebereich 500-2000 amu, Scanzeit 5 s, Gesamtaufnahme 90 s, Durchfluss der Kapillare 160-500 nl/min, Spray Tip Potential 2115 V, Nozzle Potential 180 V; **(A)** 1 % Ameisensäure, pH 2,8; **(B)** 1 % Essigsäure, pH 3,6; **(C)** kein Zusatz, pH 5,5; **(D)** 10 % NH₃-Lösung, pH 8,0.

Ergebnisse

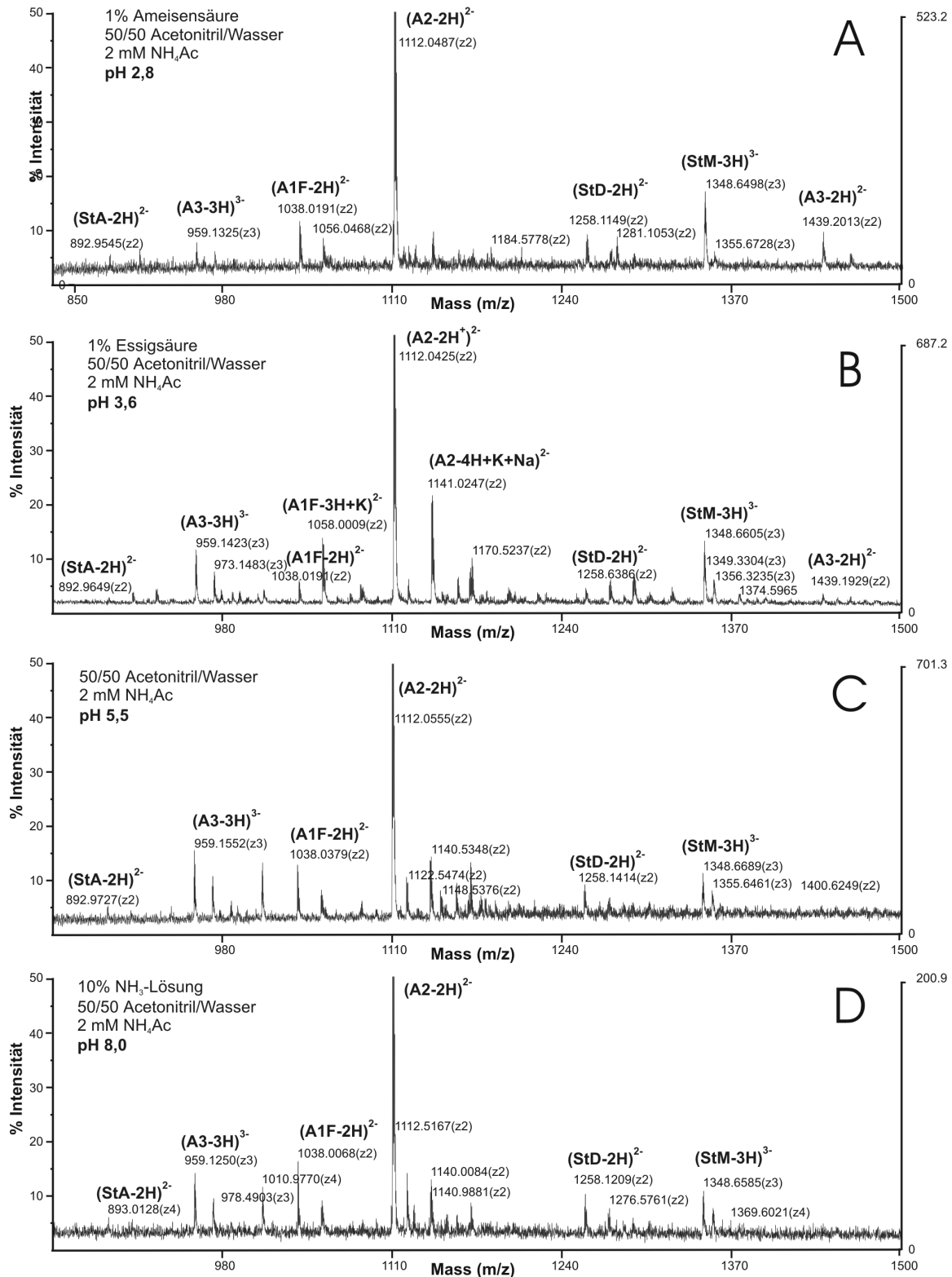


Abb. 80: Massenspektren der Glykanstandards StA, A1F, A2, A3, StD und StM (Konzentration je 0,83 µg/ml in 2 mM NH₄Ac, 50/50 Acetonitril/Wasser) im negativen Modus mittels Kombination Nanospray und ESI-TOF-MS, Aufnahmebereich 500-2000 amu, Scanzeit 5 s, Gesamtaufnahme 90 s, Durchfluss der Kapillare 160-500 nl/min, Spray Tip Potential 1486 V, Nozzle Potential 130 V; **(A)** 1 % Ameisensäure, pH 2,8; **(B)** 1 % Essigsäure, pH 3,6; **(C)** kein Zusatz, pH 5,5; **(D)** 10 % NH₃-Lösung, pH 8,0.

4.6.2 Isoelektrische Fokussierung

Die erste Veröffentlichung ^[79], in der die Trennung von humanem und rekombinantem Erythropoietin beschrieben wurde, erfolgte bereits 1995. Aufgrund der benötigten Geräte und des kommerziell nicht erhältlichen Antikörpers konnten die Ergebnisse jedoch in keinem weiteren Labor reproduziert werden. Demzufolge wurde die erneute Veröffentlichung einer vergleichbaren Methode ^[2] sehr skeptisch aufgenommen. Erstmals wurde diese als Bestätigungsmethode bei den Olympischen Spielen 2000 in Sydney eingesetzt, während statistische Modelle hämatologischer Parameter ^[1] als Screeningmethode genutzt wurden. Nachdem die Methode in den Dopinglabors in Oslo, Los Angeles und Barcelona etabliert war und die Ergebnisse reproduzierbar waren, wurde Ende 2002 mit dem Aufbau dieser Methode im IDAS Kreischa begonnen.

Zu diesem Zeitpunkt konnte mit der Methode zwischen rekombinantem und humanem Erythropoietin unterschieden werden, indem der prozentuale Anteil der urinären Isoformen, die im Bereich des rekombinanten Erythropoietins liegen, bestimmt wurde (**Abb. 81**). Als Grenzwert für diese Auswertung gilt die letzte Profilbande des rhEPO (**Abb. 81**, Profil BRP, Bande 7). Studien aller Labors, die dieser Methode anwenden, haben ergeben, dass der höchste Anteil an urinären Isoformen (**Abb. 81**, Profil Urin Blank, „Peak 1“) bei untersuchten Athleten bei 66 % lag. Um sicher zu sein, dass man kein falsch positives Ergebnis erhält wurde daher ein Grenzwert von 86 % als Entscheidungswert für ein EPO-Doping festgelegt.

Bereits 1999 erfolgte die erste Veröffentlichung ^[36] über ein modifiziertes Erythropoietin (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein – NESP). Dieses Glykoprotein besitzt eine Veränderung in der Peptidkette, an die zwei zusätzliche Glykanketten gebunden sind. Mit der Zulassung und klinischen Anwendung dieses neuen Präparats stellte sich das Problem der Nachweisbarkeit erneut. Um NESP zu erfassen, war es notwendig die bisher durchgeführte Methode zu modifizieren. Eine Änderung der bisherigen Methode war allerdings erst zu Beginn 2002 mit der kommerziellen Verfügbarkeit von NESP in Deutschland möglich. Dazu war es notwendig die Größe der verwendeten Membranen zu erhöhen. Durch die im Vergleich zu rhEPO größere Anzahl an Sialinsäuren, die wahrscheinlich auch die Ursache für die höhere Halbwertszeit sind, tragen NESP-Moleküle eine negativere Ladung und wandern im elektrischen Feld in den niedrigen pH-Bereich des Gels (**Abb. 81**), der nach der bisherigen Methode verworfen wurde. Der Endpunkt für die isoelektrische Fokussierung wurde auf 4000 Vh erhöht, da die NESP-Moleküle zur Fokussierung länger benötigten.

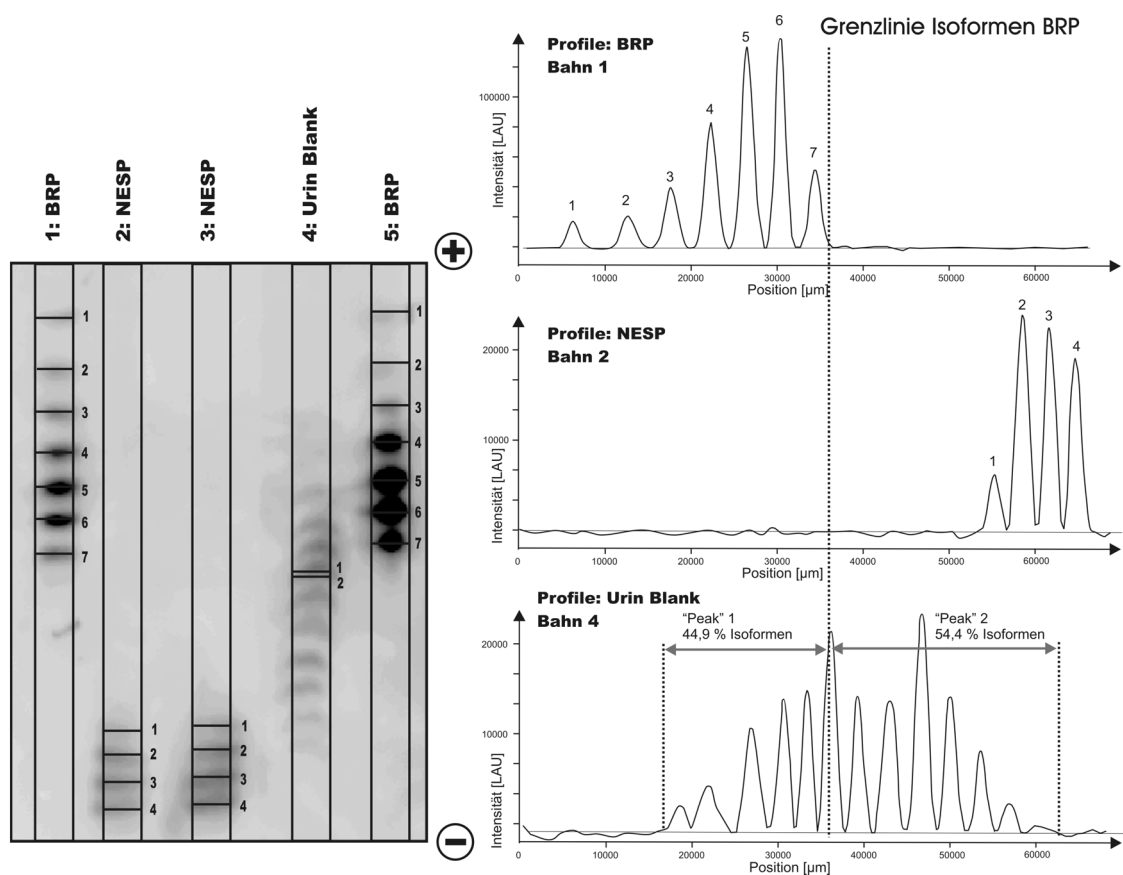


Abb. 81: Isoelektrisches Muster von rhEPO-Standard (BRP, Bahnen 1 und 5), NESP (ARANESP, Bahnen 2 und 3) und Kontrollurin (Blank, Bahn 4). Die Profile sind auf der rechten Seite nochmals einzeln dargestellt: **oben:** BRP-Standard 65 mU (500 µg), **Mitte:** NESP 1 ng, **unten:** Urin Blank 51 mU. Die Intensitäten der Isoformen sind in Linear Arbitrary Units (LAU), der Maßeinheit des Kamerasystems (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH – Straubenhardt) angegeben. Die Positionen von Kathode (-) und Anode (+) sind dargestellt.

Im Gegensatz zu rhEPO existiert noch keine internationale Festlegung zwischen den Dopinglabors hinsichtlich der Auswertung. Alle bisher analysierten Urinproben zeigten nur einen geringen bzw. gar keinen Anteil an Isoformen in diesem Bereich. Auch die bisher einzige Arbeit [105], die auf diesem Gebiet veröffentlicht wurde, gibt darüber keine Auskunft. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die längere Halbwertszeit die Produktion von körpereigenem Erythropoietin fast komplett unterdrückt wird, d. h. während eines Missbrauchs im Urin keine humanen Isoformen nachgewiesen werden können.

Mit der steigenden Anzahl an routinemäßig untersuchten Urinproben ergeben sich jedoch neue Probleme, die bisher nicht berücksichtigt wurden. Da fast alle Wettkampfkontrollen und ein Großteil der Trainingskontrollen nach einer Belastung genommen werden, ist bei den meisten dieser Urine der Proteingehalt erhöht, was sich bei der direkten EPO-Analytik bemerkbar macht. Zum einen ist das Auftragen der erhitzten Proben auf die Probenauftragsstücke durch die veränderte Probenkonsistenz extrem erschwert, zum anderen lässt sich bei dem Großteil

dieser Proben kein „normales“ Bandenmuster beobachten. Dies wird anhand der Probe 1 in **Abb. 82** deutlich. Die Signale dieser Probe (**Abb. 82**, Bahn 2 des IEF-Gels und Profil Mitte rechts) liegen im basischen Bereich, noch oberhalb des BRP-Peaks (**Abb. 82**, Bahn 1 des IEF-Gels und Profil oben rechts). Die mitgeführte Kontrollprobe Urin blank zeigt hingegen ein normales Profil (**Abb. 82**, Profil unten rechts). Da sich dies bei einer zunehmenden Zahl an Proben beobachten lässt, werden somit neue Anforderungen an die Probenaufarbeitung gestellt.

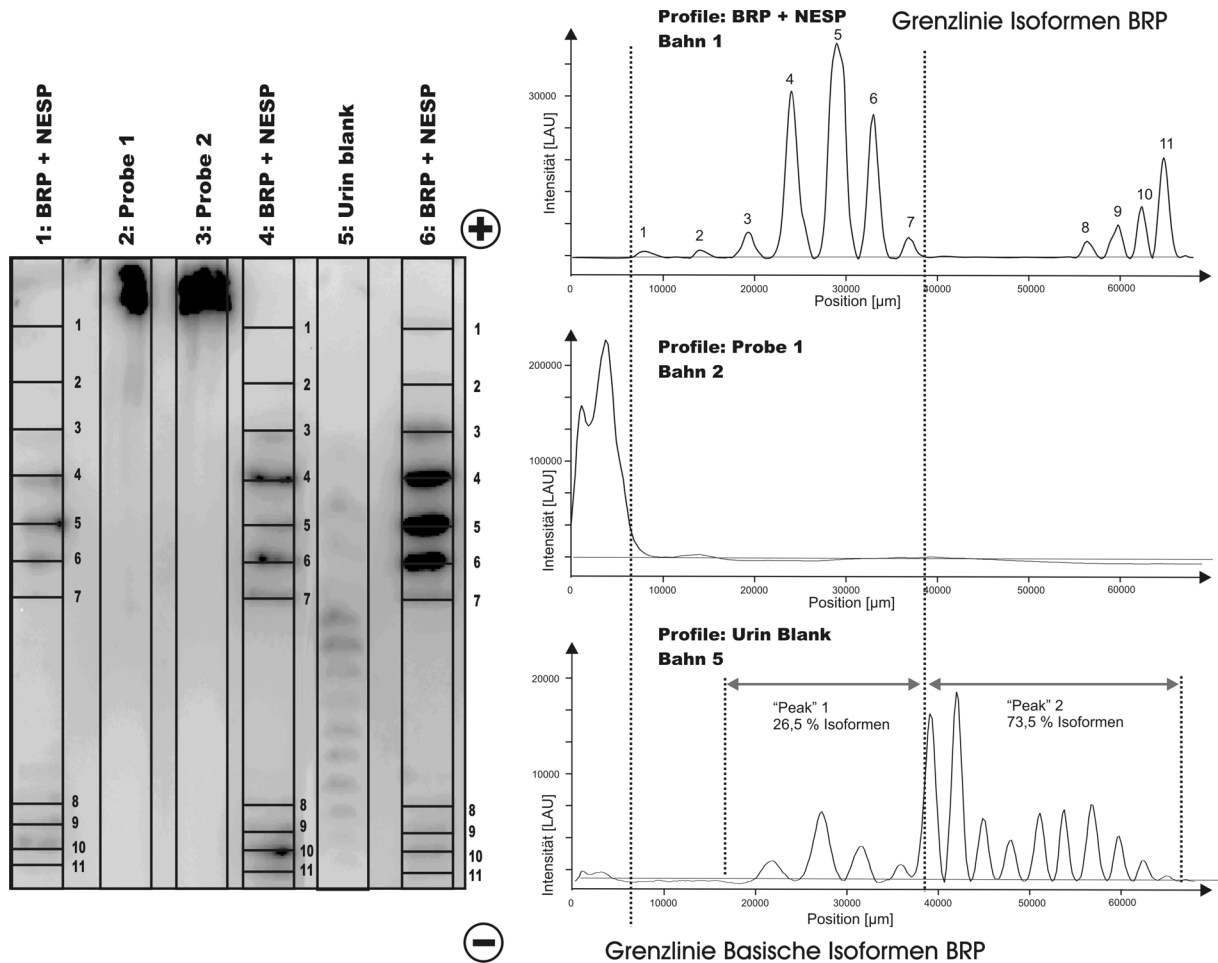


Abb. 82: Isoelektrisches Muster der Standardmischung rhEPO-Standard und NESP (Bahnen 1, 4 und 6), zweier Probenurine (Bahnen 2 und 3) und Kontrollurin (Blank, Bahn 5). Die Profile sind auf der rechten Seite nochmals einzeln dargestellt: **oben:** BRP-Standard 65 mU (500 pg) und NESP 1 ng, **Mitte:** Probe 1, **unten:** Urin blank. Die Intensitäten der Isoformen sind in Linear Arbitrary Units (LAU), der Maßeinheit des Kamerasystems (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH – Straubenhardt), angegeben. Die Positionen von Kathode (-) und Anode (+) sind dargestellt.

5 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit war, durch die Messung von Blutproben gut trainierter Athleten Normalwerte für hämatologische Parameter und korrelierende Faktoren im Serum zu finden. Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, eine Applikationsstudie mit rhEPO oder NESP durchzuführen, sollten durch den Vergleich von Literaturwerten vorangegangener Studien ^[1, 35, 95, 96, 106-111], bei denen gesunden Probanden rhEPO verabreicht wurde, mit den Normalwerten der im IDAS durchgeführten Studien Grenzwerte ermittelt werden. Zudem wurde versucht, nur Studien zu berücksichtigen, bei denen die EPO-Applikation etwa der eines realen Dopings entsprechen könnte, d. h. niedrige Dosen und zusätzliche Substitution von Eisen. Bei den im IDAS Kreischa durchgeführten Studien sollten u.a. auch Aspekte untersucht werden, die sich bei einer realen Dopingkontrolle ergeben, d. h. Veränderungen der Parameter durch den Zeitpunkt der Abnahme, der Einfluss von maximaler Belastung, die Probenstabilität und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Neben der Suche nach indirekten Parametern, welche möglichst schnell in der Praxis angewandt werden sollten, war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit, Untersuchungen zur direkten Analytik von Erythropoietin durchzuführen, wobei vorzugsweise eine massenspektrometrische Methode entwickelt werden sollte. Während dieser Arbeiten wurde von Lasne und de Ceauriz ^[2] eine Methode veröffentlicht, die auf einer IEF-Trennung und immunologischen Detektion basiert und mit der rekombinantes von humanem Erythropoietin unterschieden werden kann. Diese Methode wurde im IDAS aufgebaut und zusätzlich angepasst, um das neue Präparat ARANESP, ein modifiziertes Erythropoietin, ebenfalls damit erfassen zu können. Durch die Verfügbarkeit eines direkten Nachweises änderte sich auch das Untersuchungsziel bezüglich der Anwendung indirekter Parameter. Wie bereits im Abschnitt 1 beschrieben, war das Ziel der Auswertung aller Studien somit nicht mehr die Suche nach alleinigen Parametern zum Nachweis eines Erythropoietindopings, sondern Screeningparameter zur Vorauswahl von Urinproben für die direkte Analysenmethode (siehe Abschnitt 4.6.2) zu finden und damit gleichzeitig zusätzliche Information hinsichtlich der Beurteilung von positiven Befunden zu erhalten.

5.1 Grenzwerte für hämatologische Parameter und Serumparameter

5.1.1 Parameterfindung

Die Möglichkeit der Leistungssteigerung, d. h. Erhöhung der maximalen Sauerstofftransportkapazität durch eine Transfusion von Erythrozyten, führte schon in den 80er Jahren zu Diskussionen über das so genannte „Blutdoping“ [37, 41, 42, 46, 112]. Ab 1988 wurde dies auch vom IOC auf die Liste der verbotenen Wirkstoffe und Methoden gesetzt. Wegen der logistischen Probleme der Abnahme, Lagerung und Reinfusion bei autologer Transfusion bzw. den Risiken bei Fremdbluttransfusion kann davon ausgegangen werden, dass diese Methode jedoch nur sehr wenig angewandt wurde. Die Möglichkeiten zur Beeinflussung der maximalen Sauerstofftransportkapazität änderten sich schlagartig ab 1989 mit der Verfügbarkeit von gentechnisch hergestelltem Erythropoietin. Obwohl rekombinantes Erythropoietin seit 1992 ebenfalls vom IOC verboten ist, existierte keine Methode, um das rekombinante vom körpereigenen zu unterscheiden.

Von den Sportverbänden wurden lediglich grundlegende hämatologische Parameter als Präventivmaßnahme bestimmt. Anfang 1997 legte der Internationale Skiverband (FIS) nach der Bestimmung von hämatologischen Parametern einen Hämoglobingrenzwert von 16,5 g/dl bei Frauen und 18,5 g/dl bei Männern fest [46]. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten bei Skisportlern Maximalwerte von 21 g/dl bei männlichen und 19 g/dl bei weiblichen Athleten gemessen werden. Ebenfalls seit 1997 werden vom Internationalen Radsportverband (UCI) als Präventivmaßnahme vor dem Start von einer Anzahl ausgeloster Fahrer Blutproben hinsichtlich ihres Hämatokritwertes analysiert. Ab einem Wert von 50 % wird die Lizenz des Fahrers einbehalten, so dass dieser an dem Rennen nicht teilnehmen kann. Eine Nachuntersuchung erfolgt nach zwei Wochen; bei dauerhaft erhöhten Werten wird für den betreffenden Radsportler eine Ausnahmegenehmigung erteilt. Alle Überschreitungen der entsprechenden Grenzwerte gelten nicht als Dopingverstoß, sondern dienen nur zum Schutz der Gesundheit des Athleten.

Die Median- und Maximalwerte der Parameter Hämatokrit und Hämoglobin aller im IDAS Kreischa durchgeführten Studien sind in **Tab. 14** aufgeführt. Um diese Parameter zum Screening von Blutproben verwenden zu können, muss jedoch geklärt werden, inwieweit sie sich durch eine Applikation von rekombinantem Erythropoietin verändern.

Tab. 14: Zusammenfassung der Median- und Maximalwerte aller Studien für die Parameter Hämatokrit und Hämoglobin. Für die Populationsstudie wurden lediglich Werte der Ausdauerathleten berücksichtigt, bei den Belastungsstudien nur Werte nach der Belastung.

Studie	Männer Median (Maximum)		Frauen Median (Maximum)	
	Hämatokrit [%]	Hämoglobin [g/dl]	Hämatokrit [%]	Hämoglobin [g/dl]
Populationsstudie (Abschnitt 4.1.1)	44,6 (50,0)	14,9 (16,1)	41,0 (45,8)	13,8 (15,6)
Verlaufsstudie (Abschnitt 4.1.2)	45,8 (53,1)	15,8 (17,8)	41,8 (49,0)	14,0 (16,2)
Tagesstudie (Abschnitt 4.2.1)	43,4 (50,1)	15,5 (17,8)	39,3 (47,6)	13,4 (15,8)
Jahresstudie (Abschnitt 4.2.2)	44,3 (52,6)	15,1 (19,1)	40,8 (47,8)	13,6 (16,3)
Belastungsstudie – Marathon (Abschnitt 4.2.3)	47,6 (52,1)	15,6 (17,5)	41,7 (48,0)	13,8 (15,4)
Belastungsstudie – Rad- rennen (Abschnitt 4.2.3)	47,1 (52,6)	15,7 (18,2)	44,6 (49,0)	15,1 (16,3)
Verlaufsstudie – Zehnkampf (Abschnitt 4.3)	48 ,6 (56,2)	15,3 (16,9)	-	-
Routinekontrollen (Abschnitt 4.4)	43,7 (55,2)	15,2 (17,6)	39,2 (49,6)	13,5 (16,6)

Die Veränderung der beiden Parameter Hämatokrit und Hämoglobin entsprechender Applikationsstudien sind in **Abb. 83** dargestellt, wobei in den wenigsten Studien beide Parameter angegeben werden. Details der Studien (verabreichte Dosis rhEPO, Probanden, Substitution, etc) sind im Anhang 2 zu finden. Ein Nachteil der meisten Studien ist, dass lediglich der Fehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean) angegeben wird, der wesentlich kleiner als die Standardabweichung ist und im Grunde keine Aussage über die Streuung der Werte gibt^[86]. Die angegebenen Mittelwerte der Studien stimmen zum Beginn der Applikationszeit gut mit den ermittelten Median-Werten (**Tab. 14**) überein, lediglich die Hämoglobinwerte des einzelnen Athleten der Applikationsstudie von Casoni^[106] (**Abb. 83 E**) liegen für einen männlichen Athleten sehr niedrig. Auch bei mehreren Marathonveranstaltungen (Hamburg Marathon 2001-2003, Berlin Marathon 2001-2003) konnten, gerade bei den besten Marathonläufern der Welt, durchgängig niedrige Hämatokrit- und Hämoglobinwerte gemessen werden.

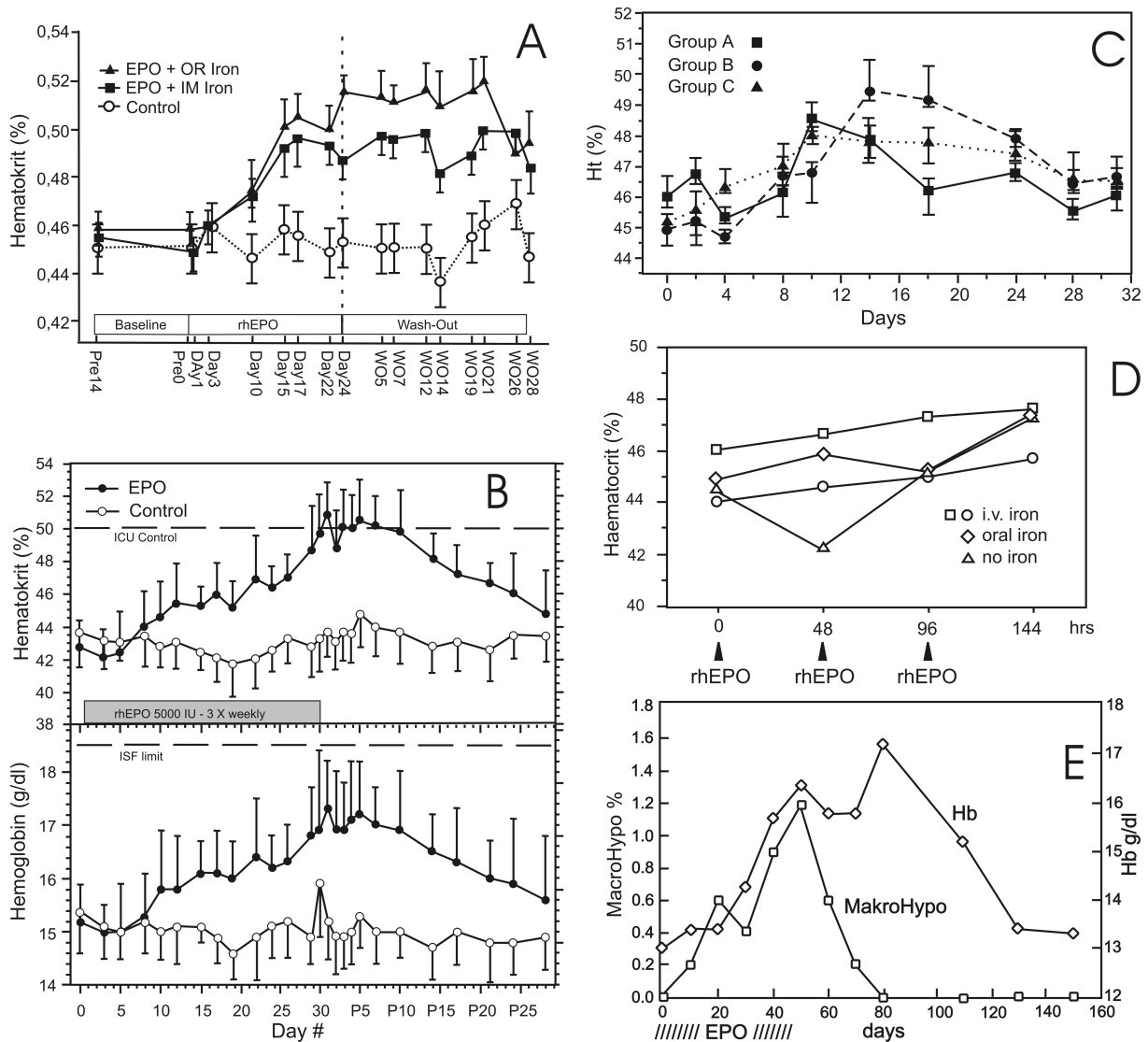


Abb. 83: Veränderung der Parameter Hämatokrit und Hämoglobin durch rhEPO-Applikation, zu den genaueren Details der Studien siehe Anhang 2; **(A)** Parisotto et al. ^[1], Mittelwert \pm SEM; **(B)** Birkeland et al. ^[110], Mittelwert \pm SD; **(C)** Magnani et al. ^[111], Mittelwert \pm SEM; **(D)** Breymann et al. ^[109]; **(E)** Casoni et al. ^[106]. Der Graph zeigt lediglich die Veränderung der Parameter eines Athleten, zusätzlich ist der Parameter Makrozyten dargestellt.

Anhand des Kurvenverlaufs lässt sich erkennen, dass erst nach einer mehrtägigen Applikationsphase der Mittelwert den von der UCI festgelegten Grenzwert von 50 % Hämatokrit eindeutig überschreitet (**Abb. 83 A** und **B**), in einer anderen Studie liegt der Mittelwert aller Gruppen eindeutig darunter (**Abb. 83 C**) und in einer weiteren (**Abb. 83 D**) sind die Änderungen zu gering, um den Hämatokritwert von 50 % zu überschreiten, was sich aber mit der geringen Applikationszeit erklären lässt. Nicht nur der Zeitraum der Applikation, sondern auch die Eisensubstitution (**Abb. 83 A**, i.m.-Verabreichung) und der zeitliche Abstand der Applikationen (**Abb. 83 C**; Gruppe A und C) führen dazu, dass ein Wert von 50 % nicht überschritten wird. Der Grenzwert von 18,5 g/dl Hämoglobin wird hingegen in keiner der Studien überschritten (**Abb. 83 B** und **E**). Bei allen Studien stellt sich jedoch die Frage, welche Erhöhung dieser

Parameter ein Athlet durch den Missbrauch von rhEPO erzielen muss, so dass damit auch eine gesteigerte Ausdauerleistung verbunden ist. Bei der ersten Studie ^[44], die sich mit dieser Thematik beschäftigte, konnte bei männlichen, trainierten Athleten eine Erhöhung der maximalen Sauerstofftransportkapazität und somit der Ausdauerleistung bei einer gleichzeitigen Veränderung des Hämoglobinwertes von $15,2 \pm 0,4$ g/dl auf $16,9 \pm 0,9$ g/dl festgestellt werden. Der Hämatokritwert erhöhte sich in diesem Zeitraum von $44,5 \pm 1,5$ % auf $49,7 \pm 1,9$ %. Eine weitere Studie ^[110] kam zu analogen Ergebnissen, der Verlauf der Hämatokrit- und Hämoglobinkonzentration ist in **Abb. 83 A** dargestellt. Bereits zehn Tage nach Beginn der Applikationen stieg die maximale Sauerstofftransportkapazität über die Werte der Kontrollgruppe und blieb mehr als drei Wochen nach der letzten Applikation deutlich erhöht. Auch in der Studie von Parisotto et al. ^[113] wurde ein Anstieg der maximalen Sauerstofftransportkapazität bei beiden Applikationsgruppen (**Abb. 83 A**) von über 6 % gefunden. Ein moderater Anstieg um wenige Prozent Hämatokrit respektive 1-2 g/dl Hämoglobin reichen somit aus, um die Ausdauerleistung bis zu drei Wochen nach der letzten Verabreichung von rhEPO auf einem künstlich erhöhten Niveau zu erhalten.

Gerade bei der FIS steht zum jetzigen Zeitpunkt das Problem, dass ein Screening der Blutproben am Wettkampfort (oder in äußerst geringem Umfang im Labor) hinsichtlich des Grenzwertes Hämoglobin durchgeführt wird, und erst beim Überschreiten dieses Wertes wird die korrespondierende Urinprobe auf rhEPO und NESP untersucht. Wie die Daten der Applikationsstudien zeigen ^[106, 110], wird jedoch durch moderate rhEPO-Dosen dieser Grenzwert nicht überschritten. Überträgt man die in diesen Studien ermittelte, durch rhEPO verursachte Erhöhung des Hämoglobinwerts auf die Daten der im IDAS durchgeführten Studien (**Tab. 14**), würde mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls keine Grenzwertüberschreitung stattfinden. Eine Veröffentlichung der FIS ^[114] zeigt, dass die Hämoglobinwerte von Skiathleten vor der Verfügbarkeit von rhEPO deutlich unter den Werten von Kontrollgruppen lagen, während danach, bis zur Einführung der Grenzwerte 1997, drastisch erhöhte Werte gemessen werden konnten. Nach der Einführung der Grenzwerte von 18,5 g/dl für Männer und 16,5 g/dl für Frauen wurden zwar die Maximalwerte von vor 1997 nicht mehr erreicht, die Hämoglobinwerte pendelten sich allerdings auf ein Niveau kurz unter den Grenzwerten ein und liegen damit signifikant über den Werten der Kontrollgruppen. Bei allen im IDAS durchgeführten Studien (**Tab. 14**) konnte jeweils lediglich eine Probe bei männlichen und weiblichen Athleten gefunden werden, die diesen Grenzwert überschritt.

Bei der Verwendung des Parameters Hämatokrit hingegen besteht das Problem, dass viele Athleten den festgelegten Grenzwert überschreiten ^[90, 115]. Zum aktuellen Zeitpunkt wird von verschiedenen Sportverbänden ein Hämatokritwert von 50 % bei Männern und 47 % bei Frauen

als Vorauswahl für die EPO-Bestimmung im Urin angewandt. Diese Werte wurden in fast allen Studien überschritten, besonders bei der Verlaufsuntersuchung des deutschen Zehnkampfteams wiesen einige Athleten zu Beginn der Trainingsphase (**Abb. 47**, erste Abnahme) Hämatokritwerte über 50 % auf.

Das grundlegende Problem bei der Anwendung der Parameter Hämatokrit und Hämoglobin ist vor allem, dass diese immer nur einen Überblick über alle Erythrozyten geben, d. h. die Gesamtleistung des sauerstofftransportierenden Systems, die jedoch eine natürlich bedingt große Spannweite aufweist. Weiterhin wird keine Aussage über das Blutvolumen und die Hämoglobinmasse getroffen, beide Parameter sind aber Konzentrationswerte und beziehen sich auf ein definiertes Volumen. Es existieren nur wenige Arbeiten ^[67, 68], die sich mit dieser Thematik beschäftigen. Übereinstimmend kommen diese zu dem Ergebnis, dass Ausdauerathleten über ein generell größeres Blutvolumen verfügen und damit bei gleicher Erythrozytenzahl geringere Hämatokrit- und Hämoglobinwerte aufweisen. Dies erklärt auch das oft als Sportanämie beschriebene Phänomen ^[98, 116-118]. Die Messung der Parameter Gesamtblutvolumen bzw. Hämoglobinmasse sind jedoch sehr aufwendig und damit für den Einsatz in der Dopinganalytik schlecht praktikabel. Die Gefahr besteht vielmehr darin, dass Ausdauerathleten, die niedrige Grundwerte (Hämatokrit, Hämoglobin) besitzen, durch moderate Dosen rhEPO ihre Ausdauerleistung erhöhen, ohne dass sie die Grenzwerte erreichen bzw. überschreiten. Beide Parameter, vor allem aber Hämoglobin, sind somit zum Screening vor Ort bzw. im Labor kaum geeignet um Urinproben für eine direkte Analyse zu selektieren. Demgegenüber steht die einfache und kostengünstige Messung sowie die leichte Erklärbarkeit und das Verständnis dieses Parameters. Dadurch ist jedoch auch jeder Athlet in der Lage die Messung selbst durchzuführen und den jeweiligen Parameter zu überwachen.

Damit stellte sich die Frage, welche Parameter besser geeignet wären, um Aussagen über eine veränderte Erythropoese zu erhalten. Bei der Verlaufsuntersuchung (Abschnitt 4.1.2) wurden erstmals Retikulozytenparameter von Hochleistungssportlern untersucht. Retikulozyten (siehe Abschnitt 3.2.1) und deren einzelne Parameter, besonders die jeweiligen Reifestadien, geben unter anderem einen Einblick in die aktuelle Erythropoese ^[9, 59, 65, 107], einen eventuellen Eisenmangel ^[29, 58, 60, 61, 119, 120] oder die Wirksamkeit einer EPO-Therapie bei Patienten ^[9, 29, 121-123]. Der Parameter Retikulozyten wurde erstmals 1932 von Heilmeyer et al. ^[124] zur Abschätzung der täglichen Hämoglobinproduktion beschrieben, bis in die 90er Jahre bestand jedoch das Problem der Bestimmung dieses Parameters. Bis dahin bestand die einzige Analysenmethode im Anfärben eines Zellausstriches und der Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop ^[9], wobei die übliche ausgezählte Zellzahl 1000 betrug. Da von dieser Anzahl bei einem gesunden Probanden nur ca. 10 Zellen als Retikulozyten eingestuft werden und der Großteil (~80 %)

davon nur noch geringe RNA-Reste besitzt, d. h. die Anfärbung nur sehr schwach ist, war diese Methode lediglich zur Bestimmung bei krankhaften Veränderungen geeignet, wo die absolute Retikulozytenzahl wesentlich höher liegt. Bereits 1993 wurde der Parameter Retikulozyten von Casoni et al. ^[106] bei einer Applikationsstudie hinsichtlich der Verwendung in der Dopinganalytik untersucht. Die Bestimmung erfolgte jedoch durch manuelles Auszählen und so konnte bei einer rhEPO-Applikation von 30 IU/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 45 Tagen lediglich eine Erhöhung von $1,16 \pm 0,68$ auf $2,53 \pm 1,61$ für den prozentualen Anteil der Retikulozyten an der Gesamtzellzahl gefunden werden. Auch bei einer weiteren Studie ^[93] erfolgte die Bestimmung der Retikulozyten in Hinblick auf die Suche nach geeigneten Parametern für die Dopingkontrolle noch manuell. Trotz einer fünfmaligen Verabreichung von 200 IU/kg Körpergewicht konnte eine Erhöhung der Retikulozyten von $1,08 \pm 0,81$ auf nur $1,36 \pm 0,68$ % gefunden werden. Aufgrund dieser geringen Veränderungen und des großen manuellen Zählfehlers (bis zu 40 % ^[9]) wurde daher dieser Parameter für die Dopinganalytik nicht weiter in Betracht gezogen.

Erst mit der Verfügbarkeit von Durchflusszytometern war eine reproduzierbare und genaue Messung der Retikulozyten und die Erfassung zusätzlicher Parameter, wie der Reifestufen und später der Zelleigenschaften, möglich ^[9, 62-64, 81, 121, 125-127]. Die Bestimmung der Retikulozyten erfolgte bei Applikationsstudien zur besseren Optimierung bzw. Wirksamkeit der Therapie mit Erythropoietin, aber auch zur Überwachung von Eisenmangelerscheinungen ^[29, 33, 35, 61, 65, 95, 96, 107, 122, 123, 128]. Die hohen Kosten der Geräteanschaffung und der Messung beschränkten den Einsatz jedoch auf wenige spezialisierte Labors.

Bei der 1999 begonnenen und im IDAS Kreischa durchgeführten Verlaufsuntersuchung (Abschnitt 4.1.2) wurden somit zum ersten Mal von Hochleistungssportlern Retikulozyten und Retikulozytenparameter, d. h. deren Reifestadien, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die damalige Zielstellung der Arbeit bestand in der Untersuchung von individuellen und allgemeinen Grenzwerten, da eine direkte Analysenmethode zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Die ermittelten Retikulozytenkonzentrationen der Studie und aller weiteren sind in **Tab. 15** zusammengefasst. Der prozentuale Anteil der Retikulozyten und die Retikulozytenkonzentration geben Auskunft über den gleichen Parameter, haben aber ein unterschiedliches Bezugssystem. Während sich die Retikulozytenkonzentration auf die Zellzahl pro Volumeneinheit bezieht, wird der prozentuale Anteil der Retikulozyten immer auf die Gesamtmenge an Erythrozyten berechnet. Je nach Erythrozytenkonzentration verschiebt sich somit bei gleicher Retikulozytenzahl der Wert. Da zudem bei dem größten Teil aller Applikationsstudien (**Abb. 84**) immer die Retikulozytenkonzentration angegeben ist und man diese aufgrund des

Bezugssystems nicht einfach umrechnen kann, wurden in dieser Arbeit immer beide Parameter angegeben.

Tab. 15: Zusammenfassung der Median- und Maximalwerte aller Studien für die Parameter prozentualer Anteil der Retikulozyten und Retikulozytenkonzentration. Bei den Belastungsstudien wurden die nach der Belastung ermittelten Werte angegeben. Die Daten der Verlaufsuntersuchung wurden mit dem R3000 bestimmt, alle weiteren mit dem ADVIA 120.

Studie	Männer Median (Maximum)		Frauen Median (Maximum)	
	Retikulozyten [%]	Retikulozyten [10 ⁹ /l]	Retikulozyten [%]	Retikulozyten [10 ⁹ /l]
Verlaufsstudie	1,0 (2,1)	48,2 (114,3)	1,0 (1,8)	44,8 (81,9)
Tagesstudie	1,2 (2,2)	61,8 (116,2)	1,2 (2,7)	53,9 (109,1)
Jahresstudie	1,4 (2,8)	73,8 (160,0)	1,5 (3,3)	67,8 (133,7)
Belastungsstudie – Marathon	1,6 (3,3)	76,3 (154,5)	1,4 (2,4)	60,0 (111,7)
Belastungsstudie – Radrennen	1,5 (2,0)	74,1 (100,5)	1,5 (1,8)	70,1 (87,6)
Verlaufsstudie –Zehnkampf	1,1 (1,8)	55,1 (86,5)	-	-
Routinekontrollen	1,4 (2,4)	74,2 (123,9)	1,5 (2,8)	67,1 (127,6)

Vergleicht man die in der Verlaufsuntersuchung gemessenen Werte mit dem Kurvenverlauf der in **Abb. 84** dargestellten Retikulozytenparameter aus zu diesem Zeitpunkt bekannten Applikationsstudien ^[35, 95, 107, 108], so stimmen die Medianwerte der DLV-Athleten gut mit den Startwerten der Applikationsstudien in **Abb. 84 B, C** und **D** überein, während die Mittelwerte in **Abb. 84 A** höher liegen. Bei diesen Studien erhöhen sich die Retikulozytenparameter durch die Applikation von rhEPO und liegen deutlich über den gemessenen Maximalwerten der DLV-Athleten. Lediglich bei der Studie von Major et al. ^[95] (**Abb. 84 A**) werden die Maximalwerte der männlichen DLV-Athleten nur geringfügig überschritten, allerdings wurde hier nur einmal eine Dosis von 300 IU/kg Körpergewicht appliziert.

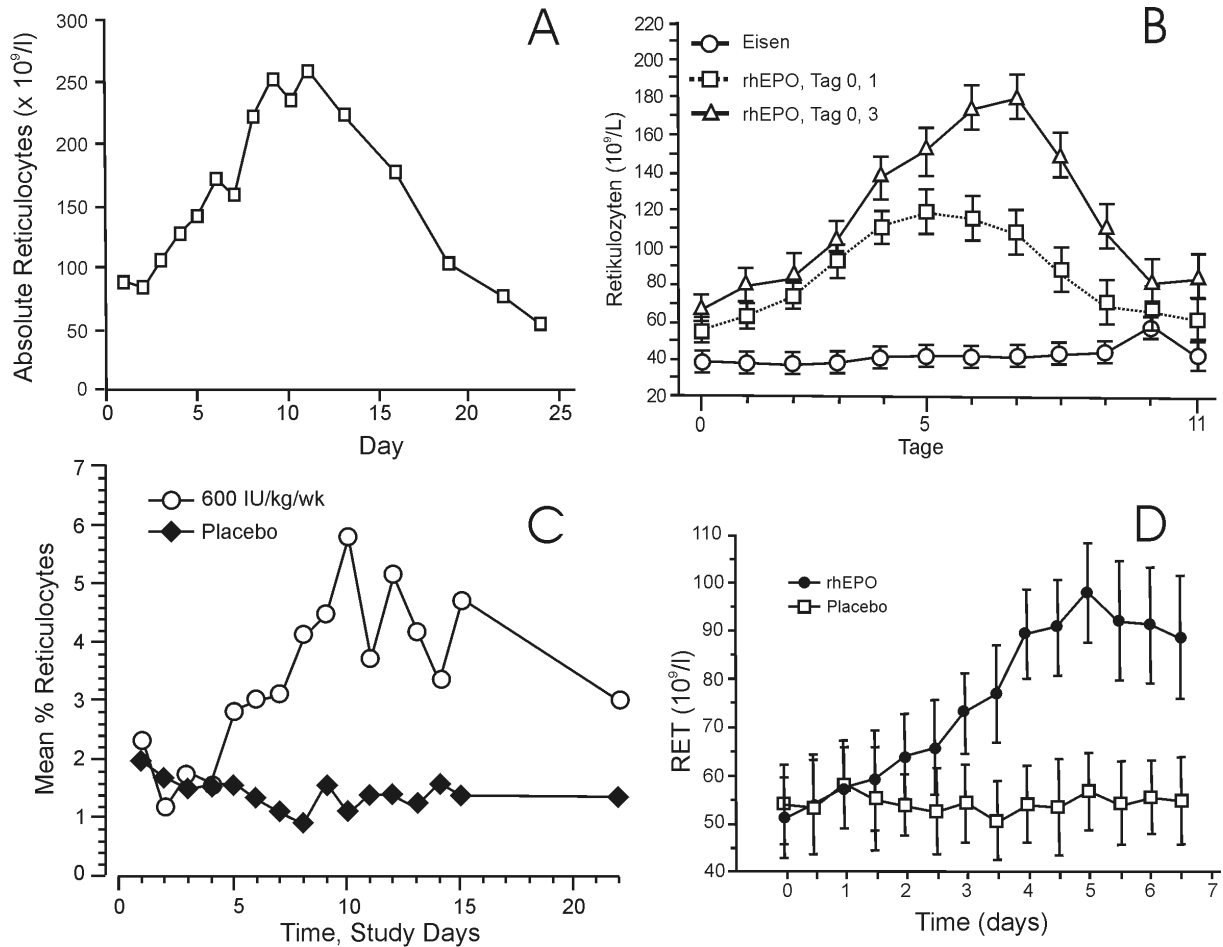


Abb. 84: Veränderung der Parameter Retikulozytenkonzentration und des prozentualen Anteils der Retikulozyten durch rhEPO-Applikation, zu den genaueren Details der Studien siehe Anhang 2; **(A)** Brugnara et al. ^[107], Mittelwert; **(B)** Breymann et al. ^[35], Mittelwert \pm SEM; **(C)** Cheung et al. ^[108], Mittelwert; **(D)** Major et al. ^[95], Mittelwert \pm SEM.

Weitere Parameter, die Aussagen über eine gesteigerte Erythropoese, d. h. eine Funktionsdiagnose des Knochenmarks, liefern können, sind die Reifestadien der Retikulozyten ^[64]. Da sich durch die Applikation von Erythropoietin die Reifezeit der Retikulozyten im Knochenmark von ca. vier Tagen auf lediglich zwei Tage verkürzt ^[122, 123], steigt der Anteil der unreifen hochfluoreszierenden Retikulozyten im Blut an ^[35, 95]; der Verlauf dieser Erhöhung ist in **Abb. 85 A** und **B** dargestellt. Die Maximalwerte von gesunden Personen für den Anteil an hochfluoreszierenden Retikulozyten liegen zudem niedrig ^[63, 129], so dass dieser Parameter gut geeignet scheint, um zusätzlich zu den Parametern prozentualer Anteil an Retikulozyten und Retikulozytenkonzentration Aussagen über einen rhEPO-Missbrauch zu liefern. Die Bestimmung dieses Parameters erfolgte mit dem in der Verlaufsuntersuchung verwendeten R3000; Median und Maximalwerte sind in **Tab. 16** aufgeführt. Die Bestimmung des in allen weiteren Studien verwendeten Parameters Retikulozythämatokrit war mit dem R3000 jedoch nicht möglich, so dass dieser Parameter für die Verlaufsstudie nicht ermittelt werden konnte.

Tab. 16: Zusammenfassung der Parameter HFR (Median und Maximalwerte) und Retikulozythämatokrit (Minimal- und Maximalwerte) aller Studien. Bei den Belastungsstudien wurden die nach der Belastung ermittelten Werte angegeben. Die Werte der Verlaufsuntersuchung wurden mit dem R3000 bestimmt, alle weiteren mit dem ADVIA 120.

Studie	Männer		Frauen	
	HFR [%] Median (Max)	Retikulozyt- hämatokrit Min-Max	HFR [%] Median (Max)	Retikulozyt- hämatokrit Min-Max
Verlaufsstudie	0,7 (3,3)	-	1,2 (3,2)	-
Tagesstudie	1,0 (13,3)	0,26-1,08	1,4 (10,5)	0,24-1,17
Jahresstudie	1,0 (8,6)	0,31-1,54	1,1 (10,2)	0,25-1,43
Belastungsstudie – Marathon	2,3 (4,0)	0,57-1,60	1,8 (3,8)	0,45-1,17
Belastungsstudie – Radrennen	1,4 (3,6)	0,46-1,04	1,5 (4,6)	0,49-0,94
Verlaufsstudie – Zehnkampf	2,2 (5,6)	0,29-0,88	-	-
Routinekontrollen	0,9 (4,8)	0,41-1,28	1,0 (3,4)	0,26-1,21

Vergleicht man die Maximalwerte der Verlaufsuntersuchung (**Tab. 16**) mit dem Kurvenverlauf in **Abb. 85 A** und **B**, so liegen diese deutlich unter denen der beiden Studien. Die Parameter prozentualer Anteil der Retikulozyten, Retikulozytenkonzentration und die Reifestufen der Retikulozyten, speziell der Anteil an hochfluoreszierenden Zellen, scheinen damit wesentlich geeigneter zu sein, um einen Missbrauch von rhEPO zu erfassen, als die Parameter Hämatokrit und Hämoglobin. Dies ist vor allem dadurch plausibel, da eine künstliche Steigerung der Erythropoese durch die Applikation von rhEPO immer zu einer erhöhten Produktion an Retikulozyten und einer verkürzten Reifezeit im Knochenmark führt ^[9, 35, 59, 65, 95, 107, 108, 121-123]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist es zwar möglich, durch die Wahl einer sehr niedrigen Dosis rhEPO die Steigerung der Erythropoese sehr gering zu halten, so dass Grenzwerte, die sich auf Retikulozytenparameter beziehen, nicht überschritten werden. Allerdings ist dann auch kaum der gewünschte Effekt zu erzielen, die körpereigene Erythrozytenzahl über das Niveau, das durch die natürlichen Prozesse möglich ist, zu erhöhen. In dem Abschlussbericht der Verlaufsuntersuchung an die Anti-Dopingkommission Deutschlands wurde daher die Verwendung von Retikulozytenparametern und dem löslichen Transferrinrezeptor (siehe weiter unten) empfohlen, es erfolgte jedoch keine Umsetzung.

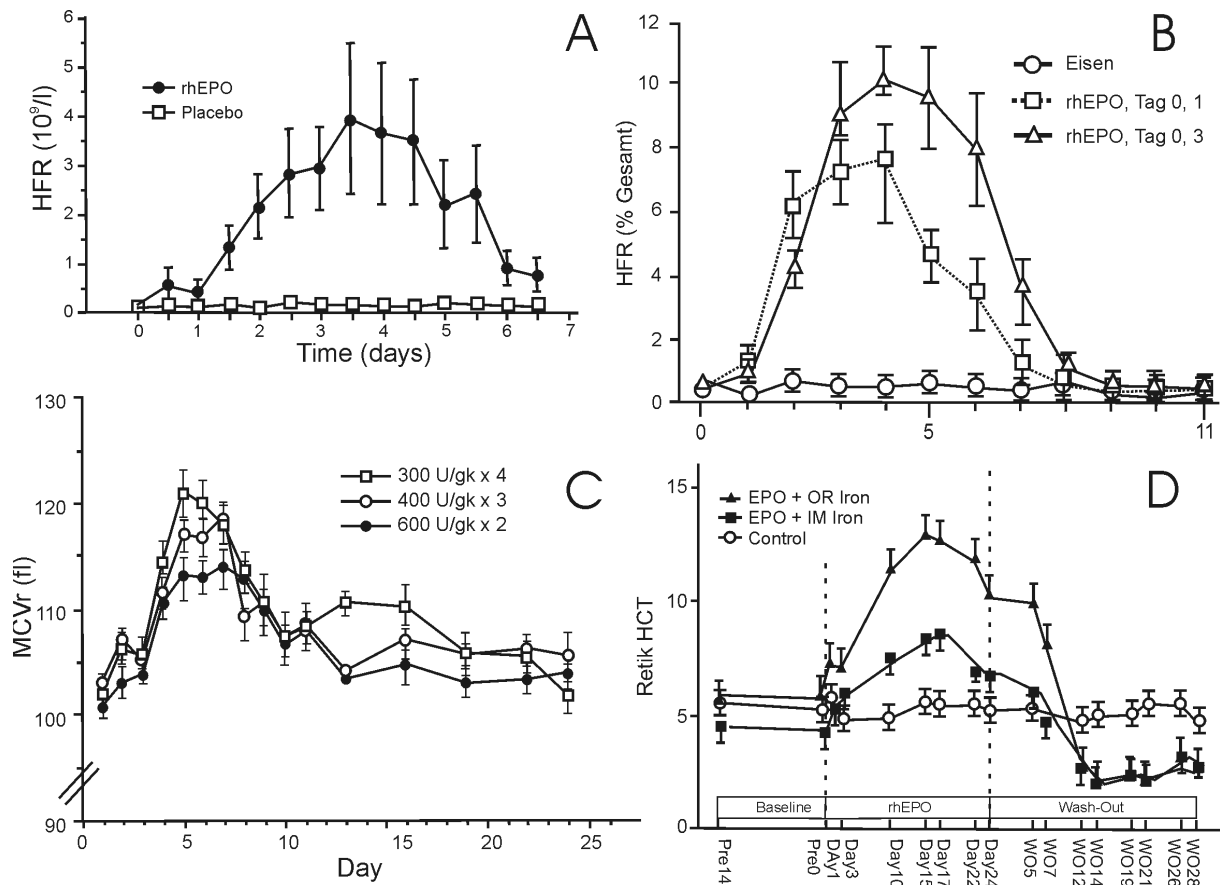


Abb. 85: Veränderung der Retikulozytenparameter durch rhEPO-Applikation, zu den genaueren Details der Studien siehe Anhang 2; **(A)** Major et al. ^[95], Konzentration hochfluoreszierender Retikulozyten, Mittelwert \pm SEM; **(B)** Breymann et al. ^[35], Anteil hochfluoreszierender Retikulozyten an der Gesamtkonzentration der Retikulozyten, Mittelwert \pm SEM; **(C)** Brugnara et al. ^[96], mittleres Zellvolumen der Retikulozyten, Mittelwert \pm SEM; **(D)** Parisotto et al. ^[1], Retikulozythämatokrit, Mittelwert \pm SEM. Der Wert wurde zur besseren Übersicht in der Originalpublikation mit dem Faktor 10 multipliziert.

In einer vom IOC unterstützten Kooperationsstudie zwischen den Dopinglabors Oslo, Köln und Kreischa sollten die bisher bekannten Parameter und wenn möglich neue hinsichtlich ihrer Validierung genauer untersucht werden. Ziel der Studien war unter anderem die Variationen über den Tag (Abschnitt 4.2.1), eines Jahres (Abschnitt 4.2.2) und den Einfluss von Belastung (Abschnitt 4.2.3) auf die indirekten Parameter zu untersuchen. Zu Beginn der Kooperationsstudie erfolgte die Veröffentlichung von Parisotto et al. ^[1], in der statistische Modelle vorgestellt wurden, um einen Missbrauch von rhEPO zu erfassen. Diese Modelle wurden zu den Olympischen Spielen 2000 in Sydney angewandt. Als neuer Parameter wurde der Retikulozythämatokrit eingeführt, der als Produkt aus Retikulozytenkonzentration und Retikulozytenvolumen berechnet wird. Zusätzlich wurde der Parameter Makrozyten (Zellen mit einem Zellvolumen größer als 120 fl) mit in die Berechnung der Modelle eingebunden. Für beide neue Parameter war die Bestimmung der einzelnen Zelleigenschaften, d. h. des Hämoglobingehalts und Zellvolumens, notwendig. Diese Analytik und damit die Anwendung der

statistischen Modelle erforderte die Anschaffung des neuen Hämatologiesystems ADVIA 120, da dies das einzige verfügbare Gerät war und ist, welches durch seine Aufkuglungstechnik (**Abb. 3**) diese Parameter bestimmen kann. In allen weiteren Studien wurde daher dieses System zur Analyse der Blutproben eingesetzt. Der Grund für die Verwendung des Parameters Retikulozythämatokrit war, dass sich bei einer rhEPO-Applikation nicht nur die Retikulozytenkonzentration durch eine schnellere Reifung erhöht, sondern auch das Zellvolumen dieser kürzer gereiften Retikulozyten größer ist. Diese Ergebnisse konnten bereits 1994 von Brugnara et al. ^[96] gefunden werden (**Abb. 85 C**), dem allerdings für seine Studie der Prototyp des ADVIA 120-Vorläufers H*3 zur Verfügung stand. Durch die Kombination der beiden Parameter Retikulozytenkonzentration und Zellvolumen ^[1] wurde der beobachtete Effekt verstärkt, außerdem bot der daraus resultierende Parameter Retikulozythämatokrit den Vorteil, dass er nach Ende der rhEPO-Applikationsphase deutlich unter die Ausgangswerte fiel. Ein niedriger Retikulozythämatokrit in Verbindung mit hohen Hämoglobin- und Hämatokritwerten ist ein Hinweis, dass ein Doping mit rhEPO stattgefunden haben könnte, siehe dazu auch die Diskussion der Multiparametermodelle (Abschnitt 5.2). Aufgrund dessen wurden in **Tab. 16** die Maximal- und Minimalwerte des Retikulozythämatokrits aufgeführt.

Vergleicht man die Mittelwerte der Retikulozytenkonzentrationen aller nach der Verlaufsuntersuchung durchgeführten Studien in **Tab. 15**, so stellt man fest, dass diese Werte generell höher sind. Die Ursache dafür ist der Wechsel des hämatologischen Systems, da mit dem ADVIA 120 systematisch höhere Retikulozytenwerte bestimmt wurden als mit dem R3000. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Abschnitt 4.5.2 dargestellt und werden nachfolgend in Abschnitt 5.3.2 diskutiert. Generell kann festgestellt werden, dass die Medianwerte der Studien sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Athleten gut übereinstimmen. Die einzige Studie die abweichende Werte zeigt, ist die Verlaufsuntersuchung des deutschen Zehnkampfteams. Die wahrscheinlichen Ursachen dafür sind die eng begrenzte und kleine Population sowie die strikte Trainingsausrichtung, während bei allen anderen Studien immer mehrere Sportarten vertreten waren, vor allem aber die Anzahl der untersuchten Probanden größer war. Lediglich bei den Maximalwerten ergeben sich größere Unterschiede zwischen den Studien (**Tab. 15**). Der Vergleich zwischen den Gruppen ist jedoch schwierig, da die Trainingsausrichtung und Trainingsintensität der Probanden der einzelnen Studien sehr unterschiedlich sind. Der wichtigste Faktor, der den größten Einfluss auf die Festlegung der Grenzwerte hat, sind die Routinekontrollen, die in den letzten drei Jahren durchgeführt wurden (Abschnitt 4.4). Es gibt bisher noch keine Veröffentlichung, die sich mit der Untersuchung von Retikulozytenparametern bei Hochleistungssportlern und der Frage des Einflusses unterschiedlicher Trainingsarten beschäftigt. Bis jetzt gibt es lediglich Untersuchungen zu den Basiswerten Hämatokrit und Hämoglobin ^[90, 91]. Vor allem bei der Tages- und Jahresstudie

konnten sehr hohe Werte für den Parameter hochfluoreszierende Retikulozyten gefunden werden. Dies hat zwei Ursachen: Zum einen besitzen einige der Probanden der Tagesstudie durchgängig hohe Werte dieses Parameters. Da diese zusätzlich an der Jahresstudie teilnahmen, konnten hier ebenfalls, wenn auch nicht über den gesamten Zeitraum, hohe Werte gefunden werden. Zum anderen führte die mehrmalige Blutabnahme innerhalb von 24 h zu einer geringen Stimulation des blutbildenden Systems, was sich anhand des empfindlichsten Parameters, den hochfluoreszierenden Retikulozyten, zeigt. Der Einfluss des Zeitpunkts der Abnahme wird in Abschnitt 5.1.2 diskutiert.

Im Gegensatz zu den anderen Retikulozytenparametern ergeben sich für die Messung zusätzlich zu den biologischen Schwankungen zwei grundlegende Probleme. Das erste besteht darin, dass kein Hersteller von Hämatologiesystemen Kontrollen anbietet, mit denen die korrekte Messung der Reifestadien überprüft werden kann. In verschiedenen Labors ermittelte Werte können daher nicht so einfach miteinander verglichen werden und es empfiehlt sich immer nur der Vergleich zwischen den Messungen, die mit dem gleichen System bestimmt wurden. Das zweite Problem ergibt sich aus den grundlegenden Eigenschaften dieses Parameters. Bei der Messung mit einem modernen Durchflusszytometer werden zwischen 30.000 und 40.000 Zellen/Erythrozyten je Bestimmung analysiert. Von dieser Zahl sind lediglich 1-2 % Retikulozyten, d. h. 300 bis 800 Zellen, von denen wiederum nur 1-4 % zur Fraktion der unreifen Zellen gehören, d. h. 3 bis 32 Zellen. Daran lässt sich erkennen, welche hohen Anforderungen an die Messoptik gestellt werden und dass eine Bestimmung dieses Parameters immer mehrmals erfolgen muss, um Fehler zu minimieren.

Die Makrozyten wurden sowohl von Breyman et al. ^[109] als auch von Parisotto et al. ^[1] erstmals 2000 als möglicher Parameter zur Erfassung eines rhEPO-Missbrauchs erwähnt. Bisher fand dieser Parameter lediglich hinsichtlich der Erkennung einer Eisenmangelerscheinung bei der Behandlung von Dialysepatienten mit rhEPO Beachtung ^[59, 119, 130, 131]. Dass die Substitution von Eisen einen wichtigen Einfluss besitzt, zeigt **Abb. 86 B**, da bei gleicher rhEPO-Dosis, aber fehlender Eisensubstitution eine signifikante Erhöhung der Makrozytenkonzentration erfolgt. Selbst bei einer Eisensubstitution und moderaten Dosen rhEPO ist die Bioverfügbarkeit des Eisens je nach Verabreichung unterschiedlich. Wie man anhand **Abb. 86 A** erkennen kann, ist bei einer oralen Aufnahme die Bioverfügbarkeit des Eisens gegenüber einer i.m.-Applikation erhöht. Trotzdem steigt bei beiden Applikationsgruppen die Konzentration an Makrozyten an, da es durch die rhEPO-induzierte, künstliche Steigerung der Erythropoese nicht mehr möglich ist, alle Zellen während ihrer Reifung ausreichend mit Hämoglobin zu versorgen.

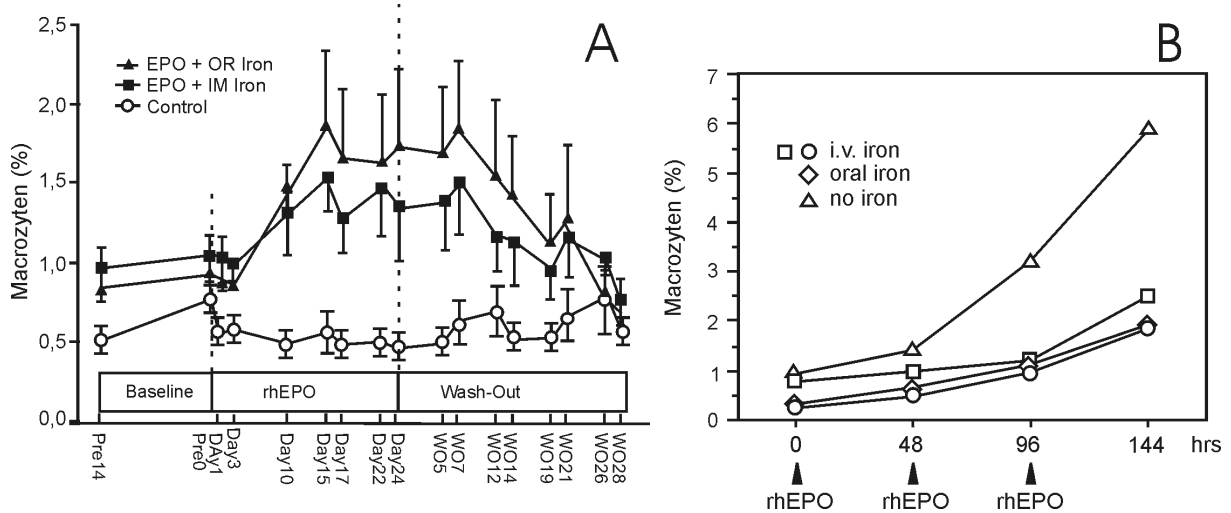


Abb. 86: Veränderung des Parameters Makrozyten durch rhEPO-Applikation, zu den genaueren Details der Studien siehe Anhang 2; **(A)** Parisotto et al. ^[1], Mittelwert \pm SEM; **(B)** Breymann et al. ^[109].

Zur Erfassung der Makrozyten ist ein Hämatologiesystem notwendig, welches Zellvolumen und Zellhämoglobin bestimmen kann, so dass dieser Parameter für die beiden ersten Studien (Populationsstudie und Verlaufsstudie) nicht zur Verfügung stand. Die Werte aller weiteren Studien sind in **Tab. 17** aufgeführt. Die hohe Sensitivität in Bezug auf Eisenmangelerscheinungen hat jedoch auch zur Folge, dass bei Probanden ohne eine ständige Eisensubstitution hohe Makrozytenwerte gemessen werden können. Gerade bei weiblichen Athleten ist häufig ein Eisenmangel festzustellen ^[58, 60, 120, 132-134]. Ein einfacher Parameter zur Bestimmung des Eisenspiegels ist Ferritin. Ferritin ist das Eisenspeicherprotein, welches den größten Anteil an gebundenem Eisen aufweist. Das in Ferritin gespeicherte Eisen steht zur Hämoglobinsynthese zur Verfügung, wobei allerdings der direkte Transport für die unmittelbare Hämoglobinsynthese über Transferrin und den Transferrinrezeptor erfolgt ^[54]. Gerade bei weiblichen Athleten lassen sich im Vergleich zu den männlichen Sportlern der gleichen Studien signifikant geringere Ferritinwerte beobachten (**Abb. 26**, **Abb. 36** und **Abb. 46**). Jedoch konnten auch während der Verlaufsuntersuchung bei einigen Sportlern des deutschen Zehnkampfteams geringe Ferritinwerte gemessen werden (**Abb. 50**). Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für die höheren Makrozytenwerte der Zehnkämpfer. Allerdings weisen auch einige Athleten mit als normal eingestuften Ferritinwerten (> 20 ng/ml) ^[58, 60, 120, 132-134] erhöhte Makrozytenkonzentrationen auf. Ob es sich hier dennoch um eine Eisenmangelerscheinung handelt, ist schwer zu sagen, da in der Literatur keine übereinstimmende Meinung existiert, ab welchem Ferritinwert ein Eisenmangel vorliegt.

Tab. 17: Zusammenfassung der Median- und Maximalwerte aller Studien für die Parameter Makrozyten und löslicher Transferrinrezeptor. Bei den Belastungsstudien wurden die nach der Belastung ermittelten Werte angegeben.

Studie	Männer Median (Max)		Frauen Median (Max)	
	Makrozyten [%]	sTfR [nmol/l]	Makrozyten [%]	sTfR [nmol/l]
Populationsstudie	-	19,6 (36,2)	-	20,5 (33,4)
Verlaufsstudie	-	19,7 (36,3)	-	13,8 (28,5)
Tagesstudie	0,2 (3,1)	17,2 (28,6)	0,4 (7,5)	17,6 (39,8)
Jahresstudie	0,3 (3,4)	18,2 (43,8)	0,5 (7,3)	18,1 (55,4)
Belastungsstudie – Marathon	1,4 (5,1)	16,5 (28,8)	2,0 (9,4)	15,5 (41,6)
Belastungsstudie – Radrennen	0,9 (5,8)	17,8 (22,9)	1,0 (5,4)	16,9 (24,4)
Verlaufsstudie – Zehnkampf	1,6 (6,7)	15,1 (20,2)	-	-
Routinekontrollen	0,1 (1,3)	19,4 (39,6)	0,2 (3,0)	17,9 (43,8)

Eisenmangelerscheinungen spielen bei Hochleistungssportlern jedoch nur eine geringe Rolle, da man bei diesen eher eine Eisenüberladung feststellen kann. Die überwiegende Anzahl der Athleten geben bei der Angabe der in den letzten 72 h eingenommenen Medikamente auf den Dopingkontrollformularen Eisenpräparate bzw. Spurenelemente an. Betrachtet man die Werte der weiblichen Athleten in **Abb. 54** sowie die der DLV-Athletinnen bei der Verlaufsuntersuchung (**Abb. 16**), findet man viele Proben, deren Ferritinkonzentration nur durch Substitution erreicht werden kann. Dies ist wahrscheinlich die Ursache, dass bei den Makrozytenwerten der Routinekontrollen (vergleiche **Tab. 17**) die niedrigsten Maximalwerte aller Studien gefunden werden konnten. Aber selbst diese relativ niedrigen Werte sind immer noch höher als die maximalen Makrozytenwerte, die durch rhEPO-Applikation erreicht werden (**Abb. 86**). Der Parameter Makrozyten ist daher allein nicht sinnvoll, sondern immer nur als Zusatzinformation zu sehen und am besten mit einer gleichzeitigen Bestimmung der Ferritinkonzentration zu ergänzen.

Bereits 1994 wurde in einer Veröffentlichung von Gareau et al. ^[53] der lösliche Transferrinrezeptor (sTfR) als möglicher Parameter vorgeschlagen, um einen Missbrauch von rhEPO zu erfassen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte aber lediglich der Vergleich der Werte gesunder Athleten mit denen rhEPO-behandelter Patienten. Der Transferrinrezeptor ist ein Transmembranglykoprotein, welches durch Interaktion mit dem Eisentransportprotein Transferrin Eisen durch die Zellmembran transportiert. Der genaue Mechanismus ist allerdings

noch nicht vollständig bekannt. Der sTfR ist ein Teilstück des Membranproteins, welches im Serum gefunden werden kann. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Konzentration des sTfR und der Gewebekonzentration des Transferrinrezeptors ^[54]. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass Veränderungen in der sTfR-Konzentration mit einer veränderten Erythropoese und/oder einem veränderten Eisenstatus assoziiert sind ^[135, 136]. In einer 1996 durchgeführten Applikationsstudie ^[55] an einer kleinen Gruppe Athleten konnten die eindeutigsten Veränderungen bei der Kombination sTfR und Ferritin gefunden werden. So eindeutig die Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt auch erschienen, das größte Problem bestand darin, die Notwendigkeit von Blutproben zum Zwecke der Dopingkontrolle zu verdeutlichen sowie die Reproduzierbarkeit der mittels immunologischer Messung bestimmten Ergebnisse zu garantieren (siehe dazu den nachfolgenden Abschnitt 5.3.1). Basierend auf diesem Ergebnis wurde ein Jahr später eine ausführliche Applikationsstudie durchgeführt ^[56], deren Ziel die genaue Untersuchung der Pharmakokinetik von rhEPO bei gesunden Probanden und die Festlegung von Grenzwerten für den sTfR und das Verhältnis sTfR zu Ferritin war. Die vorgeschlagenen Werte erwiesen sich jedoch nicht als praktikabel, da bei beiden Studien keine Eisensubstitution erfolgte. In einer nachfolgenden Veröffentlichung ^[94] wurden bei einem identischen Studienprotokoll mit zusätzlicher Eisensubstitution die vorgeschlagenen Grenzwerte nicht überschritten, da der Abfall des Ferritinwertes wesentlich geringer war. Als Bezugssystem wurde daher in der nächsten Studie ^[57] die Serumproteinkonzentration gewählt, was jedoch in keiner der weiteren Studien in Hinblick auf rhEPO und Doping angewandt wurde.

Beim Vergleich der sTfR-Werte mit Daten aus der Literatur ist zu beachten, dass diese mit dem gleichen Immunoassay bestimmt sein müssen oder zumindest abgesichert sein muss, dass die verwendeten Immunoassays vergleichbare Ergebnisse liefern. Für die Studien im IDAS Kreischa wurde zu Beginn der Quantikine-Assay, später der Advantage-Assay, dessen Ergebnisse gut mit denen des Quantikine übereinstimmen, verwendet (siehe dazu auch Abschnitt 5.3.1). Die beiden Studien von Parisotto et al. ^[1] und Magnani et al. ^[111], in denen ebenfalls der Quantikine-Assay verwendet wurde, zeigen beim Vergleich der Mittelwerte (**Abb. 87 A, C**) mit den Mittelwerten der in **Tab. 17** aufgeführten Studien eine gute Übereinstimmung.

Bei der dritten, in **Abb. 87 B** dargestellten Studie aus Norwegen ^[110] erfolgte die Bestimmung sowohl mit dem Orion- als auch dem Ramco-Assay, so dass nur der generelle Kurvenverlauf und nicht die Absolutwerte verglichen werden können. Alle Studien zeigen jedoch eindeutig, dass sich die sTfR-Werte durch die rhEPO-Applikation signifikant erhöhen. Damit stellt sich die Frage, ab welcher Konzentration die Werte nicht mehr als Normalwerte betrachtet werden können. Geht man davon aus, dass krankheitsbedingte Erhöhungen des sTfR bei Hochleistungsathleten keinen Einfluss haben, kann dennoch der Aspekt einer Eisenmangel-

erscheinung nicht außer Acht gelassen werden. Analog zu den Makrozytenwerten, können auch bei dem Großteil der in **Tab. 17** zusammengefassten Studien die höchsten sTfR-Werte bei den weiblichen Athleten gefunden werden. Im Gegensatz zu den Makrozyten sind die Variationen jedoch wesentlich geringer.

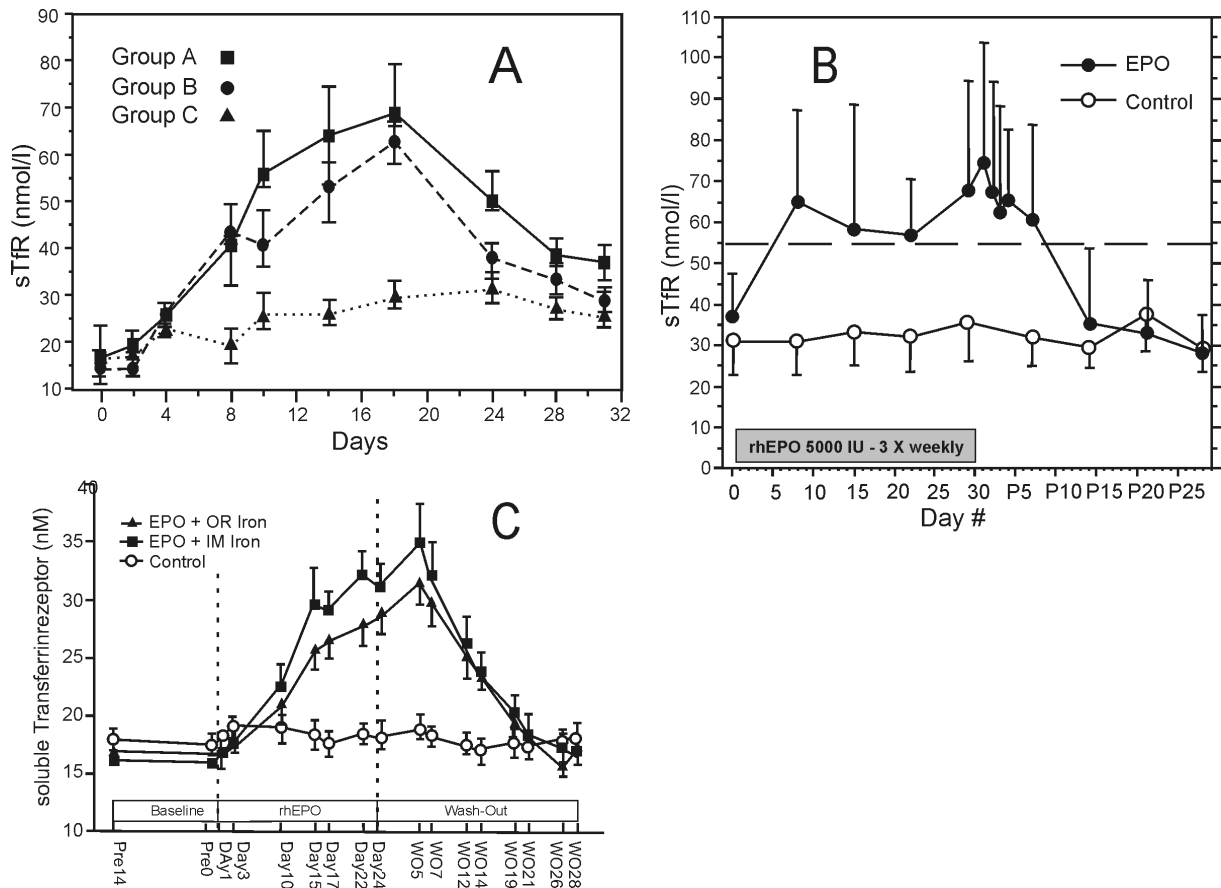


Abb. 87: Veränderung der Konzentration des sTfR durch rhEPO-Applikation, zu den genaueren Details der Studien siehe Anhang 2; **(A)** Magnani et al. ^[111], Mittelwert ± SEM; **(B)** Birkeland et al. ^[110], Mittelwert ± SD; **(C)** Parisotto et al. ^[1], Mittelwert ± SEM.

Vergleicht man die Literaturwerte und deren durch eine rhEPO-Applikation verursachten Veränderungen (**Abb. 83** bis **Abb. 87**) mit den gemessenen Werten der im IDAS Kreischa durchgeführten Studien (**Tab. 14** bis **Tab. 17**), so ist eindeutig zu erkennen, dass die Retikulozytenparameter und der lösliche Transferrinrezeptor am besten geeignet sind, um eine abnormale Erythropoese zu erkennen. Die Messung grundlegender hämatologischer Parameter, wie Hämatokrit und Hämoglobin, bedeutet zwar hinsichtlich der analytischen Bestimmung den geringsten apparativen Aufwand, die Aussagekraft dieser Werte in Bezug auf ein EPO-Doping ist allerdings beschränkt. Es stellt sich somit die Frage, wie eine globale Strategie aufgebaut sein sollte, d. h. welcher Parameter geeignet wäre und welche grenzwerte für diesen festgelegt werden sollten, um zum einen mit dem geringsten Aufwand eine möglichst große Zahl an Proben zu bearbeiten, zum anderen sicher zu stellen, dass eine auffällige Probe

auch als solche erkannt würde. Eine Zusammenfassung der relevanten Parameter und ein Vorschlag für eine globale Strategie wird in Abschnitt 5.4 vorgestellt.

5.1.2 Einfluss der Abnahmezeit

Um Grenzwerte für indirekte Parameter, die in der Dopinganalytik eingesetzt werden sollen, festzulegen, war es notwendig, die jeweiligen Parameter hinsichtlich ihrer individuellen Variation zu untersuchen. Im Gegensatz zu den durchgeführten Applikationsstudien ^[1, 35, 95, 96, 106-111] findet eine Dopingkontrolle nicht zu einer festgelegten Tageszeit statt. Damit war zu klären, inwieweit ein zirkadianer Rhythmus für die jeweiligen Parameter existiert, vor allem da sich insbesondere für Erythropoietin die Angaben in der Literatur widersprechen ^[69, 137-142]. Die Daten wurden dabei unter zwei Gesichtspunkten ausgewertet. Zum einen wurde untersucht, ob die individuellen Werte einen zirkadianen Rhythmus aufweisen, da auch immer wieder von verschiedenen Seiten die Fragestellung eines so genannten „Blutpasses“ aufgegriffen wird, d. h. inwieweit von einem Sportler ein individuelles Profil der hämatologischen Daten angelegt werden kann. Zum anderen stellte sich die Frage, ob ein vorhandener individueller zirkadianer Rhythmus so ausgeprägt ist, dass sich auch bei der Betrachtung der Daten als unabhängige Gruppen signifikante Unterschiede ergeben, die dann gegebenenfalls bei der Grenzwertfestlegung mit berücksichtigt werden müssen. Die Zusammenfassung in **Tab. 6** und die Grafiken in **Abb. 17** bis **Abb. 26** zeigen, dass lediglich für den Parameter Erythropoietin ein signifikanter zirkadianer Rhythmus existiert, der unabhängig von den individuellen Werten ist. Für die Parameter Hämatokrit, Hämoglobin, sTfR und Ferritin können sowohl bei Männern als auch bei Frauen, für den Parameter Makrozyten bei Männern und für den Parameter HFR bei den Frauen signifikante individuelle Veränderungen gefunden werden. Bereits 1989 wurde von Wide et al. ^[141] bei der Untersuchung von 27 Patienten ein zirkadianer Rhythmus gefunden. Die höchsten Werte für Erythropoietin konnten 20:00 Uhr gemessen werden, die niedrigsten am Morgen um 8:00 Uhr. Zu analogen Ergebnissen kamen Klausen et al. ^[139] 1993 bei dem Vergleich von gesunden trainierten und untrainierten männlichen Probanden. Auch Günenfelder et al. ^[140] konnten bei einer kleinen Gruppe Probanden, sowohl Männer als auch Frauen, eine eindeutige Variation des Serumerythropoietins über einen Zeitraum von 24 h feststellen, allerdings mit einem Maximum in den frühen Morgenstunden. Bei der Untersuchung einer größeren Probandengruppe von Männern und Frauen wurde von Pasqualetti et al. ^[142] ein Konzentrationsverlauf mit Maximalwerten am Nachmittag und Minimalwerten während der Nachtzeiten gefunden. Dem entgegen steht eine Studie von Roberts et al. ^[137], die bei einer Untersuchung von 26 gesunden Probanden keinerlei signifikante Veränderung für Erythropoietin finden konnten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Studie zeigt deutlich, dass ein zirkadianer Rhythmus für Erythropoietin bei gesunden trainierten und untrainierten, männlichen und weiblichen Probanden mit einem Maximum in den späten Abendstunden (20:00-23:00 Uhr)

existiert. Die Ursache für den zirkadianen Rhythmus sind Veränderungen im Sauerstoffgehalt des Blutes. Da eine Stimulation der Erythropoietinproduktion durch eine Hypoxämie im Gewebe ^[5, 23] erfolgt, ist die Erhöhung im Tagesverlauf höchstwahrscheinlich auf einen gesteigerten Sauerstoffbedarf zurückzuführen. Der verminderte Sauerstoffbedarf über Nacht, aufgrund eines verringerten Metabolismus, führt dann zu einem Abfall der Serumerythropoietinkonzentration. Bis heute ist jedoch nicht geklärt, ob diese Veränderungen auf einer Neuproduktion von Erythropoietin und Metabolisierung des nicht benötigten basiert oder ob eventuell eine Speicherung des Proteins im Gewebe erfolgt ^[23].

Untersuchungen zur zirkadianen Veränderung von hämatologischen Parametern sind in großem Umfang ^[138] durchgeführt wurden; zur speziellen Problematik der Schwankung grundlegender hämatologischer Parameter, wie Hämatokrit und Hämoglobin, bei Athleten gibt es dagegen nur eine geringe Anzahl von Arbeiten ^[69] bzw. zur Variation der Retikulozytenparameter gar keine. Die individuellen Schwankungen, die für Hämatokrit und Hämoglobin gefunden werden konnten, lassen sich auf Veränderungen des allgemeinen Flüssigkeitshaushaltes zurückführen ^[138]. Größere Schwankungen des Hämatokrits, wie von Schmidt et al. ^[69] bei einer kleinen Gruppe von Radsportlern innerhalb von 24 h beobachtet wurden, treten bei den in dieser Arbeit untersuchten Probanden nicht auf. Die individuellen Schwankungen der Makrozytenwerte lassen sich bei den männlichen Probanden wahrscheinlich ebenfalls auf Veränderungen des Flüssigkeitshaushaltes zurückführen, wie Hämatokrit und Hämoglobin. Dass bei den weiblichen Probanden keine signifikanten individuellen Veränderungen gemessen wurden, kann auf deren wesentlich höhere Makrozytenwerte zurückgeführt werden, welche geringfügige Veränderungen „abpuffern“.

Die Retikulozytenparameter der im IDAS Kreischa untersuchten Probanden der Tagesstudie bleiben alle über den gesamten Zeitraum unverändert, lediglich bei den weiblichen Probanden konnten individuelle Unterschiede gemessen werden. Die höchsten HFR-Werte wurden am Abend bei der Abnahme um 23:00 Uhr gemessen. Ursache dafür ist wahrscheinlich die bis dahin abgenommene Blutmenge, welches zu einer Stimulation des blutbildenden Systems führt. Diese lässt sich mit einer künstlichen Stimulation durch rhEPO vergleichen, die zu einer sofortigen Ausschüttung junger und mittlerer Retikulozyten führt, wobei die Freisetzung schneller erfolgt, als bei jeder anderen Stimulation der Erythropoese beobachtet werden konnte. Es wird vermutet, dass die Freisetzung aus einem kleinen intramedullären Reservoir erfolgt ^[95]. Bei der Untersuchung der zirkadianen Veränderung muss natürlich auch die Blutabnahme selbst als möglicher Einflussfaktor in Betracht gezogen werden. Die insgesamt abgenommene Menge betrug 72 ml, was im Vergleich zu den meisten anderen Studien ^[137, 139, 141, 142] sehr wenig ist.

Fasst man die zirkadianen Veränderungen zusammen, so lässt sich für eine Reihe von Parametern ein zirkadianer Rhythmus finden, der insbesondere bei der Diskussion um individuelle Grenzwerte eine Rolle spielt. Würde man von einem Athleten eine Art hämatologischen Pass anlegen, so wäre die Wahl einer festen Tageszeit für alle weiteren Probennahmen notwendig, da sich allein aufgrund des Zeitpunkts der Probennahme Variationen ergeben. Weitere Faktoren, wie eine Veränderung über einen längeren Zeitraum und der Einfluss von Belastung, sollen in Abschnitt 5.1.3 diskutiert werden. Der einzige Parameter, der einen zirkadianen Rhythmus unabhängig von der individuellen Betrachtung aufweist, ist Erythropoietin selbst, was in Übereinstimmung mit den meisten Studien der Literatur^[139-142] steht. Gegenteilige Ergebnisse^[137] können anhand der vorliegenden Daten nicht nachvollzogen werden. Für die Dopinganalytik besteht somit das Problem, dass bei Abnahmen, die am späten Nachmittag oder abends stattfinden, ein erhöhter Erythropoietinspiegel gemessen wird. Dies spielt zwar für die vorgeschlagenen Grenzwerte keine Rolle, jedoch bei der Anwendung der statistischen Multiparametermodelle, was gesondert in Abschnitt 5.2 diskutiert wird.

Im Gegensatz zu einer Reihe von Untersuchungen hinsichtlich eines zirkadianen Rhythmus gibt es nur eine äußerst geringe Anzahl von Studien^[115, 143] bezüglich der Variation hämatologischer Parameter, inklusive der Retikulozyten, für einen größeren Zeitraum. Die Mittelwerte der Parameter der Jahresstudie sind in **Tab. 7** aufgeführt und deren Veränderungen über den gesamten Zeitraum in **Abb. 27** bis **Abb. 36** graphisch dargestellt. Alle hämatologischen Parameter und Retikulozytenparameter zeigen sowohl eine signifikante individuelle Variation als auch eine signifikante Variation bei der Betrachtung der Daten als unabhängige Gruppen. Die Veränderung des hämatologischen Parameters Hämatokrit konnte auch von Schumacher et al.^[115] bei Eliteradsportlern beobachtet werden. Während bei dieser Studie die höchsten Werte im Zeitraum November bis Februar lagen, wurden bei den Probanden der Jahresstudie die höchsten Werte in den Sommermonaten (**Abb. 27** bis **Abb. 36**, Abnahmen 4 bis 6) gemessen. Analoge Ergebnisse konnten bei einer Studie aus Italien^[143] gefunden werden, an der eine große Anzahl Profifußballer teilnahm. Obwohl die untersuchten Zeiträume lediglich in drei zeitlich unterschiedliche Abschnitte eingeteilt wurden, konnte ein deutlicher Abfall der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte, beginnend im Zeitraum Juli bis September, beobachtet werden. Bei dieser Studie wurden auch Retikulozytenparameter und der lösliche Transferrinrezeptor bestimmt, allerdings gibt es keine Angaben mit welchen Hämatologiesystemen bzw. Immunoassays die Analysen erfolgten. Für einen Vergleich der Werte ist dies aber von Bedeutung^[144-146], worauf in den Abschnitten 5.3.1 und 5.3.2 noch genauer eingegangen wird, während die Parameter Hämatokrit bzw. Hämoglobin auch bei Verwendung unterschiedlicher Analytoren nur gering variieren.

Eine längerfristige Untersuchung der Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin von gesunden männlichen und weiblichen Athleten ist bisher nicht veröffentlicht worden. Im Gegensatz zu dem signifikanten zirkadianen Rhythmus der Tagesstudie sind die Erythropoietinwerte über den gesamten Untersuchungszeitraum der Jahresstudie stabil, während der sTfR bei männlichen und weiblichen Athleten eine signifikante Veränderung aufweist. Die zwei Maxima der männlichen bzw. ein Maximum der weiblichen Sportler (**Abb. 35**) erscheinen zunächst wie Ausreißer der immunologischen Bestimmung. Da aber sowohl die Kontrollen des Herstellers als auch die internen gepoolten Serumkontrollen (siehe 4.5.5) bei diesen Messungen keine erkennbaren Abweichungen zeigten, kann dies als Ursache ausgeschlossen werden. Der Parameter Ferritin, welcher als Eisenspeicherhormon vor allem von der Eisenaufnahme mit der Nahrung (keiner der untersuchten Probanden substituierte Eisen) abhängt, zeigte lediglich bei den männlichen Athleten eine signifikante Veränderung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Variation aller Parameter, mit Ausnahme des Erythropoietins, über den untersuchten Zeitraum eines Jahres besteht. Ein individueller hämatologischer Pass, wie er von verschiedenen Seiten vorgeschlagen wurde und wird, ist daher nicht sinnvoll. Da die individuellen Parameter sehr stark variieren, müssten damit wiederum Grenzwerte geschaffen werden, in denen diese Variationen noch als „normal“ gelten. Eine Diskussion zu der Problematik individuelle oder allgemeine Grenzwerte erfolgt in Abschnitt 5.4.

5.1.3 Einfluss von Belastung auf die Parameter

Schon länger ist bekannt, dass Ausdauersportler sehr niedrige Hämatokrit- und Hämoglobinwerte aufweisen, was als Sportanämie bezeichnet wird^[117]. Die ständig wiederholte und langandauernde Belastung führt zu einer Adaption des gesamten Blutkreislaufes und einer Veränderung der rheologischen Eigenschaften, wobei bis heute nicht alle dabei beteiligten Faktoren bekannt sind^[98, 99, 116, 147]. Für eine Anwendung von hämatologischen Parametern zum Screening bezüglich eines Missbrauchs von rhEPO oder analogen erythropoesesteigernden Verbindungen ist jedoch die Frage zu klären, wie sich eine akute Belastung auf die verwendeten Parameter auswirkt. In Veröffentlichungen^[1, 53, 55, 57, 66, 106, 112, 113], die sich mit der Anwendung von Grenzwerten für Blutparameter beschäftigen, wurde diese Problematik bisher nicht beachtet, d. h. alle Probenahmen wurden vor einer Belastung durchgeführt. In der Praxis besteht aber das Problem, dass bei Wettkampfproben nach dem Wettkampf oder bei Trainingskontrollen während eines Trainings, d. h. immer nach einer Belastung genommene Blutproben erhöhte Werte aufweisen können und somit eine Reihe von Athleten im Screening als falsch positiv bewertet würden. Um den Einfluss einer Wettkampfbelastung zu untersuchen,

wurden Blutproben von gut trainierten Männern und Frauen vor und nach einem Marathon bzw. einem Radrennen untersucht.

Hämatokrit und Hämoglobin sind Parameter, die von einer zunehmenden Anzahl von Sportverbänden als Teilnahmekontrolle vor einem Wettkampf oder als Vor-Ort-Screening zur Auswahl für eine Urinuntersuchung (siehe Abschnitt 4.6.2) verwendet werden. Dies ist höchstwahrscheinlich auch die Ursache, dass sich die Hämatokrit- und Hämoglobinkonzentrationen bei Athleten bestimmter Sportverbände signifikant verringert haben^[90, 114, 148] und Grenzwerte kaum noch überschritten werden. Dabei werden für vor und nach dem Wettkampf genommene Proben, also unabhängig von der Belastung, die gleichen Grenzwerte verwendet. Veröffentlichte Untersuchungen kommen hinsichtlich der Auswirkung einer Belastung zu sehr differierenden Ergebnissen. Bodary et al.^[149] fanden bei der Untersuchung von zehn männlichen trainierten Läufern nach mehreren Belastungstests eine signifikante Erhöhung des Hämatokrit- und Hämoglobinwertes. Zu analogen Ergebnissen kamen Schmidt et al.^[69] bei einem Ausdauerbelastungstest von untrainierten Probanden, wobei nach einer Stunde Erholung die Ausgangswerte wieder erreicht wurden. Bei der ebenfalls von Schmidt et al. durchgeführten Untersuchung von Hochleistungsradsportlern während eines zehntägigen Radrennens (1700 km gesamt) wurde hingegen ein Abfall der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte bis zum fünften Tag des Rennens festgestellt, danach blieben die Werte konstant auf einem niedrigen Niveau. Gleichzeitig mit der Verringerung der hämatologischen Parameter stieg das Plasmavolumen der Radsportler an^[69], was den Abfall der konzentrationsbedingten Werte erklärt. Ebenfalls eine Erhöhung der hämatologischen Werte nach einer einstündigen Gesamtbelastung (30 min Maximalbelastung) von mäßig trainierten Athleten konnte von Robinson et al.^[150] gefunden werden.

Der Einfluss der Belastung scheint direkt mit der Trainingsbelastung der untersuchten Probanden zu korrelieren, d. h. je besser der Sportler trainiert ist, desto besser ist der Blutkreislauf an eine Belastungssituation angepasst. Dies erklärt, dass bei den untersuchten männlichen Probanden sowohl beim Marathon als auch beim Radrennen keine Veränderung der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte gemessen werden konnte (**Tab. 8**). Auch bei den weiblichen Athleten zeigen sich lediglich bei einer individuellen Auswertung nach dem Marathon signifikante Unterschiede bei beiden Parametern, die Belastung durch das Radrennen hat keine Auswirkung (**Tab. 9**). Die Belastung war anscheinend zu gering für die untersuchten Probanden, so dass keine gravierende Veränderung des Plasmavolumens erfolgte, wie es bei einem mehrtägigen Radrennen beobachtet werden konnte^[69]. Einschränkend muss natürlich immer beachtet werden, dass bei Extrembelastungen, wie sehr langen Rennen (mehrfache Marathondistanzen), oder großem Flüssigkeitsverlust dennoch auch bei sehr gut trainierten

Athleten eine Erhöhung der hämatologischen Parameter gefunden werden könnte. Dies dürfte jedoch nur sehr selten eintreten, da unter den seit 2001 im IDAS untersuchten Proben auch die der Sieger der beiden wichtigsten Marathonläufe in Deutschland, dem Hamburg und dem Berlin Marathon, analysiert wurden und die entsprechenden Werte für Hämatokrit und Hämoglobin im Gegenteil sehr niedrig waren.

Obwohl sich, wie oben aufgeführt, kein Einfluss der Belastung bei den untersuchten männlichen Athleten beobachten lässt, kann eine individuell signifikante Erhöhung der Makrozyten sowohl nach dem Radrennen als auch nach dem Marathon gefunden werden. Die Ursache ist wahrscheinlich eine Veränderung des Blut-pH-Wertes und der Plasmaosmose, die zu einem Anschwellen der Zellen führt. Da die Einteilung in Makrozyten aufgrund des Zellvolumens erfolgt, wäre dies eine mögliche Erklärung, allerdings kann bei den beiden Belastungsstudien dieser Arbeit keine Veränderung des MCV der männlichen Athleten gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der Makrozytenwerte könnte eher mit der Ausschüttung von Retikulozyten, die ein größeres Zellvolumen als die fertig gereiften Erythrozyten aufweisen, erklärt werden, als mit einer Veränderung der Zellen. Nachfolgend wird darauf noch eingegangen.

Retikulozyten und damit verbundene Parameter sind die wahrscheinlich beste Möglichkeit, um Proben im Screening zu selektieren und einen eventuellen Missbrauch von rhEPO zu erfassen. Durch die Belastung verursachte Veränderungen des Plasmavolumens haben zudem auf die meisten Retikulozytenparameter keinen Einfluss, was auch in der einzigen Studie ^[150], die sich mit dem Einfluss von Belastung auf Retikulozytenparameter beschäftigte, bestätigt werden konnte. Die Bestimmung der Retikulozyten erfolgte dort mit einem CD 4000, welches lediglich die Retikulozytenkonzentration und den Quotienten aus unreifen Retikulozyten und der Retikulozytengesamtzahl bestimmt. Das bei den im IDAS Kreischa durchgeführten Studien verwendete ADVIA 120 bestimmt hingegen eine wesentlich größere Anzahl an Retikulozytenparametern, vor allem Einzelzellparameter. Dass Belastung auf das erythropoetische System einen Einfluss hat, kann daher an den Retikulozytenparametern sowohl bei den männlichen (**Tab. 8**) als auch den weiblichen (**Tab. 9**) Athleten festgestellt werden. Besonders die Belastung durch den Marathon führt bei den Männern nicht nur zu einer signifikanten Veränderung der individuellen Werte, auch bei der unabhängigen Auswertung konnte eine signifikante Erhöhung gefunden werden. Nicht nur die Erhöhung der Retikulozytenkonzentration, des prozentualen Anteils an Retikulozyten und dem damit verbundenen Retikulozythämatokrit, sondern vor allem eine signifikante Erhöhung der HFR-Werte (**Abb. 42**) lässt sich bei den männlichen Marathonläufern feststellen. Auch bei den männlichen und weiblichen Radsportlern erhöhen sich die HFR signifikant. Hingegen können

für die weiblichen Marathonläufer lediglich individuelle Veränderungen der Retikulozytenparameter beobachtet werden. Die Veränderungen der Retikulozytenwerte lassen sich nur mit einer unmittelbaren Stimulation des erythropoetischen Systems und einer unmittelbaren Freisetzung von Retikulozyten in die Blutbahn erklären, da eine gesteigerte Retikulozytenproduktion sich frühestens nach 24 h auswirkt ^[95]. Eine analoge Freisetzung von Retikulozyten, vor allem unreifen, konnte bei einer Applikation von rhEPO beobachtet werden, wobei die dabei gemessene Erhöhung der HFR größer war. Es ist anzunehmen, dass der gleiche Mechanismus der Stimulation zugrunde liegt, der je nach der Belastung bei den Probandengruppen jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Erhöhung der Retikulozytenkonzentration ist höchstwahrscheinlich auch die Ursache für die Erhöhung der Makrozytenwerte, da die jungen Retikulozyten ein größeres Zellvolumen besitzen, welches sich im Verlauf des Reifeprozesses verringert ^[9]. Bei der Messung und Einstufung der Makrozyten werden ebenfalls die Retikulozyten mit erfasst, so dass eine Erhöhung dieser sich auch auf den Anteil Makrozyten auswirken kann, wenn die Zellen größer als 120 fl sind.

Untersuchungen hinsichtlich der Auswirkung einer Belastung sind für die drei Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin nur in geringem Umfang veröffentlicht und beziehen sich vor allem auf männliche Probanden. Bei diesen Studien ^[150-152] konnte kein Einfluss der Belastung auf die Erythropoietinkonzentration gefunden werden, was auch bei den untersuchten männlichen Athleten festgestellt werden konnte. Hingegen bei den weiblichen Athleten, besonders den Marathonläuferinnen, wurde ein signifikanter Anstieg der Erythropoietinkonzentration beobachtet, während sich bei den Radsportlerinnen nur die individuellen Werte erhöhten. Bezüglich des Einflusses von Belastung auf den sTfR gibt es keine übereinstimmende Meinung in der Literatur. Während Robinson et al. ^[150] eine deutliche Erhöhung bei männlichen Athleten fanden, die sich nicht für alle Sportler mit einer Veränderung des Plasmavolumens erklären lässt, war die Erhöhung bei weiblichen Athleten nach einem Triathlon nur sehr gering und nach Korrektur des Plasmavolumens nicht mehr signifikant ^[153]. Eine ebenfalls nur sehr geringe Erhöhung konnte von Schumacher et al. ^[154] nach einem Ausdauerstest bis zur maximalen Belastung bei untrainierten und mäßig trainierten Probanden gefunden werden. Bei den im IDAS Kreischa untersuchten Probanden konnte nach dem Belastungstest hingegen lediglich eine individuelle Erhöhung der sTfR-Konzentration der männlichen Radsportler gemessen werden. Eine individuelle Erhöhung der Ferritinkonzentration nach Belastung kann für alle Athleten gefunden werden (**Tab. 8** und **Tab. 9**), was in Übereinstimmung mit Daten der Literatur steht ^[154].

Für den Einfluss der Belastung auf die relevanten Parameter lassen sich kaum generelle Aussagen treffen. Die von einigen Autoren ^[69, 143, 150, 155] befürchtete Verfälschung der bisher

verwendeten hämatologischen Parameter Hämatokrit und Hämoglobin wirkt sich bei entsprechend gut trainierten Athleten kaum aus bzw. führt zur Verringerung dieser Werte. Anscheinend kann davon ausgegangen werden, dass sich durch ein gezieltes Ausdauertraining das gesamte kardiovaskuläre System an die entsprechende Belastung anpasst. Der Einfluss auf alle weiteren Parameter der Retikulozyten, Erythropoietin, sTfR und Ferritin ist je nach untersuchter Probandengruppe sehr unterschiedlich. Dies verdeutlicht umso mehr, wie schwierig die Festlegung eines „hämatologischen Passes“ für einen Athleten wäre, da der Faktor Belastung zusätzlich berücksichtigt werden müsste.

5.2 Verwendung von Multiparametermodellen

Die Kombination mehrerer Parameter zur Detektion eines Missbrauchs von rhEPO wurde bereits 1994 von Gareau et al. ^[53] vorgeschlagen, wobei das Verhältnis von sTfR zu Ferritin verwendet werden sollte. Der Grenzwert für diesen Quotienten wurde in einer späteren Studie ^[56] um einen Grenzwert für den sTfR erweitert. Aufgrund des für die Bestimmung des sTfR verwendeten Immunoassays konnten die Werte jedoch nicht auf die im IDAS untersuchten Proben übertragen werden. Die Verwendung des Quotienten aus sTfR und Ferritin erwies sich als nicht praktikabel, da bei den Applikationsstudien ^[53, 56] zu dessen Bestimmung die Substitution von Eisen nicht berücksichtigt wurde. Eine spätere Applikationsstudie ^[94] zeigte, dass bei einem identischen Studienprotokoll mit zusätzlicher i.v.-Verabreichung von Eisen, Vitamin B12 und Folsäure der vorgeschlagene Quotient aus sTfR und Ferritin nicht überschritten wurde. Als neues Bezugssystem wurde daher von Audran et al. ^[57] das Verhältnis von sTfR zum Gesamtproteingehalt in Verbindung mit der sTfR-Konzentration vorgeschlagen, was sich aber in der Praxis ebenfalls nicht als anwendbar erwies. Die in dieser Studie gemessene Retikulozytenkonzentration wurde in die abschließende Auswertung nicht mit einbezogen. Mit den beiden statistischen „ON“- und „OFF“-Modellen von Parisotto et al. ^[1] wurde erstmals nicht nur versucht, eine akute Applikation von rhEPO zu erfassen, sondern auch den Zeitraum nach einem Missbrauch. Diese beiden Modelle wurden zu den Olympischen Spielen 2000 in Sydney als Screeningmethode eingesetzt, sowie für die Routinekontrollen, die im IDAS Kreischa von 2001 bis Ende 2002 analysiert wurden, verwendet. In diesem Zeitraum wurde bei einer Probe mit dem „OFF“-Modell ein positives Ergebnis berechnet. Die Untersuchung der korrespondierenden Urinprobe im Laboratoire National de Dépistage du Dopage konnte aufgrund der geringen Erythropoietinkonzentration der Probe kein eindeutiges Ergebnis liefern. Die statistischen Modelle lassen sich jedoch, trotz der guten Übereinstimmung zwischen dem in der Studie verwendeten Quantikine-Assay und dem im IDAS benutzten Advantage-Assay für die Bestimmung des sTfR (siehe Abschnitt 5.3.1), nicht problemlos in der Routine anwenden. Die Berechnung für die im IDAS durchgeführten Studien und Routinekontrollen mit diesen Modellen zeigt insbesondere bei dem „ON“-Modell, d. h. Markern

einer erhöhten Erythropoese, eine Reihe von falsch positiven Analysen (**Abb. 88**), während für das „OFF“-Modell keine positiven Ergebnisse, von dem oben erwähnten abgesehen, gefunden wurden.

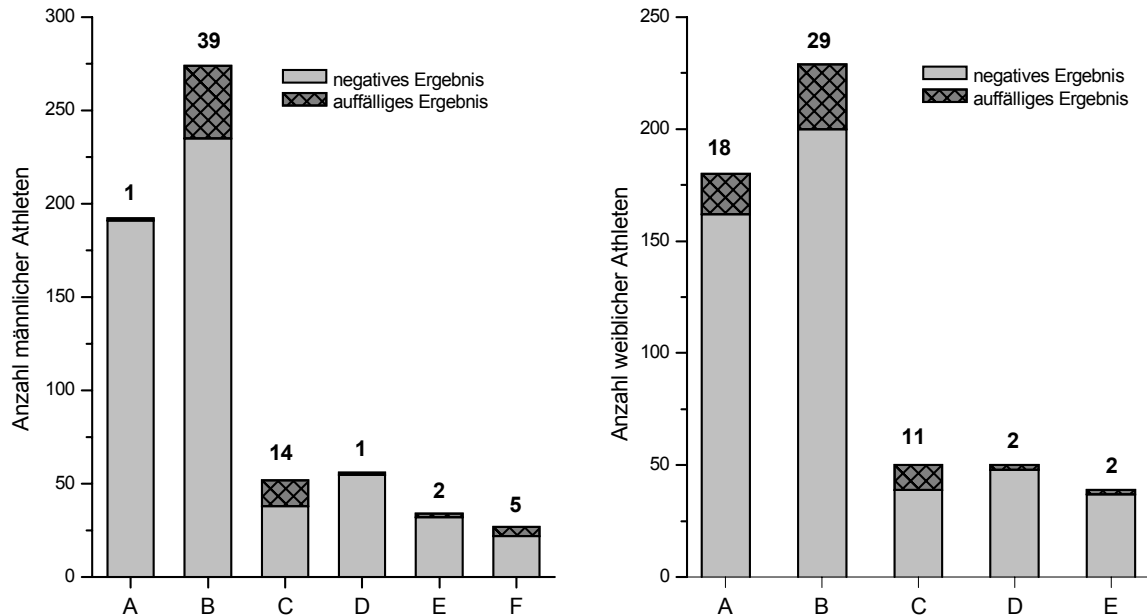


Abb. 88: Anteil der auffälligen Proben der untersuchten Probanden nach Berechnung mit dem „ON“-Modell ^[1], unterteilt nach Geschlecht und Studien (A = Tagesstudie; B = Jahresstudie; C = Belastungsstudie Marathon; D = Belastungsstudie Radrennen; E = Routinekontrollen; F = Verlaufsuntersuchung des Zehnkampfteams). Die Anzahl der auffälligen Proben (Wahrscheinlichkeit > 0,99) ist zusätzlich als Zahl oberhalb des jeweiligen Balkens dargestellt.

Damit stellt sich die Frage, ob diese Ergebnisse falsch positiv oder wirklich auffällig sind, d. h. die untersuchten Probanden rhEPO genommen haben. Bei den Probanden der Tages- und Jahresstudie, die zum überwiegenden Teil Studenten der Deutschen Sporthochschule Köln waren, kann ausgeschlossen werden, dass ein Doping mit rhEPO stattgefunden hat. Analoge Schlüsse lassen sich für die Probanden der Belastungsstudien – Marathon und Radrennen – ziehen, da die untersuchten Athleten alle Amateursportler waren. Da die Teilnahme an dieser Untersuchung auf freiwilliger Basis erfolgte, wäre ein Missbrauch, vor allem bei einer solch großen Anzahl an Sportlern, sehr unwahrscheinlich. Am wahrscheinlichsten wäre ein Missbrauch von rhEPO bei den untersuchten Spitzensportlern der Routinekontrollen, bei denen auch eine geringe Zahl an auffälligen Ergebnissen mit dem statistischen „On“-Modell gefunden wurde. Alle auffälligen Proben und auch Proben, deren Berechnungen der statistischen Modelle Werte nahe eines auffälligen Ergebnisses lieferten, wurden mit der direkten Methode (Abschnitt 3.6.3) analysiert, wobei der Verdacht eines EPO-Dopings widerlegt wurde. Unsicherheit bezüglich falsch positiv Werte besteht vor allem bei den Ergebnissen der Verlaufsuntersuchung der Zehnkampfathleten, da zu diesem Zeitpunkt die Urinanalytik auf EPO im IDAS Kreischa

noch nicht etabliert und auch weltweit noch nicht anerkannt war, so dass demzufolge keine Urinproben von den Athleten abgenommen wurden. Da diese Untersuchung aber ausdrücklich auf Wunsch des Verbandes durchgeführt wurde, die Teilnahme der Athleten freiwillig war und den Athleten auch bekannt war, dass auf rhEPO untersucht wurde, kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass zumindest in diesem Zeitraum kein Missbrauch erythropoese-steigernder Mittel stattfand.

Betrachtet man die einzelnen Parameter der Probanden, deren Auswertung ein falsch positives Ergebnis lieferte, so fällt auf, dass bei allen erhöhte Hämatokrit- und/oder Makrozytenwerte gefunden werden können. Insbesondere bei erhöhter Makrozytenzahl wurden sehr niedrige Ferritinwerte gemessen, d. h. es kann von einer Eisenmangelerscheinung ausgegangen werden. Da die Probanden der Applikationsstudie ^[1] eine Eisensubstitution erhielten, wurde dieser Effekt nicht beobachtet und für die Erstellung der Modelle demzufolge nicht berücksichtigt. Da alle auffälligen Ergebnisse bei der Berechnung des „ON“-Modells auftraten, würde dies bedeuten, dass der jeweilige Athlet zum Zeitpunkt der Probennahme bzw. kurz vorher rhEPO eingenommen haben muss. Ein akuter Missbrauch würde aber auch Einfluss auf die Retikulozytenparameter sowie die Konzentration des sTfR haben und diese erhöhen (**Abb. 84**, **Abb. 85** und **Abb. 87**). Diese Parameter lagen jedoch alle im Normalbereich und wiesen keine Erhöhung auf. Es ist daher wesentlich wahrscheinlicher, dass die Auffälligkeit der Proben auf Unzulänglichkeiten der statistischen Modelle zurückzuführen sind, so dass ein akuter Missbrauch von rhEPO oder NESP ausgeschlossen werden kann. Die Ursache dieser Unzulänglichkeiten der Modelle liegen möglicherweise darin, dass Parisotto et al. ^[1] bei deren Erstellung von einer einheitlichen Population Probanden (geringe Spannweite der hämatologischen Parameter) ausging, während die Spannweite der relevanten Parameter auf die Gesamtpopulation an Hochleistungsathleten bezogen, wesentlich größer ist.

In einer zweiten Applikationsstudie von Parisotto et al. ^[66] wurden die statistischen Modelle aufgrund des größeren Datenumfangs überarbeitet. Dabei wurde auch eine Applikationsstudie mit asiatischen Athleten durchgeführt, wobei die Bestimmung des sTfR vollautomatisch mit einem anderen Immunoassay erfolgte. Sowohl für die ursprünglichen Modelle, als auch für die neu angepassten war es notwendig, die Blutproben mit einem ADVIA 120 zu messen, um den Parameter Retikulozythämatokrit zu erhalten. In einer weiteren Studie ^[156] wurden daher auf der Grundlage der Daten aus den beiden vorherigen Applikationsstudien ^[1, 66] neue Modelle erstellt, die lediglich die Parameter prozentualer Anteil an Retikulozyten, Hämoglobin, Erythropoietin und sTfR benötigten. Bei der Berechnung der Werte der Proben, die im IDAS Kreischa in den Studien und den Routinekontrollen analysiert wurden, mittels dieser neuen Modelle, stieg der Anteil an falsch positiven Ergebnissen drastisch an, z. T. wurden mehr als 50 % der Proben

einer Studie als positiv gewertet (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen liegen wahrscheinlich zum einen in der Veränderung des Assays zur Bestimmung des sTfR, zum anderen darin, dass die Athleten der Applikationsstudien eine sehr homogene Population darstellten und zusätzlich eine Eisensubstitution erhielten. Eine Anwendung der neueren statistischen Modelle erwies sich somit als nicht praktikabel.

5.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zwei Probleme, welche kaum in einer Veröffentlichung genannt werden, die sich mit der Thematik der Festlegung von Grenzwerten hinsichtlich eines Dopings mit rhEPO beschäftigt, betreffen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Stabilität der Proben. Im Gegensatz zu einer Applikationsstudie, bei der immer das gleiche Hämatologiesystem und meist nur ein Immunoassay pro Parameter zur Bestimmung genutzt wird sowie die Messung der Proben unverzüglich erfolgt, sind diese Anforderungen in der Praxis nicht so einfach umzusetzen, so dass die Anwendung der in solchen Studien ermittelten Grenzwerte schwierig ist. Um Grenzwerte mit der Zielstellung Dopinganalytik einzusetzen zu können, ist es absolut notwendig, dass die Ergebnisse verschiedener Labors vergleichbar sind, vor allem wenn es sich um Blutproben handelt, die aufgrund der geringen Stabilität der Matrix lediglich in einem (oder im Ausnahmefall in einem zweiten) Labor analysiert werden können. Sowohl bei den verwendeten Hämatologiesystemen als auch den Immunoassays und den dazugehörigen Geräten gibt es zwischen den einzelnen Dopinglabors Unterschiede bzw. stimmen diese mit den in den Applikationsstudien verwendeten nicht überein. Zudem besteht das Problem, dass Blutproben innerhalb kürzester Zeit gekühlt (aber nicht gefroren) vom Abnahmeort zum analytischen Labor gelangen sollten. Die professionellen Kurierdienste (z. B. WorldCourier) verlangen aber für diese Serviceleistung entsprechende Beträge, die nicht von jedem Sportverband bzw. Veranstalter gezahlt werden. In den beiden folgenden Abschnitten sollen die in den Studien ermittelten Ergebnisse diskutiert werden, da gerade in Hinblick auf die Ergebnisreproduzierbarkeit viele Proben simultan in den Labors Köln und Kreischa gemessen wurden.

5.3.1 Vergleich der immunologischen Bestimmungen

Die Bestimmung der Parameter Erythropoietin, sTfR und Ferritin ist nur mittels immunologischer Methoden möglich. Die kommerziellen Immunoassays, die dafür zur Verfügung stehen, sind jedoch für den diagnostischen Einsatz in der klinisch-chemischen Analytik entworfen und validiert, in der nur selten der absolute Konzentrationswert, sondern vielmehr die Diagnose einer Erkrankung von Bedeutung ist. Die Werte von gesunden Hochleistungssportlern liegen damit meist innerhalb der Normalwerte dieser Assays, so dass nur ein geringer Messbereich

von Relevanz ist. Wie groß die Differenzen bei immunologischen Messungen sein können, zeigt der Vergleich der Erythropoietinbestimmungen in Köln und Kreischa in **Abb. 55**. Die Unterschiede konnten auf die Verwendung von Immunoassays unterschiedlicher Produktionsbatches zurückgeführt werden, da bei der nachfolgenden Vergleichsmessung mit einem Immunoassay aus dem gleichen Produktionsbatch in Köln und Kreischa im Rahmen der Assayvariation ($CV < 5\%$) vergleichbare Ergebnisse gemessen werden konnten. Um die Ergebnisse aller weiteren Studien besser vergleichen zu können, wurden daher Serumproben mit hohen und niedrigen EPO-Konzentrationen vereinigt, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Ein Aliquot der beiden als „Pool1“ und „Pool2“ bezeichneten Kontrollproben wurde bei jeder nachfolgenden Messreihe im IDAS Kreischa mitgeführt, um Veränderungen des Immunoassays oder der Proben zu erfassen. Aufgrund der Anzahl der Studien war es notwendig, zwei neue „Pool“-Proben durch erneute Vereinigung von Serumproben herzustellen. Die Messwerte dieser Proben für Erythropoietin sind in **Abb. 71** und für den sTfR in **Abb. 72** dargestellt. Obwohl die Werte der vom Hersteller der Assays mitgelieferten Kontrollen immer im Bereich lagen, zeigten die Messwerte der Pool-Proben, dass bei einigen Messreihen die Abweichungen größer waren, als vom Hersteller angegeben. Um für Parameter, die mittels Immunoassay bestimmt werden, Grenzwerte festzulegen ^[53, 55-57, 94, 110, 111, 155] oder diese als Komponenten eines Mehrparametermodells ^[1, 66, 155-157] zu verwenden, ist es daher absolut notwendig laboreigene Kontrollen zu etablieren; nur so können durch den Assay verursachte Abweichungen erkannt werden. Dies zeigte sich z. B. bei dem Wechsel des von Nichols für den Erythropoietinassay verwendeten Antikörpers, der nach der Verlaufsuntersuchung der DLV-Athleten stattfand. Generell führten Messungen mit dem neuen Antikörper zu höheren Werten, was sich besonders bei dem Vergleich der Daten mit denen der Messungen des Kölner Labors bemerkbar machte, da dort alle Proben mit dem Assay mit monoklonalem Antikörper gemessen wurden. Der Bland-Altman-Plot in **Abb. 56**, rechts zeigt deutlich den Trend, wobei die Messwerte trotzdem eine hohe Korrelation aufweisen (**Abb. 56**, links). Ebenfalls eine hohe Übereinstimmung zeigen die Bestimmungen mit dem manuellen Quantikine-sTfR-Assay (**Abb. 58**, links). Aber auch hier weist der Bland-Altman-Plot generell höhere Werte für die Messungen des Kölner Labors auf (**Abb. 58**, rechts). Der Vergleich der im IDAS Kreischa mit dem manuellen Quantikine- und dem automatisierten Advantage-Assay bestimmten Proben zeigt sowohl eine gute Übereinstimmung (**Abb. 59**, links) als auch eine sehr gute Vergleichbarkeit im Bland-Altman-Plot (**Abb. 59**, rechts). Aufgrund dieser guten Übereinstimmung wurde für alle weiteren Messungen der Advantage-Assay, der den Vorteil der vollautomatischen Messung bietet, verwendet. Der Vergleich von Werten, die mit unterschiedlichen Immunoassays bestimmt wurden, ist in den meisten Fällen jedoch wesentlich problematischer – wenn nicht gar ausgeschlossen. Dies zeigt u. a. der Vergleich der Erythropoietinwerte, die im IDAS Kreischa mit dem Advantage-Assay und im Kölner Labor mit einem ebenfalls vollautomatisierten System von DPC Biermann

bestimmt wurden. Sowohl die Korrelation (**Abb. 57**, links) als auch der Bland-Altman-Plot (**Abb. 57**, rechts) zeigen lediglich eine geringe Übereinstimmung. Solche schlechten Korrelationen treten auch bei der Bestimmung von Erythropoietin mit unterschiedlichen Immuno- und Radioimmunoassays ^[158] auf. Die Anzahl der Vergleichsmessungen dieser Untersuchung war zum einen wesentlich geringer, zum anderen wurde zusätzlich eine Anzahl von durch verschiedene Zusätze (Bilirubin, Albumin u. a.) verursachten Kreuzreaktionen untersucht. Für den sTfR existieren eine Reihe von Vergleichsstudien, insbesondere da die Messung des sTfR im Serum, welcher zur Menge des Transferrinrezeptors in den Geweben proportional ist, zur Bestimmung der erythropoetischen Aktivität und der Eisenspeicher des Körpers eingesetzt wird. Von Nachteil ist, dass bisher kein internationaler Standard verfügbar ist. Zur Kalibrierung der Assays werden intakter sTfR, sTfR-Transferrin-Komplexe oder Gemische verwendet. Daher sind die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Assays erzielt werden, sehr schlecht vergleichbar. Nicht nur die Referenzbereiche unterscheiden sich je nach verwendetem Assay, auch hinsichtlich der Korrelation der Assays untereinander existieren verschiedene Aussagen in der Literatur ^[144-146, 159]. Wurde von Suominen et al. ^[159] eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse, die mit dem Quantikine- und Orion-Assay (Orion Diagnostica) ermittelt wurden, gefunden, fiel diese dagegen beim Vergleich von Quantikine- und Ramco-Assay (Ramco Laboratories) wesentlich geringer aus. Im Kontrast dazu steht die Studie von Akesson et al. ^[145], die eine gute Korrelation der mit dem Quantikine- und Ramco-Assay bestimmten Werte, aber eine wesentlich schlechtere zwischen den Werten des Quantikine- und Orion-Assays ermittelten.

Diese Studien der Literatur sowie die Unterschiede bei den im IDAS mit verschiedenen Assays durchgeführten Messungen zeigen, dass sich Werte aus verschiedenen Studien nicht direkt übertragen lassen. Auch wenn Assays vom selben Hersteller verwendet werden, können sich zwischen den Ergebnissen zweier Labors z. T. erhebliche Unterschiede ergeben. Es sollten daher in jedem Fall laborinterne Kontrollen bei jeder Messung mitgeführt werden. Eine weltweite Standardisierung wäre hilfreich, um insbesondere den Parameter sTfR als zusätzlichen Screeningparameter in der Dopinganalytik zu etablieren.

5.3.2 Vergleich der hämatologischen Messungen und Stabilität von Blutproben

Mit der Verfügbarkeit vollautomatischer Hämatologiesysteme wurde die fehlerbehaftete und vor allem sehr aufwendige manuelle Zählmethode ^[9, 126] zur Retikulozytenbestimmung weitgehend verdrängt, da die Analytoren nicht nur schnellere und präzisere Ergebnisse, besonders bei geringen Retikulozytenkonzentrationen, sondern auch zusätzliche Retikulozytenparameter, wie

Zellgröße oder Reifegrad, liefern. Mit der zunehmenden Anzahl von Gerätetypen ergibt sich aber auch das Problem der Vergleichbarkeit der Ergebnisse und selbst bei der Verwendung identischer Hämatologiesysteme stellt sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit von Messungen in unterschiedlichen Labors. Der Vergleich der Bestimmungen der Retikulozytenwerte, die jeweils mit dem R3000 und dem ADVIA 120 gemessen wurden, in Abschnitt 4.5.2 zeigt zwar für die Parameter prozentualer Anteil an Retikulozyten (**Abb. 60**, links) und Retikulozytenkonzentration (**Abb. 61**, links) eine gute Korrelation mit einem p-Wert kleiner als 0,001 für den t-Test gepaarter Stichproben, der jeweils zugehörige Bland-Altman-Plot (**Abb. 60** und **Abb. 61**, rechts) offenbart jedoch, dass mit dem ADVIA 120 generell höhere Werte bestimmt werden. Vergleichsstudien in der Literatur ^[127, 160] geben im Allgemeinen höhere Korrelationskoeffizienten für den Vergleich zwischen Messwerten, die mit unterschiedlichen Durchflusszytometern bestimmt wurden, an. Bei diesen Studien wurden aber immer Proben von Patienten mit sehr hohen bzw. sehr niedrigen Retikulozytenwerten analysiert, während die Werte der im IDAS untersuchten Proben von Athleten alle im Normalbereich von gesunden Personen lagen ^[63, 129]. In keiner der Vergleichsstudien der Literatur ^[127, 160, 161] wurden die Reifestadien der Retikulozyten, die eine Aussage über die momentane Aktivität der Erythropoese erlauben, berücksichtigt. Der Vergleich der Messwerte der jungen, hochfluoreszierenden Retikulozytenfraktion (**Abb. 62**) zeigt, dass sich die Werte dieses Parameters nicht von einem System auf ein anderes übertragen lassen. Für einen Einsatz in der Dopinganalytik ist daher die Verwendung des gleichen Hämatologiesystems notwendig, wobei das ADVIA 120 das Gerät der Wahl ist, da sich der für die statistischen Modelle ^[66, 113, 155-157] benötigte Parameter Retikulozytenvolumen aufgrund des Geräteaufbaus und Messprinzips (Aufkuglung der Zellen, siehe **Abb. 3**) nur mit diesem bestimmen lässt.

Der Vergleich von Proben, die in Köln und Kreischa analysiert wurden (Abschnitt 4.5.3), demonstriert die hervorragende Korrelation der Messwerte für die Parameter Hämatokrit (**Abb. 63**) und Hämoglobin (**Abb. 64**). Für den prozentualen Anteil der Makrozyten (**Abb. 65**) und die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 66**) ist die Streuung der Werte zwar größer, die Bland-Altman-Plots dieser Parameter zeigen aber, dass keine systematische Veränderung existiert.

Ein wichtiger Punkt hinsichtlich der praktischen Anwendung von Grenzwerten für hämatologische Parameter ist die Stabilität der Blutproben, da diese vom Abnahmeort zum Labor transportiert werden müssen, wo die Analyse der Proben sofort durchgeführt werden sollte. Besonders die Veränderung der Retikulozyten ist von Interesse, wobei sich die Frage stellt, ob eine nachträgliche Reifung der Zellen vom Retikulozyten zum Erythrozyten außerhalb des Blutkreislaufes möglich ist. Die durchgeführte Untersuchung (Abschnitt 4.5.4) zeigt, dass

bereits innerhalb der ersten 36 h eine Veränderung der Proben stattfindet. Durch das Antikoagulant EDTA kommt es zum Anschwellen der Zellen^[59], so dass eine Vergrößerung des Zellvolumens eintritt, wobei dieser Prozess über den gesamten Untersuchungszeitraum anhält. Dies kann man vor allem an den steigenden Hämatokrit- (**Abb. 67**, links) und Makrozytenwerten (**Abb. 68**, links) feststellen, da durch die Zellvergrößerung mehr Zellen ein Volumen von größer als 120 fl aufweisen und damit als Makrozyten eingestuft werden. Ein stabiler Parameter über den untersuchten Zeitraum ist Hämoglobin (**Abb. 67**, rechts), da vor der Messung dieses Parameters eine vollständige Lyse der Zellen erfolgt, so dass die Zelleigenschaften, welche sich während der Lagerung verändern, keinen Einfluss mehr besitzen. Sowohl der prozentuale Anteil der Retikulozyten (**Abb. 68**, rechts) als auch die Retikulozytenkonzentration (**Abb. 69**, links) zeigen erst nach 60 h Lagerung bei 8° C einen signifikanten Abfall der Werte. Diese Daten sind vergleichbar mit der einzigen Veröffentlichung^[162] über die *in vitro* Stabilität von Retikulozyten. Hier konnte ebenfalls eine relativ hohe Stabilität der Retikulozyten bei einer Lagerung von ca. 4° C (72 h), in einzelnen Fällen sogar bis zu 120 h beobachtet werden. Im Gegensatz zur alleinigen Auswertung der Retikulozytenkonzentrationen zeigt die Veränderung der Reifestadien, dass mehrere Prozesse ablaufen, die einen Einfluss auf die Zelleigenschaften der Retikulozyten besitzen.

Während Cavill et al.^[162] die Verringerung der Retikulozyten lediglich auf eine allgemein verzögerte Reifung zurückführen, zeigt die Verringerung des Anteils an niedrigfluoreszierenden Retikulozyten (LFR, **Abb. 69**, rechts), dass *in vitro* zuerst hauptsächlich diese Subpopulation der Retikulozyten zum Erythrozyten reift. Innerhalb der ersten 60 h erhöht sich der Anteil an mittelfluoreszierenden Retikulozyten (MFR, nicht dargestellt) und geringfügig der Anteil der hochfluoreszierenden Retikulozyten (HFR, **Abb. 70**, links). Die Ursache für die Erhöhung der MFR- und HFR-Werte liegt lediglich in der Berechnung der beiden Parameter, da durch die Verringerung der Zellzahlen der LFR, die den größten Anteil der Retikulozyten bilden, sich trotz gleichbleibender absoluter Zellzahlen der MFR und HFR deren prozentualer Anteil erhöht. Anscheinend sind die größeren RNS-Reste dieser beiden Retikulozytensubpopulationen stabiler als die geringen RNS-Reste der LFR.

Der Retikulozythämatokrit verringert sich analog der Retikulozytenkonzentration ebenfalls nach 60 h bei 8 °C (**Abb. 70**, rechts). Die gefundenen Ergebnisse stehen z. T. im Widerspruch zu den Angaben von Parisotto et al.^[1], die über einen Zeitraum von vier Tagen und einer Lagerung bei 4 °C keinerlei Veränderungen der Proben feststellen konnten, jedoch keine Daten dazu veröffentlichen. Die hier gefundenen Werte zeigen eindeutig eine Veränderung des Probenmaterials, insbesondere der Retikulozyten, auf deren Stabilität bisher in der Literatur nicht eingegangen wurde.

Die Bestimmung hämatologischer Parameter, die für ein Screening hinsichtlich eines Dopings mit rhEPO verwendet werden, insbesondere die Retikulozytenparameter, sollte mit Hämatologiesystemen des gleichen Typs durchgeführt werden, um eine Übertragbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Der Vergleich von Messungen des Kölner und Kreischaer Labors, die beide mit dem ADVIA 120 durchgeführt wurden, zeigten eine gute Übereinstimmung der Daten. Die Auswertung der Stabilitätsuntersuchung verdeutlicht, dass eine Veränderung der Proben stattfindet, die relevanten Parameter (siehe Abschnitte 5.1.1 und 5.4) sind jedoch über einen Zeitraum von 60 h stabil. Eine Analyse der Proben innerhalb von 24 h, wie von einigen Verbänden gefordert, ist somit zwar wünschenswert, aber nicht zwingend notwendig.

5.4 Methodenkombination und Grenzwerte – Globale Strategie

Durch den Vergleich der Ergebnisse der im IDAS durchgeführten Studien mit den in der Literatur [1, 53, 55-57, 66, 68, 93, 110, 111, 113, 143, 156, 163, 164] angegebenen Daten bzw. deren Veränderungen nach rhEPO-Applikation, siehe dazu die ausführliche Diskussion der Parameterfindung in Abschnitt 5.1.1, wurde deutlich, dass die Retikulozytenparameter und der lösliche Transferrinrezeptor als Parameter für eine Screening am besten geeignet sind.

Bei der Festlegung von Grenzwerten hinsichtlich eines Screenings stellte sich die Frage, ob alle im IDAS Kreischa untersuchten Proben oder nur bestimmte Athletenpopulationen gewertet werden sollten. Aufgrund des praxisrelevanten Bezugs wurden für die Bestimmung der Grenzwerte die 95-Perzentilwerte der untersuchten Routineproben verwendet. Dabei war von Vorteil, dass erstens ein Zeitraum von drei Jahren erfasst wurde und zweitens die untersuchte Population einen Teil der weltbesten Ausdauerathleten umfasste. Die Werte für männliche und weibliche Athleten sind in **Tab. 18** aufgeführt, da sich diese nicht signifikant nach Geschlecht unterscheiden, wurde als allgemein gültiger Grenzwert für ein Screening der jeweils niedrigere Wert verwendet. Alle Parameter sind hinsichtlich ihrer Veränderung bei einem akuten Missbrauch von rhEPO ausgewählt, d. h. Veränderungen, die durch eine abnormal erhöhte Erythropoese erreicht werden.

Tab. 18: 95-Perzentil ausgesuchter Parameter von männlichen und weiblichen Athleten der Routinekontrollen und daraus abgeleitete allgemein gültige Grenzwerte. Für den Retikulozythämatokrit wurde zusätzlich das 5-Perzentil angegeben.

Parameter	Männer 95-Perzentil (5-Perzentil)	Frauen 95-Perzentil (5-Perzentil)	allgemein gültige Grenzwerte
Retikulozyten [%]	109,7	109,7	110
Retikulozyten [$10^9/l$]	2,2	2,5	2,2
HFR [%]	3,4	3,3	3,3
Retikulozythämatokrit [%]	1,08 (0,42)	1,15 (0,35)	1,1 (0,4)
sTfR [nmol/l]	33,5	31,8	30,0

Ein Überschreiten der in **Tab. 18** angegebenen Grenzwerte weist auf ein potentielles EPO-Doping hin. Die einzige Ausnahme ist das 5-Perzentil des Retikulozythämatokrits, wobei ein Unterschreiten dieses Wertes auf ein stattgefundenes Doping hindeutet (vergleiche **Abb. 85 D**),

da es durch die Erhöhung der Erythrozytenzahl über den Normalwert des Athleten hinaus zu einer Verringerung der Erythropoese und damit einem Absinken des Retikulozythämatokrits kommt. Für die Parameter Hämatokrit und Hämoglobin wurden keine Grenzwerte angegeben, da diese als Screeningparameter kaum geeignet sind, siehe dazu die ausführliche Diskussion in Abschnitt 5.1.1.

Zur besseren Übersicht wurden die vorgeschlagenen Grenzwerte aus **Tab. 18** in Bezug auf alle Daten der jeweiligen Parameter der im IDAS Kreischa durchgeführten Studien in den **Abb. 89** und **Abb. 90** zusammengefasst dargestellt. Dabei muss beachtet werden, dass die Parameter der Verlaufsuntersuchung der DLV-Athleten mit dem Sysmex R3000 bestimmt wurden, die aller anderen Studien mit dem ADVIA 120. Dies erklärt, dass die Werte für den prozentualen Anteil der Retikulozyten und die Retikulozytenkonzentration dieser Studie (**Abb. 89**, Studie **A**) etwas unter den Werten der anderen Studien liegen, siehe für den Vergleich der Daten unterschiedlicher Hämatologiesysteme Abschnitt 4.5.2 mit der Diskussion in Abschnitt 5.3.2.

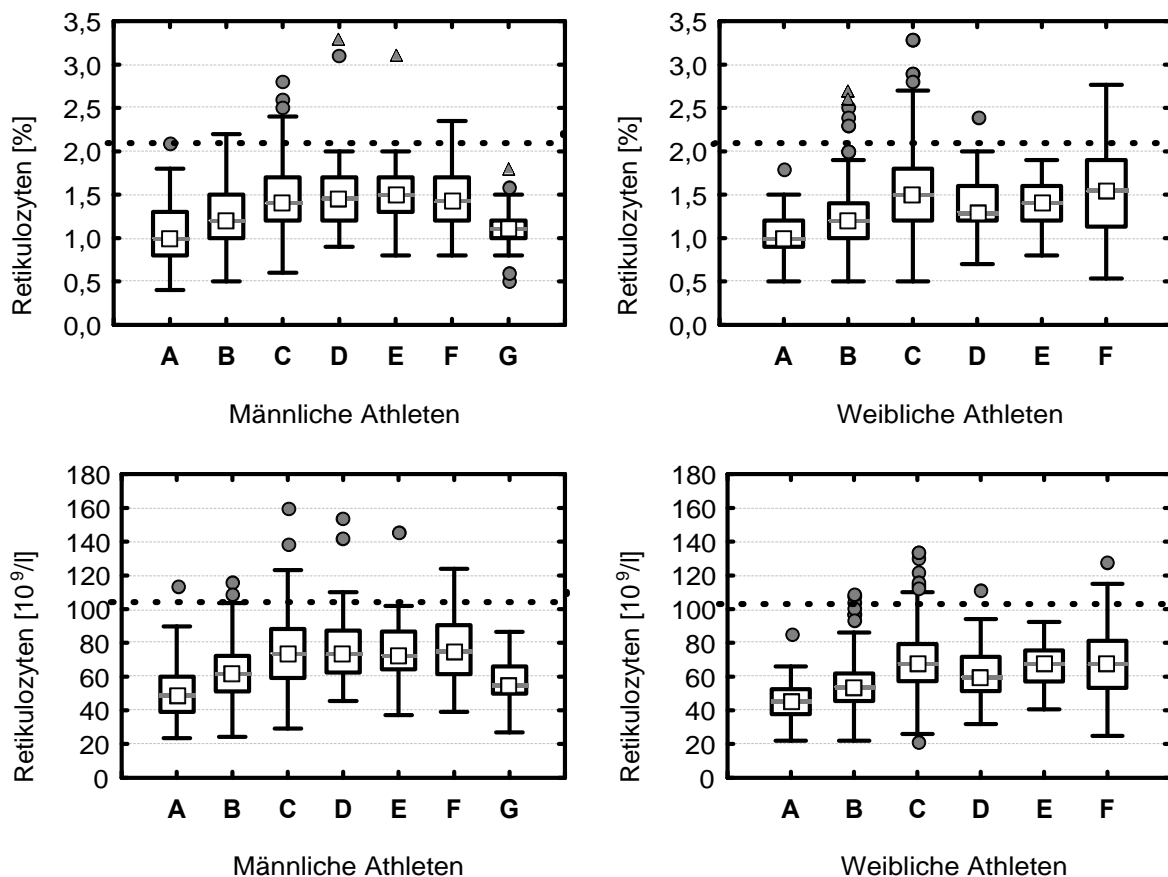


Abb. 89: Box-Plots der Parameter prozentualer Anteil Retikulozyten (oben) und Retikulozytenkonzentration (unten) aller im IDAS Kreischa durchgeführten Studien (**A:** Verlaufsuntersuchung DLV-Athleten; **B:** Tagesstudie; **C:** Jahresstudie; **D:** Belastungsstudie Marathon; **E:** Belastungsstudie Radrennen; **F:** Routineuntersuchungen 2001-2003, **G:** Verlaufsuntersuchung des Zehnkampfteams. Die gestrichelte Linie zeigt den vorgeschlagenen Grenzwert für das Screening.

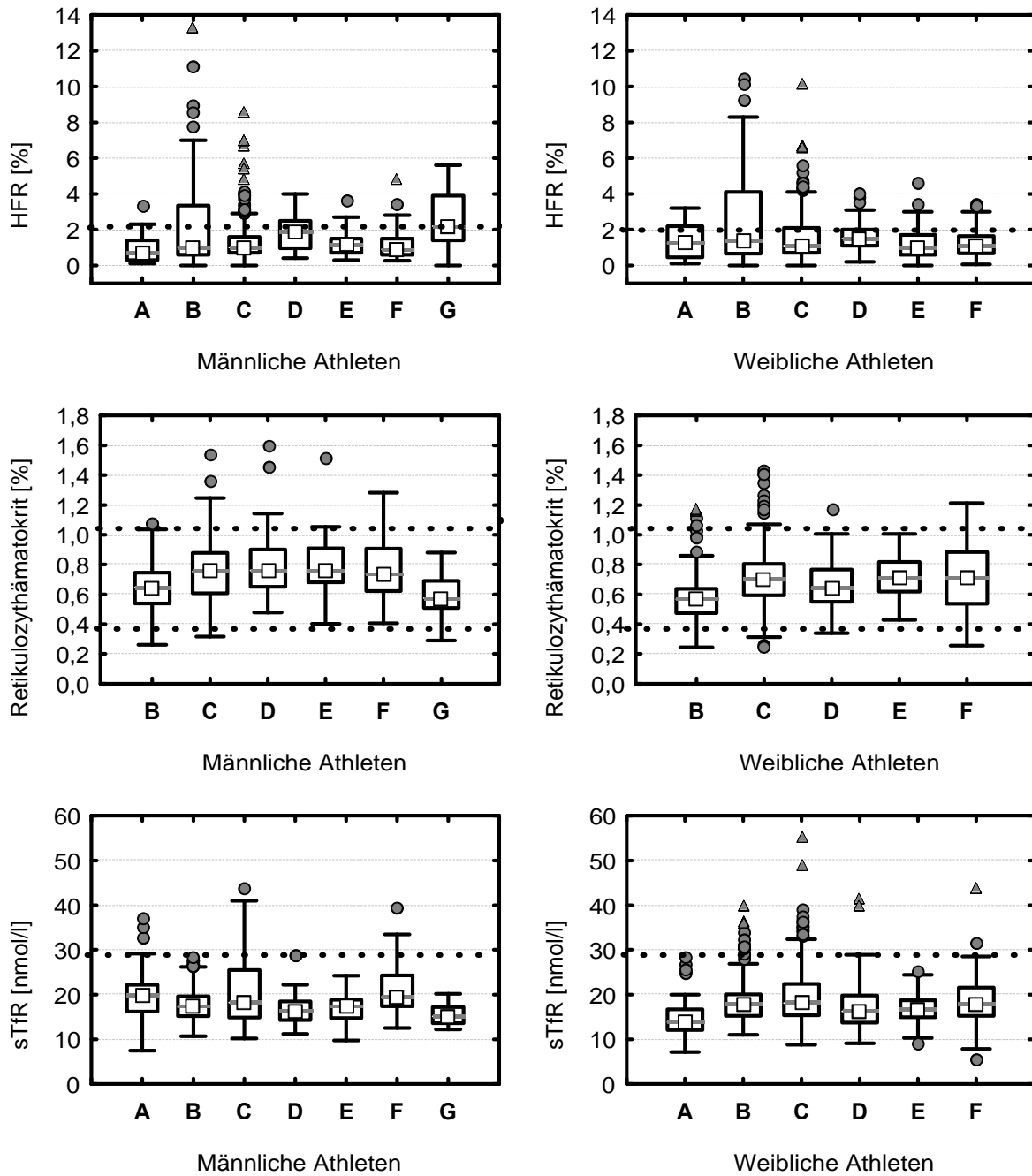


Abb. 90: Box-Plots der Parameter HFR (oben), Retikulozythämatokrit (Mitte) und sTfR (unten) aller im IDAS Kreischa durchgeführten Studien (**A:** Verlaufsuntersuchung DLV-Athleten; **B:** Tagesstudie; **C:** Jahresstudie; **D:** Belastungsstudie Marathon; **E:** Belastungsstudie Radrennen; **F:** Routineuntersuchungen 2001-2003, **G:** Verlaufsuntersuchung des Zehnkampfteams. Die gestrichelte Linie zeigt den vorgeschlagenen Grenzwert für das Screening.

Während für die Parameter prozentualer Anteil Retikulozyten und Retikulozytenkonzentration die Unterschiede zwischen den einzelnen Studien relativ gering sind, findet man besonders für den Anteil an hochfluoreszierenden Retikulozyten (**Abb. 90**, oben) und die Konzentration des sTfR (**Abb. 90**, unten) bei der Tages- und Jahresstudie im Vergleich zu den anderen Untersuchungen signifikante Unterschiede. Die Schwankungen für den Retikulozythämatokrit

(**Abb. 90**, Mitte) fallen dagegen wesentlich geringer aus. Den größten Einfluss auf die Festlegung der Grenzwerte hatten jedoch die Routineuntersuchungen von 2001 bis 2003 (**Abb. 89** und **Abb. 90**, Studie **F**), da bei diesen eine repräsentative heterogene Population von Hochleistungsathleten vertreten war.

Mit den festgelegten Grenzwerten stellt sich die Frage nach einer globalen Strategie, d. h. wie diese verwendet werden sollten. Von einigen Autoren ^[40, 143, 165, 166] wird die Einführung eines „Blutpasses“, d. h. die Bestimmung individueller hämatologischer Parameter z. T. mit einer Vor-Ort-Bestimmung, favorisiert. Dem stehen mehrere Argumente entgegen. Zum einen reicht die vorgeschlagene Anzahl von zwei bis drei Untersuchungen innerhalb eines Jahres kaum aus, um ein individuelles Profil zu etablieren. Betrachtet man die Schwankungen der Parameter während der Jahresstudie (Abschnitt 4.2.2), den Einfluss der Belastung (Abschnitt 4.2.3) oder auch die Veränderungen bei der Verlaufsuntersuchung des deutschen Zehnkampfteams (Abschnitt 4.3), kann eindeutig festgestellt werden, dass sich individuelle Werte verändern. Wählt man hingegen die individuelle Schwankungsbreite der Parameter so groß, dass die Variationen innerhalb dieser liegen, stellt sich die Frage, warum allgemein gültige Grenzwerte nicht ausreichen. Eine weitere Tatsache, die die Verwendung eines „Blutpasses“ erschwert, ist die Reproduzierbarkeit der Messungen. Von den Autoren wird lediglich die Teilnahme an Ringversuchen als Kriterium angesehen, dabei ist vielmehr von Interesse, mit welchem Hämatologiesystem die analytische Bestimmung durchgeführt wird. Vor allem, da die Retikulozytenparameter von Bedeutung sind und insbesondere die Bestimmung des Retikulozythämatokrits nur mit einem ADVIA 120 durchgeführt werden kann. Gleichzeitig machen die Autoren keine exakten Angaben darüber, welche Parameter in diesen „Blutpass“ aufgenommen werden sollten.

Der Vorteil der Verwendung von Blutparametern besteht darin, dass eine große Anzahl von Proben in einem kurzen Zeitraum gescreent werden können und zusätzliche Informationen, aus den Blutparametern erhalten werden. Geht man davon aus, dass ein Athlet rhEPO oder NESP missbraucht hat, so gibt es zum Zeitpunkt der Dopingkontrolle zwei Möglichkeiten. Erstens, der Missbrauch findet zu diesem Zeitpunkt statt, damit wird zumindest einer der in **Tab. 18** aufgeführten Grenzwerte überschritten und im Urin sollte mit der direkten Methode ein positives Ergebnis gefunden werden (Abschnitt 4.6.2). Wird jedoch die Dopingkontrolle nach dem Wettkampf durchgeführt, so kann durch den erhöhten Proteingehalt des Urins die direkte Methode eventuell nicht zu einem positiven Befund führen (**Abb. 82**), dieses Problem ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass der Athlet rhEPO oder NESP missbraucht und ca. zwei Wochen vor dem entsprechenden Wettkampf dieses absetzt. Damit ist die Erythrozytenkonzentration und die maximale Sauerstofftransportkapazität noch erhöht, rhEPO/NESP mit der direkten Methode aber nicht mehr nachzuweisen, da es aufgrund der Plasmahalbwertszeit vollständig aus dem

Körperkreislauf eliminiert wurde. Höchstwahrscheinlich würde auch keiner der in **Tab. 18** aufgeführten Parameter überschritten werden, da die gesteigerte Produktion von Erythrozyten abgeschlossen ist und im Gegenteil die Parameter der Erythropoese sehr niedrig sind.

Der einzige Parameter, der sich eignet, eine zu geringe Erythropoese zu erkennen, ist der Retikulozythämatokrit, da man für diesen Parameter nach einer rhEPO-Applikation Werte messen kann, die nicht nur unterhalb der Ausgangswerte liegen (**Abb. 85 D**), sondern auch unterhalb des Großteils der Normalwerte (vergleiche **Abb. 85 D** mit den Werten aus **Abb. 90**). Die auffälligste Probe, die im IDAS Kreischa gemessen werden konnte, besaß einen Retikulozythämatokrit von 0,233 % und lag damit nicht nur unter den vorgeschlagenen Grenzwerten (**Tab. 18**), sondern auch unter dem Minimalwert der Welteliteathleten (**Tab. 11**). Eine Untersuchung des Urins mit der direkten Methode zeigte zwar schwache Spuren von rhEPO, aufgrund der geringen Konzentration konnte diese Probe aber nicht als positiv bewertet werden. Dies zeigt auch den Nachteil der hämatologischen Parameter, da ein positives Ergebnis nicht allein durch diese, sondern nur bei einer gleichzeitigen Bestätigung mittels der direkten Methode als positiver Befund gewertet würde.

Das Schema für eine globale Strategie ist in **Abb. 91** dargestellt. Grundsätzlich sind sowohl Blutproben als auch Urinproben abzunehmen, die gekühlt und unverzüglich zum Labor versandt werden sollten. Als Hämatologiesystem ist ein ADVIA 120 zwingend notwendig, um den Parameter Retikulozythämatokrit ermitteln zu können. Die Erfassung des sTfR sollte mit einem Quantikine- oder Advantage-Assay durchgeführt werden. Als Selektionsparameter werden zuerst die Parameter Hämatokrit und Hämoglobin überprüft, weniger wegen ihrer Eignung als Grenzwerte, sondern vielmehr, da diese von den meisten Sportverbänden verlangt werden. Anschließend werden die Parameter einer gesteigerten (Prozentualer Anteil Retikulozyten, Retikulozytenkonzentration, HFR, Retikulozythämatokrit und sTfR) bzw. verringerten Erythropoese (Retikulozythämatokrit) überprüft, ob diese die Grenzwerte über- bzw. unterschreiten. Ist das der Fall, erfolgt ebenfalls eine Selektion der korrespondierenden Urinproben für die direkte Analyse, wobei die Aufarbeitung der Urinproben unverzüglich durchzuführen ist. Eine Bestimmung von Blutparametern vor Ort ist aufgrund der Problematik der Vergleichbarkeit hämatologischer Parameter (Abschnitt 5.3.2) nicht zu empfehlen. Auch eine Verzögerung der Aufarbeitung durch den Vergleich gemessener Werte mit vorhandenen individuellen Werten (Problematik „Blutpass“) durch den Verband führt höchstens zur Erschwernis des direkten Nachweises.

Diese Strategie bietet den Vorteil, dass eine große Anzahl von Proben innerhalb kürzester Zeit analysiert werden kann und eine Untersuchung der Urinproben gezielt erfolgt. Falls nach positiver Analyse einer Blutprobe die dazugehörige Urinprobe aufgrund einer Proteinüberladung oder zu geringen EPO-Konzentration, d. h. fehlenden urinären Banden, nicht ausgewertet werden kann, so ist dem Verband eine erneute Probennahme (Blut und Urin) zu empfehlen. Ein

Verzicht auf Blutproben, in Hinblick auf die direkte Analytik im Urin, ist keinesfalls zu befürworten, da auch in Zukunft mit neuen erythropoesesteigernden Medikamenten oder Methoden^[3] zu rechnen ist, die gegebenenfalls nur über erhöhte hämatologische Parameter zu erfassen sind. Zudem würde ein positiver Befund durch entsprechende auffällige hämatologische Parameter unterstützt.

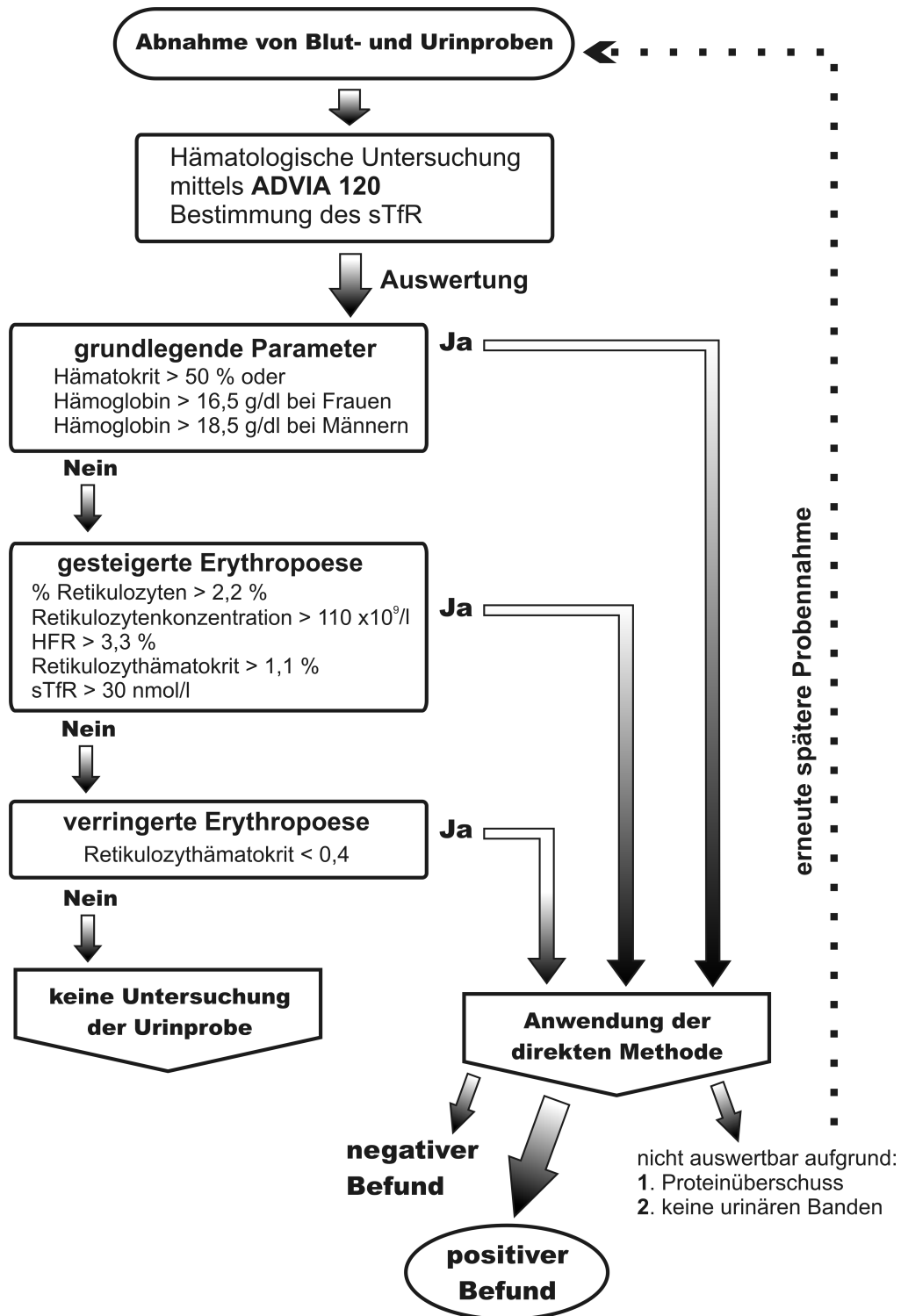


Abb. 91: Globale Strategie für das Screening von Blutproben hinsichtlich der Auswahl der korrespondierenden Urinproben für die direkte EPO-Analytik.

5.5 Direkte Nachweismethoden von rhEPO und NESP

5.5.1 Experimente hinsichtlich eines Nachweises mittels Massenspektrometrie

Die ersten kompletten massenspektrometrischen Untersuchungen von Erythropoietin wurden 1987 mittels Fast Atom Bombardment (FAB) und einer Stoffmenge von 5 mg durchgeführt ^[10, 15]. Zusätzlich war es notwendig, die Glykane nach enzymatischer Abspaltung zu methylieren. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden eine Reihe von massenspektrometrischen Untersuchungen von Erythropoietin durchgeführt ^[18, 26, 27, 76, 78, 100-102], jedoch immer mit Stoffmengen im Milligrammbereich. Aufgrund der Verwendung verschiedener Massenspektrometer (FAB, MALDI bzw. ESI-MS) und unterschiedlicher Probenaufarbeitung ist der Vergleich der Daten außerdem schwierig. Da bei Dopingkontrollen nur eine begrenzte Probenmenge vorliegt, sollte die Aufarbeitung geringer Stoffmengen für die weitere Analytik mittels MS untersucht werden. Dabei stellte sich die Frage, ob mit der geringen Stoffmenge, die bei einer Abnahme von Blut- oder Urinproben hinsichtlich einer Dopingkontrolle zur Verfügung steht, überhaupt verwertbare Signale zu erzielen wären.

Um möglichst den gesamten Bereich der zu erwartenden Glykanstrukturen ^[10, 15, 17, 167] abzudecken, wurden zwei-, drei- und vierantennige Grundstrukturen, Glykane mit proximaler Fucosylierung, Lactosamin-Repeat und terminalen Sialinsäuren verwendet. Die Auftrennung der Glykane mittels HPLC konnte mit den Standardglykanen gezeigt werden, erwies sich jedoch aufgrund der hohen benötigten Substanzmenge als nicht praktikabel. Mittels der Kombination Nanosprayquelle und TOF-MS war es möglich, Glykane in dem Stoffmengenbereich nachzuweisen, der auch bei realen Proben zu erwarten wäre (Abschnitt 4.6.1.2). Um die Signalintensität zu erhöhen, wurde versucht durch Veränderung des pH-Wertes die bevorzugte Bildung von Ionen zu beeinflussen. In früheren Veröffentlichungen wurde bei ESI-MS-Analytik hauptsächlich Trifluoressigsäure (TFA) verwendet ^[103, 168, 169], während beim Einsatz von Nanosprayquellen Ameisensäure ^[170-172] oder Essigsäure ^[28, 76, 173] Anwendung fanden. Für die gezielte Analytik im negativen Modus, d. h. von deprotonierten Glykanen, wurden gute Ergebnisse im basischen Bereich (pH 8,0 und pH 9,3 ^[174] bzw. pH 11 ^[175]) festgestellt. Da die Verwendung von Nanosprayquellen sehr eingeschränkt ist und diese auch erst seit einigen Jahren kommerziell erhältlich sind, ist die Anzahl der Veröffentlichungen zur Thematik Glykananalytik jedoch sehr gering ^[172, 173, 176]. Der große Vorteil der Messung im negativen Modus (**Abb. 80**) im Vergleich zur Messung im positiven Modus ist, dass kaum zusätzliche Addukte gebildet werden. Die Ergebnisse der Messungen im negativen Modus unterscheiden sich erheblich von den Angaben der Literatur ^[174, 175], da die größten Signalintensitäten im pH-Bereich von 3,6 bis 5,5 auftraten und diese selbst bei einem pH-Wert von 2,8 relativ hoch

waren. Im positiven Modus konnten optimalen Signale im pH-Bereich 2,8 (1 % Ameisensäure) beobachtet werden, eine weitere Absenkung des pH-Wertes auf 2,1, durch den Zusatz von 0,1 % TFA, führte zu einem Zusammenbrechen des Nanosprays. Der für die gleichzeitige Messung im positiven und negativen Modus am besten geeignete pH-Bereich (pH 3,6) konnte durch den Zusatz von 1 % Essigsäure erreicht werden.

Aufgrund der Einführung der direkten Methode (siehe den folgenden Abschnitt) wurde die massenspektrometrische Methode nicht weiter verfolgt. Die Untersuchungen zur Anreicherung mittels an Magnetpartikel gebundenen Antikörpern (Abschnitt 4.6.1.1) und die Experimente zur massenspektrometrischen Analytik der Glykane (Abschnitt 4.6.1.2) zeigen, dass diese Kombination zeitlich und gerätetechnisch noch aufwendiger als die Kombination aus isoelektrischer Fokussierung und Double Blot ist. Es ist daher fraglich, ob eine weitere Entwicklung dieser Methode sinnvoll ist, da selbst die bisher angewandte direkte Nachweismethode aufgrund ihres Aufwandes und der Spezialisierung des Personals nur in ausgewählten Labors etabliert wurde. Mit der Entwicklung von weiteren erythropoeseestimulierenden Präparaten für die medizinische Anwendung ist die Notwendigkeit massenspektrometrischer Nachweismethoden jedoch nicht auszuschließen.

5.5.2 Direkter Nachweis von EPO im Urin

Bei Überschreiten des Grenzwertes eines hämatologischen Erythropoeseparameters oder korrelierender Faktoren im Serum ist immer der Nachweis von rhEPO oder NESP im Urin notwendig, um ein Doping zu beweisen. Die von Lasne und de Ceauriz ^[2, 80] entwickelte Methode zum direkten Nachweis von rhEPO im Urin, welche die Kombination von isoelektrischer Fokussierung und Double Blot einschließt (Abschnitt 4.6.2), wurde entsprechend modifiziert, damit auch der Nachweis des neu verfügbaren Präparats NESP möglich ist, da sich dessen isoelektrische Eigenschaften eindeutig von denen des urinären und rekombinanten Erythropoietins unterscheiden. Bei der Anwendung dieser Methode in der Praxis traten jedoch neue Probleme, die bisher nicht beachtet wurden, auf.

Bei ca. 20 bis 30 % aller Proben können keine Aussagen über die Isoformen getroffen werden, da die EPO-Konzentration so gering ist, dass keine Signale gefunden werden. Da für den Großteil dieser Proben die dazugehörigen Blutproben nicht vorlagen, konnte auch keine Aussage getroffen werden, ob die hämatologischen Parameter im Normalbereich lagen, d. h. die niedrige EPO-Konzentration im Urin für diesen Athleten normal war. Ein gemessener niedriger Retikulozythämatokrit würde auf einen eventuell stattgefundenen Missbrauch von rhEPO hindeuten, so dass die Ursache für die niedrige EPO-Konzentration eine verringerte Erythropoese ist. In diesem Fall wäre eine erneute Probennahme anzuraten, um zu überprüfen,

inwieweit sich hämatologische Parameter und die EPO-Konzentration im Urin sowie die Isoformen und damit die Lage der Banden im IEF-Gel verändern. Bei einer Normalisierung der Blutparameter und der vorhandenen Isoformen im Urin wäre eine weiterführende Beobachtung dieses Athleten zu empfehlen. Eine einheitliche Verfahrensweise für solche Fälle existiert bisher nicht. Daraus ist aber ersichtlich, dass erstens auf Blutproben hinsichtlich der Klärung auffälliger Proben nicht verzichtet werden kann und zweitens die Verfahrensweise für solche Auffälligkeiten harmonisiert werden muss.

Ein weiteres Problem, das sich ebenfalls erst während des routinemäßigen Einsatzes der Methode zeigte, sind auffällige Banden im basischen Bereich des IEF-Gels, d. h. oberhalb bzw. im Bereich der ersten IEF-Bande des BRP-Standards (**Abb. 82**, Proben 1 und 2). Solche Signale wurden erstmalig bei Radsportlern gefunden, was den Verdacht nahe legte, dass ein neues erythropoesesteigerndes Präparat erhältlich sein könnte und traten bei einer zunehmenden Anzahl von Proben auf, insbesondere bei Proben, die nach Belastung genommen wurden und einen sehr hohen Proteingehalt aufwiesen. Bei den laboreigenen Kontrollurinen wurden ebenfalls analoge Signale zusätzlich zu den urinären Banden gefunden, so dass ein neues Präparat ausgeschlossen werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre die Bildung eines Proteinkomplexes, bestehend aus den unter Belastung zusätzlich ausgeschiedenen Proteinen und dem urinärem EPO, so dass zwar eine Detektion mittels Antikörper möglich ist, der pI-Wert dieses Komplexes sich aber deutlich von dem der Isoformen des urinären EPO unterscheidet oder die Wanderung im IEF-Gel aufgrund der Größe des Komplexes gestört ist. Die Auswertung eines solchen Gels ist problematisch, da fraglich ist, ob man diesen Bereich einfach verwerfen und somit die bisherige Form der Auswertung (Abschnitt 4.6.2) beeinflussen darf. Dies zeigt, dass das Problem des direkten Nachweises von rhEPO und NESP, insbesondere die Aufarbeitung der Proben, immer noch nicht vollständig gelöst ist .

Bei zukünftig erhältlichen Präparaten, wie dem angekündigten DYNEPO der Firma Aventis, besteht zudem das Problem, dass noch keinerlei Strukturdaten vorliegen und es auch nicht im Rahmen der Dopinganalytik als Referenzsubstanz erhältlich ist, so dass hinsichtlich des direkten Nachweises nur spekuliert werden kann.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war, Parameter und Methoden zu finden, die es erlauben, einen Missbrauch von rekombinantem Erythropoietin zu erfassen. Dabei wurden zwei generell verschiedene Nachweismethoden betrachtet: zum einen ein indirekter Nachweis des Erythropoietins durch dessen Auswirkungen auf die Erythropoese, wie z. B. eine erhöhte Gesamtleistung des sauerstofftransportierenden Systems oder eine abnormal gesteigerte Erythropoese, und zum anderen der direkte Nachweis von rekombinantem EPO, vorzugsweise mit einer massenspektrometrischen Methode, wobei Unterschiede in den Glykosilierungsmustern von rekombinantem und humanem EPO erfasst werden sollten.

Um möglichst schnell anwendbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die indirekte Nachweismethode favorisiert, da diese einfacher und erfolgversprechender schien. Neben allgemein gültigen Grenzwerten für relevante hämatologische Parameter sollte auch die Fragestellung der individuellen Werte, d. h. der Etablierung eines hämatologischen Passes für jeden Athleten, untersucht werden.

Als erste Studie wurde eine Populationsuntersuchung von 229 Leistungssportlern (140 Männer, 89 Frauen) mit der Unterteilung der Probanden nach Kraft-, Kraftausdauer- und Ausdauerathleten durchgeführt. Der einzige Parameter, bei dem sich infolge der Trainingsausrichtung bei den Ausdauerathleten signifikante Unterschiede zu den Kraft- und Kraftausdauerathleten zeigten, war der lösliche Transferrinrezeptor, die allgemeinen hämatologischen Parameter unterschieden sich nicht.

In der nachfolgenden Verlaufsuntersuchung von 26 der besten Ausdauerathleten des DLV mit insgesamt 122 Proben wurden zusätzlich die Parameter der Retikulozyten und die individuelle Variation aller Parameter im Hinblick auf die Etablierung eines „Blutpasses“ untersucht. Für alle Parameter konnten, insbesondere für die der Retikulozyten, über den Zeitraum der Studie konstante Werte gefunden werden. Mit Hilfe dieser Werte und des Vergleichs mit Applikationsstudien aus der Literatur konnten potentielle Grenzwerte festgelegt werden. Wenn auch die Anzahl der untersuchten Proben für die Festlegung von allgemein gültigen Grenzwerten noch zu gering war, konnte jedoch gezeigt werden, dass der von einigen Sportverbänden favorisierte Hämatokrit- bzw. Hämoglobinwert als Kontrollwert nicht geeignet ist.

Im Rahmen eines vom IOC unterstützten Projektes sollten verschiedene Einflussfaktoren untersucht werden, die insbesondere für die Umsetzung hämatologischer Grenzwerte in der routinemäßig angewandten Dopingkontrolle von Bedeutung sind. Dabei wurden die zirkadiane

Rhythmik (Variation innerhalb von 24 h), die Variation über den Zeitraum eines Jahres sowie der Einfluss einer Wettkampfbelastung (Marathon und Radrennen) geprüft. Für diese Projekte wurde ein neues Hämatologiesystem (ADVIA 120) eingesetzt, mit dem eine Reihe von zusätzlichen Parametern ermittelt werden konnte, die es ebenfalls ermöglichten, die zu den Olympischen Spielen 2000 in Sydney verwendeten statistischen Modelle anzuwenden.

An der Untersuchung des Einflusses der zirkadianen Rhythmik nahmen 32 Männer und 30 Frauen teil, innerhalb von 24 h wurden von jedem Probanden sechs Proben abgenommen. Die Auswertung der Daten zeigte, dass lediglich der Parameter Erythropoietin einen signifikanten zirkadianen Rhythmus aufweist und sein Maximum in den späten Abendstunden (20:00 bis 23:00 Uhr) erreicht.

An der Untersuchung der Variation der indirekten Parameter über den Zeitraum eines Jahres nahmen 54 Probanden (29 Männer, 25 Frauen), die auch an der Tagesstudie beteiligt waren, teil. Während des Zeitraums von zwölf Monaten wurden jeweils zehn Probennahmen durchgeführt. Insbesondere in Hinblick auf die Diskussion des individuellen „Blutpasses“ konnte bei der Auswertung der Daten der Jahresstudie festgestellt werden, dass im Gegensatz zu der Verlaufsuntersuchung der DLV-Athleten, bei der der längste Untersuchungszeitraum sechs Monate betrug, eine Veränderung aller Parameter, mit Ausnahme von Erythropoietin, besteht.

Um den Einfluss der Belastung eines Wettkampfes zu bestimmen, wurden Proben von 51 Marathonläufern (26 Männer, 25 Frauen) und 53 Radsportlern (28 Männer – 72 km Rennen, 25 Frauen – 42 km Rennen) untersucht. Die Auswertung der Belastungsstudien zeigte, dass Wettkämpfe ebenfalls einen geringen Einfluss auf die hämatologischen Parameter gut trainierter Athleten besitzen. Grundlegende Parameter des Blutbildes, wie Hämatokrit und Hämoglobin, änderten sich lediglich äußerst geringfügig, während bei einigen Retikulozytenparametern signifikante Erhöhungen festgestellt werden konnten, wobei die Effekte je nach Geschlecht variierten.

An einer Fortsetzung der Verlaufsuntersuchung nahmen neun Athleten des deutschen Zehnkampfteams teil, wobei von allen Athleten innerhalb von 16 Wochen jeweils drei Proben abgenommen wurden. Die Untersuchung zeigte nur geringfügige Veränderungen der hämatologischen Parameter innerhalb dieses Zeitraums, bei dem Großteil der Athleten konnten jedoch durchgängig hohe Hämatokrit- und Hämoglobinwerte gemessen werden.

Die erstmalige routinemäßige Untersuchung von Blutproben, hinsichtlich eines Missbrauchs von rhEPO, bei kommerziellen Veranstaltungen führte bereits 2001 zu einem positiven Befund, der

aufgrund der zu geringen Erythropoietinkonzentration im Urin mit der direkten Methode nicht bestätigt werden konnte. Unter Berücksichtigung der Daten aus den bisherigen Studien wurden anhand der Werte der weltbesten Ausdauerathleten und des Vergleichs mit Werten aus Applikationsstudien allgemein gültige Grenzwerte für zum EPO-Screening geeignete hämatologische Parameter aufgestellt.

Im Rahmen der durchgeführten Studien wurde die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der indirekten Parameter sowie zusätzlich die Stabilität der hämatologischen Parameter und Retikulozytenwerte untersucht. Der Vergleich hämatologischer Werte, die mit unterschiedlichen Messgeräten bestimmt wurden, zeigte, dass insbesondere für die Messung der Retikulozytenparameter die Verwendung des gleichen Hämatologiesystems notwendig ist. Werden die Blutproben bei 8 °C gelagert, ist deren Stabilität ausreichend, um sogar diese nach 60 h noch problemlos analysieren zu können. Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit immunologischer Bestimmungen zeigte deutlich, dass eine Übertragbarkeit der Werte nur bei der Verwendung identischer Immunoassays gewährleistet ist, und selbst dann ist die Etablierung laboreigener Kontrollen notwendig, um Abweichungen des verwendeten Assays zu erfassen.

Zusätzlich zu den indirekten Parametern wurden Untersuchungen hinsichtlich eines direkten Nachweises, d. h. der Anreicherung von Erythropoietin und massenspektrometrischer Analyse der abgespalteten Glykanketten, durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass für verschiedene Glykane unter geeigneten Bedingungen mit der Kombination Nanospray und TOF-MS die notwendigen Nachweisgrenzen erreicht werden können. Außerdem wurde die direkte Analytik von EPO im Urin, ausgehend von der von Lasne und de Ceauriz ^[2] veröffentlichten Methode, aufgebaut und für den Nachweis des neuen Erythropoietinpräparats NESP modifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ausgewählte Blutparameter für ein Screening um ein Doping mit erythropoesesteigernden Substanzen zu erfassen, sehr gut geeignet sind. Im Gegensatz zur Methode des direkten Nachweises von EPO im Urin, die durch die Verfügbarkeit der Referenzsubstanzen limitiert ist, bietet der indirekte Nachweis über Blutparameter den Vorteil, Veränderungen des erythropoetischen Systems, verursacht durch neue Substanzen oder Methoden, erfassen zu können. Gerade bei dem in letzter Zeit diskutierten Problem der Bluttransfusion oder Verwendung künstlicher Sauerstoffträger kann eine Nachweismethode nur auf der Basis von Blutproben entwickelt werden. Es wäre also nicht ratsam, die in den letzten Jahren mühsam etablierten hämatologischen und serologischen Parameter zugunsten des alleinigen Nachweises von EPO im Urin aufzugeben.

7 Literatur

- (1) Parisotto, R.; Gore, C. J.; Emslie, K. R.; Ashenden, M. J.; Brugnara, C.; Howe, C.; Martin, D. T.; Trout, G. J.; Hahn, A. G. A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* **2000**, *85*: 564-72.
- (2) Lasne, F.; de Ceauriz, J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* **2000**, *405*: 635.
- (3) Rizzuto, G.; Cappelletti, M.; Maione, D.; Savino, R.; Lazzaro, D.; Costa, P.; Mathiesen, I.; Cortese, R.; Ciliberto, G.; Laufer, R.; Monica, N. I.; Fattori, E. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, *96*: 6417-22.
- (4) Erslev, A. J.; Caro, J.; Miller, O.; Silver, R. Plasma Erythropoietin in Health and Disease. *Ann Clin Lab Sci* **1980**, *10*: 250-6.
- (5) Jelkmann, W. Renal Erythropoietin: Properties and Production. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **1986**, *104*: 139-215.
- (6) Kendall, R. G. Erythropoietin. *Clin Lab Haematol* **2001**, *23*: 71-80.
- (7) Lacombe, C.; Mayeux, P. Biology of Erythropoietin. *Haematologia* **1998**, *83*: 724-32.
- (8) Lacombe, C.; Mayeux, P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* **1999**, *14 Suppl 2*: 22-8.
- (9) Portsmann, B. *Retikulozyten Reifung - Analytik - Klinische Bedeutung*; Verlag D. E. Wachholz: Nürnberg, 1993.
- (10) Recny, M. A.; Scoble, H. A.; Kim, Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem* **1987**, *262*: 17156-63.
- (11) Choi, D.; Kim, M.; Park, J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *J Chromatogr B Biomed Appl* **1996**, *687*: 189-99.
- (12) Imai, N.; Kawamura, A.; Higuchi, M.; Oh-Eda, M.; Orita, T.; Kawaguchi, T.; Ochi, N. Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. *J Biochem (Tokyo)* **1990**, *107*: 352-9.
- (13) Morimoto, K.; Tsuda, E.; Said, A. A.; Uchida, E.; Hatakeyama, S.; Ueda, M.; Hayakawa, T. Biological and physicochemical characterisation of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconj J* **1996**, *13*: 1013-20.
- (14) Miyake, T.; Kung, C. K.; Goldwasser, E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* **1977**, *252*: 5558-64.
- (15) Sasaki, H.; Bothner, B.; Dell, A.; Fukuda, M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* **1987**, *262*: 12059-76.
- (16) Takeuchi, M.; Kobata, A. Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietin. *Glycobiology* **1991**, *1*: 337-46.
- (17) Tsuda, E.; Goto, M.; Murakami, A.; Akai, K.; Ueda, M.; Kawanishi, G.; Takahashi, N.; Sasaki, R.; Chiba, H.; Ishihara, H.; Mori, M.; Tejima, S.; Endo, S.; Arata, Y. Comparative Structural Study of N-linked Oligosaccharides of Urinary and Recombinant Erythropoietins. *Biochemistry* **1988**, *27*: 5646-54.
- (18) Rahbek-Nielsen, H.; Roepstorff, P.; Reischl, H.; Wozny, M.; Koll, H.; Haselbeck, A. Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **1997**, *32*: 948-58.
- (19) Skibeli, V.; Nissen-Lie, G.; Torjesen, P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* **2002**, *98*: 3626-34.
- (20) Takeuchi, M.; Inoue, N.; Strickland, T. W.; Kubota, M.; Wada, M.; Shimizu, R.; Hoshi, S.; Kozutsumi, H.; Takasaki, S.; Kobata, A. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**, *86*: 7819-22.

-
- (21) Misaizu, T.; Matsuki, S.; Strickland, T. W.; Takeuchi, M.; Kobata, A.; Takasaki, S. Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* **1995**, *86*: 4097-104.
- (22) Egrie, J. C.; Browne, J. K. Development and Characterisation of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br J Cancer* **2001**, *84*: 3-10.
- (23) Jelkmann, W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEPO and NESP. *Eur J Haematol* **2002**, *69*: 265-74.
- (24) MacDougall, I. C. Optimizing erythropoietin therapy. *Curr Opin Hematol* **1999**, *6*: 121-6.
- (25) Sunder-Plassmann, G.; Hörl, W. H. Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP). *Nieren Hochdruck* **2001**, *30*: 166-73.
- (26) Nimitz, M.; Martin, W.; Wray, V.; Klöppel, K. D.; Augustin, J.; Conradt, H. S. Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur J Biochem* **1993**, *213*: 39-56.
- (27) Mueller, P. P.; Schlenke, P.; Nimitz, M.; Conradt, H. S.; Hauser, H. Recombinant Glycoprotein Product Quality in Proliferation-Controlled BHK-21 Cells. *Biotechnol Bioeng* **1999**, *65*: 529-36.
- (28) Cointe, D.; Béliard, R.; Jorieux, S.; Leroy, Y.; Glacet, A.; Verbert, A.; Bourel, D.; Chirat, F. Unusual N-Glycosylation of a recombinant human erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties. *Glycobiology* **2000**, *10*: 511-9.
- (29) Ahluwalia, N.; Skkine, B. S.; Savin, V.; Chonko, A. Markers of Masked Iron Deficiency and Effectiveness of EPO Therapy in Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* **1997**, *30*: 532-41.
- (30) Marrades, R. M.; Alonso, J.; Roca, J.; Desuso, J. M. G.; Campistol, J. M.; Barbera, J. A.; Diaz, O.; Torregrosa, J. V.; Masclans, J. R.; Rodriguezroisin, R.; Wagner, P. D. Cellular bioenergetics after erythropoietin therapy in chronic renal failure. *J Clin Invest* **1996**, *97*: 2101-10.
- (31) Marrades, R. M.; Roca, J.; Campistol, J. M.; Diaz, O.; Barbera, J. A.; Torregrosa, J. V.; Masclans, J. R.; Cobos, A.; Rodriguezroisin, R.; Wagner, P. D. Effects of erythropoietin on muscle O₂ transport during exercise in patients with chronic renal failure. *J Clin Invest* **1996**, *97*: 2092-100.
- (32) Rohling, R. G.; Zimmermann, A. P.; Breymann, C. Intravenous versus oral iron supplementation for preoperative stimulation of hemoglobin synthesis using recombinant human erythropoietin. *J Hematother Stem Cell Res* **2000**, *9*: 497-500.
- (33) Rutherford, C. J.; Schneider, T. J.; Dempsey, H.; Kirn, D. H.; Brugnara, C.; Goldberg, M. A. Efficacy of Different Dosing Regimens for Recombinant Human Erythropoietin in a Simulated Perisurgical Setting: The Importance of Iron Availability in Optimizing Response. *Am J Med* **1994**, *96*: 139-45.
- (34) Sans, T.; Bofill, C.; Joven, J.; Cliville, X.; Simo, J. M.; Llobet, X.; Pero, A.; Galbany, J. Effectiveness of very low doses of subcutaneous recombinant human erythropoietin in facilitating autologous blood donation before orthopedic surgery. *Transfusion* **1996**, *36*: 822-6.
- (35) Breymann, C.; Bauer, C.; Major, A.; Zimmermann, R.; Gautschi, K.; Huch, A.; Huch, R. Optimal timing of repeated rh-erythropoietin administration improves its effectiveness in stimulating erythropoiesis in healthy volunteers. *Br J Haematol* **1996**, *92*: 295-301.
- (36) MacDougall, I. C.; Gray, S. J.; Elston, O.; Breen, C.; Jenkins, B.; Browne, J.; Egrie, J. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **1999**, *10*: 2392-5.
- (37) Berglund, B.; Hemmingson, P.; Birgegard, G. Detection of autologous blood transfusions in cross-country skiers. *Int J Sports Med* **1987**, *8*: 231-3.
- (38) Brien, A. J.; Simon, T. L. The effects of red blood cell infusion on 10-km race time. *JAMA* **1987**, *257*: 2761-5.
- (39) Sawka, M. N.; Young, A. J.; Muza, S. R.; Gonzalez, R. R.; Pandolf, K. B. Erythrocyte reinfusion and maximal aerobic power. An examination of modifying factors. *JAMA* **1987**, *257*: 1496-9.
-

-
- (40) Ashenden, M. A strategy to deter blood doping in sport. *Haematologia* **2002**, *87*: 225-34.
- (41) Klein, H. G. Blood transfusion and athletics. Games people play. *N Engl J Med* **1985**, *312*: 854-6.
- (42) Sawka, M. N.; Joyner, M. J.; Miles, D. S.; Robertson, R. J.; Spriet, L. L.; Young, A. J. The use of blood doping as an ergogenic aid. *Med Sci Sports Exerc* **1996**, *28*: R1-R8.
- (43) Ekblom, B. T. Blood boosting and sports. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2000**, *14*: 89-98.
- (44) Ekblom, B.; Berglund, B. Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. *Scan J Med Sci Sports* **1991**, *1*: 88-93.
- (45) Castelli, G.; Famularo, A.; Semino, C.; Machi, A. M.; Ceci, A.; Cannella, G.; Meliloli, G. Detection Of Anti-Erythropoietin Antibodies In Haemodialysis Patients Treated With Recombinant Human-Erythropoietin. *Pharmacol Res* **2000**, *41*: 313-8.
- (46) Clasing, D. Erythropoietin. *Dtsch Z Sportmed* **1997**, *48*: 452-7.
- (47) Carallo, C.; Pujia, A.; Irace, C.; De Franceschi, M. S.; Motti, C.; Gnasso, A. Whole Blood viscosity and haematocrit are associated with internal carotid atherosclerosis in men. *Coron Artery Dis* **1998**, *9*: 113-7.
- (48) Wannamethee, G.; Shaper, A. G. Haematocrit: relationship with blood lipids, blood pressure and other cardiovascular risk factors. *Thromb Haemost* **1994**, *72*: 58-64.
- (49) Gagnon, D. R.; Zhang, T. J.; Brand, F. N.; Kannel, W. B. Hematocrit and the risk of cardiovascular disease - The Framingham Study: A 34-year follow-up. *Am Heart J* **1994**, *127*: 674-82.
- (50) Ernst, E. Haematokrit and cardiovascular risk. *J Intern Med* **1995**, *237*: 527-8.
- (51) Erikssen, G.; Thaulow, E.; Sandvik, L.; Stormorken, H.; Erikssen, J. Haematokrit: a predictor of cardiovascular mortality? *J Intern Med* **1993**, *234*: 493-9.
- (52) Birkeland, K. I.; Donike, M.; Ljungqvist, A.; Fagerhol, M.; Jensen, J.; Hemmersbach, P.; Oftebro, H.; Haug, E. Blood Sampling in Doping Control. *Int J Sports Med* **1997**, *18*: 8-12.
- (53) Gareau, R.; Gagnon, M. G.; Thellend, C.; Chenard, C.; Audran, M.; Chanal, J.-L.; Ayotte, C.; Brisson, G. R. Transferrin Soluble receptor: A Possible Probe for Detection of Erythropoietin Abuse by Athletes. *Horm Metab Res* **1994**, *26*: 311-2.
- (54) Feelders, R. A.; Kuiper-Kramer, E. P. A.; van Eijk, H. G. Structure, Function and Clinical Significance of Transferrin Receptor. *Clin Chem Lab Med* **1999**, *37*: 1-10.
- (55) Gareau, R. Erythropoietin abuse in athletes. *Nature* **1996**, *380*: 113.
- (56) Bresolle, F.; Audran, M.; Gareau, R.; Baynes, R. D.; Guidicelli, C.; Gomeni, R. Population Pharmacodynamics for Monitoring Epoetin in Athletes. *Clin Drug Invest* **1997**, *14*: 233-42.
- (57) Audran, M.; Gareau, R.; Matecki, S.; Durand, F.; Chenard, C.; Sicart, M. T.; Marion, B.; Bressolle, F. Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc* **1999**, *31*: 639-45.
- (58) Ashenden, M. J.; Fricker, P. A.; Morrison, N. K.; Dobson, G. P.; Hahn, A. G. The haematological response to an iron injection amongst female athletes. *Int J Sports Med* **1998**, *19*: 474-8.
- (59) Dixon, L. R. The complete blood count: physiologic basis and clinical usage. *J Perinat Neonatal Nurs* **1997**, *11*: 1-18.
- (60) Ashenden, M. J.; Dobson, G. P.; Hahn, A. G. Sensitivity of reticulocyte indices to iron therapy in an intensely training athlete. *Br J Sports Med* **1998**, *32*: 259-60.
- (61) Major, A.; Mathez-Loic, F.; Rohling, R.; Gautsch, K.; Brugnara, C. The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* **1997**, *98*: 292-4.
- (62) d'Onofrio, G.; Kuse, R.; Foures, C.; Jou, J. M.; Pradella, M.; Zini, G. Reticulocytes in haematological disorders. *Clin Lab Haematol* **1996**, *18*: 29-34.
- (63) Tarallo, P.; Humbert, J. C.; Mahassen, P.; Fournier, B.; Henny, J. Reticulocytes: Biological variations and reference limits. *Eur J Haematol* **1994**, *53*: 11-5.
- (64) Tanaka, H.; Tatsumi, N.; Kann, E.; Sawamura, A.; Yoshimoto, M.; Inariba, H.; Ohno, Y.; Kishimoto, T.; Maekawa, M. EPO Test in Hemodialysis Patients. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* **1993**, *21*: 221-9.
-

-
- (65) Han, Y. S.; Kishimoto, T. Reticulocyte maturity index reflects erythropoietin effects in hemodialysis patients. *Osaka City Med J* **1997**, *43*: 69-76.
- (66) Parisotto, R.; Wu, M.; Ashenden, M. J.; Emslie, K. R.; Christopher, J. G.; Howe, C.; Kazlauskas, R.; Sharpe, K.; Trout, G. K.; Xie, M.; Hahn, A. G. Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* **2001**, *86*: 128-37.
- (67) Heinicke, K.; Wolfarth, B.; Winchenbach, P.; Biermann, B.; Schmid, A.; Huber, G.; Friedmann, B.; Schmidt, W. Blood volume and hemoglobin mass in elite athletes of different disciplines. *Int J Sports Med* **2001**, *22*: 504-12.
- (68) Schmidt, W.; Heinicke, K.; Rojas, J.; Manuel-Gomez, J.; Serrato, M.; Mora, M.; Wolfarth, B.; Schmid, A.; Keul, J. Blood volume and hemoglobin mass in endurance athletes from moderate altitude. *Med Sci Sports Exerc* **2002**, *34*: 1934-40.
- (69) Schmidt, W.; Biermann, B.; Winchenbach, P.; S., L.; Boning, D. How valid is the determination of hematocrit values to detect blood manipulations ? *Int J Sports Med* **2000**, *21*: 133-8.
- (70) Storing, P. L.; Gaines Das, R. E. The International Standard for Recombinant DNA-derived Erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol* **1992**, *134*: 459-84.
- (71) Storing, P. L.; Tiplady, R. J.; Gaines Das, R. E.; Rafferty, B.; Mistry, Y. G. Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J Endocrinol* **1996**, *150*: 401-12.
- (72) Storing, P. L.; Tiplady, R. J.; Gaines Das, R. E.; Stenning, B. E.; Lamikanra, A.; Rafferty, B.; Lee, J. Epoetin alfa and beta differ in thier erythropoietin isoform compositions and biological properties. *Br J Haematol* **1998**, *100*: 79-89.
- (73) Inoue, N.; Takeuchi, M.; Ohashi, H.; Suzuk, T., Eds. *The produktion of recombinant human erythropoietin*; Elsevier Science B.V., 1995.
- (74) Tam, R. C.; Coleman, S. L.; Tiplady, R. J.; Storing, P. L.; Cotes, P. M. Comparison of human, rat and mouse erythropoietins by isoelectric focusing: differences between serum and urinary erythropoietins. *Br J Haematol* **1991**, *79*: 504-11.
- (75) Kung, C. K.; Goldwasser, E. A probable conformational difference between recombinant and urinary erythropoietins. *Proteins* **1997**, *28*: 94-8.
- (76) Linsley, K. B.; Chan, S. Y.; Chan, S.; Reinhold, B. B.; Lisi, P. J.; Reinhold, V. N. Applications of Electrospray Mass Spectrometry to Erythropoietin N- and O-linked Glycans. *Anal Biochem* **1994**, *219*: 207-17.
- (77) Kanazawa, K.; Ashida, K.; Itoh, M.; Nagai, H.; Sasaki, H.; Fukuda, M. Establishment of a Method for Mapping of N-linked Oligosaccharides and Ist Use to Analyse Industrially Produced Recombinant Erythropoietin. *Biol Pharm Bull* **1999**, *22*: 339-46.
- (78) Nimtz, M.; Wray, V.; Rüdiger, A.; Conradt, H. S. Identifikation and struktural charakterisation of a mannose-6-phosphat containing oligomannosidic N-glycan from human erythropoietin secreted by recombinant BHK-21 cells. *FEBS Lett* **1995**, *365*: 203-8.
- (79) Wide, L.; Bengtsson, C.; Berglund, B.; Ekblom, B. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc* **1995**, *27*: 1569-76.
- (80) Lasne, F. Double-Blotting: a solution to the problem of non-specific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* **2001**, *253*: 125-31.
- (81) Takubo, T.; Kitano, K.; Ohto, Y.; Ikemoto, T.; Kikuchi, T.; Inai, S. The usefulness of the R-1000 automated reticulocyte counter in a clinical hospital laboratory. *Eur J Haematol* **1989**, *43*: 88-9.
- (82) Tycko, D. H.; Metz, M. H.; Epstein, E. A.; Grinbaum, A. Flow-cytometric light scattering measurement of red blood cell volume and hemoglobin concentration. *Applied Optics* **1985**, *24*: 1355-65.
- (83) Lämmlli, U. K. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*: 680-5.
-

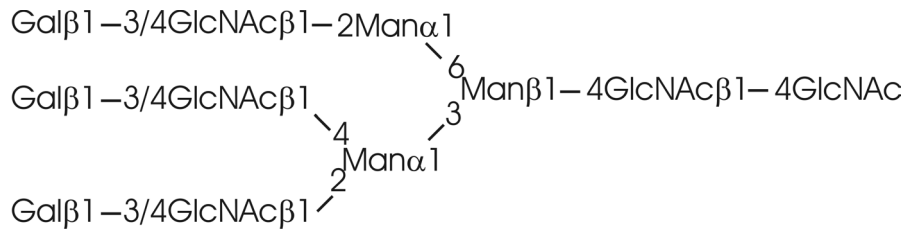
-
- (84) Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1987**, *8*: 93-9.
- (85) Bland, J. M.; Altman, D. G. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1986**, *1*: 307-10.
- (86) Glantz, S. A., Ed. *Biostatistik: EinFach für die Praxis*, 4. ed.; The McGraw-Hill Publishing Company - Regional Office for Germany, Austria and Switzerland: Frankfurt am Main, 1998.
- (87) Lange, S.; Bender, R. Quantile, empirische Verteilungsfunktion und Box Plot. *Dtsch Med Wschr* **2001**, *126*: T27-T8.
- (88) Tukey, J. W. *Explanatory Data Analysis*; Addison-Wesley, 1977.
- (89) Lange, S.; Bender, R. Median oder Mittelwert ? *Dtsch Med Wschr* **2001**, *126*: T25-T6.
- (90) Vergouwen, P. C.; Collee, T.; Marx, J. J. M. Haematocrit in elite athletes. *Int J Sports Med* **1999**, *20*: 538-41.
- (91) Manfredini, F.; Tschukin, A.; Moranm, M.; Mongolinim, C.; Buzzoni, D.; Haberstroh, J. Blood testing in biathlon: observation of hematocrit values during competitive periods 1994-1997. *Int J Sports Med* **1999**, *20*: 403-6.
- (92) Gore, C. J.; Hahn, A. G.; Burge, C. M.; Telford, R. D. VO₂max and haemoglobin mass of trained athletes during high intensity training. *Int J Sports Med* **1997**, *18*: 477-82.
- (93) Souillard, A.; Audran, M.; Bressolle, F.; Gareau, R.; Duvallet, A.; Chanal, J. L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control. *Br J Clin Pharmacol* **1996**, *42*: 355-64.
- (94) Magnani, M. Monitoring erythropoietin abuse in athletes. *Br J Haematol* **1999**, *106*: 260-1.
- (95) Major, A.; Bauer, C.; Breymann, C.; Huch, A.; Huch, R. rh-Erythropoietin stimulates immature reticulocyte release in man. *Br J Haematol* **1994**, *87*: 605-8.
- (96) Brugnara, C.; Colella, G.; Cremins, J.; Langley, R. C.; Schneider, T. J.; Rutherford, C. J.; Goldberg, M. A. Effects of subcutaneous recombinant human erythropoietin in normal subjects: Development of decreased reticulocyte hemoglobin content and iron-deficient erythropoiesis. *J Lab Clin Med* **1994**, *123*: 660-7.
- (97) Berglund, B.; Ekblom, B. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med* **1991**, *229*: 125-30.
- (98) Neuhaus, D.; Gaehtgens, P. Haemorrheology and long term exercise. *Sports Med* **1994**, *18*: 10-21.
- (99) Brun, J. F.; Khaled, S.; Raynaud, E.; Bouix, D.; Micallef, J. P.; Orsetti, A. The triphasic effects of exercise on blood rheology: which relevance to physiology and pathophysiology ? *Clin Hemorheol Microrcirc* **1998**, *19*: 89-104.
- (100) Watson, E.; Yao, F. Capillary Electrophoretic Separation of Human Recombinant Erythropoietin (r-HuEPO) Glycoforms. *Anal Biochem* **1993**, *210*: 389-93.
- (101) Rush, R. S.; Derby, P. L.; Smith, D. M.; Merry, C.; Rogers, G.; Rohde, M. F.; Katta, V. Microheterogeneity of Erythropoietin Carbohydrate Structure. *Anal Chem* **1995**, *67*: 1442-52.
- (102) Kawasaki, N.; Ohta, M.; Hyuga, S.; Hyuga, M.; Hayakawa, T. Application of Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry to the Analysis of the Site-Specific Carbohydrate Heterogeneity in Erythropoietin. *Anal Biochem* **2000**, *285*: 82-91.
- (103) Huddleston, M. J.; Bean, M. F.; Carr, S. A. Collisional Fragmentation of Glycopeptides by Electrospray Ionization LC/MS and LC/MS/MS: Methods for Selective Detection of Glycopeptides in Protein Digests. *Anal Chem* **1993**, *65*: 877-84.
- (104) Carr, S. A.; Huddleston, M. J.; Bean, M. F. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci* **1993**, *2*: 183-96.
- (105) Catlin, D. H.; Breidbach, A.; Elliott, S.; Glaspy, J. Comparison of the Isoelectric Focussing Pattern of Darbeopoetin Alfa, Recombinant Human Erythropoietin, and Endogenous Erythropoietin from Human Urine. *Clin Chem* **2002**, *48*: 2057-9.
-

-
- (106) Casoni, I.; Ricci, G.; Ballarin, E.; Borsetto, C.; Grazi, G.; Guglielmini, C.; Manfredini, F.; Mazzoni, G.; Patracchini, M.; De Paoli Vitali, E.; Rigolin, F. Hematological indices of erythropoietin administration in athletes. *Int J Sports Med* **1993**, *14*: 307-11.
- (107) Brugnara, C.; Zelmanovic, D.; Sorette, M.; Ballas, S. K.; Platt, O. Reticulocyte hemoglobin: an integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity. *Am J Clin Pathol* **1997**, *108*: 133-42.
- (108) Cheung, W. K.; Goon, B. L.; Guilfoyle, M. C.; Wacholtz, M. C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple suncutaneous doses to healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* **1998**, *64*: 412-23.
- (109) Breymann, C.; Rohling, R.; Krafft, A.; Huch, A.; Huch, R. Blood Doping with Erythropoietin (rhEPO) and Assessment of functional iron Deficiency in healthy Volunteers. *Br J Haematol* **2000**, *108*: 883-4.
- (110) Birkeland, K. I.; Stray-Gundersen, J.; Hemmersbach, P.; Hallen, J.; Haug, E.; Bahr, R. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance. *Med Sci Sports Exerc* **2000**, *32*: 1238-43.
- (111) Magnani, M.; Corsi, D.; Bianchi, M.; Paiardini, M.; Galluzzi, L.; Gargiullo, E.; Parisi, A.; Pigozzi, F. Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol Dis* **2001**, *27*: 559-71.
- (112) Ekblom, B. Blood Doping and Erythropoietin: The Effects of Variation in Hemoglobin Concentration and Other Related Factors on Physical Performance. *Am J Sports Med* **1996**, *24*: S40-2.
- (113) Parisotto, R.; Gore, C. J.; Hahn, A. G.; Ashenden, M. J.; Olds, T. S.; Martin, D. T.; Pyne, D. B.; Gawthorn, K.; Brugnara, C. Reticulocyte Parameters as Potential Discriminators of Recombinant Human Erythropoietin Abuse in Elite Athletes. *Int J Sports Med* **2000**, *21*: 471-9.
- (114) Videman, T.; Lereim, I.; Hemmingsson, P.; Turner, M. S.; Rousseau-Bianchi, M.P.; Jenoure, P.; Raas, E.; Schonhuber, H.; Rusko, H.; Stray-Gundersen, J. Changes in hemoglobin values in elite cross-country skiers from 1987-1999. *Scand J Med Sci Sports* **2000**, *10*: 98-102.
- (115) Schumacher, Y. O.; Grathwohl, D.; Barturen, J. M.; Wollenweber, M.; Heinrich, L.; Schmid, A.; Huber, G.; Keul, J. Haemoglobin, Haematocrit and Red Blood Cell Indices in Elite Cyclists. Are the Control Values for Blood Testing Valid? *Int J Sports Med* **2000**, *21*: 380-5.
- (116) Weight, L. M.; Byrne, M. J.; Jacobs, P. Haemolytic effects of exercise. *Clin Sci (Lond)* **1991**, *81*: 147-52.
- (117) Hallberg, L.; Magnusson, B. The etiology of "sports anemia". A physiological adaptation of the oxygen-dissociation curve of hemoglobin to an unphysiological exercise load. *Acta Med Scand* **1984**, *216*: 145-8.
- (118) Gledhill, N.; Warburton, D.; Jamnik, V. Haemoglobin, Blood Volume, Cardiac Function and Aerobic Power. *Can J Appl Physiol* **1999**, *24*: 54-65.
- (119) Schaefer, R. M.; Schaefer, L. Hypochromic red blood cells and reticulocytes. *Kidney Int Suppl* **1999**, *55*: S44-8.
- (120) Ashenden, M. J.; Pyne, D. B.; Parisotto, R.; Dobson, G. P.; Hahn, A. G. Can reticulocyte parameters be of use in detecting iron deficient erythropoiesis in female athletes? *J Sports Med Phys Fitness* **1999**, *39*: 140-6.
- (121) Rowan, R. M.; Cavil, I.; Corebrand, J. X. The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. *Clin Lab Haem* **1996**, *18*: 3-8.
- (122) Brugnara, C. Reticulocyte Cellular Indices: A new Approach in the Diagnosis of Anemias and Monitoring of Erythropoietic Function. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2000**, *37*: 93-130.
- (123) Sowade, O.; Sowade, B.; Brilla, K.; Franke, W.; Stephan, P.; Gross, S.; Scigalla, P.; Warnke, H. Kinetics of Reticulocyte Maturity Fractions and Indices and Iron Status During Therapy With Epoetin beta (Recombinant Human Erythropoietin) in Cardiac Surgery Patients. *Am J Hematol* **1997**, *55*: 89-96.
- (124) Heilmeyer, J.; Westhäuser, R. Reiferstadien an überlebenden Retikulozyten in vitro und ihre Bedeutung für die Schätzung der täglichen Hämoglobinproduktion in vivo. *Z. Klin. Med.* **1932**, *121*: 361-5.
-

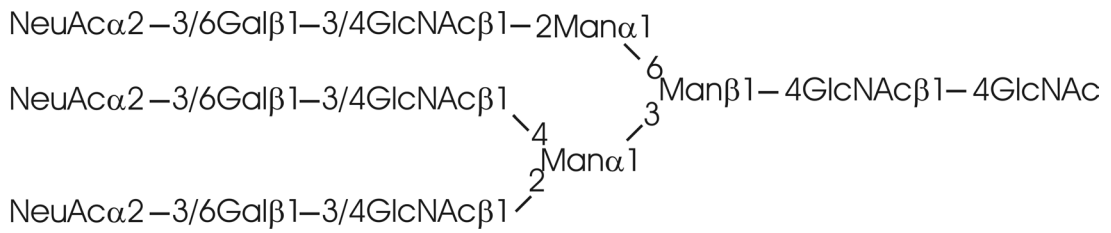
-
- (125) Davis, B. H.; Bigelow, N. C.; Koepke, J. A.; Borowitz, M. J.; Houwen, B.; Jacobberger, J. W.; Pierre, R. V.; Corash, L.; Ault, K. A.; Batjer, J. D. Flow Cytometric Reticulocyte Analysis. *Am J Clin Pathol* **1994**, *102*: 468-77.
- (126) Corberand, J. X. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* **1996**, *38*: 487-94.
- (127) d'Onofrio, G.; Kim, Y. R.; Schulze, S.; Lorentz, T.; Dörner, K.; Goossens, W.; Zini, G.; Tommasi, M.; Kendall, R.; Scott, C. S. Evaluation of the Abbot Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACScan and Sysmex R1000 methods. *Clin Lab Haematol* **1997**, *19*: 253-60.
- (128) Villamor, N.; Kirsch, A.; Huhn, D.; Vives-Corrons, J. L.; Serke, S. Interference of blood leucocytes in the measurements of immature red cells (reticulocytes) by two different (semi-)automated flow-cytometry technologie. *Clin Lab Haematol* **1996**, *18*: 89-94.
- (129) Tarallo, P.; Humbert, J. C.; Fournier, B.; Mahassen, P.; Henny, J. Reticulocytes: reference limits. *Clin Lab Haematol* **1996**, *18*: 13-4.
- (130) Goodnough, L. T.; Skinine, B.; Brugnara, C. Erythropoietin, iron and erythropoiesis. *Blood* **2000**, *96*: 823-33.
- (131) Bovy, C.; Tsobo, C.; Crapanzano, L.; Rorive, G.; Beguin, Y.; Albert, A.; Paulus, J. M. Factors deterring the percentage of red blood cells in hemodialysis patients. *Kidney Int* **1999**, *56*: 1113-9.
- (132) Punnonen, K.; Irjala, K.; Rajamaki, A. Serum transferrin receptor, ferritin and TfR-F index in identification of latent iron deficiency. *Eur J Haematol* **1998**, *60*: 135-7.
- (133) Rowland, T. W. Iron Deficiency in the young Athlete. *Pediatr Clin North Am* **1990**, *37*: 1153-63.
- (134) Rowland, T. W.; Stephen, A. B.; Kelleher, J. F. Iron Deficiency in Adolescent Endurance Athletes. *J Adolesc Health Care* **1987**, *8*: 322-6.
- (135) Ho, C. H. The differential diagnostic values of serum transferrin receptor, serum ferritin and related parameters in the patients with various causes of anemia. *Haematologica* **2001**, *86*: 206-7.
- (136) R'zik, S.; Loo, M.; Beguin, Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. *Haematologica* **2001**, *86*: 244-51.
- (137) Roberts, D.; Smith, D. J. Erythropoietin does not demonstrate circadian rhythm in healthy men. *J Appl Physiol* **1996**, *80*: 847-51.
- (138) Jones, A. R.; Twedt, D.; Swaim, W.; Gottfried, E. Diurnal change of blood count analytes in normal subjects. *Am J Clin Pathol* **1996**, *106*: 723-7.
- (139) Klausen, T.; Dela, F.; Hippe, E.; Galbo, H. Diurnal variations of serum erythropoietin in trained and untrained subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **1993**, *67*: 545-8.
- (140) Grünenfelder, C. H. Zirkadiane Periodik des Serumerythropoietins. *Schweizerische Rundschau für Medizin (Praxis)* **1996**, *85*: 1283-93.
- (141) Wide, L.; Bengtsson, C.; Birgegard, G. Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br J Haematol* **1989**, *72*: 85-90.
- (142) Pasqualetti, P.; Casale, R. Circadian rhythm of serum erythropoietin in healthy subjects. *Riv Eur Sci Med Farmacol* **1996**, *18*: 91-3.
- (143) Malcovati, L.; Pascutto, C.; Cazzola, M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica* **2003**, *88*: 570-81.
- (144) Yeung, G. S.; Kjarsgaard, J. C.; Zlotkin, S. H. Disparity of serum transferrin receptor measurements among different assay methods. *Eur J Clin Nutr* **1998**, *52*: 801-4.
- (145) Akesson, A.; Bjellerup, P.; Vahter, M. Evaluation of kits for measurement of the soluble transferrin receptor. *Scand J Clin Lab Invest* **1999**, *59*: 77-81.
- (146) Virtanen, M.; Siimes, M. A.; Krusius, T.; Pettersson, T.; Teppos, A. M.; Viinikka, L. Evaluation of an ELISA test for determination of the serum transferrin receptor. Demonstration of discordance between results obtained with two methods. *Scand J Clin Lab Invest* **1998**, *58*: 561-8.
- (147) Gueguen-Duchesne, M.; Durand, F.; Beillot, J. Effects of maximal physical exercise on haemorrhological parameters in top level sportsmen. *Clin Hemorheol* **1989**, *9*: 625-32.
- (148) Stray-Gundersen, J.; Videman, T.; Penttila, I.; Lereim, I. Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or ? *Clin J Sport Med* **2003**, *13*: 132-7.
-

-
- (149) Bodary, P. F.; Russel, R. P.; Quiong, F. W.; McMillan, G. S. Effects of acute exercise on plasma erythropoietin levels in trained runners. *Med Sci Sports Exerc* **1999**, *31*: 543-6.
- (150) Robinson, N.; Saugy, M.; Mangin, P. Effects of exercise on the secondary blood markers commonly used to suspect erythropoietin doping. *Clin Lab Haem* **2003**, *49*: 57-62.
- (151) Engfred, K.; Kjaer, M.; Secher, N. H.; Friedman, D. B.; Hanel, B.; Nielsen, O. J.; Bach, F. W.; Galbo, H.; Levine, B. D. Hypoxia and training-induced adaption of hormonal responses to exercise in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **1994**, *68*: 303-9.
- (152) Schmidt, W.; Spielvogel, H.; Eckardt, K. U.; Quintela, A.; Penaloza, R. Effects of chronic hypoxia and exercise on plasma erythropoietin in high-altitude residents. *J Appl Physiol* **1993**, *74*: 1874-8.
- (153) Rocker, L.; Hinz, K.; Holland, K.; Gunga, H. C.; Vogelgesang, J.; Kiesewetter, H. Influence of endurance exercise (triathlon) on circulating transferrin receptors and other indicators of iron status in female athletes. *Clin Lab Haem* **2002**, *48*: 307-12.
- (154) Schumacher, Y. O.; Schmid, A.; Konig, D.; Berg, A. Effects of exercise on soluble transferrin receptor and other variables of the iron status. *Br J Sports Med* **2002**, *36*: 195-9.
- (155) Sharpe, K.; Hopkins, W.; Emslie, K. R.; Howe, C.; Trout, G. J.; Kazlauskas, R.; Ashenden, M. J.; Gore, C. J.; Parisotto, R.; Hahn, A. G. Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica* **2002**, *87*: 1248-57.
- (156) Gore, C. J.; Parisotto, R.; Ashenden, M. J.; Stray-Gundersen, J.; Sharpe, K.; Hopkins, W.; Emslie, K. R.; Howe, C.; Trout, G. J.; Kazlauskas, R.; Hahn, A. G. Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* **2003**, *88*: 333-44.
- (157) Ashenden, M. J.; Gore, C. J.; Parisotto, R.; Sharpe, K.; Hopkins, W., G.; Hahn, A. G. Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica* **2003**, *88*: 1053-62.
- (158) Marsden, J. T.; Sherwood, R. A.; Peters, T. J. Evaluation of six erythropoietin kits. *Ann Clin Biochem* **1999**, *36*: 380-7.
- (159) Suominen, P.; Punnonen, K.; Rajamäki, A.; Irjala, K. Evaluation of a new immunoenzymetric assay for measuring soluble transferrin receptor to detect iron deficiency in anemic patients. *Clin Chem* **1997**, *43*: 1641-6.
- (160) Van den Bossche, J.; Devreese, K.; Malfait, R.; Van de Vyvere, M.; De Schouwer, P. Comparison of the reticulocyte mode of the Abx Pentra 120 Retic, Coulter General-S, Sysmex SE 9500, Abbott CD 4000 and Bayer Advia 120 haematology analysers in a simultaneous evaluation. *Clin Lab Haematol* **2001**, *23*: 355-60.
- (161) Buttarello, M.; Bulian, P.; Farina, G.; Temporin, V.; Toffolo, L.; Trabuio, E.; Rizzotti, P. Flow cytometric reticulocyte counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers: an NCCLS-ICSH approach. *Am J Clin Pathol* **2001**, *115*: 100-11.
- (162) Cavill, I.; Kraaijenhagen, R.; Pradella, R.; D'Onofrios, G.; Herkner, K.; Rowan, R. M.; Theodorsen, L.; Tichelli, T. In vitro stability of the reticulocyte count. *Clin Lab Haematol* **1996**, *18*: 9-11.
- (163) Breymann, C. Erythropoietin test methods. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2000**, *14*: 135-45.
- (164) Souillard, A.; Audran, M.; Bressolle, F.; Jaussaud, P.; Gareau, R. Pharmacokinetics and haematological parameters of recombinant human erythropoietin after subcutaneous administrations in horses. *Biopharm Drug Dispos* **1996**, *17*: 805-15.
- (165) Cazzola, M. A global strategy for prevention and detection of blood doping with erythropoietin and related drugs. *Haematologica* **2000**, *85*: 561-3.
- (166) Lippi, G.; Guidi, G. Laboratory Screening for Erythropoietin Abuse in Sport: an Emerging Challenge. *Clin Chem Lab Med* **2000**, *38*: 13-9.
- (167) Sasaki, H.; Ochi, N.; Dell, A.; Fukuda, M. Site-Specific Glycosilation of Human Recombinant Erythropoietin: Analysis of Glycopeptides or Peptides at Each Glycosilation Site by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Biochemistry* **1988**, *27*: 8618-26.
-

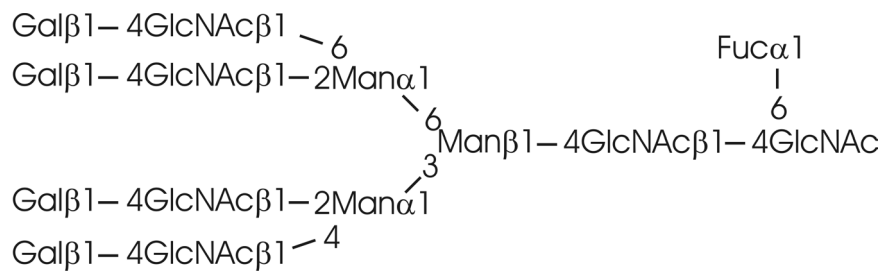
-
- (168) Mazsaroff, I.; Yu, W.; Kelley, B. D.; Vath, J. E. Quantitative Comparison of Global Carbohydrate Structures of Glycoproteins using LC-MS and In-Source Fragmentation. *Anal Chem* **1997**, *69*: 2517-24.
- (169) Eshraghi, J.; Chowdhury, S. K. Factors Affecting Electrospray Ionization of Effluents Containing Trifluoroacetic Acid for High-Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry. *Anal Chem* **1993**, *65*: 3528-33.
- (170) Duffin, K. L.; Welphy, J. K.; Huang, E.; Henion, J. D. Charakterization of N-linked Oligosaccharides by Electrospray and Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* **1992**, *64*: 1440-8.
- (171) Charlwood, J.; Langride, J.; Camilleri, P. Strutral Characterisation of N-linked Glycan Mixtures by Precursor Ion Scanning and Tandem Mass Spectrometric Analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *13*: 1522-30.
- (172) Geromanos, S.; Freckleton, G.; Tempst, P. Tuning of an Electrospray Ionization Source for Maximum Peptide-Ion Transmission into a Mass Spectrometer. *Anal Chem* **2000**, *72*: 777-90.
- (173) Mirgorodskaya, E.; Roepstorff, P.; Zubarev, R. A. Localisation of O-Glycosylation Sites in Peptides by Electron Capture Dissociation in a Fourier Transform Mass Spectrometer. *Anal Chem* **1999**, *71*: 4431-6.
- (174) Thomsson, K. A.; Karlsson, N. G.; Hansson, G. C. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry as a tool for the analysis of sulfated oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Chromatogr A* **1999**, *854*: 131-9.
- (175) Loo, J. A.; Ogorzalek Loo, R. R.; Light, K. J.; Edmonds, C. G.; Smith, R. D. Multiply Charged Negative Ions by Electrospray Ionization of Polypeptides and Proteins. *Anal Chem* **1992**, *64*: 81-8.
- (176) Bahr, U.; Pfenniger, A.; Karas, M.; Stahl, B. High-Sensitivity Analysis of Neutral Underivatized Oligosaccharides by Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *Anal Chem* **1997**, *69*: 4530-5.



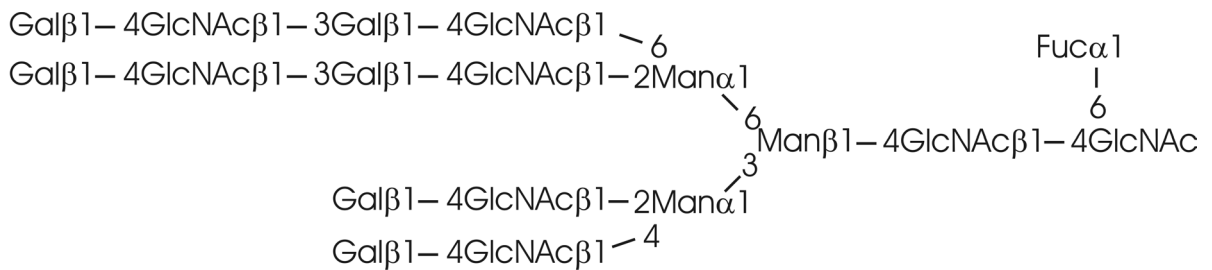
Struktur Standard NA3



Struktur Standard A3



Struktur Standard StD



Struktur Standard StF

Anhang 2

Parameter der Literaturstudien mit Applikation von rhEPO

Studie	Probanden- gruppen	rhEPO-Dosis und Applikation
Casoni et al. ^[106]	20 Männer	30 IU/kg Körpergewicht (KG); täglich, 45 Tage lang; zusätzliche Eisensubstitution, Folsäure, Vitamin B12, Vitamin B6
Brugnara et al. ^[96]	8 Männer	300 IU/kg KG; Tag 1, 4, 7, 10; zusätzliche Eisensubstitution
	8 Männer	400 IU/kg KG; Tag 1, 5, 9; zusätzliche Eisensubstitution
	8 Männer	600 IU/kg KG; Tag 1, 10; zusätzliche Eisensubstitution
Major et al. ^[95]	6 Männer, 2 Frauen	300 IU/kg KG; einmal
	3 Männer, 2 Frauen	Kontrollgruppe
Breymann et al. ^[35]	2 Männer, 3 Frauen	Kontrollgruppe; zusätzliche Eisensubstitution
	3 Männer, 2 Frauen	300 IU/kg KG; Tag 0, 1; zusätzliche Eisensubstitution
	3 Männer, 2 Frauen	300 IU/kg KG; Tag 0, 3; zusätzliche Eisensubstitution
Brugnara et al. ^[107]	8 Männer	400 IU/kg KG; Tag 1, 5, 9; zusätzliche Eisensubstitution
Cheung et al. ^[108]	5 Männer	600 IU/kg KG; einmal wöchentlich, 4 Wochen; zusätzliche Eisensubstitution
	5 Männer	Kontrollgruppe
Breymann et al. ^[109]	2 Männer	150 IU/kg KG; Tag 0, 2, 4; zusätzliche Eisensubstitution (i.v.)
	1 Mann	150 IU/kg KG; Tag 0, 2, 4; zusätzliche Eisensubstitution (oral)
	1 Mann	150 IU/kg KG; Tag 0, 2, 4

Birkeland et al. ^[110]	10 Männer	5000 IU pro Woche, 3 Wochen; zusätzliche Eisensubstitution
	10 Männer	Placebo; zusätzliche Eisensubstitution
Parisotto et al. ^[1]	8 Männer, 2 Frauen	50 IU/kg KG; dreimal wöchentlich, 4 Wochen; zusätzliche Eisensubstitution (i.m.)
	7 Männer, 1 Frau	50 IU/kg KG; dreimal wöchentlich, 4 Wochen; zusätzliche Eisensubstitution (oral)
	7 Männer, 2 Frauen	Placebo
Magnani et al. ^[111]	5 Männer (Gruppe A)	200 IU/kg KG; Tag 0, 2, 4, 8, 10
	5 Männer (Gruppe B)	200 IU/kg KG; Tag 0, 2, 4, 8, 10; zusätzliche Eisensubstitution, Folsäure, Vitamin B12
	8 Männer (Gruppe C)	30 IU/kg KG; Tag 0, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 21, 24, 28; zusätzliche Eisensubstitution, Folsäure, Vitamin B12

Veröffentlichungen und Poster

Veröffentlichungen

Bialas, B., Schwenke, D., Schänzer, W., Müller, K.: Diurnal variation of indirect parameters for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. In: W. Schänzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck-Engelke (eds.) *Recent advances in doping analysis* (9). Sport und Buch Strauß, Köln **2001**, 311-316.

Schwenke, D.; Müller, R. K. Erythropoietin und Doping. *Dtsch Z Sportmed* **2002**, 53.

Poster

Manfred Donike Workshop 19th Cologne Workshop on Dope Analysis
Köln, 18.-23. März 2001

Diurnal variation of indirect parameters for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes

B. Bialas, D. Schwenke, W. Schänzer, R. K. Müller

6th International Lübeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and other Hemopoietic Growth Factors
Lübeck, 26.-29. Juni 2003

Experiences with the introduction of the EPO-test in doping control

D. Schwenke, R. K. Müller

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. R. K. Müller im Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Kreischa angefertigt.

Kreischa, den 12.05.2004

Dirk Schwenke