

Aus dem Institut für Biochemie
der Deutschen Sporthochschule Köln
Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. Wilhelm Schänzer

**NACHWEIS VON BLUT- UND EPODOPING.
UNTERSUCHUNGEN ZUR VALIDITÄT DER DIREKTEN UND
INDIREKTEN METHODEN**

von der Deutschen Sporthochschule Köln zur Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Sportwissenschaften

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Sven Christian Voss
aus Lüdenscheid

Köln 2012

Erste/r Gutachter/in: Prof. Dr. Wilhelm Schänzer

Zweite/r Gutachter /in:

Vorsitzende/r des Promotionsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung:

Eidesstattliche Versicherungen gem. § 7 Abs. 2 Nr. 4 und 5:

Hierdurch versichere ich:

Ich habe diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und technischen Hilfen angefertigt; sie hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen. Wörtlich übernommene Textstellen, auch Einzelsätze oder Teile davon, sind als Zitate kenntlich gemacht worden.

Hierdurch erkläre ich, dass ich die „Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis“ der Deutschen Sporthochschule Köln eingehalten habe.

Datum, Unterschrift

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Veröffentlichungen:

Voss SC, Thevis M, Schinkothe T, Schänzer W: Detection of Homologous Blood Transfusion. Int J Sports Med. 2007; 28:633-637

Voss SC, Flenker U, Majer B, Schänzer W: Stability tests for hematological parameters in antidoping analyses, Lab Hematol. 2008; 14(3):24-9

Voss S, Lüdke A, Romberg S, et al: Effects of high intensity exercise on isoelectric profiles and SDS-PAGE mobility of erythropoietin. Int J Sports Med. 2010 Jun;31(6):367-71

Achtzehn S, de Marees M, Voss SC, et al: Retikulozyten: Untersuchungen zur Referenzwertermittlung und zum Vergleich unterschiedlicher Laboranalysegeräte, Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin. 2010; 61 (9): 208-215

Tagungsbeiträge:

Voss SC, Majer B, Schänzer W, Thevis M (2006): Validation and signal amplification of a flow cytometric method to detect homologous blood transfusion. In: Schänzer W; Geyer H; Gotzmann A; Mareck U (Editors), Recent Advances in Doping Analysis (14), Sport und Buch Strauß, Köln 2006

Voss SC, Alsayrafi M, Alsowaidi N, et al: The influence of an 8 hour flight on haematological variables used in the athletes' biological passport of WADA. Br J Sports Med. 2011 Dec; 45(15):A10

Voss SC, Alsayrafi M, Alsowaidi N, et al: The influence of exercise and circadian rhythm of haemoglobin concentration associated changes in plasma volume on the biological passport. Br J Sports Med. 2011 Dec; 45(15):A7

DANKSAGUNGEN

Der Autor bedankt sich bei Prof. Dr. Wilhelm Schänzer für die Überlassung des Themas, die vielen wertvollen Diskussionen und die Möglichkeit selbständig zu forschen. Danke dafür, dass mir Ihre Tür immer offen stand! Es hat Spaß gemacht und zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen im Institut für Biochemie zu lernen, zu arbeiten und zu forschen. Die Mitarbeiter aus vielen unterschiedlichen Disziplinen sind etwas Besonderes, und für mich eine Erklärung dafür, dass dieses Institut seit Jahren zu den weltbesten Anti-Doping Laboratorien gehört.

Ulrich (Uli) Flenker möchte ich ein besonderes Dankeschön aussprechen für die „etwas aufwändigeren“ Statistiken im Bereich Blutstabilität, aber auch für die zahlreichen Gespräche bei einem Kaffee, die zu vielen kreativen Ideen führten.

Ein Dank an Prof. Dr. Mario Thevis, der mich gelehrt hat Forschungsergebnisse in internationalen Journals zu publizieren.

Im Bereich aller Studien, bei denen Probanden mitgewirkt haben, möchte ich mich bei diesen ganz herzlich bedanken – ohne Euch wäre dies nicht möglich gewesen.

Für die Studie zum Einfluss von hochintensiver Belastung auf die urinären Erythropoietintests möchte ich ein Dankeschön an die Kollegen der Epo-Abteilung und an die Mitarbeiter des Instituts für Trainingswissenschaft Silvia Achtzehn und Dr. Markus de Marées aussprechen.

Gerade bei den Studien die in Qatar durchgeführt worden sind, möchte ich mich bei der Aspire Academy for Sports Excellence bedanken, bei Dr. Muhammad Alsayrafi vom Anti Doping Lab Qatar und bei Prof. Dr. Olaf Schumacher, die diese Projekte planerisch, finanziell und logistisch unterstützt haben. Nicht vergessen möchte ich hier natürlich Felix Klodt, Damiano Nonis, Mohamed Ibrahim Elzain Elgingo und die Verkehrspolizei von Qatar ohne deren Hilfe eine Durchführung der Studie vor Ort nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturbesprechung	2
2.1	Kurzer Überblick zur Geschichte des Dopings	2
2.2	Blut- und Erythropoietindoping	3
2.2.1	Blutdoping	3
2.2.2	Erythropoietindoping	8
2.3	Blut- und Erythropoietindoping und Einfluss auf die Leistungsfähigkeit	11
2.4	Nebenwirkungen von Blut- und Erythropoietindoping.	16
2.5	Indirekte Parameter zum Nachweis von Doping mit Bluttransfusionen und rekombinantem Erythropoietin.	19
2.5.1	Zelluläre Parameter	19
2.5.2	Hämoglobinmasse	24
2.6	Direkter Nachweis der homologen Bluttransfusion	28
2.6.1	Überblick zu der Methode	28
2.7	Direkter Nachweis von rekombinantem Erythropoietin	35
2.7.1	Überblick zu den Methoden	35
3	Experimenteller Teil	43
3.1	Untersuchung zur Lagerungsstabilität der einzelnen zellulären Parameter.	43
3.2	Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Analysegeräte auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.	47
3.3	Untersuchung zum Einfluss einer Flugreise auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.	51
3.4	Untersuchung zum diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration vor und während eines Etappenrennens im Radsport.	54

3.5	Untersuchung zum Einfluss von belastungsinduzierten Schwankungen im Plasmavolumen auf Hämoglobinkonzentration.	57
3.6	Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung.	62
3.7	Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Blutgasanalysegeräte auf die Hämoglobinmasse.	63
3.8	Untersuchung zur Validität der Methode zur direkten Detektion der homologen Bluttransfusion.	65
3.8.1	Probenaufarbeitung und Analyse.	66
3.8.2	Validierung der Methode.	70
3.8.3	Verbesserung der Separation einer Mixpopulation durch Signalverstärkung.	72
3.9	Überprüfung des Einflusses hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin.	73
4	Ergebnisse und Diskussion	79
4.1	Untersuchung zur Lagerungsstabilität der einzelnen zellulären Parameter.	79
4.2	Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Analysegeräte auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.	90
4.3	Untersuchung zum Einfluss einer Flugreise auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.	98
4.4	Untersuchung zum diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration vor und während eines Etappenrennens im Radsport.	101
4.5	Untersuchung zum Einfluss von belastungsinduzierten Schwankungen im Plasmavolumen auf die Hämoglobinkonzentration.	102
4.6	Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung.	108
4.7	Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Blutgasanalysegeräte auf die Hämoglobinmasse.	111

4.8	Untersuchung zur Validität der Methode zur direkten Detektion der homologen Bluttransfusion.	116
4.8.1	Spezifität	116
4.8.2	Präzision	116
4.8.3	Linearität	116
4.8.4	Robustheit	118
4.8.5	Verbesserung der Separation einer Mixpopulation durch Signalverstärkung.	118
4.8.6	Diskussion der Validierung.	121
4.9	Überprüfung des Einflusses hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin.	122
4.9.1	Einfluss auf die Matrix Urin und urinäre Proteine.	123
4.9.2	IEF Ergebnisse vor und nach Belastung.	124
4.9.3	SDS-PAGE Ergebnisse vor und nach Belastung.	126
4.9.4	Diskussion der Ergebnisse.	128
5	Zusammenfassung/ Fazit	132
6	Anhang	137
6.1	Abbildungsverzeichnis	137
6.2	Tabellenverzeichnis	142
6.3	Abkürzungsverzeichnis	144
7	Literatur	147
8	Lebenslauf	154
9	Kurzzusammenfassung (Abstract Deutsch)	155
10	Abstract	157

1. Einleitung

Die hier vorgestellte Arbeit: „Nachweis von Blut- und Erodoping. Untersuchungen zur Validität der direkten und indirekten Methoden.“ soll einen Überblick zum Stand der aktuellen analytischen Verfahren geben, die dazu beitragen die unerlaubte Leistungssteigerung mittels rekombinantem Erythropoietin und Bluttransfusion zu detektieren.

Da mögliche Einflüsse jedweder Art auf Ergebnisse der Dopinganalytik vermieden werden müssen, war es Ziel dieser Arbeit, einige dieser Einflussfaktoren zu untersuchen und damit die aktuell genutzten analytischen Methoden zu validieren.

Es wurden physiologische, präanalytische und analytische Einflüsse auf die Dopinganalytik untersucht. Dabei wurde insbesondere auf den Einfluss von kurz- und mittelfristiger Belastung, Probentransport sowie auf unterschiedliche Messtechniken eingegangen.

Die Ergebnisse wurden zum Teil in nationalen und internationalen Zeitschriften mit unabhängigen Fachgutachtern veröffentlicht oder auf internationalen Kongressen vorgestellt.

2. Literaturbesprechung

2.1 Kurzer Überblick zur Geschichte des Dopings

Das Wort Doping findet seinen Ursprung im Afrikaans, der Sprache der weissen Siedler in Südafrika. Ein Getränk mit dem Namen „Dop“ wurde von den Einheimischen bei Feierlichkeiten konsumiert und war für seine stimulierende Wirkung bekannt. Der Name des Getränks wurde daraufhin von den Siedlern für alle Getränke mit stimulierender Wirkung benutzt und das Wort fand seinen Weg auch in den englischen Sprachgebrauch. Die treffendste Übersetzung des Wortes Doping ist wohl „Verabreichung von Drogen“ [1-3].

Im heutigen Sprachgebrauch versteht man unter Doping gemeinhin die Einnahme von Substanzen oder die Nutzung von Methoden zur Steigerung der körperlichen und psychischen Leistung im Sport, die von der Welt Anti-Doping Agentur verboten wurden [4]. Die ersten Substanzen die zum Zwecke der Leistungssteigerung missbraucht wurden gehörten zur Klasse der Stimulanzien, zu denen zum Beispiel Amphetamin, Kokain, Ephedrin, aber auch Koffein zählen. Weitere Substanzklassen, die sich im Laufe der Zeit bildeten, sind die der Anabolika, Narkotika, Diuretika und die der Peptidhormone. Zu der eingeführten Klasse der verbotenen Methoden zählt das Blutdoping aber auch das Gendoping [5].

2.2 Blut- und Erythropoietindoping

2.2.1 Blutdoping

Die Welt Anti Doping Agentur (WADA) definiert Blutdoping im Anti-Doping Code 2011 als Verabreichung von Eigenbluttransfusionen (autologe Transfusionen) oder Fremdbluttransfusionen (homologe Bluttransfusion). Außerdem steht die heterogene Bluttransfusion (Transfusion von Tierblut), sowie die Transfusion von roten Blutkörperchen jeden Ursprungs auf der Liste der verbotenen Methoden (M1. Erhöhung des Sauerstofftransports) [5].

Kurz- und langfristige Auswirkungen einer Blutabnahme auf den Organismus

Die bei allen Blutdopingmethoden für die Transfusion notwendige Blutkonserve wird aus etwa 500 ml Blut gewonnen. Die Abnahme einer solchen Menge stellt bei einem gesunden Erwachsenen in der Regel kein Problem dar. Der durch die geringere Blutmenge hervorgerufene Abfall des venösen Blutdrucks wird über Vasokonstriktion innerhalb von ca. einer halben Stunde kompensiert und das verlorengegangene Volumen über den Einstrom von interstitieller Flüssigkeit in das Gefäßsystem innerhalb von etwa 24 Stunden ausgeglichen. Direkt nach der Blutentnahme kommt es zu einem Anstieg der Leukozyten (bedingt durch eine Vermehrung der Granulozyten), der aber nach etwa 5 Stunden wieder abklingt. Ein Abfall der

Thrombozytenpopulation ist von geringer Relevanz, da auch er innerhalb wenigen Stunden ausgeglichen wird [6].

Am längsten dauert die Kompensation der Erythrozytenverluste. Erythrozytenkonzentration und auch der Hämatokrit beginnen nach etwa 4 bis 5 Stunden zu sinken und sind nach Ausgleich des Volumenverlusts durch die interstitielle Flüssigkeit etwa 6 bis 10% unter ihren Ausgangswert gefallen. Dies entspricht etwa einem Abfall von 1 g/dl in der Hämoglobinkonzentration. Ein gesunder Erwachsener sollte den Erythrozytenverlust innerhalb einer Woche ausgeglichen haben. Da die Qualität der neugebildeten Erythrozyten aber von den körpereigenen Eisenreserven abhängig ist, kann der Hämoglobingehalt der Erythrozyten bei niedrigen Eisenreserven vermindert sein. Bei der Entnahme einer Blutkonserve gehen etwa 250 mg Eisen verloren – eine nicht unbedeutende Menge. Bedenkt man, dass der Körper eines gesunden Menschen nur etwa 1 mg Eisen pro Tag aufnimmt und die Aufnahme auch in Mangelsituationen nur auf 5 mg pro Tag gesteigert werden kann, sind die Verluste durch orale Eisenzufuhr frühestens innerhalb von 50 Tagen ausgeglichen [6].

Konservierung von Blutkonserven

Die Lagerung des Bluts erfolgt in speziellen sterilen Kunststoffbeuteln. Diese Beutel enthalten etwa 70 ml einer Lösung zur Konservierung der Zellen, wie zum Beispiel den sogenannten CPDA-Stabilisator, wobei CPDA für Citrat, Phosphat, Dextrose und Adenin steht. Die genaue

Zusammensetzung für diesen Stabilisator beträgt pro Liter 3 g Zitronensäure, 26,3 g Natriumcitrat, 2,2 g Natriumdihydrogenphosphat, 38,3 g Glucosemonohydrat und 559 mg Adenin-Hydrochlorid. Der pH Wert der Lösung beträgt 5,6 bis 5,8. Nach der Vermischung mit 450 ml Blut steigt er auf 7,1 bis 7,2. Dieses für Blut leicht saure Milieu (6,8 bis 7,2) wird benötigt um den ATP Gehalt zu stabilisieren, der schon bei einem leicht basischen pH (7,5 bis 7,9) schnell abfallen würde. Die Zitronensäure gleicht den basischen Einfluss des Natriumcitrats aus. Das Natriumcitrat wirkt als Antikoagulanzen, da es die vorhandenen Calciumionen bindet. Das ebenfalls enthaltene Natriumdihydrogenphosphat, das Adenin und die Glucose fördern die ATP und 2,3-DPG-Synthese, da bei einem Abfall dieser beiden Substanzen die Lebensdauer der Erythrozyten, aber auch die Abgabe des Sauerstoffs vom Hämoglobin, negativ beeinträchtigt wäre. Die Lebensdauer einer Konserve, die mit CPDA stabilisiert ist beträgt bei 4 Grad Celsius etwa 35 Tage [7].

Arten von Blutkonserven

Bei Blutkonserven wird zwischen Vollblutkonserven und Erythrozytenkonzentrat unterschieden. Die Vollblutkonserve enthält sowohl den zellulären als auch den Plasmaanteil. Im Bereich der klinischen Anwendung wird die Vollblutkonserve aufgrund von möglicherweise auftretenden Gerinnungsstörungen nicht mehr zur Behandlung von Patienten verwendet. Die Vollblutkonserve dient nur noch als Ausgangsstoff zur Herstellung von Blutkomponenten. Da die Herstellung einer

Vollblutkonserve logistisch unproblematisch ist, wird sie wahrscheinlich im Bereich der illegalen Leistungssteigerung durch Doping am ehesten angewandt. Das Auftreten von möglichen Nebenwirkungen wird dabei in Kauf genommen [8].

Unter Erythrozytenkonzentrat versteht man Blutkonserven, aus denen der Plasmaanteil größtenteils entfernt wurde. Zur Herstellung wird nach der Zentrifugation des Vollblutes der sogenannte „Buffy Coat“ (Leukozyten und Thrombozyten) von den Erythrozyten getrennt. Das so gewonnene Konzentrat wird dann mit 80 bis 100ml additiver Lösung, ähnlich der CPDA Lösung, resuspendiert. Manche dieser Lösungen enthalten nur unterschiedliche Mengen der CPDA Bestandteile, anderen wird zum Beispiel zusätzlich Mannitol beigefügt. Die Lagerungszeit für diese Erythrozytenkonzentrate beträgt 42 bis 49 Tage. Ein Erythrozytenkonzentrat enthält etwa 50 bis 60 g Hämoglobin. Bei einer Erythrozyten-Überlebensrate von 75%, die bei den heutigen Stabilisatoren erwartet werden kann, ist nach der Transfusion eines Blutkonservenkonzentrats mit einem ungefähren Hämoglobinanstieg von 1 g/dl zu rechnen. Die durchschnittliche Überlebenszeit der Erythrozyten im Organismus beträgt dann etwa 60 Tage [9].

Eine weitere Möglichkeit Erythrozyten zu konservieren ist die Kryokonservierung. Zur Herstellung eines Kryokonzentrates werden die gewonnenen Erythrozyten gewaschen und unter Zusatz von Glycerin oder einem anderen Gefrierschutzmittel tiefgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgt dann bei Temperaturen unter minus 80 Grad Celsius. Da die kryokonservierten Erythrozytenkonzentrate praktisch kein Plasma und keine

Leukozyten und Thrombozyten enthalten, werden sie normalerweise nur bei speziellen Indikationen, wie zum Beispiel ungewöhnlichen Blutgruppen verwendet. Bei angemessener Lagerung bleiben die Kryokonserven bis zu 10 Jahre transfusionsfähig [10].

Blutdoping in der Praxis

Im Zuge der „Operation Puerto“, einer Polizeiaktion, die 2006 gegen den spanischen Arzt Eufemiano Fuentes durchgeführt wurde, konnten neue Erkenntnisse über die aktuelle illegale Praxis des Blut dopings gewonnen werden. Bei dieser Aktion wurden Blutkonserven gefunden, die einzelnen Sportlern zugeordnet werden konnten. Durch die Zuordnung fand man heraus, dass manche Athleten bis zu 8 Konserven bei Dr. Fuentes lagerten. Mit dem Wissen, dass das Blutvolumen eines Menschen etwa 5 bis 7 Liter und der Blutverlust pro Konserve etwa 450 ml beträgt, ist es einleuchtend, dass diese Anzahl an Blutkonserven nicht zeitgleich abgenommen werden konnten. Mittlerweile geht man davon aus, dass den Sportlern zuerst ein oder zwei Konserven entnommen wurden und nach einer Regenerationsperiode drei weitere Konserven. Die Konserven aus der ersten Abnahme wurden direkt nach der neuen Abnahme retransfundiert um die nächste Regenerationsperiode von den zuletzt abgenommenen drei Konserven zu verkürzen. Im Anschluss an diese Erholungsphase wurden vier Konserven entnommen und die letzten drei zurücktransfundiert. Auf diese Weise war es möglich die Anzahl der gelagerten Blutkonserven kontinuierlich zu steigern, ohne dem Sportler einen zu großen akuten Blutverlust zuzumuten und damit das Training negativ zu beeinflussen. Es

wird spekuliert, dass versucht wurde die Regenerationsperioden zwischen den einzelnen Blutentnahmen mit Erythropoietin Injektionen zu beschleunigen. Ein Hinweis auf diese Praxis ist der Fund von rekombinantem humanem Erythropoietin in den konfiszierten Blutkonserven, die von dem spanischen Anti-Doping Labor nachträglich untersucht wurden [11].

2.2.2 Erythropoietindoping

Laut WADA Reglement 2011 versteht man unter Erythropoietindoping die Verabreichung von sogenannten Erythropoese stimulierenden Faktoren. Als Beispiel werden von der WADA rekombinante Erythropoietine aber auch EPO-Mimetika genannt. In der WADA Prohibited List 2011 werden die Erythropoese stimulierenden Faktoren unter „S2. Peptide Hormones, Growth Factors and related Substances“ geführt [5].

Erythropoietin

Erythropoietin (EPO) ist ein Peptidhormon das aus 165 Aminosäuren und vier Kohlenhydratseitenketten besteht. Der Körper eines erwachsenen Menschen produziert EPO hauptsächlich in der Niere und zu einem kleinen Teil in der Leber. Stimuliert wird die endogene Produktion von EPO durch Sauerstoffmangel, der zum Beispiel durch Aufenthalt in großen Höhen, mangelnder Ventilation, Anämie oder durch eine Kohlenmonoxidvergiftung entstehen kann. Unter Hypoxie vermittelt der Transkriptionsfaktor Hypoxia

Inducible Factor 1 (HIF-1) die Proteinbiosynthese von EPO aber auch anderen Proteinen wie zum Beispiel VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder Transferrin [12]. Ausgelöst durch den Hypoxiereiz wird HIF 1- α (eine Untereinheit von HIF-1) vom Zytoplasma in den Zellkern geschleust, wo eine Bindung an HIF 1- β stattfindet. Der so entstandene HIF-1 Komplex bindet dann an CREB (cAMP Response Element Binding Protein) sowie an den Transkriptionskoaktivator p300, wodurch letztendlich die Gentranskription eingeleitet wird. Unter Normoxie ist HIF-1 instabil und zerfällt in seine Bestandteile HIF 1- α und HIF 1- β [12]. Die Stimulation der Erythropoese findet im Knochenmark statt. Hier stimuliert EPO Zielzellen, die einen EPO-Rezeptor aufweisen, der die JAK2 (Januskinase 2)/STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) Signalkaskade aktiviert. Dadurch wird im Knochenmark die Proliferation, Differenzierung und Reifung der CFU-E (Colony-Forming Unit Erythroid) Zellen induziert aus denen sich langfristig die Erzhroyzten differenzieren . EPO ist damit ein essentieller Wachstumsfaktor, ohne den es zur Apoptose der Vorläuferzellen kommt.

EPO-Präparate

Rekombinantes Erythropoietin wurde erstmals in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovarial Zellen) produziert. Mittlerweile werden auch andere Zelltypen wie BHK-Zellen (Baby Hamster Kidney Zellen) oder humane Zellen zur Produktion benutzt. Unterschiede zwischen rekombinantem und

endogenem EPO bestehen nur in der Glykosilierung. Die Aminosäuresequenz ist identisch [12]. Die Aminosäuresequenz von EPO wurde 1977 aufgedeckt und gentechnologisch produziertes EPO wurde erstmals 1989 als Arzneimittel von Amgen auf den Markt gebracht. 1989 wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ausserdem eine Nomenklatur für die rekombinanten Erythropoetine eingeführt. Zur Unterscheidung der EPO Varianten wird der Bezeichnung Epoetin ein griechischer Buchstabe angehängt. Gemäß dieser Nomenklatur sind bei der WHO folgende Varianten gelistet: Epoetin alpha (α), Epoetin beta (β), Epoetin gamma (γ), Epoetin delta (δ), Epoetin epsilon (ϵ), Epoetin zeta (ζ), Epoetin theta (θ), Epoetin kappa (κ), Epoetin omega (ω) und Darbepoetin alfa (α) [13]. Klinische Relevanz haben zurzeit nur Epoetin α , β , δ , ζ , ω und Darbepoetin. Laut Roter Liste 2009 sind in Deutschland aktuell Epoetin α (z.B. Erypo von Hexal), Epoetin β (NeoRecormon, Roche) auch als Methoxy-Polyethylenglycol modifiziertes Epoetin β (Mircera, Roche), Epoetin ζ (Silapo, cell pharm) und Darbepoetin (Aranesp, Amgen) erhältlich. Das aus humanen Zellen gewonnene, von Shire Pharmaceuticals hergestellte Dynepo, wurde 2008 vom Markt genommen [14].

2.3 Blut- und Erythropoietindoping und Einfluss auf die Leistungsfähigkeit

Blutdoping:

Erste Untersuchungen zum Einfluss einer künstlichen Erhöhung des Erythrozytenvolumens durch Transfusionen wurden schon in den 70er Jahren durchgeführt und veröffentlicht.

Von Ekblom wurden 1972 Ergebnisse einer Studie (n = 7 trainierte Sportstudenten) zur Reaktion des Körpers auf Belastung nach Blutspende und einer Reinfusion vier Wochen später berichtet [15]. In der Studie wurden zwei Gruppen gebildet. Gruppe 1 wurden jeweils 800 ml und Gruppe 2 jeweils 1200 ml Blut entnommen. Die Blutspende in Gruppe 1 fand an einem Tag statt, während den Probanden von Gruppe 2 dreimal 400 ml Blut im Abstand von 4 Tagen abgenommen wurde. Die maximale Sauerstoffaufnahme war nach der Blutspende um 13 % (4,57 l/min auf 4,09 l/min) in der ersten und 18 % (4,49 l/min auf 3,78 l/min) in der zweiten Gruppe vermindert. Eine Reinfusion nach vier Wochen erhöhte die maximale Sauerstoffaufnahme ($VO_2\max$) dann um 9% (4,40 l/min auf 4,79 l/min) in der ersten Gruppe, während in der zweiten Gruppe nur ein sehr geringer Anstieg zu beobachten war (4,49 l/min auf 4,56 l/min). Ebenfalls untersucht wurde die Zeit bis zum Belastungsabbruch bei einem $VO_2\max$ Test auf dem Laufband. Interessanterweise war die Verbesserung der beiden Gruppen sehr ähnlich. Gruppe 1 verbesserte ihre Laufzeit um 23%, Gruppe 2 um 25%. Für Gruppe 2 wurde außerdem die totale Hämoglobinmasse bestimmt. Nach Abnahme von 1200 ml Blut reduzierte

sich die Hämoglobinmasse von durchschnittlich 742 g auf 602 g. Nach Reinfusion wurde ein Anstieg auf 818 g beobachtet. Der Anstieg von nur 76 g Hämoglobin, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Probanden ihre zum Zeitpunkt der Reinfusion ihre Ausgangswerte von 742 g noch nicht erreicht hatten, was auch eine mögliche Erklärung für den geringen Anstieg in der $VO_2\text{max}$ wäre. Andere Erklärungsversuche sind der mögliche Verlust von Hämoglobin bei der Präparation der Konserven oder Messfehler bei der Bestimmung der $VO_2\text{max}$ oder der Hämoglobinmasse.

In einer Studie von Buick wurde 11 hochtrainierten Läufern mit einer maximalen Sauerstoffaufnahme von durchschnittlich 5,11 l/min, 900 ml Blut entnommen und tiefgefroren gelagert [16]. Die Rücktransfusion fand sieben Wochen später im Doppel-Blind Design statt. Als Ergebnis dieser Intervention wurde ein Anstieg der $VO_2\text{max}$ auf durchschnittlich 5,37 ml/min beschrieben, sowie ein 33 prozentiger Anstieg der Zeit bis zur Erschöpfung bei einem standardisierten Laufbandtest (95% der $VO_2\text{max}$).

Eine weitere Studie von Spriet, in der 4 Hochleistungssportler über einen Zeitraum von drei Wochen jede Woche ein Erythrozytenkonzentrat verabreicht bekamen zeigte für die $VO_2\text{max}$ nach der ersten Einheit im Durchschnitt keine signifikante Veränderung (5,04 l/min vs. 5,06 l/min) [17]. Jedoch erzielten zwei der Probanden einen Anstieg von 0,1 und 0,2 l/min. Bei einer Probandenzahl von vier ist das Studienergebnis, das keine Leistungssteigerung nach Transfusion von 450 ml Blut in der ersten Woche feststellte, aufgrund der geringen Stichprobengröße sicherlich kritisch zu hinterfragen. Nach der zweiten Einheit in Woche 2 stieg die durchschnittliche

VO₂max auf 5,24 l/min und nach einer dritten Einheit in der dritten Woche auf 5,38 l/min. Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits die ab der zweiten Woche erfasst wurden dokumentierten einen Anstieg von durchschnittlich 14,7 g/dl auf 15,8 g/dl Hämoglobin nach der zweiten Transfusion und auf 16,1 g/dl nach der dritten Transfusion. Der Hämatokrit stieg von 42,1 % auf 45,1% und 46,5%.

Die amerikanischen Streitkräfte führten Ende der 80er Jahre Untersuchungen zum Einfluss von Transfusionen auf Thermoregulation unter körperlicher Belastung in Hitze durch [18, 19]. Die gewählte Belastung in den Untersuchungen war ein 2x45 minütiger Walkingtest bei 35 Grad Celsius und 45 % Luftfeuchtigkeit. Leider wurden keine Studien mit einer Lauf- oder Radfahrbelastung bei höherer Intensität durchgeführt, so dass eine Übertragung der Ergebnisse auf den Spitzensport nicht ohne weiteres möglich ist. Die Hyperthermie-bedingte Vasodilatation zur Körperkühlung bewirkt eine verstärkte subkutane Durchblut, die die Durchblutung der Skelettmuskulatur und damit deren Sauerstoffversorgung verringert. Durch eine Transfusionsintervention, die das Blutvolumen erhöht und damit die arterielle Sauerstoffversorgung verbessert, sollen die Bedürfnisse der beiden konkurrierenden Systeme Oberflächengefäße und Skelettmuskulatur besser bedient werden. Die Untersucher erwarteten dadurch eine verbesserte Leistungsfähigkeit während Hyperthermie. Die Ergebnisse der Studie dokumentieren nach der Transfusion eine erhöhte Schweißproduktion und eine verminderte Körperkerntemperatur der Probanden unter Belastung im Vergleich zu den Probanden ohne Transfusion. Dies galt sowohl im dehydrierten, als auch im hydrierten

Zustand der Probanden. Plasmavolumen und Blutvolumen waren erhöht, wobei das erhöhte Plasmavolumen mit einer ebenfalls erhöhten Proteinmasse einherging.

Eine der ersten Studien zum Einfluss von Bluttransfusionen auf die Toleranz von Hypoxie während Belastung wurde 1982 durchgeführt [20]. Den Probanden (n = 5) wurde 750 ml vorher entnommenes und tiefgefroren gelagertes autologes Erythrozytenkonzentrat transfundiert, was vier Einheiten Vollblut entspricht. Der Hämatokrit und die Hämoglobinkonzentration stiegen von durchschnittlich 43,3 auf 54,8 % sowie von 13,8 auf 17,6 g/dl. Unter Normalbedingungen stieg die VO_2 max von 3,3 auf 3,7 l/min und unter Hypoxie von 2,6 auf 3,0 l/min. Die von den Autoren berechnete Veränderung in der Hypoxietoleranz betrug +463,6 m. Damit war die Hypoxietoleranz nach Transfusion klar erhöht.

Erythropoietindoping:

Die erste Studie zur Wirkung von rekombinantem Erythropoietin auf die körperliche Leistungsfähigkeit wurde 1991 von Ekblom und Berglund durchgeführt [21]. Dabei wurden 15 gesunden Sportstudenten über einen Zeitraum von sechs Wochen dreimal pro Woche 20-40 IU rhEPO pro kg Körpergewicht injiziert. Zusätzlich wurde allen Probanden täglich 200 mg Eisensulfat peroral verabreicht. Die Hämoglobinkonzentration stieg von durchschnittlich 15,2 g/dl auf 16,9 g/dl an, während der Hämatokrit einen Anstieg von 44.5 % auf 49.7 % verzeichnete. Die VO_2 max erhöhte sich von 4,52 l/min auf 4,88 l/min. Der Anstieg der VO_2 max pro Gramm Anstieg der Hämoglobinkonzentration zeigte keinen Unterschied zwischen einer

Transfusion mit roten Blutkörperchen oder einer Behandlung mit rhEPO. Das Blutvolumen der Probanden, das mit der ^{125}I -Albumin Methode bestimmt wurde, zeigte keine signifikante Veränderung vor ($6,2\pm 0,6$ l) und nach ($6,2\pm 0,7$ l) der Behandlung mit rhEPO oder der Verabreichung eines Erythrozytenkonzentrats ($6,1\pm 0,7$ l). Die bei einem Laufbandtest ermittelte Zeit bis zur Erschöpfung stieg um durchschnittlich 83 Sekunden. Unter Belastung wurden keine signifikanten Veränderungen bezüglich Herzfrequenz, Atmung oder Laktatkonzentration festgestellt.

In einer Studie von Russel et al. wurde getestet ob niedrige EPO-Dosen, die leistungsfördernden Effekte einer initial hoch dosierten EPO-Gabe aufrecht erhalten können [22]. In dieser Studie mit 21 Probanden, wurden über drei Wochen, dreimal pro Woche 50 IU rhEPO/kg Körpergewicht verabreicht. In den fünf darauffolgenden Wochen wurde die Dosis auf dreimal pro Woche 20 IU rhEPO/kg Körpergewicht reduziert. Im Anschluss wurden die Blutwerte der Probanden für vier weitere Wochen getestet und in Woche 12 ein weiterer Leistungstest durchgeführt. Die Probanden waren in eine Placebo Gruppe und zwei rhEPO Gruppen aufgeteilt, wobei sich die beiden EPO Gruppen in der zusätzlichen Eisenzufuhr unterschieden (intravenös versus oral).

Die relativen Verbesserungen der VO_2max in den Wochen 4, 8 und 12 waren 7,7% ($\pm 7,5$), 9,7% ($\pm 7,5$) und 4,5% ($\pm 5,6$) für die Gruppe mit rhEPO und intravenöser Eisenzufuhr; 6,0% ($\pm 5,0$), 4,7% ($\pm 5,5$) und 3,1% ($\pm 6,8$) für die Gruppe mit rhEPO und oraler Eisenzufuhr und -0,5% ($\pm 4,6$), -0,1% ($\pm 7,6$) und -1,0% ($\pm 6,9$) für die Placebo Gruppe. Diese Daten machen deutlich,

dass die $VO_2\text{max}$ noch vier Wochen nach Absetzen von rhEPO erhöht sein kann.

In einer weiteren Studie mit ähnlichem Design erhielt die Epo Gruppe zwei Wochen jeden zweiten Tag 5000 IU rhEPO, gefolgt von drei Injektionen in der dritten Woche und je einer Injektion in den Wochen vier bis 13 [23]. Den Probanden der Plazebo Gruppe wurde nach dem gleichen Schema jeweils eine Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Beide Gruppen erhielten eine orale Eisensubstitution.

In der rhEPO Gruppe konnte ein Anstieg der $VO_2\text{max}$ von 9,1% in Woche vier und 8,1% in Woche 11 dokumentiert werden. Die Werte für die Kontrollgruppe blieben unverändert. Die Zeit bis zum Belastungsabbruch in den Tests in der vierten und elften Woche konnte in der EPO Gruppe um 54% und 54,3% verbessert werden.

2.4 Nebenwirkungen von Blut- und Erythropoietin-doping

Blutdoping:

Durch den Anstieg der Gesamterthrozytenmasse steigt nach einer Transfusion die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokrit und die Viskosität des Bluts. Bei gesunden Menschen soll dadurch das Risiko eines kardiovaskulären Todes exponentiell mit der Hämoglobinkonzentration und dem Hämatokrit zunehmen [24]. Durch die Lagerung des Blutes kommt es vor und während einer Reinfusion zu einer Hämolyse, welche zu einem

prähepatischen Ikterus führen kann. Eine Folgeerscheinung der Hämolyse ist die Freisetzung von Eisen, so dass häufiges Blutdoping zu einer Eisenüberladung führen kann. Bei der homologen Bluttransfusion kann es, wenn nicht genau kontrolliert, zudem zu einer Übertragung von Krankheiten wie HIV oder Hepatitis kommen. Ein weiteres Problem der homologen Bluttransfusion können außerdem Antigen-Antikörperreaktionen sein, die im schlimmsten Fall zum Tode führen.

Erythropoietindoping:

Die erste Untersuchung zu Nebenwirkungen von rekombinantem Erythropoietin in gesunden Männern wurde 1991 von Ekblom veröffentlicht [25]. In dieser Studie wurde der Effekt einer EPO Behandlung auf Blutdruck und hämatologische Parameter untersucht. Acht Probanden wurde über sechs Wochen dreimal pro Woche 20 IU rhEPO/kg Körpergewicht verabreicht und weitere sieben Probanden bekamen die gleiche Dosis über einen Zeitraum von vier Wochen, gefolgt von 40 IU rhEPO/kg Körpergewicht über weitere drei Wochen. Die Ergebnisse des hämatologischen Befunds zeigten einen Anstieg der Hb-Konzentration von 15,2 g auf 16,9 g. Interessanterweise kam es zu keinem Anstieg der Retikulozyten, was der Autor mit der geringen Dosis erklärt. Elektrolyte, Leberenzyme und das weiße Blutbild blieben ebenfalls unverändert, beim Ferritin kam es zu einem Abfall von 87 auf 59 mmol/L. Der Blutdruck in Ruhe blieb unverändert, jedoch kam es zu einem Anstieg des Blutdrucks unter Belastung.

In einem Review von Smith et al. über die kardiovaskulären Effekte von EPO Gaben, beschreiben die Autoren ein erhöhtes Thromboserisiko durch die

Effekte von rhEPO auf die Thrombozyten [26]. So sollen die Thrombozyten nach EPO Behandlung größer und aktiver sein. Die Blutungszeit soll geringer sein und es kann zu einer Aggregation der Erythrozyten kommen, die jedoch durch die Gabe von Azetylsalizylsäure vermindert werden kann. Es wird außerdem berichtet, dass EPO bezüglich der Kapillarisation von Geweben ähnlich effektiv sein soll wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Weiterhin beschreiben die Autoren eine Verschlechterung von bereits bestehenden Bluthochdrucks bei 20-30% der untersuchten Nierenpatienten, die mit rhEPO behandelt wurden.

In einem Artikel von Shi et al., wird beschrieben, wie rhEPO durch die Aktivierung bestimmter molekularer Signalwege, das Tumorwachstum bei Brustkrebszelllinien unterstützt [27].

Im Beipackzettel der Firma Amgen zu ihrem Produkt Aranesp wurden einige der folgenden, nach der Behandlung von 1598 Patienten mit chronischem Nierenversagen ermittelten Nebenwirkungen angegeben:

Schmerzen an der Injektionsstelle 7%, Ödeme 11%, Müdigkeit 9%, Fieber 9%, Tod 7%, Brustschmerz 6%, Grippeähnliche Symptome 6%, Bluthochdruck 23%, niedriger Blutdruck 22%, kardiäre Arrhythmien/Herzstillstand 10%, Angina Pectoris 8%, Thrombosen 8%, Kopfschmerzen 16%, Durchfall 16%, Erbrechen 15%, Myalgien 21%.

2.5 Indirekte Parameter zum Nachweis von Doping mit Bluttransfusionen und rekombinantem Erythropoietin

Die Analyse von Blut zum Nachweis von Doping mit EPO oder Transfusionen wurde von Videman schon 1989 auf dem zweiten IAF Welt Symposium für Doping im Sport vorgestellt. Es handelte sich um Ergebnisse der Bluttests bei den Weltmeisterschaften im Skilanglauf in Lahti, Finnland.

Der internationale Leichtathletikverband (IAAF) entschied später bei acht Weltcup Meetings in den Jahren 1993 und 1994 Blutproben zur Dopingkontrolle bei insgesamt 99 Athleten zu entnehmen. Die Ergebnisse dieser Proben wurden 1997 publiziert [28].

2.5.1 Zelluläre Parameter

Die relativ unkomplizierte und wenig zeitaufwendige Blutbildanalyse auf Hämatologieanalysegeräten ermöglichte die Einführung von populationsbasierten Grenzwerten für die Hämoglobinkonzentration und den Hämatokrit.

Sportverbände wie FIS (Federation Internationale du Ski), ISU (International Skating Union), UCI (Union Cycliste Internationale) oder IAAF (International Association of Athletics Federations) führten unterschiedliche Grenzwerte für ihre jeweilige Sportart ein und testeten Athleten zum Teil mit portablen Systemen am Wettkampfort vor dem Start des Wettkampfs.

Nachteile dieser indirekten Methode waren eine fehlende Standardisierung für die Prozeduren der Abnahme und Analyse. Die maximale Sanktion bei erhöhten Werten war eine sogenannte „Schutzsperre“ für einen Zeitraum von zwei Wochen. Die Möglichkeit zur Manipulation von Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit durch Flüssigkeitsgabe war relativ einfach möglich, so dass gedopte Athleten vor der Wettkampfkontrolle durch Trinken oder Infusion akzeptable Ergebnisse unter dem Grenzwert erzielen konnten. Ein weiterer Nachteil der populationsbasierten Grenzwerte war auf der einen Seite, dass Individuen mit natürlich erhöhten Werten einem Dopingverdacht ausgesetzt wurden und auf der anderen Seite Athleten mit natürlich niedrigen Werten selbst in gedopten Zustand noch unter dem Grenzwert liegen konnten.

Im Jahr 2000 zu den olympischen Spielen in Sydney gab es durch neue Analysegeräte die Möglichkeit die Retikulozytenmenge im Blut automatisiert zu bestimmen. Eine australische Forschergruppe entwickelte unter Einbeziehung der Retikulozytenwerte Multiparametermodelle, die zwischen aktueller und vorangegangener EPO Administration unterscheiden konnten. Diese sogenannten ON-Score und OFF-Score Modelle waren das Ergebnis einer Reihe von Studien mit Probanden, denen EPO verabreicht wurde [29, 30].

Die indirekten ON- und OFF-Score Modelle wurden im Laufe der nächsten Jahre zu den so genannten Bluttests der zweiten Generation verändert, mit denen Analysen schneller, kostengünstiger und nicht mehr unbedingt am Wettkampfort durchgeführt werden konnten. Validierungsstudien zum

Einfluss von Höhentraining und zu Blutabnormalitäten sowie die Standardisierung von Retikulozytenmessungen auf unterschiedlichen Analysegeräten verbesserten die Dopinganalytik weiter [31-33].

2006 wurde das sogenannte Modell der dritten Generation veröffentlicht. Der große Unterschied zu den Vorgängermodellen lag darin, dass die Grenzwerte nicht mehr komplett populationsbasiert waren, sondern die aktuellen Blutwerte eines Athleten mit seinen eigenen in der Vergangenheit gemessenen Blutwerten verglichen wurden. Der Grenzwert für den Athleten ist demnach überschritten, wenn die intraindividuelle Varianz größer ist als die Varianz innerhalb einer von den Autoren untersuchten Population [34].

2008 startete die WADA zusammen mit der UCI das sogenannte Blutpass Projekt, das das Überschreiten von individuellen Grenzwerten mit einem Dopingverstoß gleichsetzt. Auf Basis dieses Modells, können Sportler die ihren individuellen Grenzwert überschreiten, für 2 Jahre gesperrt werden.

Innerhalb des Blutpasses werden der ABPS (Abnormal Blood Profile Score) sowie Hb, Ret% und der Off-Score genutzt. Der ABPS Multiparameter Ansatz besitzt aktuell zwölf unterschiedliche Marker, von denen sieben indirekte Marker (Hb, Hct, RBC, Ret%, MCV, MCH, MCHC) die auf rhEPO oder Bluttransfusion ansprechen in das Modell eingehen können [35]. Ein bisher ungelöstes Problem, ist der Einfluss von Veränderungen des Plasmavolumens und den damit verbundenen Schwankungen der Konzentration der erfassten Parameter.

Die Basis des Blutpasses sind heterogene Faktoren und Störfaktoren. Jeder der im Blutpass genutzten Marker weist eine eigene Variabilität auf, die einen biologischen Ursprung hat – dies sind die heterogenen Faktoren. Als Störfaktoren werden die Faktoren bezeichnet, die Ergebnis der Aktivitäten der Athleten sind. Wenn bekannt ist welche Faktoren die Variabilität beeinflussen, kann die individuelle Varianz reduziert werden. Ein Beispiel ist die Diagnose eines Eisenmangels. Zur Interpretation der Hämoglobinkonzentration benutzt der Arzt Referenzwerte, die auf das Alter und das Geschlecht bezogen sind. Im Blutpass werden zusätzlich zu Alter und Geschlecht Faktoren wie ein durchgeführtes Höhentraining, die Sportart der Athleten oder die Tatsache, dass es sich um einen Raucher oder Nichtraucher handelt in die Bewertung einbezogen. Die bisher für den Blutpass untersuchten Faktoren, sind Geschlecht, Ethnie, Sportart, Alter, sowie Höhe, Zigarettenkonsum und Geräteunterschiede [36-38]. Es kann zwischen zeitabhängigen und zeitunabhängigen Faktoren unterschieden werden, wobei Faktoren wie Alter, Umgebungshöhe, Tabakkonsum in Form von Rauchen oder das Analysegerät zu den zeitabhängigen gehören, während Geschlecht und Ethnie Beispiele für zeitunabhängige Faktoren darstellen [39]. Das Modell des Blutpasses basiert auf Studien, in denen die genannten Faktoren untersucht wurden. Leider sind manche Themengebiete zu komplex, um das bestmögliche Modell zu erstellen. Ein Beispiel ist der Faktor Umgebungshöhe. Einige Athleten leben ständig in der Höhe, während sich andere nur in bestimmten Abschnitten ihrer Trainingsperiodisierung in der Höhe aufhalten. Durch die unterschiedlichen Arten des Höhentrainings wie „Living High – Training High“, „Living High –

Training Low“, „Living Low – Training High“ oder durch die Dauer des Aufenthalts in der Höhe ist es nicht möglich ein perfektes Modell zu entwickeln das jedwede Variabilität minimiert. Dadurch, dass Höhe ein Faktor des aktuellen Modells ist, wird aber versucht einen Teil der Variabilität dieses Faktors zu minimieren [35]. Die Nutzung eines biologischen Markers ist entweder von populationsbezogenen Referenzwerten abhängig oder von Längsschnittuntersuchungen der Testergebnisse innerhalb eines Individuums. Ein Marker wird dann für den Passport Ansatz interessant wenn die Variabilität innerhalb des Individuums geringer ist als die Variabilität innerhalb der relevanten Population. Die Unterschiede der intraindividuellen im Vergleich zur interindividuellen Variabilität, der zur Zeit im Passport Modell genutzten Marker, bestätigt die Notwendigkeit von Längsschnittuntersuchungen [34]. Dies macht deutlich, dass individuelle Referenzwerte ermittelt werden müssen, die zum Teil erheblich von populationsbasierten Referenzwerten abweichen können.

Die Erstellung einer Längsschnittdatenbank ist abhängig von den Basiswerten eines Athleten. Im Gegensatz zur Situation in der medizinischen Diagnostik, in der bekannt ist, dass der Patient krank ist, kennt man den Dopingstatus eines Athleten nicht. Diese Situation macht es erforderlich so viele Parameter wie möglich zu untersuchen um einen Verdachtsfall dokumentieren zu können.

2.5.2 Hämoglobinmasse

Einer der zwölf Parameter, der innerhalb des hämatologischen Moduls des Blutpasses implementiert ist, jedoch zur Zeit nicht genutzt wird, ist die Hämoglobinmasse [40-42]. Der theoretisch große Vorteil der Hämoglobinmasse ist die Unabhängigkeit von Veränderungen des Plasmavolumens und den damit verbundenen Schwankungen denen konzentrationsbasierte Parameter ausgesetzt sind.

Das Verfahren der Kohlenstoffmonoxid Rückatmung zur Bestimmung der Hämoglobinmasse wurde erstmals 1995 von Burge und Skinner beschrieben und dann 2005 von Schmidt und Prommer optimiert. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Kohlenstoffmonoxid (CO) durch die Alveoli der Lunge ins Blut diffundieren kann. In Konkurrenz zu Sauerstoff bindet das Gas mit einer sehr hohen Affinität an Hämoglobin, wodurch Carboxyhämoglobin (HbCO) entsteht. CO kann zwar auch an andere Moleküle wie Myoglobin binden, dies geschieht jedoch nur in sehr geringer Menge. Wenn CO appliziert wird, kommt es nach kurzer Zeit zu einer Equilibrierung des HbCO im Körper, wodurch HbCO zur Bestimmung der Hämoglobinmasse genutzt werden kann.

Zur Bestimmung der Hämoglobinmasse wird dem Athleten mit Hilfe eines Spirometers (Abb.1) ein vom Körpergewicht abhängiger CO Bolus verabreicht. Die aktuelle Menge Kohlenstoffmonoxid wird mit 1 ml pro kg Körpergewicht für männliche Athleten beschrieben. Die Verabreichung des Gases erfolgt durch Injektion des Bolus in ein Glasspirometer. Dies geschieht mittels einer 100 ml Plastikspritze mit 2 ml Skalierung. Hier kann

es bei verschiedenen Anwendern schon zu leicht unterschiedlichen Gasvolumina kommen, die sich auf die Hämoglobinmasse auswirken können. Das Glasspirometer ist mit einem Sauerstoffreservoir (ca. 3 l) verbunden und der Athlet muss nach der Einatmung des CO Bolus die Luft für 10 Sekunden anhalten, bevor er für weitere 1,50 min im geschlossenen System des Spirometers atmen muss, das letztendlich ein CO – Sauerstoff Gemisch enthält. Das Spirometer muss während der Prozedur auf Dichtigkeit überprüft werden, wozu ein CO-Gas Messgerät genutzt wird. Das Restvolumen des Gasgemisches im Spirometer wird mit einer speziellen Pumpe gemessen und die Restmenge an CO im Spirometer und in der Lunge wird jeweils mit dem CO-Gas Messgerät bestimmt. Die Hämoglobinmasse erhält man durch Bestimmung des prozentualen Anteils von CO-Hämoglobin (COHb%) im Kapillarblut vor der Inhalation und sechs und acht Minuten danach. Die Abnahme nach sechs und acht Minuten erfordert vom Anwender genügend Erfahrung in der Abnahme von Kapillarblut, um das für die Analyse erforderliche Blutvolumen zu bekommen. Bei Verwendung von venösem Blut wird die Abnahme vor der Inhalation und 7 Minuten danach durchgeführt. Da schon Unterschiede von 0,1% COHb zu relativ großen Unterschieden in der resultierenden HB-Masse führen, wird mittlerweile empfohlen, von einer zweifach Bestimmung auf mindestens drei- bis besser fünffach Bestimmung überzugehen [43]. Weitere Einflüsse auf den Test haben die Umgebungstemperatur und der Luftdruck, da sich beide Faktoren auf das Gasvolumen und damit auf die tatsächlich verabreichte Gasmenge auswirken können.

Die Hämoglobinmasse wird dann aus der folgenden Formel berechnet:

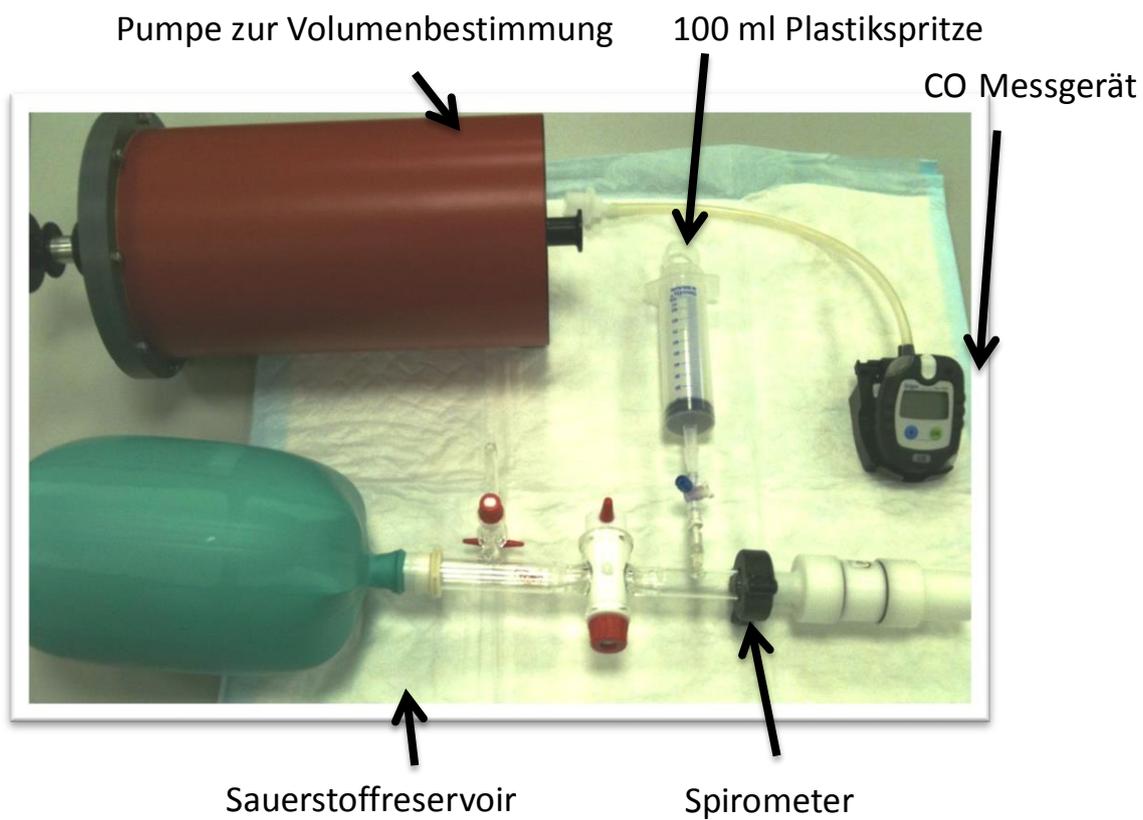
$$Hb_{\text{mass}} = K \times MCO \times 100 / (\Delta HbCO \times 1,39)$$

$K = (\text{aktueller Umgebungsluftdruck mmHg} \times 273^{\circ}\text{K}) / (760 \text{ mmHg} \times \text{aktuelle Umgebungsstemperatur } ^{\circ}\text{K})$.

$MCO =$ Volumen des CO Bolus minus das CO Volumen welches im Spirometer und der Lunge verbleibt, sowie durch Atmung zwischen Ende der Applikation und Blutabnahme und durch die Bindung an Myoglobin verloren geht.

$\Delta HbCO =$ Unterschied in HbCO% vor und nach CO Applikation.

1,39= CO Bindungskapazität für Hämoglobin nach Hüfner.



*Abb.1: Benötigtes Equipment zur Hämoglobinmassenbestimmung.
Blutgasanalysegerät nicht abgebildet.*

2.6 Direkter Nachweis der homologen Bluttransfusion

2.6.1 Überblick zu der Methode

Bei der homologen Bluttransfusion stammt das transfundierte Blut nicht vom Blut des Empfängers, weshalb man auch von Fremdblut spricht. Um Transfusionsrisiken zu minimieren, werden nur Transfusionen gegeben, die im AB0-System und Rhesus-D Faktor kompatibel zum Empfängerblut sind. Die Methode zum Nachweis solcher Fremdblut-Transfusionen beruht auf der Tatsache, dass Antigene weiterer Blutgruppensysteme auf der Erythrozytenmembran lokalisiert sind, die eine Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerblut möglich machen. Diese weiteren Antigene werden bei einer Transfusion meistens nicht erfasst, da die Gefahr auftretender Komplikationen minimal ist. Die Nachweisbarkeit dieser Antigene auf den roten Blutkörperchen wird über spezifische Antikörper ermöglicht, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Eine anschließende Messung auf dem Durchflusszytometer ermöglicht die Erfassung von Zellen mit und ohne Antigen. Eine Fremdbluttransfusion wird dadurch angezeigt, dass bei der Untersuchung auf ein bestimmtes Antigen zwei Populationen von Erythrozyten gemessen werden, nämlich ungefärbte und gefärbte.

Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Markierung von Antigenen die innerhalb oder auf der Oberfläche von Zielzellen präsent sind.

Um Zellen zu markieren werden Antikörper benutzt, die eine nicht-kovalente Bindung zu einem Epitop des Antigens eingehen. Die Stärke der Bindung ist bedingt durch die hohe Anzahl an Bindungsstellen zwischen Epitop und Paratop. Bindungen zwischen Antikörper und Antigen beruhen auf Wasserstoffbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen, elektrostatischen und Van der Waals Kräften.

Die Markierung erfolgt entweder direkt mit einem Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, oder indirekt mit einem unkonjugierten Antikörper der dann selbst mit einem farbstoffkonjugierten Antikörper markiert wird (Abb.2).

Direkt konjugierte Antikörper haben den Vorteil, dass zur Aufarbeitung weniger Inkubationsschritte nötig sind und damit die Analyse schneller durchgeführt werden kann. Die Vorteile der indirekten Markierung sind zum einen, dass Antigene markiert werden können, für die es keine direkt konjugierten Antikörper gibt und zum anderen, dass die Fluoreszenz durch eine höhere Anzahl an Epitopen für den sekundären Antikörper (speziell im Fall von IgM Primärantikörpern) intensiver ist. Somit kann man auch Antigene, die schwach exprimiert werden, detektieren.

Die so markierten Zellen werden innerhalb des Durchflusszytometers, in einer Durchflusszelle mit dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung

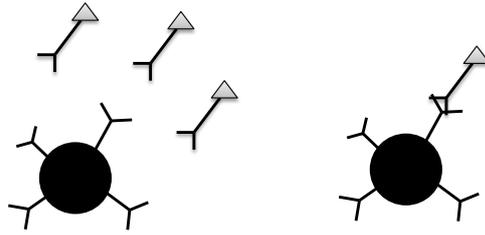
einzelnen hintereinander aufgereiht, so dass sie in hohem Tempo eine Lichtquelle passieren, die wiederum die Fluoreszenzfarbstoffe anregt.

In der Regel werden, falls es sich um fluoreszenzmarkierte Zellen handelt, drei Signale detektiert. Dabei handelt es sich um die Fluoreszenz sowie um das Vorwärtsstreulicht und das Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) korreliert mit der Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter) mit der Granularität, bzw. der inneren Beschaffenheit der Zelle. Im Falle von Leukozyten, kann so schon allein mit Hilfe des Streulichts zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden werden (Abb. 3).

Innerhalb der Durchflusszytometrie kann durch den Einsatz von Lasern unterschiedlicher Wellenlänge (z.B. 488 nm, 532 nm, 633 nm) und durch die Variation der eingebauten Filter mit einer hohen Anzahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe gearbeitet werden. Durchflusszytometer der neuesten Generation bieten mittlerweile die Möglichkeit, 10 und mehr Oberflächenmarker gleichzeitig zu erfassen und die so markierten Zellen automatisch für spätere Analysen, wie zum Beispiel PCR, zu sortieren und zu sammeln.

Die Durchflusszytometrie bietet sehr viele Applikationen, wie zum Beispiel intrazelluläre pH-, Kalzium-, Zytokin- und Apoptosemessungen oder Zellzyklusbestimmungen. Bei dem Nachweis von Blutdoping mit homologen Transfusionen erfolgt die Analyse zur Zeit über eine indirekte Markierung der Oberflächenantigene.

Prinzip der direkten Markierung



Prinzip der indirekten Markierung

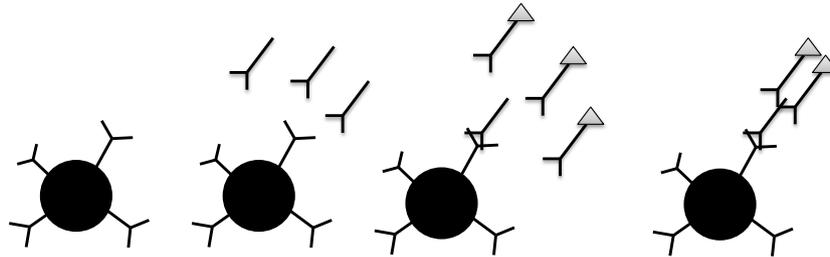


Abb.2: Prinzip der direkten und indirekten Markierung von Oberflächenantigenen auf Zellen.

Prinzip der Durchflusszytometrie

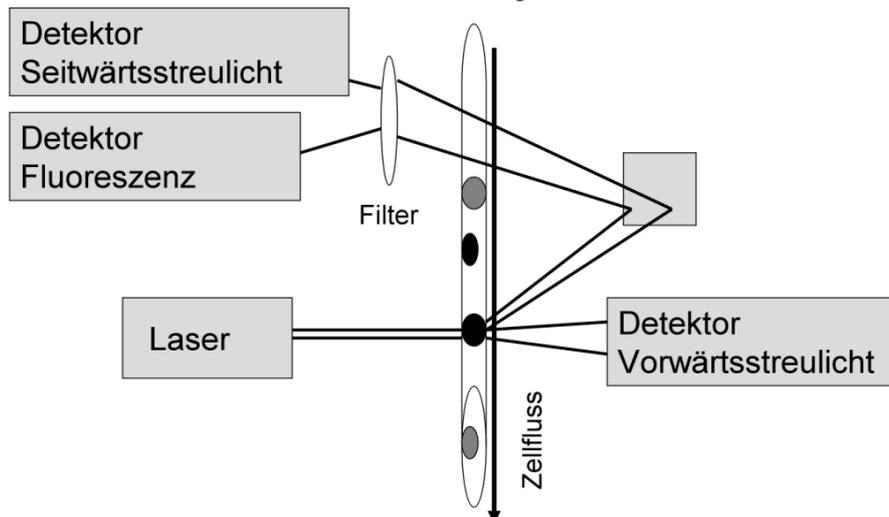


Abb.3: Prinzip der Durchflusszytometrie.

Relevante Antigene auf Erythrozyten

Bei der Installation der Methode im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln wurden acht verschiedene Antigene für die Analyse zur Methode zum Nachweis homologer Bluttransfusionen ausgewählt. Dies waren C, c, E, e, Jka, Jkb, Fya und Fyb, die im folgenden genauer beschrieben werden.

C, c, E, e

C und c Antigene sind die Produkte der Allele des RHCE Gens. In Europäern beträgt das Vorkommen von C und c etwa 68% und 80%. In Schwarzafrikanern ist die Frequenz für c sehr viel höher (über 95%), während bei Chinesen C (über 93%) mit einer hohen Frequenz auftritt. E und e Antigene sind ebenfalls auf Allele des RHCE Gens zurückzuführen. Antigen e zeigt eine sehr hohe Frequenz in allen Populationen (über 95%) [44]. Tabelle 1 gibt einen Überblick der ungefähren Anzahl der jeweiligen Antigene pro Erythrozyt in Abhängigkeit vom Phänotyp.

Phänotyp	Antigen D	Antigen C	Antigen c	Antigen e
Dce/dce	10000-15000	22000-40000	37000-53000	18000-25000
Dce/Dce	15000-23000	46000-57000	0	18000-25000
DcE/DcE	16000-33000	0	70000-85000	0
Dce/DcE	23000-31000	26000-40000	37000-53000	14000-15000
dce/dce	0	0	70000-85000	18000-25000

Tab. 1: Ungefähre Anzahl der jeweiligen Antigene pro Erythrozyt in Abhängigkeit vom Phänotyp [45].

Die Antigene C, c, E und e sind nicht glykosyliert und haben eine Länge von 417 Aminosäuren. Es sind Transmembranproteine mit sechs extrazellulären Schleifen und die N- und C-Enden des Proteins befinden sich im Cytosol.

Die C/c und E/e Polymorphismen basieren auf Veränderungen der Aminosäuresequenz des RhCcEe Proteins. Der Unterschied zwischen C und c besteht hauptsächlich in einem Austausch von Serin mit Prolin an Position 103 in der zweiten extrazellulären Schleife des Proteins, während der E/e Polymorphismus von einem Prolin/Alanin Austausch an Position 226 in der vierten extrazellulären Schleife abhängt. Auch wenn die beiden genannten Veränderungen die primäre Rolle spielen, haben Wechsel von Aminosäuren an bestimmten anderen Positionen ebenfalls Einfluss auf den resultierenden Phänotyp.

Fya, Fyb

Die beiden Antigene Fya und Fyb gehören zu dem sogenannten Duffy System. Ein sogenannter „single nucleotide polymorphism“ (SNP) im zweiten Exon des Fy Gens ist dafür verantwortlich ob an Position 42 in der Aminosäuresequenz des Proteins die Aminosäure Glycin oder Asparagin sitzt, wodurch wiederum definiert wird ob das Protein ein Fya Antigen oder Fyb Antigen ist.

In Afrikanern gibt es das Allel des Fy Gens, welches die Expression von sowohl Fya als auch Fyb verhindert. Da diese beiden Antigene Rezeptoren für Malariaerreger darstellen ist die Abwesenheit dieser Antigene ein Selektionsvorteil für Menschen in Regionen in denen dieser Erreger auftritt.

Das Duffy Protein ist glykosyliert und auch als Duffy Rezeptor für Chemokine (DARC) bekannt. Es hat drei extrazelluläre Schleifen, einen extrazellulären, glykosylierten N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus.

Das Auftreten der Antigene in unterschiedlichen Populationen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Phänotyp	% Europäer	% Afrikaner	% Asiaten
Fy (a+b-)	17	9	91
Fy (a+b+)	49	1	9
Fy (a-b+)	34	22	1
Fy (a-b-)	0	68	0

Tab.2: Auftreten des Duffy Antigens in unterschiedlichen Populationen in Abhängigkeit vom Phänotyp [46].

Jka, Jkb

Die beiden Antigene Jka und Jkb sind Antigene des Kidd-Systems, die vom SLC14A1 Gen kodiert werden. Es sind glykosylierte Transmembranproteine mit einer Länge von 389 Aminosäuren und fünf extrazellulären Schleifen. N- und C-Terminus des Proteins liegen im Zytosol. Kidd Antigene haben die Funktion von Urea Transportern, was den Erythrozyten hilft, in einer Umgebung wie der Niere, die reich an Urea ist, nicht zu lysieren. Das Auftreten des Kidd Antigens in unterschiedlichen Populationen ist in Tabelle 3 dargestellt. Kidd negative Zellen (Jk a-b-) weisen eine sehr hohe

Resistenz gegenüber hohen Urea Konzentrationen auf. Der Phänotyp kommt jedoch weltweit kaum vor und hat nur eine Frequenz von 0,9% in Polynesiern.

Phänotyp	% Europäer	% Afrikaner	% Asiaten
Jk (a+b+)	50	41	49
Jk (a+b-)	26	51	23
Jk (a-b+)	23	8	27
Jk (a-b-)	0	0	0

Tab.3: Auftreten des Kidd Antigens in unterschiedlichen Populationen in Abhängigkeit vom Phänotyp [46].

2.7 Direkter Nachweis von rekombinantem Erythropoietin

2.7.1 Überblick zu den Methoden

Während die Aminosäuresequenz von rekombinantem und humanem Erythropoietin identisch ist, gibt es Unterschiede in der Glykosylierung dieses Proteins. Die Unterschiede sind das Ergebnis einer posttranslationalen Modifizierung, die abhängig vom Zelltyp selbst, aber auch von den Umweltbedingungen der EPO produzierenden Zellen sein kann [47]. Zur Zeit gibt es zwei Methoden zur direkten Detektion von rekombinantem Erythropoietin in Urin, die von der WADA zugelassen sind [48]. Dies sind der isoelektrische Fokussierungstest [49] und die SDS-PAGE Technik [50, 51]. Die SDS-PAGE Technik wird im technischen Dokument der WADA zur Zeit allerdings nur als Bestätigungsmethode beschrieben.

Isoelektrische Fokussierung und Western Blot.

Die Probenvorbereitung ist hauptsächlich eine Aufkonzentrierung der Proteine der Urinprobe. Dazu werden mehrere Ultrafiltrations- und Waschschriffe mit Zentrifugenfiltern durchgeführt, die es ermöglichen das Erythropoietin von Zellen oder Bakterien abzutrennen, mögliche Verunreinigungen zu beseitigen und kleinere Proteine zu entfernen. Das WADA Dokument erlaubt die alternative oder zusätzliche Anwendung von Immunoaffinitätsaufreinigungen, besonders im Fall von Plasma- oder Serumanalysen, verlangt allerdings immer eine Validierung der jeweils angewandten Methode.

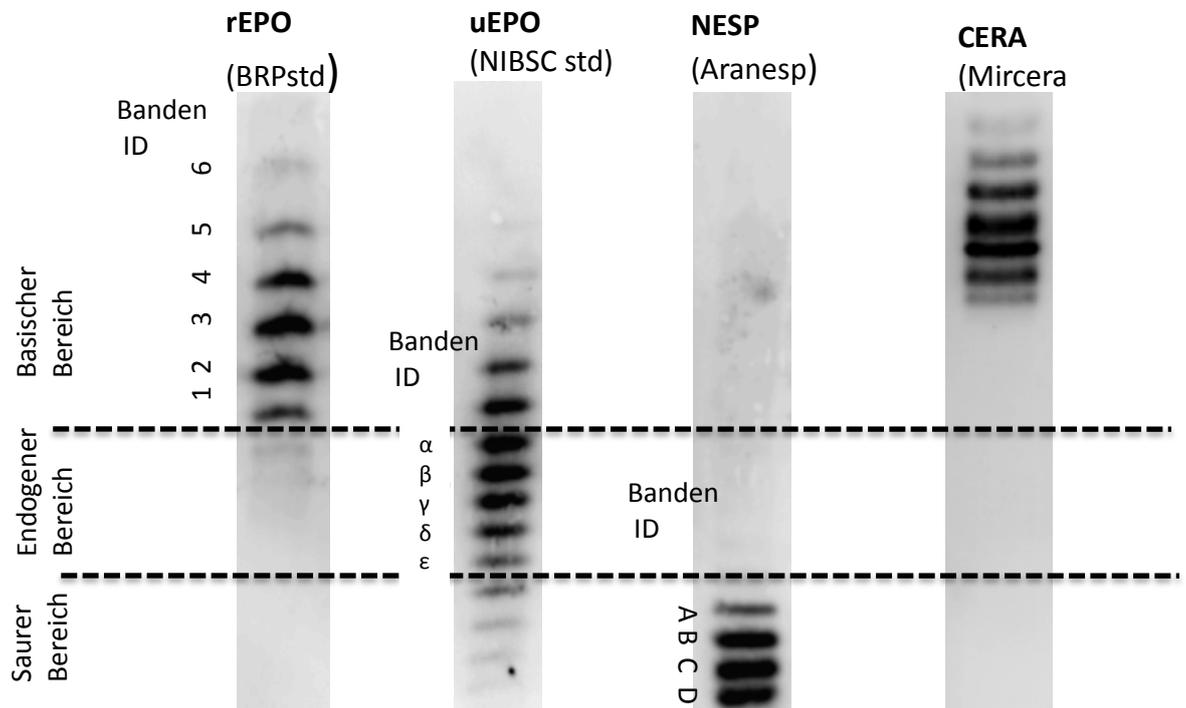
Die isoelektrische Fokussierung des aus der Probenvorbereitung gewonnenen Proteinkonzentrats erfolgt unter, durch Urea induzierte, denaturierenden Bedingungen. Das Gel zur Fokussierung hat einen pH Gradienten von 2 – 6 was dem Bereich der isoelektrischen Punkte des natürlichen und rekombinaten EPOs entspricht.

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung erfolgt die sogenannte Doppel-Blot Prozedur. Im ersten Blot werden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran übertragen und dann mit einem monoklonalen Anti-EPO Antikörper inkubiert (Klon AE7A5), der an die EPO-Isoformen bindet. Im zweiten Blot wird die Bindung des Antikörpers an das EPO durch eine Ansäuerung des pHs unterbrochen und der Antikörper wird auf eine zweite PVDF Membran übertragen. Im technischen Dokument wird die Bedeutung

des spezifischen Antikörperklons hervorgehoben. Die Akzeptanz der Anwendung eines einzelnen Antikörpers, im Gegensatz zu üblichen ELISA-Techniken, wird mit der vorhergehenden isoelektrischen Fokussierung begründet. Die Methode ist dadurch hochspezifisch und mögliche Cross-Reaktionen mit anderen Proteinen können ausgeschlossen werden. Durch die Möglichkeit der oben genannten Immunoaffinitätsaufreinigung, die mit einem anderen Antikörperklon durchgeführt werden kann, verbessert sich die Spezifität noch weiter.

Die Detektion des Antikörpers auf der zweiten PVDF Membran erfolgt durch die Zugabe eines biotinierten Anti-Maus IgG Antikörpers, eines Streptavidin-Peroxidase Komplexes und Chemilumineszenz Substrat. In Anwesenheit der Peroxidase wird durch das Substrat eine Chemilumineszenz erzeugt, die es ermöglicht ein Bild zu generieren, das einen Rückschluss auf die Position und Anzahl der EPO-Isoformen im Gel ermöglicht (Abb.4).

- Kathode



+ Anode

Abb.4: Darstellung unterschiedlicher EPO-Formen als Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung mit anschliessendem Doppel-Blot. Modifiziert nach WADA TD2009EPO.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt wie in Abb.4 ersichtlich mit Banden IDs, die die Position der Isoformen mit Hilfe des rekombinanten EPO "Biological Reference Population" (Gemisch aus Epoetin alpha und beta), NESP und urinärem EPO (International Reference Preparation, NIBSC, UK) definieren. Die Definition erfolgt dabei wie oben beschrieben als Zahl oder Buchstabe.

Die Beurteilung des Ergebnisses ist von Kriterien zur Akzeptanz, Identifikation und Stabilität abhängig.

Die Akzeptanzkriterien beschreiben die Bedingungen, die vom analytischen Ergebnis erfüllt werden müssen um eine Auswertung durchführen zu dürfen. Proben mit zum Beispiel starkem Hintergrund oder Schmier dürfen nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die Referenzstandards sollten immer eine Benennung der Banden in einer Probe ermöglichen.

Das technische Dokument TD2009EPO beschreibt auch die genauen Identifikationskriterien für Epoetin alpha und beta, anderer Erythropoetine, NESP und CERA. Diese basieren auf der Bandenanzahl im jeweiligen basischen oder sauren Bereich und der individuellen Bandenintensität.

Da die Stabilität von Urinproben durch Bakterienaktivität beeinflusst werden kann, muss für Urinproben ein Stabilitätstest durchgeführt werden, der ebenfalls im TD2009EPO beschrieben wird. Erst wenn gezeigt werden kann, dass die Probe stabil ist, darf eine Probe als „Adversed Analytical Finding“ berichtet werden [48].

SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-PAGE Technik zur Detektion von rekombinantem Erythropoietin in der Dopinganalytik wurde erstmals 2008 in einer Veröffentlichung beschrieben [50]. In dieser Publikation wird ein Verfahren vorgestellt, dass es ermöglicht, die relative Mobilität des EPOs im Gel zu errechnen und damit eine quantitative Aussage zu treffen. 2009 folgte eine weitere Publikation, die Vorteile und Limitierungen der Methode im Bereich der Dopingkontrolle beschreibt [51]. Wie schon oben erwähnt erlaubt die WADA in ihrem technischen Dokument die Anwendung der SDS-PAGE Technik für

Bestätigungsanalysen, allerdings wird nicht darauf eingegangen ob die Auswertung quantitativ oder qualitativ erfolgen muss.

Die Probenvorbereitung ist vergleichbar mit der der isoelektrischen Fokussierung, allerdings ist bei der SDS-PAGE immer eine Immunoaffinitätsaufreinigung durchzuführen. Die Trennung des Proteins ist bei der SDS-PAGE hauptsächlich von der Größe des Proteins und seinem Molekulargewicht abhängig, kann aber auch durch die dreidimensionale Struktur und postranslationale Modifikationen beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass glykosylierte Proteine weniger effektiv mit SDS beladen werden und dadurch ein langsames Laufverhalten aufweisen als nicht glykosylierte Proteine mit dem selben Molekulargewicht [52]. Die Proben für den EPO Test werden vorzugsweise in einem NuPAGE 10% Bis-Tris Gel elektrophoretisch separiert und dann im semi-dry Verfahren auf eine PVDF Membran geblottet. Im Gegensatz zur isoelektrischen Fokussierung kann auf einen Doppelblot verzichtet werden. Die Detektion des EPO Moleküls auf der Membran erfolgt durch die Zugabe eines Maus-Anti-EPO IgG Antikörpers und eines Anti-Maus Antikörpers konjugiert mit einem Peroxidase Komplex. Durch Zugabe von Chemilumineszenz Substrat wird durch die Peroxidase Chemilumineszenz erzeugt, die es ermöglicht ein Bild zu generieren, das Rückschlüsse auf die Position des EPO Moleküls im Gel ermöglicht (Abb.5).

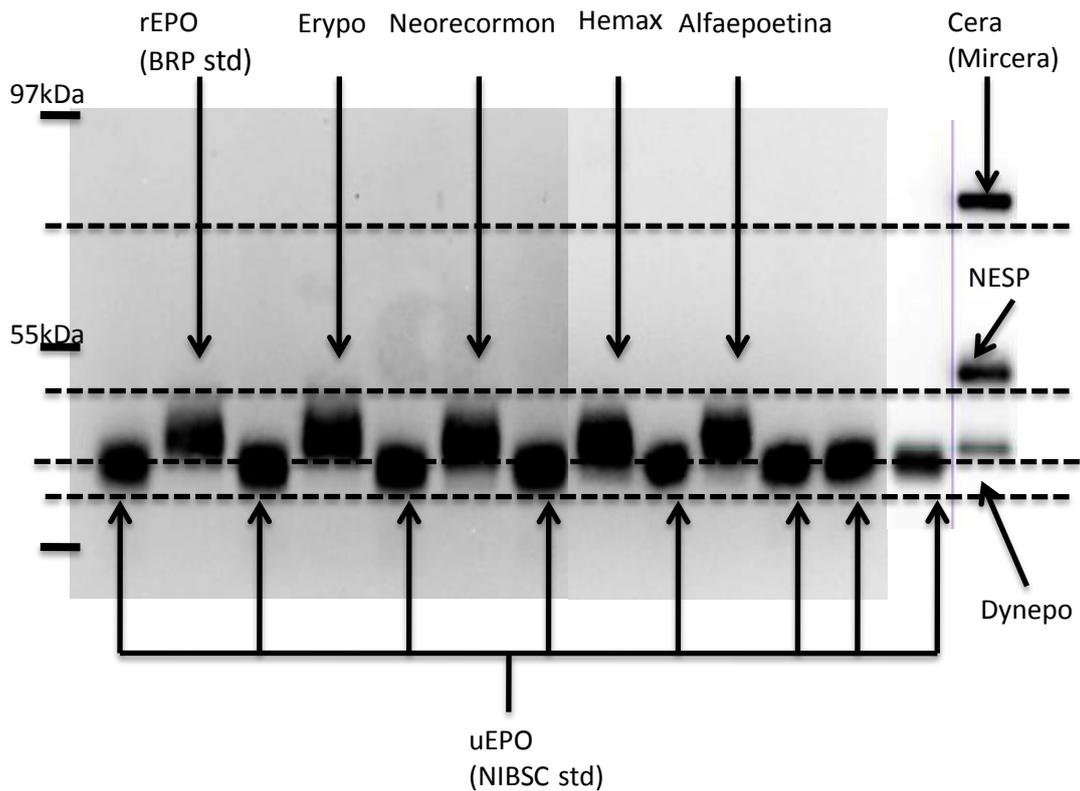
Die Auswertung der SDS-PAGE Methode kann, wie im Dokument der WADA dargestellt, rein qualitativ erfolgen oder quantitativ wie im Artikel von Kohler et al. beschrieben. Dabei wird die relative Mobilität aus dem

Verhältnis der Distanzen von NESP und EPO sowie NESP und Ratten-EPO ermittelt.

$$\text{Relative Mobilität} = 1 - (\text{EPO} - \text{NESP}) / (\text{Ratten-EPO} - \text{NESP})$$

Daten eines EPO Ausscheidungsversuchs und von 53 negativen Referenzurinen zeigen mit einem Vertrauensintervall von 99,9% einen Grenzwert für die relative Mobilität von knapp unter 0,58 [50].

Eine Limitierung der SDS-PAGE ist die Analyse von EPO aus Baby Hamster Kidney Zellen (Repotin). Dieses Präparat zeigt eine eher niedrigere relative Mobilität, kann aber glücklicherweise mit der isoelektrischen Fokussierung detektiert werden.



+ Anode

Abb.5: Darstellung unterschiedlicher EPO-Formen als Ergebnis der SDS-PAGE mit nachfolgendem Blot. Modifiziert nach WADA TD2009EPO. BRP (Biological Reference Preparation)= Gemisch aus Epoetin α und β . Erypo, Hemax und Alfaepetina= Epoetin α . Neorecormon= Epoetin β . CERA= Epoetin β konjugiert mit Methoxypolyethylenglycolpolymer. NESP= Darbepoetin α . Dynepo= Epoetin Δ . uEPO (NIBSC)= urinäres EPO (National Institute for Biological Standards and Controls).

3 Experimenteller Teil

3.1 Untersuchung zur Lagerungsstabilität der einzelnen zellulären Parameter

Ein Teil des nachfolgenden Kapitels wurde auf englischer Sprache 2008 als Artikel in der Zeitschrift Laboratory Hematology veröffentlicht [53].

Ziel dieser Arbeit war es die Stabilität von Blutproben über Zeit und unter Berücksichtigung unterschiedlicher Lagerungstemperaturen für die Parameter des roten Blutbildes und der Retikulozyten bei Messung auf dem ADVIA120 zu überprüfen. Die ausgewählten Parameter für diese Untersuchung waren: Erythrozytenzahl (Ery), Hämoglobinkonzentration (Hb), Hämatokrit (Hct), Mittleres Zellvolumen (MCV), prozentualer Anteil hypochromer Erythrozyten (Hypo%), prozentualer Anteil Makrozyten (Macros%), Retikulozytenzahl (Reti#), prozentualer Anteil Retikulozyten (Reti%), Mittleres Zellvolumen der Retikulozyten, Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHr), prozentualer Anteil der Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz (HFR%) sowie der aus Hb und Reti% berechnete OFF-Score Wert. Bei der Auswahl der Parameter ist anzumerken, dass die Messung von Hypo% und Makro% Parameter sind, die nur von dem Blutanalysegerät ADVIA120 gemessen werden können, welcher zur Zeit der Untersuchung zusammen mit dem Sysmex XT2000i eines der zwei von der WADA zugelassenen Messinstrumente darstellte.

Hintergrund der Untersuchung waren die Erfahrungen des Kölner Anti-Doping Labors bei der Einführung der Blutkontrollen für den Blutpass. Es

wurde von Seiten der deutschen Dopingkontrollfirma PWC, sowie der NADA darüber diskutiert Blutkontrollen zu einem akkreditierten Anti- Dopinglabor, in das nächstgelegene Krankenhaus zu schicken oder direkt am Ort der Blutabnahme analysieren zu lassen. Nachteile der Analyse in Krankenhäusern ist die große Anzahl unterschiedlicher Analysesysteme, sowie die unterschiedliche Kalibrierung der Systeme, die selbst wenn es sich um den gleichen Gerätetyp handelt zu großen Unterschieden in den Messergebnissen führen kann. Jedes Krankenhaus, das Blutproben im Sinne der Dopinganalytik messen wollte, müsste außerdem von der WADA akkreditiert werden. Dies würde Schulungen des Personals für Dokumentation, Probenannahme, Messung und Lagerung notwendig machen. Blutproben direkt am Ort der Probenentnahme zu analysieren hat die Vorteile schnellere Ergebnisse produzieren zu können und die Proben geringeren Einflüssen von Lagerungsfaktoren wie Umgebungstemperaturen aussetzen zu müssen. Dies ist der Grund, warum diese Vorgehensweise auch weiterhin bei Wettkämpfen wie der Tour de France praktiziert wird. Da es sich bei den Blutproben zur Erstellung des Blutpasses aber hauptsächlich um Trainings- und nicht um Wettkampfkontrollen handelt, ist es ökonomischer die Blutproben in akkreditierte Labore zu schicken. Diese Vorgehensweise hat ausserdem den Vorteil, dass verdächtige Proben zusätzlich auf Fremdblut oder quervernetzte Hämoglobine untersucht werden können. Letztendlich wurde von Seiten der NADA die Entscheidung getroffen, die Blutproben an die zwei deutschen WADA akkreditierten Labore in Köln und Kreischa zu versenden.

Auf Grund der möglichen Veränderungen der Blutparameter durch Probentransport und der geringen Anzahl von Studien zu diesem Problem musste so schnell wie möglich untersucht werden, in welchem Zeitraum und bei welchen Temperaturen die Proben zu den Laboratorien transportiert werden müssen.

Durch die bisherigen Erfahrungen war bekannt, dass es innerhalb von Deutschland im Extremfall bis zu 48 Stunden dauern kann, bis Proben im Labor eintreffen. Dies war der Grund, diesen Zeitraum auch für unsere Untersuchung zu wählen. Um den jahreszeitlichen Temperaturen gerecht zu werden, wurde außerdem der Einfluss von Lagerung bei 4°C und 21°C untersucht.

Das Blut für die Studie wurde fünf gesunden, kaukasischen Probanden entnommen, vier Männern und einer Frau. Die Probanden wurden über die Ziele der Studie aufgeklärt und waren einverstanden an der Studie teilzunehmen. Es handelte sich um Freizeitsportler im Alter von 25 bis 39 Jahren, von denen einer der Männer Raucher war.

Die Blutentnahme erfolgte in sitzender Position und wurde an zwei Versuchstagen morgens im Zeitraum von 7.00 Uhr bis 9.00 Uhr durchgeführt. Es wurden pro Proband jeweils 3,0 ml Blut in ein K2-EDTA Vacutainer Röhrchen (Becton-Dickinson, Plymouth, UK) abgenommen. Den Probanden war es nicht erlaubt, vor der Abnahme Sport zu treiben oder zu essen.

Die Blutproben wurden gemäß der oben genannten Parameter in Zweifachmessung auf einem ADVIA120 (Bayer, Fernwald, Deutschland) bestimmt. Die erste Messung erfolgte 20 Minuten nach Blutabnahme, die folgenden Messungen dann zu den Zeitpunkten 6, 24, 30 und 48 Stunden.

Vor jeder Analyse wurden die Proben für 20 Minuten auf einem Blutmixer homogenisiert. Die Probenlagerung zwischen den Messungen erfolgte in einem temperaturüberwachten Kühlschrank bei 4°C und in einem Laborraum bei 21°C. Der ADVIA120 wurde in regelmäßigen Abständen mit einer SetPoint Kalibratorlösung (Bayer, Fernwald, Deutschland) von einem zertifizierten Techniker der Firma Bayer kalibriert. Zur Überprüfung des Geräts wurden vor jeder Messung die Kontrolle NORMAL Testpoint 3in1 und ABNORMAL2 Testpoint 3in1 (Bayer, Fernwald, Deutschland) analysiert. Die Messwerte für die Parameter der beiden genutzten Kontrollen entsprechen den Bereichen die von Dopingproben zu erwarten sind.

Die Messunsicherheit des Analysegeräts wird in Tabelle 4 als Variationskoeffizient % demonstriert. Die Ergebnisse der Kontrollen NORMAL und ABNORMAL2 repräsentieren den kompletten Zeitraum der Studie.

	NORMAL		ABNORMAL2	
	Ø	CV%	Ø	CV%
Erythrozyten	4,27 x 10 ⁶ /µl	0,86	5,22 x 10 ⁶ /µl	1,51
Hämoglobin	12,3 g/dl	1,28	17,3 g/dl	1,23
Hämatokrit	34,0 %	1,76	47,9 %	1,63
MCV	79,5 fL	1,42	93,1 fL	0,61
Reti	3,7 %	6,46	0,6 %	23,6

Tab.4: Kontrollwerte für die Kontrollen NORMAL und ABNORMAL2 für den kompletten Zeitraum der Untersuchung. Dargestellt sind Ø (Durchschnittswert) und CV% (Variationskoeffizient in Prozent).

Die Datenanalyse erfolgte durch Anpassung von linearen und nichtlinearen Modellen. Typischerweise wurde eine zufällige Variation der Schnittpunkte zwischen den Probanden und innerhalb der Probanden angenommen. Dadurch war es möglich, angemessene Trends zu modellieren und die Kurvenparameter mit der Interaktion der Temperatur zu überprüfen. Für alle Berechnungen wurde R-2.5.1 Software unter Verwendung der nlme-Bibliothek genutzt [54].

3.2 Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Analysegeräte auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten

Ein Teil der Daten im nachfolgende Kapitel wurde 2010 in der Deutschen Zeitschrift für Sportmedizin in Kooperation mit dem Institut für Trainingswissenschaften der DSHS Köln veröffentlicht [37].

Das hämatologische Modul des biologischen Passes erfährt seit 2008 eine immer größer werdende Bedeutung. Zu Beginn der Einführung des

Blutpass-Ansatzes bestand noch der Plan, die Messung der Blutproben auf unterschiedlichen Analysegeräten der Firmen Bayer und Sysmex durchzuführen. Neben biologischen Einflüssen, wie zum Beispiel diurnaler Rhythmus oder sportliche Belastung, können auch analytische Einflüsse zur Vergrößerung der intraindividuellen Varianz der Blutwerte eines Athleten beitragen. Für die Untersuchung war es daher erforderlich die analytischen Einflüsse wie instrumentelle Faktoren zu evaluieren.

Innerhalb dieser Studie wurden Geräte unterschiedlicher Hersteller sowie Geräte desselben Herstellers für die Parameter Hämoglobin und Retikulozytenprozent miteinander verglichen. Die untersuchten Analysegeräte waren ein ADVIA120 (Bayer, Fernwald, Deutschland), ein KX21N, ein R500 und zwei XT2000i (Sysmex, Kobe, Japan).

Mit dem ADVIA120 wird Hämoglobin in einem photometrischen Messkanal bei einer Wellenlänge von $\lambda = 546 \text{ nm}$ gegen eine Referenzlösung (Rinse) gemessen. Hierzu werden die Erythrozyten in einem ersten Schritt vollständig lysiert und anschließend sämtliche Hämoglobinfraktionen mit Kaliumcyanid (KCN) oxidiert und als Zyanmethämoglobin gemessen. Die Retikulozyten werden am ADVIA[®]120 im Lasermesskanal (Laserdiode, $\lambda = 670 \text{ nm}$) optisch gemessen. Hierzu werden die Retikulozyten mit speziellen Reagenzien isovolumetrisch aufgekugelt („Isovolumetric Sphering“), mit Oxazin 750 die RNA der Retikulozyten angefärbt und mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung jeweils als singuläre Zellen gemessen und validiert. Als Messsignale werden das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter) in zwei unterschiedlichen Winkelbereichen (Niedrigwinkel $2 - 3^\circ$ und

Hochwinkel $5 - 15^\circ$) und die Absorption jeder Zelle von Detektoren aufgefangen und in ein Scattergramm (Retigramm) projiziert [55].

Bei Sysmex erfolgt die Hämoglobinmessung über die SLS-Hämoglobinmethode. Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS) löst die Lipoproteine in der Zellmembran und setzt damit das Hämoglobin aus den roten Blutkörperchen frei. Die hydrophoben Gruppen des SLS binden an den Globinanteil und bewirken so eine Konformitätsänderung im Hämoglobinmolekül. Dadurch wird die Oxidation des zweiwertigen Eisens möglich und es entsteht Methämoglobin. Hydrophile Bestandteile des Natrium-Lauryl-Sulfates können nun an das entstandene dreiwertige Eisen im Methämoglobinkomplex binden. Auf diese Weise entsteht ein stabiler Farbkomplex (SLS-Hb), der photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 555 nm gemessen wird.

Die Retikulozytenmessung erfolgt über eine RNA Färbung mit dem Polymethin Auramin-O welches beim R500 mit einem Argonlaser ($\lambda = 488$ nm) und beim XT2000i mit einem Halbleiterlaser ($\lambda = 633$ nm) angeregt wird. Über das Vorwärtsstreulicht und die Fluoreszenzintensität können die Retikulozyten von anderen Zellen differenziert werden [56]. Es wurden insgesamt drei Vergleichsuntersuchungen durchgeführt. In der ersten Untersuchung wurde die Technologie des ADVIA120 mit dem KX21N für die Hämoglobinkonzentration und mit dem R500 für die Retikulozyten innerhalb einer sportwissenschaftlichen Interventionsstudie verglichen. In der zweiten Untersuchung wurden die gleichen Geräte verglichen, allerdings mit realen Anti-Doping Proben der deutschen NADA. Die dritte Untersuchung war ein

Intra-Technologie Vergleich, bei dem zwei XT2000i miteinander verglichen wurden.

Die Daten der ersten Untersuchung (n=34) stammten aus einer Hypoxieinterventionsstudie (sleep high – train low) des Instituts für Trainingswissenschaft und Sportinformatik der DSHS Köln. Während dieser Studie schliefen neun Probanden (siehe Tabelle 5) in einer Hypoxiekammer bei normalem Luftdruck in einer simulierten Schlafhöhe von etwa 2500m.

	Alter (Jahre)	Grösse (cm)	Gewicht (kg)
Ø	24,0	176,6	69,0
SD	1,8	3,4	6,3

Tab.5 : Details zu den Probanden. Dargestellt sind Ø (Durchschnittswert) und SD (Standardabweichung).

Die Daten aus Untersuchung 2 (n=120) stammten aus Routineproben des Instituts für Biochemie der DSHS Köln die im Jahr 2007 analysiert wurden. Die Proben wurden von der deutschen NADA im Rahmen von Dopingkontrollen entnommen. Durch die Anonymisierung liegen leider keine anthropometrischen Daten vor. Die Analyse der Proben fand erst im Institut für Biochemie und danach im Labor des Instituts für Trainingswissenschaften statt, mit einer Verzögerung von maximal 45 Minuten.

Der Gerätevergleich der dritten Untersuchung (n=15) wurde innerhalb einer Belastungsstudie durchgeführt. Die anthropometrischen Daten der Probanden sind in Tabelle 6 zu finden. Die Proben für den Vergleich wurden

am letzten Tag einer Studie in Doha, Qatar entnommen und innerhalb von 24 Stunden im Zentrallabor der Universität Freiburg in Deutschland analysiert.

Alle Geräte unterlagen während des Untersuchungszeitraumes regelmäßigen Servicemaßnahmen von Seiten des Herstellers. Zur Überprüfung des ADVIA120 wurden vor jeder Messung die Kontrolle NORMAL Testpoint 3in1 und ABNORMAL2 Testpoint 3in1 (Bayer, Fernwald, Deutschland) analysiert, während für die Sysmex Geräte die e-check Kontrollen 1-3 (Sysmex, Kobe, Japan) genutzt wurden.

3.3 Untersuchung zum Einfluss einer Flugreise auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.

Ein Teil des nachfolgenden Kapitels wurde auf englischer Sprache 2011 als Poster auf dem International Sport Science Sport Medicine Congress in Newcastle vorgestellt und als Posterbeitrag 2011 im „British Journal of Sport Medicine“ veröffentlicht [57].

Athleten auf internationalem Niveau müssen oft sehr weit reisen, wenn sie an den Ort ihres Trainingslagers gelangen wollen oder um an internationalen Wettkämpfen teilzunehmen. Dopingkontrollen werden durch die ausrichtende Wettkampfinstanz zuweilen direkt nach Ankunft genommen, wie zum Beispiel bei der Leichtathletik Hallenweltmeisterschaft 2009 in Doha, bei der der Weltleichtathletikverband IAAF Blutproben von Athleten entnahm, die zum Teil erst sechs Stunden vorher angereist waren. Diese

Blutproben wurden direkt in Doha analysiert und die Ergebnisse an die WADA, zur Integration in den biologischen Pass übermittelt. Eine andere Situation, ist die Rückkehr eines Athleten von seinem Trainingslager im Ausland an den Heimatort. Die nationalen Anti-Doping Agenturen haben die Möglichkeit einen Athleten direkt nach Rückkehr zu testen, was in der Praxis auch getan wird. Gründe dafür sind sowohl ökonomischer Art, als auch die Tatsache, das die Einnahme von Dopingsubstanzen in hochintensiven Trainingsphasen für den dopenden Athleten sinnvoll erscheint. Ein Test kurz nach einem Trainingslager erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, verbotene Substanzen im Blut oder Urin eines dopenden Athleten detektieren zu können.

Die Ergebnisse eines Anti-Doping Tests müssen vor Gericht Bestand haben. Eine Flugreise birgt die Möglichkeit von verändertem Sauerstoffgehalt, Luftdruck und Luftfeuchtigkeit im Flugzeug. Da dies als Argument für veränderte Blutwerte durch Hämokonzentration vorgebracht werden kann, galt es den Einfluss einer Flugreise auf die beiden Parameter Hämoglobinkonzentration und Prozentwert der Retikulozyten zu untersuchen. Einflüsse durch Veränderungen des zirkadianen Rhythmus oder durch mögliche Jet-lag Erscheinungen konnte dabei weitgehend ausgeschlossen werden, da der Flug der Probanden innerhalb von nur zwei Zeitzonen stattfand.

Das Blut für die Untersuchung wurde von fünfzehn gesunden, männlichen, kaukasischen Probanden entnommen. Die Probanden wurden über die Ziele der Studie aufgeklärt und waren einverstanden an der Studie teilzunehmen.

Es handelte sich um Radfahrer und Triathleten mit einem Trainingsaufwand von mindestens acht Stunden in der Woche. Die anthropometrischen Merkmale und die maximale Sauerstoffaufnahme der Probanden sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

	Alter (Jahre)	Grösse (cm)	Gewicht (kg)	Körperfett (%)	VO ₂ max (ml/kg/min)
Ø	28,3	180,4	72,4	13,5	63,5
SD	4,5	6,4	5,7	3,1	5,8

Tab.6: Anthropometrische Merkmale und maximale Sauerstoffaufnahme der Probanden. Dargestellt sind Ø (Durchschnittswert) und SD (Standardabweichung).

Die Reise der Probanden startete um neun Uhr morgens von Freiburg in Deutschland und endete 14 Stunden später, um 23 Uhr, in Doha, Qatar. Die 14 Stunden setzten sich aus einer 2,5 stündigen Bahnfahrt, einem acht stündigen Flug, sowie den Transfer- und Wartezeiten zusammen. Der Flug fand in einem Airbus der Lufthansa statt inklusive eines Zwischenstopps in Riyadh, Saudi Arabien, bei dem die Probanden an Bord des Flugzeugs bleiben mussten.

Die Blutproben der Probanden am Reisebeginn wurden am Morgen in der Uni-Klinik Freiburg abgenommen. Sie wurden zum Transport nach Doha in eine Kühlbox verpackt und nach Ankunft der Probanden in Doha direkt auf einem XT2000i (Sysmex, Kobe, Japan) in der Aspire Academy in Doha gemessen. Zeitgleich zur Messung dieser Proben erfolgte die Abnahme des Bluts zum Reiseende, das direkt im Anschluss gemessen wurde. Alle

Messungen wurden, wie in den WADA Guidelines definiert, in Zweifachbestimmung durchgeführt und bei zu großen Abweichungen wiederholt. Die nächsten Blutabnahmen fanden am Morgen und Abend des Folgetages statt um weitere Informationen zur Variation zwischen und innerhalb der Tage nach Reiseende zu gewinnen und um mögliche zirkadiane Einflüsse ausschließen zu können.

Zu jedem Zeitpunkt wurden 11,7 ml Blut entnommen, davon 2,7 ml in ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) und 9,0 ml in ein Serumröhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland). Zur Equilibrierung des Plasmavolumens mussten die Probanden vor jeder Blutabnahme mindestens 10 Minuten ruhig sitzen. Die Probanden erfuhren keine Einschränkung in Flüssigkeits- oder Nahrungsaufnahme, da dies auch innerhalb realer Dopingkontrollen nicht möglich ist.

Um weitere Informationen zum Flüssigkeitshaushalt der Probanden zu bekommen wurde das Gewicht der Probanden vor den Blutentnahmen bestimmt sowie ein von den Probanden erstelltes Flüssigkeitsprotokoll bei der Interpretation der Daten hinzugezogen.

3.4 Untersuchung zum diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration vor und während eines Etappenrennens im Radsport.

Der Weltradsportverband UCI war der erste internationale Sportverband der auf Grund der hohen Prävalenz von Dopingfällen bei seinen Athleten mit der WADA kooperierte und die Einführung von individuellen Blutprofilen

realisierte. Bei Wettkampfveranstaltungen im Radsport die über mehrere Tage gehen - wie zum Beispiel der Tour de France oder dem Giro d' Italia, wird Athleten zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blut entnommen. Die so gewonnenen Analysedaten gehen in den biologischen Pass der WADA ein. Dabei ist bekannt, dass die Hämoglobinkonzentration einem diurnalen Rhythmus unterliegt, mit in der Regel höheren Werten am Morgen und niedrigeren Werten am Abend [58]. Ziel dieser Untersuchung war es zu kontrollieren ob eine mehrtägige extreme Ausdauerbelastung, die das Plasmavolumen vergrößert, Einfluss auf den diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration hat. Diese Information könnte als Faktor „Tageszeit“ in das Bayesische Modell des biologischen Passes einfließen, womit man die Grenzwerte für Athleten weiter individualisieren könnte.

Die Untersuchung wurde an fünfzehn gesunden, männlichen, kaukasischen Probanden durchgeführt. Es handelte sich um Radfahrer und Triathleten mit einem Trainingsaufwand von mindestens acht Stunden in der Woche. Die Probanden wurden zu Beginn der Studie über die Ziele der Untersuchung aufgeklärt und waren einverstanden teilzunehmen. Die anthropometrischen Merkmale und die maximale Sauerstoffaufnahme der Probanden sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die fünfzehntägige Studie bestand aus einer dreitägigen Taperingphase der Athleten, einem neuntägigen simulierten Etappenrennen und einer dreitägigen Regenerationsphase. In der Tapering- und Regenerationsphase wurde bis auf einige leistungsphysiologische Untersuchungen keine sportliche Belastung erlaubt. Die Etappen des Rennens sind in den Tabellen

7 und 8 beschrieben. An jedem Tag wurden vor dem Rennen und mindestens zwei Stunden nach dem Rennen 11,7 ml Blut entnommen, davon 2,7 ml in ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) und 9,0 ml in ein Serumröhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland). Das EDTA Blut wurde jeweils innerhalb von 30 Minuten auf einem Sysmex XT2000i (Sysmex, Kobe, Japan) gemessen.

Etappe	1	2	3	4	5
Strecke	1	1	2	2	1
Distanz (km)	124	136	152	152	44
Aufgabe	Sprintwertung	Teamverfolgung	34 km/h	Sprintwertung	Einzelzeitfahren
Temperatur	27°C	24°C	23°C	24°C	24.5°C
Dauer	3:22	4:00	4:14	4:12	0:49

Tab. 7: Details zu den Etappen eins bis fünf.

Etappe	6	7	8	9
Strecke	1	1	1	2
Distanz (km)	124	147	102	152
Aufgabe	Kriterium	33 km/h	Teamzeitfahren	Sprintwertung
Temperatur	27°C	24.5°C	25°C	29.5°C
Dauer	4:05	4:21	2:51	4:22

Tab. 8: Details zu den Etappen sechs bis neun.

3.5 Untersuchung zum Einfluss von belastungsinduzierten Schwankungen im Plasmavolumen auf Hämoglobinkonzentration.

Ein Teil des nachfolgenden Kapitels wurde auf englischer Sprache 2011 als Poster auf dem International Sport Science Sport Medicine Congress in Newcastle vorgestellt und als Posterbeitrag 2011 im „British Journal of Sport Medicine“ veröffentlicht [59].

In der Bekämpfung von Blutdoping spielen indirekte Nachweisverfahren eine immer größere Rolle. Verschiedene, mit dem Blutzellsystem in Verbindung stehende biologische Marker, wie zum Beispiel die Hämoglobinkonzentration, werden zu diesem Zwecke verwendet. Die physiologischen Haupteinflüsse auf die Hämoglobinkonzentration sind belastungsassoziierte Plasmavolumenschwankungen. Das Ziel dieser Untersuchung war es, diese Plasmavolumenschwankungen vor, während und nach mehrtägiger Ausdauerbelastung zu quantifizieren.

Einige Studien zeigen, dass das Blutvolumen von Athleten höher als das von Freizeitsportlern ist, und dass es eine hohe Korrelation zwischen maximaler Sauerstoffaufnahme und Blutvolumen gibt [60, 61].

Der akute Effekt von Belastung kann einen Anstieg des Blutvolumens um 10-12% innerhalb von 24 Stunden bewirken [62]. Neue Belastungsreize, wie zum Beispiel der Start von Ausdauertraining nach einer Verletzungsperiode, die Einfluss auf das Plasmavolumen haben, erreichen in der Regel nach 10 – 14 Tagen eine Plateauphase.

Der Anstieg des Blutvolumens innerhalb der ersten Tage wird dabei mit einem Anstieg des Plasmavolumens ohne Veränderung der

Erythrozytenmasse erklärt. Es wird angenommen, dass ein Anstieg des Blutvolumens durch längeres kontinuierliches Training über zwei bis vier Wochen dann mit Veränderungen der Erythrozytenmasse als auch des Plasmavolumens assoziiert werden kann.

Die physiologische Erklärung für einen Anstieg des Plasmavolumens steht im Zusammenhang mit einem vorhergehenden belastungsbedingten akuten Abfall des Volumens, um die Körpertemperatur zu regulieren und Nährstoffe zu transportieren. Durch den akuten Volumenabfall kommt es zu einer Erhöhung der Elektrolytkonzentration und Osmolalität, was zu einer Aktivierung der Renin-Angiotensin-Aldosterone Kaskade und des antidiuretischen Hormons Vasopressin führt. Die Retention von Wasser und Salzen wird beeinflusst und es kommt zu einer verminderten Urinausscheidung.

Um den onkotischen Druck im Gefäßsystem zu regulieren, muss die Menge an zirkulierendem Protein ansteigen, da mit jedem Gramm Protein 14-15 ml Wasser gebunden werden. Dieser Anstieg kann sowohl als direkte Antwort auf Belastung erfolgen, als auch als langfristige Adaptation und korreliert mit dem Anstieg im Plasmavolumen [61, 63]. Verschiedene Studien, die sich mit dem Einfluss einer Vergrößerung des Blutvolumens auf die Leistungsfähigkeit beschäftigten, konnten demonstrieren, dass ein vergrößertes Blutvolumen mit einer besseren Körperoberflächenkühlung korreliert. Durch eine bessere Versorgung der Schweißdrüsen gelangt mehr Flüssigkeit auf die Haut, die durch Verdunstung zur Kühlung beiträgt.

Ein weiterer Vorteil besteht in einem erhöhten Schlagvolumen des Herzens und einer dadurch verminderten Herzfrequenz.

Ziel dieser Untersuchung war es, belastungsbedingte Veränderungen des Plasmavolumens quantitativ zu erfassen und zu kontrollieren, ob diese Veränderungen die Parameter des biologischen Passes signifikant beeinflussen.

Die Untersuchung wurde an fünfzehn gesunden, männlichen, kaukasischen Probanden durchgeführt. Es handelte sich um Radfahrer und Triathleten mit einem Trainingsaufwand von mindestens acht Stunden in der Woche. Die Probanden wurden zu Beginn der Studie über die Ziele der Untersuchung aufgeklärt und waren einverstanden teilzunehmen. Die anthropometrischen Merkmale und die durchschnittliche maximale Sauerstoffaufnahme der Probanden sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Tabelle 9 gibt außerdem Informationen zu der individuellen maximalen Sauerstoffaufnahme der Probanden (erfasst in der Abteilung für Sportmedizin der Universität Freiburg).

Proband	VO2max (ml/kg/min)
1	4.46
2	4.61
3	4.5
4	4.85
5	5.31
6	5.23
7	4.1
8	4.47
9	4.38
10	4.24
11	4.15
12	4.38
13	5.08
14	4.38
15	4.52

Tab. 9: Leistungsfähigkeit der Probanden ausgedrückt als relative maximale Sauerstoffaufnahme.

Die fünfzehntägige Studie bestand aus einer dreitägigen Taperingphase der Athleten, einem neuntägigen simulierten Etappenrennen und einer dreitägigen Regenerationsphase. In der Tapering- und Regenerationsphase wurde bis auf einige leistungsphysiologische Untersuchungen keine sportliche Belastung erlaubt. Um eine maximale Ausbelastung der Probanden zu gewährleisten und damit eine realistische Rennsituation zu schaffen, wurden Preisgelder für den Sieg bei den unterschiedlichen Etappen ausgesetzt (gefördert von UK Anti-Doping). Die Etappen des Rennens sind in den Tabellen 7 und 8 beschrieben.

Venöse Blutproben wurden jeden Tag um acht Uhr morgens vor dem Frühstück und um 18 Uhr vor dem Abendessen entnommen. Die Blutprobe am Abend erfolgte damit mindestens zwei Stunden nach Belastung. Insgesamt wurden 11,7 ml Blut entnommen, davon 2,7 ml in ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) und 9,0 ml in ein Serumröhrchen (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland). Zur Equilibrierung des Blutvolumens mussten die Probanden vor jeder Blutabnahme mindestens 10 Minuten ruhig sitzen. Das EDTA Blut wurde jeweils innerhalb von 30 Minuten auf einem Sysmex XT2000i (Sysmex, Kobe, Japan) gemessen, während die Serumproben zentrifugiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert wurden.

Um das Plasmavolumen zu errechnen, wurde für jeden Probanden eine Hämoglobinmassenbestimmung nach Schmidt und Prommer durchgeführt. Die Bestimmung fand, an den Studientagen zwei und drei, vor dem Etappenrennen statt. Zur CO-Hämoglobin Analyse wurde ein Cobas b221

Blutgasanalysegerät (Roche, Mannheim, Deutschland) eingesetzt, da das ursprünglich beschriebene Gerät OSM3 von Radiometer nicht mehr produziert wird. Der Cobas b221 hat den Nachteil, dass eine größere Menge an Blut und eine längere Analysezeit benötigt wird. Um in der Lage zu sein, fünffach Messungen vor der CO-Applikation und zu den Zeitpunkten sieben und acht Minuten durchzuführen, erfolgte die Blutentnahme in BD EDTA-Microtainer Röhren (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Zu jedem Zeitpunkt wurden etwa 500 µl Kapillarblut von einem hyperämisierten Ohrläppchen abgenommen. Zur Analyse wurden dann aus dem Microtainer Röhren etwa 80 µl Blut in eine heparinisierte Plastikkapillare aliquotiert. Durch diese Prozedur sollten gerinnungsbedingte Messfehler vermieden werden.

Die Berechnung der Plasmavolumina erfolgte unter Berücksichtigung des durch die Blutabnahmen bedingten täglichen Blutverlusts von 23,4 ml und der damit verbundenen Reduzierung der Hämoglobinmasse. Da die tägliche Resynthese des Hämoglobins individuell ist und nicht linear verläuft, wurde sie innerhalb dieser Studie nicht mit in die Berechnungen des Plasmavolumens einbezogen.

Das Plasmavolumen wurde mit Hilfe der folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Blutvolumen (ml)} = \text{HB-Masse (g)} / \text{Hämoglobin (g/dl)} * 100$$

$$\text{ErythrozytENVolumen (ml)} = \text{Blutvolumen (ml)} * \text{Hämatokrit (\%)}$$

$$\text{Plasmavolumen (ml)} = \text{Blutvolumen} - \text{ErythrozytENVolumen}$$

3.6 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung.

Der Messfehler der CO-Rückatmungsmethode zur Hämoglobinmassenbestimmung wird in der Literatur immer als Variationskoeffizient mit einem Durchschnittswert aller Messungen beschrieben. Bei erfahrenen Untersuchern soll der Variationskoeffizient bei etwa 2 Prozent liegen [40, 41]. In der Praxis bedeutet das, dass es im Extremfall bei einer Hämoglobinmasse von 1000 g zwischen zwei Messpunkten zu einem Unterschied von 40 Gramm kommen kann. Alle Untersucher in dieser Studie führten mindestens 30 Messungen im Vorfeld durch und sollten somit als erfahren gelten.

Ziel für uns war herauszufinden, wie hoch der Variationskoeffizient im extremen Fall eines Ausreißers werden kann und ob die Methode valide genug ist um Blutdoping mit einer Empfindlichkeit von 50 g (Menge einer Blutkonserve) zu detektieren. In unserer Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung (Tabelle 15) wurden insgesamt 30, in Doppelbestimmung durchgeführte Messungen, evaluiert [64]. Die Untersuchung wurde an fünfzehn gesunden, männlichen Probanden durchgeführt, die jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von zwei Wochen im Labor getestet wurden. Die CO-Rückatmungsmethode wurde wie von Schmidt und Prommer beschrieben, allerdings an einem Roche Cobas b221 Blutgasanalyser, durchgeführt.

3.7 Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Blutgasanalysegeräte auf die Hämoglobinmasse.

Wie schon erwähnt ist die Messung der HB-Masse abhängig vom Unterschied der COHb% Werte vor und nach CO Rückatmung. Theoretisch sollten also Blutgasanalysegeräte unterschiedlicher Hersteller oder deren Kalibrierung keinen Einfluss auf die resultierende HB-Masse haben. Die meisten Publikation beschreiben die Nutzung des OSM3 von Radiometer oder des Cobas b221 (Nachfolger des AVL Omni) von Roche [60, 65, 66]. Der OSM3 hat den Vorteil durch seine geringen Ausmaße portabel zu sein. Das benötigte Probenvolumen des OSM3 ist sehr gering (etwa 35-40 µl), was bei Kapillarblutmessungen eine hohe Zahl an Messwiederholungen ermöglicht. Die Analysezeit pro Messung ist etwa 1 Minute und die Kosten für Reagenzien sind sehr niedrig. Leider wurde 2010 von der Firma Radiometer bekannt gegeben, dass die Produktion des OSM3 und aller Reagenzien eingestellt wird.

Das Nachfolgemodell ABL80 Flex CO-OX ist ebenfalls portabel, benötigt jedoch ein etwas höheres Probenvolumen (etwa 60-70 µl) und die Preise für Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sind, verglichen mit dem OSM3, ebenfalls teurer. Der Cobas b221 von Roche ist aufgrund seiner Größe nicht portabel, benötigt ein noch höheres Probenvolumen (etwa 80 µl) und braucht für eine Analyse etwa 2 Minuten. Die lange Analysezeit macht sich gerade bei Studien negativ bemerkbar, in denen eine große Gruppe von Probanden innerhalb kurzer Zeit zu testen ist. Die Kosten für Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sind ebenfalls höher als die des OSM3. Der

Vorteil des Cobas b221 besteht in der Möglichkeit zusätzliche Parameter, wie pH, Bicarbonat, Elektrolyte, Glucose und Laktat messen zu können.

Gerade vor dem Hintergrund der Vergleichbarkeit von Studien sowie der Bestimmung der HB Masse in unterschiedlichen Labors innerhalb internationaler Kooperationsprojekte sollte gesichert sein, dass die die Studienergebnisse nicht durch Geräteunterschiede beeinflusst werden. Ein Teil dieser Dissertation widmet sich deshalb der Frage, welchen Einfluss die oben aufgeführten unterschiedlichen Analysegeräte auf die resultierende HB-Masse haben.

Dazu nahmen acht gesunde Männer und eine gesunde Frau an diesem Projekt teil. Das Alter der Probanden lag zwischen 24 bis 45 Jahre. Ein männlicher Proband war regelmäßiger Raucher. Es gab keine Einschränkungen bezüglich Flüssigkeits-, Nahrungsaufnahme oder Zigarettenkonsum.

Die CO-Rückatmungsmethode wurde mit der oben beschriebenen Technik an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Proben wurden als Fünffachmessung direkt auf einem OSM3 CO-Oximeter (Radiometer, Copenhagen, Denmark), einem ABL80 FLEX CO-OX Analyser (Radiometer, Copenhagen, Denmark) und einem Cobas b221 Blutgasanalyser (Roche, Mannheim, Germany) untersucht. Für ein separates Experiment wurden die Proben des ersten Tages 48 Stunden und die Proben des zweiten Tages 24 Stunden später erneut analysiert. Auf diese Weise konnten 36 Hämoglobinmassebestimmungen pro Gerät miteinander verglichen werden. Um genügend Blut für alle Wiederholungsmessungen an jedem Gerät zur

Verfügung zu haben, wurde den Probanden venöses Blut entnommen. Die Blutabnahme wurde im Sitzen durchgeführt und es wurden 6 ml Natrium Heparin Vacutainer Röhrchen benutzt (BD Diagnostics, Plymouth, UK).

3.8 Untersuchung zur Validität der Methode zur direkten Detektion der homologen Bluttransfusion.

Ein Teil des nachfolgenden Kapitels wurde auf englischer Sprache 2007 als Artikel im International Journal of Sports Medicine veröffentlicht [67]. Der Artikel konzentrierte sich auf die erstmals von Nelson und Ashenden beschriebene Methode zur Detektion von homologen Bluttransfusionen die mittlerweile in leicht abgewandelter Form in der Dopingkontrolle genutzt wird [68-72].

Einige Probleme der Methode, die Nelson beschreibt, sind der Mangel an passenden monoklonalen IgG Antikörpern gegen die „kleinen“ Blutgruppen, die unterschiedliche Antigenexpression auf der Zelle, die davon abhängt ob die Zelle homo- oder heterozygot ist sowie die Antigene als solches. Da viele Blutbanken mit monoklonalen IgM Antikörpern arbeiten, wurde die Herstellung von einigen IgG Antikörpern stark reduziert oder eingestellt. Die Antigenexpression ist relevant für die Methode, da eine geringe Antigenexpression auch weniger Bindestellen für die Detektionsantikörper bedeutet und somit eine niedrigere Fluoreszenz. Eine verminderte Fluoreszenz kann Trennungen von Populationen erschweren oder unmöglich machen. Auch der Gebrauch von IgM Antikörpern kann zu Nachteilen führen, da pro Antikörper mehr Antigenbindestellen besetzt

werden können, was auch zu einer geringeren Fluoreszenz führen kann. Ferner können IgM Antikörper zur Agglutination von Zellen führen, was es bei der durchflusszytometrischen Analyse erforderlich macht Einzelzellen von Dubletten zu trennen.

Da es zur Zeit der Studie in der relevanten Literatur noch keine Validierungsdaten für IgM Antikörper gab und in unserer Methode nicht das Fluoreszenzmolekül FITC (Fluoresceinisothiocyanate), sondern PE (Phycoerythrin) genutzt wird, wurde beschlossen die Methode für primäre IgM Antikörper und den Gebrauch von sekundären PE konjugierten Antikörpern zu validieren.

3.8.1 Probenaufarbeitung und Analyse

Zur Probenaufarbeitung und Analyse benötigte Messinstrumente, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien:

Messinstrumente:

- Durchflusszytometer (z.B. BD FACS Array)
- Hämatologie Analysegerät (z.B. Bayer ADVIA120)

Material:

- Eppendorf Reaktionsgefäße
- Sarstedt Plastik Röhrchen (4ml)
- 96 Well-Platten (U-Form)
- Pipetten/ Pipettenspitzen
- Vortex
- Alu-Folie

- Kühlschrank
- Wärmeschrank (37°C)
- Zentrifuge

Reagenzien:

- Pufferlösung (Cell-Wash, BD)
- Erythrozytenstabilisierungslösung (ID-CellStab, DiaMed AG)
- Kontrollerythrozyten (ID-DiaPanel, DiaMed AG)
- Primäre Antikörper (Tab.10)
- Sekundäre Antikörper (Tab.11)

Antikörper	Bestellnummer	Firma	Mono-/polyklonal	Klon/Zelllinie	Typ
Anti-C	101455	Diamed	monoklonal	MS24	IgM
Anti-c	101555	Diamed	monoklonal	MS33	IgM
Anti-E	101655	Diamed	monoklonal	MS260	IgM
Anti-Jka	104352	Diamed	monoklonal	MS15	IgM
Anti-Jkb	104452	Diamed	monoklonal	MS8	IgM
Anti-Fya	103801	Diamed	polyklonal	Humanblut	IgG
Anti-Fyb	103901	Diamed	polyklonal	Humanblut	IgG
Anti-e	802370	Biotest	monoklonal	MS65	IgM

Tab.10: Details zu den primären Antikörpern.

Antikörper	Bestellnummer	Firma	Mono-Polyklonal	Farbstoff
Mouse IgG Anti-human IgM	555783	BD Pharmingen	monoklonal	Phycoerythrin
Goat IgG Anti-Human IgG	IM1626	Beckman Coulter	polyklonal	Phycoerythrin

Tab.11 Details zu den sekundären Antikörpern

Allgemeine vorbereitende Maßnahmen:

Blutproben, die auf Doping mit homologer Transfusion untersucht werden sollen, müssen in Blutentnahmeröhrchen erfolgen, die auch zur

Bestimmung des Blutbildes benutzt werden können. Die hier beschriebene Methode wurde mit Blut aus EDTA-Röhrchen validiert.

Während die B-Probe nach Ankunft im Labor direkt bei 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) gelagert wird, wird die A-Probe geöffnet und 1 ml Blut in ein Sarstedt Röhrchen überführt. Das Blut im Sarstedt Röhrchen wird bei 1000 g für 2 min zentrifugiert, um das Plasma mit den darin enthaltenen Antikörpern zu entfernen. Die sedimentierten Zellen werden dann mit jeweils 3 ml Erythrozytenstabilisierungslösung (ID-CellStab, DiaMed AG) zweimal gewaschen und dann mit 3 ml Erythrozytenstabilisierungslösung homogenisiert. Die Erythrozytenkonzentration in dieser Lösung wird anschließend mit Hilfe eines Hämatologieanalysegerätes in dreifach Messung ermittelt. Der Mittelwert der drei Messungen wird zur Verdünnung einer Stammlösung von 50 Millionen Erythrozyten pro Milliliter genutzt.

Untersuchung der Blutgruppenantigene

Bei der Untersuchung der Antigene ist es dringend erforderlich, „sauber“ zu arbeiten, das heißt die Pipette erst am Röhrchenboden zu leeren und die Röhrchenwand nicht zu berühren, um Kontamination und ungefärbte Zellen zu vermeiden. Die Antikörperarbeitslösung wird von einer Stammlösung hergestellt und hängt von der Probenanzahl und des vorher mit Hilfe von Kontrollerythrozyten ermittelten optimalen Titers ab. Die Titer können, je nach Antikörper, von 1:1 bis 1:20 variieren. Die Verdünnung der Antikörper aus der Stammlösung wird mit Cell-Wash in einem „Protein-low-binding“ Eppendorfgefäß durchgeführt.

Für jede Blutprobe werden acht Sarstedtröhrchen benötigt - ein Röhrchen pro Antigen. Für jedes Batch an Blutproben werden außerdem fünf weitere Röhrchen benötigt. Dies sind Qualitätskontrollen zur Bestätigung des Analyse-Gates auf dem Zytometer und zur Kontrolle von möglichen Kreuzreaktionen der primären und sekundären Antikörper. Pro Röhrchen werden 75µl der 50×10^6 /ml Erythrozytenstammlösung gegeben (Zellanzahl: $3,75 \times 10^6$ Erythrozyten), die dann mit 55 µl der optimalen Antikörperverdünnung (z.B. 1:9 für Fya) vorsichtig mit Hilfe einer Pipette gut vermischt werden. Alle Proben werden dann für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

Im Anschluss an den Inkubationschritt werden die Proben zweimal mit 3 ml Cell Wash Lösung in einer Zentrifuge bei 1000 g für 2 Minuten gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Überstand wird verworfen und die Proben werden noch einmal zentrifugiert um Tropfen am oberen Rand des Röhrchens zu pelletieren. Dieser Schritt wird durchgeführt, da die Tropfen Zellen enthalten können, die hinterher nicht gefärbt werden.

Das Pellet wird dann mit der Pipette homogenisiert und 20 µl werden in ein neues Röhrchen überführt.

Es erfolgt nun die Zugabe von 20µl des sekundären, PE-gelabelten Antikörpers, dessen Titer vorher auch mit Hilfe von Kontrollerythrozyten getestet wurde.

Zellen und Antikörper werden gut gemischt und dann für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgen zwei weitere Waschschrte wie oben beschrieben. Nach Zentrifugation wird das

Pellet mit 100 µl Cell-Wash homogenisiert und in ein Well einer 96 Wellplate überführt.

Messung:

Die Messung der Proben erfolgt auf einem FACSArray Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson. Forward Scatter und Sideward Scatter sind jeweils auf 340 Volt eingestellt. Phycoerythrin wird von einem 532 nm Laser angeregt und die Fluoreszenz mit einem 585/42 nm Band Pass Filter von anderen Fluoreszenzen getrennt. Es werden insgesamt 10.000 Events in einem vorher definierten Gate für Erythrozyten aquiriert. Die beschriebenen Geräteeinstellungen können je nach Analysegerät variieren.

Am Anfang jeder Sequenz wird eine ungefärbte Blutverdünnung (1µl DiaMed Blut + 200µl Cell-Washlösung) zur Kontrolle des Gates gemessen. Die zweite und dritte Probe ist nur mit dem ersten Antikörper behandelt und die dritte und vierte Probe nur mit dem zweiten Antikörper. Nach diesen Qualitätskontrollen folgen die auf Doping zu untersuchenden Blutproben.

3.8.2 Validierung der Methode.

Spezifität

Die Spezifität der Methode wurde bei 25 Probanden getestet, die innerhalb der letzten sechs Monate keine Bluttransfusion erhalten hatten. Den Probanden wurde 3.0 mL Blut in einem EDTA Röhrchen abgenommen, das dann für die Analyse vorbereitet wurde. Die Blutgruppen A, B, AB und Rh+

wurden mit Testseren bestimmt während die „kleinen“ Blutgruppen durchflusszytometrisch getestet wurden.

Präzision

Pro Blutgruppe wurden jeweils 10 Proben ohne Antigen mit 5% für das Antigen homozygote Blut gespiked und gemeinsam aufgearbeitet.

Die Präzision wurde von den Ergebnissen dieser Proben mit einer ISO akkreditierten Validierungssoftware errechnet (Validat, Frechen, Deutschland).

Linearität

Die Linearität wurde mit Blut von fünf Probanden der Blutgruppe A, Rhesus positiv oder 0, Rhesus positiv durchgeführt. Die Phänotypen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Proband								
1	C+	c	E	e+	Jka+	Jkb+	Fya	Fyb+
2	C	c+	E	e	Jka+	Jkb	Fya+	Fyb+
3	C+	c+	E	e+	Jka	Jkb+	Fya	Fyb+
4	C	c+	E+	e+	Jka+	Jkb	Fya+	Fyb+
5	C+	c	E	e+	Jka+	Jkb+	Fya+	Fyb

Tab. 12: "Kleine" Blutgruppen der Probanden. Expression des Antigens ist mit einem Plus gekennzeichnet (+).

Es wurden jeweils sechs Proben ohne Antigen mit 1%, 2%, 4%, 6%, 8% und 10% für das Antigen homozygote Blut gespiked und gemeinsam aufgearbeitet. Die Linearität wurde mit dem "Mandel" Test überprüft und wurde für alle Antigene bestätigt. Von den Ergebnissen dieser Proben wurde

mit der Validat Software außerdem die Nachweisgrenze (LOD), die Quantifizierungsgrenze (LOQ) und die Wiederfindung errechnet.

Robustheit

Die Robustheit der Methode wurde für eine veränderte Konzentration (\pm 15%) des primären Antikörpers und für Analysen an unterschiedlichen Tagen getestet.

Die Ergebnisse der Analysen wurden mit der Validat Software überprüft.

3.8.3 Verbesserung der Separation einer Mixpopulation durch Signalverstärkung.

Ein schon oben beschriebenes Problem der Methode ist, dass es eine homozygote und heterozygote Expression der Blutgruppen gibt, die sich in der Anzahl der Bindestellen für die Antikörper und einer damit verbundenen unterschiedlichen Fluoreszenz widerspiegelt. Eine geringe Fluoreszenz kann die Trennungen von gemischten Erythrozytenpopulationen erschweren oder gar unmöglich machen. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine Möglichkeit zu finden, die Fluoreszenz von Antigenen auf Erythrozyten mit schwacher oder heterozygoter Expression zu intensivieren, um eine bessere Interpretation der Histogramme zu ermöglichen.

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Technik zur Fluoreszenzsignalverstärkung entwickelt, die auf der oben beschriebenen Methode basiert, jedoch zwei zusätzliche Schritte beinhaltet. Bei dieser Methode wird zuerst dem Zellpellet aus oben beschriebener Methode 15 μ l

einer Biotin konjugierten Anti-Phycoerythrin Antikörper (BD Pharmingen) Lösung hinzugefügt und für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen werden dreimal wie beschrieben gewaschen und dann mit 15 µl Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin (BD Pharmingen) inkubiert, das sich mit dem Biotin verbindet. Vor der Analyse folgen drei weitere Waschschrte, wie oben beschrieben.

3.9 Überprüfung des Einflusses hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin.

Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss von hochintensiver Belastung auf die beiden oben beschriebenen Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin in humanem Urin zu überprüfen. Auszüge des nachfolgenden Kapitels wurden auf englischer Sprache 2010 im „International Journal of Sports Medicine“ veröffentlicht [73].

Hintergrund dieses Teils der Arbeit war das Auftauchen von EPO-Proben in der Routineanalytik, die nicht mehr den Identifizierungskriterien der WADA für eine positive Bewertung entsprachen. Die Kriterien zu dieser Zeit waren, dass es mindestens drei aufeinanderfolgende Banden im basischen Bereich geben muss, mit den zwei intensivsten Banden nacheinander und innerhalb der Banden 1, 2 und 3. Ferner mussten jede der zwei intensivsten Banden mindestens doppelt so intensiv sein wie jede Bande im endogenen Bereich. Abbildung 6 zeigt exemplarisch verdächtige Proben aus der Routineanalytik mit negativen Stabilitätstest, die den WADA Kriterien nicht mehr entsprachen. Zu dieser Zeit wurden Nachahmerprodukte aus China und Russland als mögliche Ursache diskutiert, die möglicherweise sogar gezielt

zum Zweck der Anwendung als nicht zu detektierende EPO-Dopingsubstanz produziert wurden. Abbildung 7 und 8 zeigt die elektrophoretische Trennung von EPO-Nachahmerprodukten (sogenannte Biosimilars) mit der IEF und der SDS-PAGE Technik.

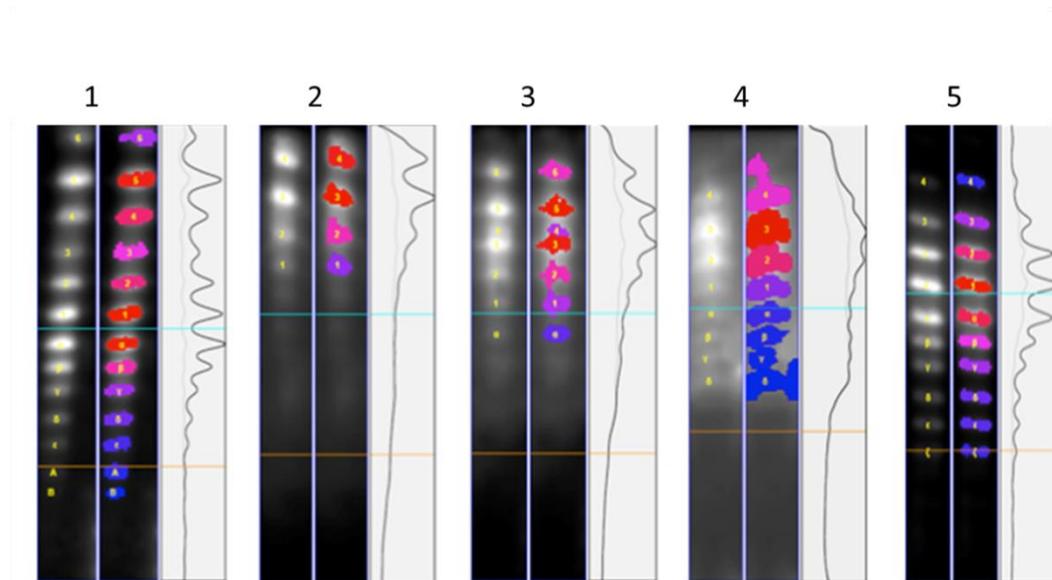


Abb.6: Verdächtige Proben (1-5), nach unauffälligem Stabilitätstest, die nicht den oben beschriebenen Identifikationskriterien entsprechen.

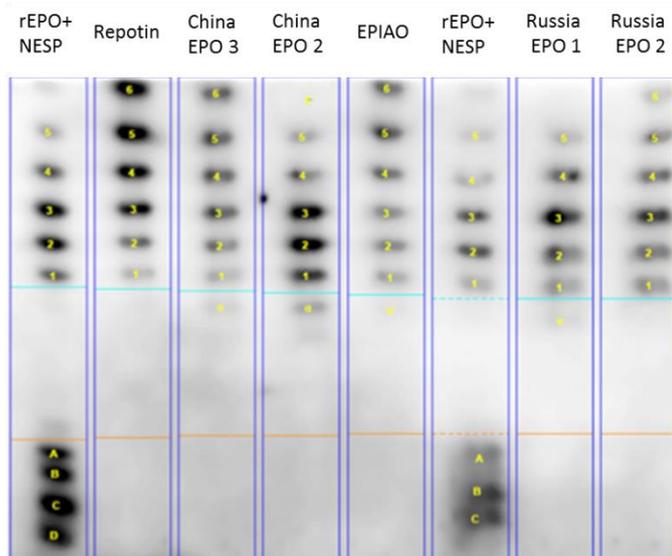


Abb.7: Biosimilars von links nach rechts: rEPO und NESP, Repotin, unbekanntes EPO aus China Nummer 3, unbekanntes EPO aus China Nummer 2, EPIAO, rEPO und NESP, unbekanntes EPO aus Russland 1, unbekanntes EPO aus Russland 2.

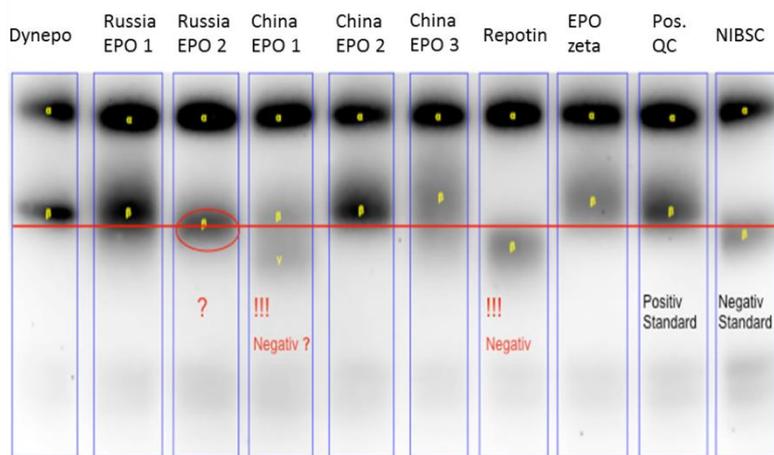


Abb.8: Biosimilars von links nach rechts: Dynepo, unbekanntes EPO aus Russland Nummer 1, unbekanntes EPO aus Russland Nummer 2, unbekanntes EPO aus China Nummer 1, unbekanntes EPO aus China Nummer 2, unbekanntes EPO aus China Nummer 3, Repotin, EPO-zeta, rEPO, NIBSC.

Ebenfalls diskutiert wurden zu dieser Zeit sogenannte “Effort urines”, die als Ergebnis intensiver Belastung auftauchen können.

Eine der ersten Publikationen, die sich mit Belastung auf den EPO-Test auseinandersetzte, erschien 2006 von Beullens et al [74]. Die Autorin beschreibt, dass intensive physische Belastung zu einem falsch positiven Ergebnis im EPO Test führen kann. Die Untersuchung wurde mit nur einem Probanden durchgeführt und die Probe wurde direkt nach Belastung abgenommen (0 hours), was keiner realen Probennahme in einer Dopingkontrolle entspricht. Ein weiterer Schwachpunkt war die Auswertung des Gels, bei der die WADA Kriterien nicht beachtet wurden. Beullens geht in Ihrer Publikation außerdem auf eine Publikation von Kahn ein, der die Anwendung einer zweidimensionalen gelelektrophoretischen Methode zur Detektion von rhEPO in humanem Urin beschreibt und Proteine detektiert, die mit dem in der Routine genutzten Antikörper (AE7A5) krossreagieren

[75]. Sie übersieht dabei, dass die dort beschriebenen Proteine deutlich außerhalb des in der Dopinganalytik festgelegten Detektionsbereichs des Gels liegen und somit irrelevant sind.

Eine statistische Auswertung von 1880 Routineproben des Kölner Labors mit der IEF-Methode aus dem Jahr 2007 (unveröffentlichte Daten) zeigte allerdings auch, dass Wettkampfkontrollen (n=805) verglichen mit Trainingskontrollen (n=1075) einen signifikant höheren Anteil an Banden im basischen Bereich aufweisen und somit scheinbar wirklich ein Zusammenhang zwischen Belastung und EPO-Banden bestehen könnte.

Da die SDS-PAGE Methode ebenfalls zu dieser Zeit als mögliche komplementäre Methode veröffentlicht wurde war es unser Ziel, den Einfluss von hoch intensiver Belastung mit resultierendem proteinreichem Urin auf die IEF-Methode und die SDS-PAGE Methode zu überprüfen. Wir untersuchten in unserer Studie außerdem spezifische Proteine zur Diagnostik von Proteinurie (Total Protein, Albumin und Mikroglobulin-1-alpha) sowie Kreatinin als mögliche Marker zur Identifikation von Belastungsurinen.

Die Studie wurde mit 20 gesunden Probanden durchgeführt, 10 Frauen und 10 Männern im Alter von 22 bis 35 Jahren. Die meisten der Probanden waren Studenten der Sporthochschule Köln und körperlich aktiv, einige aktive Leistungssportler. Die Probanden erfuhren keine Einschränkung in ihrer Diät und die Tests wurden über den ganzen Tag durchgeführt, um eine möglichst reale Situation der Dopingkontrolle widerzuspiegeln.

Die hochintensive Belastung wurde auf einem SRM Fahrradergometer simuliert. Dazu absolvierten die Probanden ein Belastungsprotokoll nach

Poortmans [76] mit einer fünfminütigen Aufwärmphase bei 60 Watt und anschließenden Stufen mit einer Dauer von einer Minute und einem Anstieg von jeweils 30 Watt bis zur totalen Erschöpfung (Abb. 9).

Die Probanden mussten, um einen Zustand der Dehydratation zu vermeiden, etwa fünf Minuten vor Belastung und fünf Minuten nach Belastung 5 ml Wasser pro kg Körpergewicht trinken. Herzfrequenz und maximale Sauerstoffaufnahme wurden während der Untersuchung mit Polar S810i Herzfrequenzmessern (Polar Electro, Finnland) und einem ZAN 600 Ergospirometer (ZAN, Obertulba, Deutschland) überwacht.

Exercise Protocol

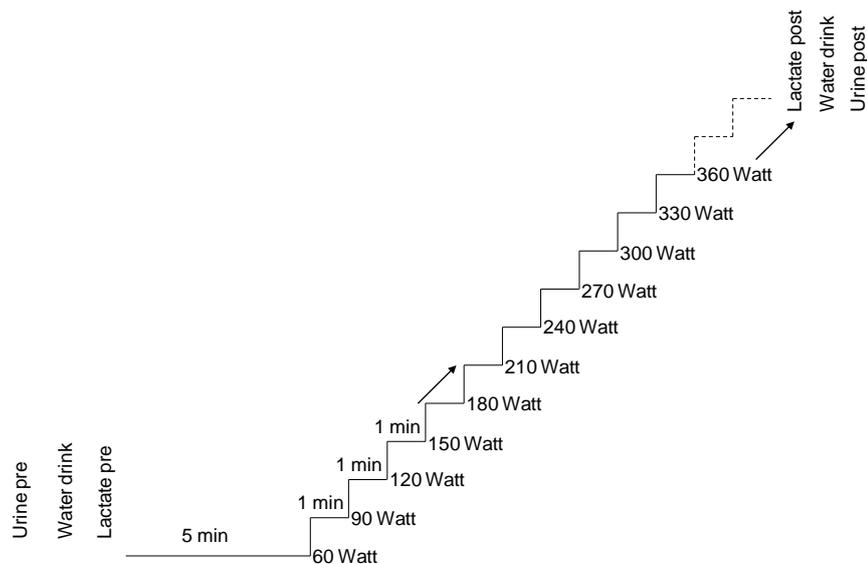


Abb.9: Grafische Darstellung des Belastungsprotokolls.

Zur Analyse des Ruhe- und Nachbelastungslaktats wurde Kapillarblut vom Ohrläppchen entnommen und auf einem EBIO plus Laktatanalysegerät gemessen (Eppendorf, Deutschland).

Die Urinproben wurden 10-15 Minuten vor dem Belastungstest abgegeben und 30 bis 90 Minuten nach Belastung, wobei eine Probandin erst nach 165 Minuten ihren ersten Urin abgeben konnte. Die Probanden wurden gebeten, ihre Urinprobe zum jeweils nächstmöglichen Zeitpunkt abzugeben, um eine möglichst reale Situation der Dopingkontrolle abzubilden. Die Probengabe erfolgte in einer Toilette neben dem Belastungslabor. Das Urinvolumen wurde dokumentiert, der Urin in einen verschließbaren Probencontainer gefüllt und dann innerhalb von drei Stunden in das Institut für Biochemie gebracht. Nach Ankunft im Labor wurden die Proben direkt in Aliquote aufgeteilt und bei 4°C und - 20°C gelagert.

Die Menge an Total Protein, Kreatinin, Albumin und Mikroglobulin-1-alpha wurden mit den dafür vorgesehenen Reagenzienkits auf einem Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) analysiert.

Die EPO Konzentration wurde mit einem ELISA Kit (Stemcell Technologies Inc, Vancouver, Kanada) auf einem Victor Plate-Reader (Wallac/Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt.

Die Analysen der IEF Profile und der SDS-PAGE relativen Mobilitätswerte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Interpretation der IEF Profile wurde die GASepo Software [77] und zur Berechnung der relativen Mobilitäten eine hauseigene Software genutzt.

Alle im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden mit SPSS statistisch ausgewertet. Zum Vergleich der Ergebnisse vor und nach Belastung wurde der Wilcoxon Test angewendet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchung zur Lagerungsstabilität der einzelnen zellulären Parameter.

Die Ergebnisse der Untersuchung werden in den Abbildungen 10-21 grafisch dargestellt. Die obere Reihe innerhalb der Abbildungen enthält die Daten für die Probenlagerung bei 21°C, während die untere Reihe die Daten für die Lagerung bei 4°C darstellt. Die Erythrozytenzahl (Abb.10) zeigt weder bei 4°C noch bei 21°C signifikante Veränderungen. Die Hämoglobinkonzentration (Abb.11) zeigt einen signifikanten Abfall über die Zeit ($p=0,039$) der temperaturunabhängig ist. Der Einfluss dieses Effekts ist allerdings zu vernachlässigen und liegt im Bereich des Messfehlers ($< 0,04 \text{ g dL}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Der Hämatokrit (Abb.12) zeigt einen hoch signifikanten Anstieg über die Zeit (ca. $0,7\% \text{ d}^{-1}$, $p<0,001$) der abhängig von der Lagerungstemperatur war. Das mittlere Zellvolumen zeigte einen linearen, ebenfalls temperaturabhängigen Anstieg über die Zeit (ca. $1,5 \text{ fL d}^{-1}$, $p<0,001$) (Abb.12). Die Schnittpunkte dieses Parameters zeigten eine sehr große interindividuelle aber relativ kleine intraindividuelle Variation. Der Trend des Parameters hypochrome Erythrozyten (Abb.16) konnte am besten mit einer exponentiellen Kurve beschrieben werden ($\text{Hypo}_{(t)} = \text{Hypo}_{(0)} e^{at}$). Der Exponent (a) bei 21°C war signifikant größer ($a=0,043$, $p<0,001$) als der Exponent bei 4°C ($a=0,035$). Die Makrozyten zeigten einen signifikanten, linearen Anstieg ($0,41 \text{ d}^{-1}$, $p<0,05$) (Abb.15). Hier konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang mit der Temperatur festgestellt werden. Die Steigung war hochgradig individuell und wies eine ausgeprägte positive Korrelation mit den Schnittpunkten auf. Die intraindividuelle Steigung sowie

die Steigung zwischen den unterschiedlichen Proben war dabei sehr reproduzierbar. Die Retikulozytenzahl (Abb.17) zeigte einen stark unterschiedlichen Verlauf der Kurven für die beiden Temperaturbedingungen. Für 4°C konnte kein signifikanter Trend gefunden werden, während es bei 21°C erst zu einem kleinen Anstieg kam, dem dann ein ausgeprägter Abfall folgte. Die Kurve für 21°C konnte am besten durch eine Parabel mit negativem Koeffizienten beschrieben werden. Der quadratische Term war bei 21°C hoch signifikant ($p < 0,001$), allerdings nicht für 4°C ($p = 0,94$). Wie in der Wahrscheinlichkeitsrechnung beschrieben, muss das quadratische Modell klar gegenüber jedem einfacheren Modell bevorzugt werden. Ein fast identisches Ergebnis wurde wie erwartet für den Parameter Reti% gefunden (Abb.13). Die Koeffizienten und Signifikanzniveaus waren zwar unterschiedlich, allerdings blieb das Modell generell gleich. Das mittlere Zellvolumen der Retikulozyten (Abb.18) zeigte einen klaren linearen Anstieg bei 4°C ($0,88 \text{ fL/d}$, $p < 0,001$), der bei 21°C noch deutlicher ausgeprägt war ($2,15 \text{ fL/d}^{-1}$, $p < 0,001$). Der Hämoglobingehalt der Retikulozyten (Abb.19) stieg bei 4°C sehr leicht aber signifikant an ($0,19 \text{ pg/d}^{-1}$, $p < 0,001$). Interessanterweise war bei 21°C ein gegensätzlicher Trend zu beobachten. Hier fiel der Hämoglobingehalt stark ab ($-1,16 \text{ pg/d}^{-1}$, $p < 0,001$). Die Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz (Abb.20) zeigten bei 4°C keine Veränderung, während sie bei 21°C einen signifikanten Anstieg verzeichneten ($2,8\%/d^{-1}$, $p < 0,001$). Das OFF-Score Modell (Abb.21) zeigte keine signifikanten Veränderungen bei 4°C, aber einen ausgeprägten nicht-linearen Anstieg bei 21°C. Die dazugehörige Größe zweiter Ordnung war hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Schnittpunkte

zeigten eine relativ große interindividuelle Variation, die allerdings intraindividuell sehr stabil war.

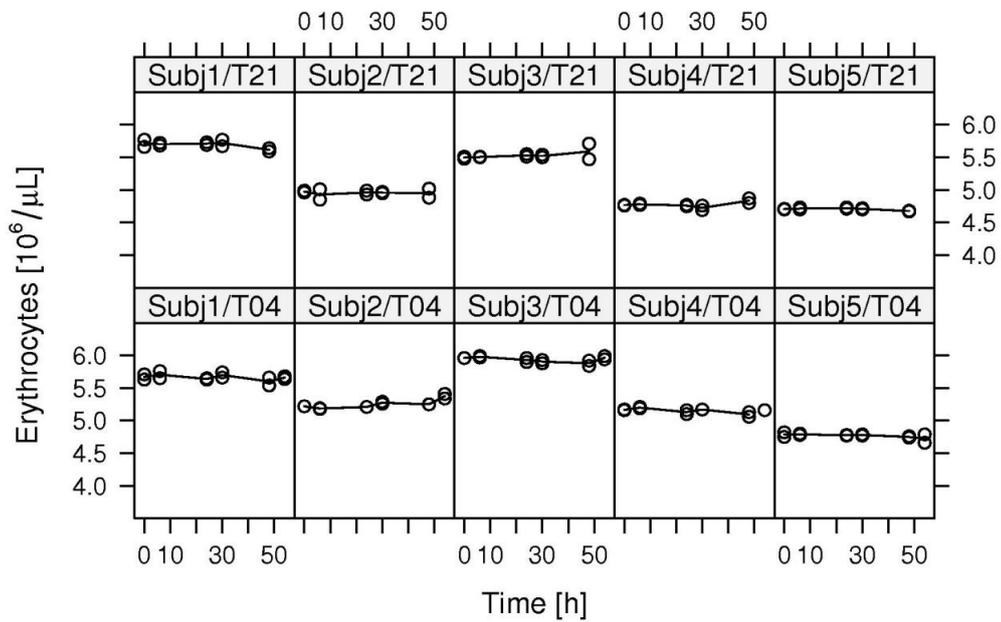


Abb.10: Erythrozyten [$\times 10^6/\mu\text{l}$]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

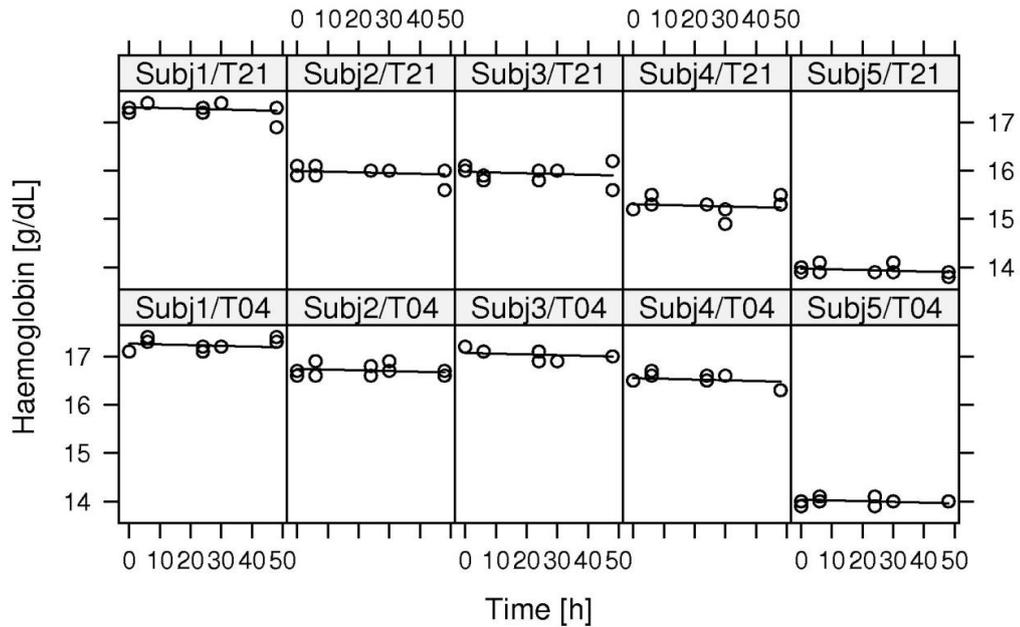


Abb.11: Hämoglobin [g/dl]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

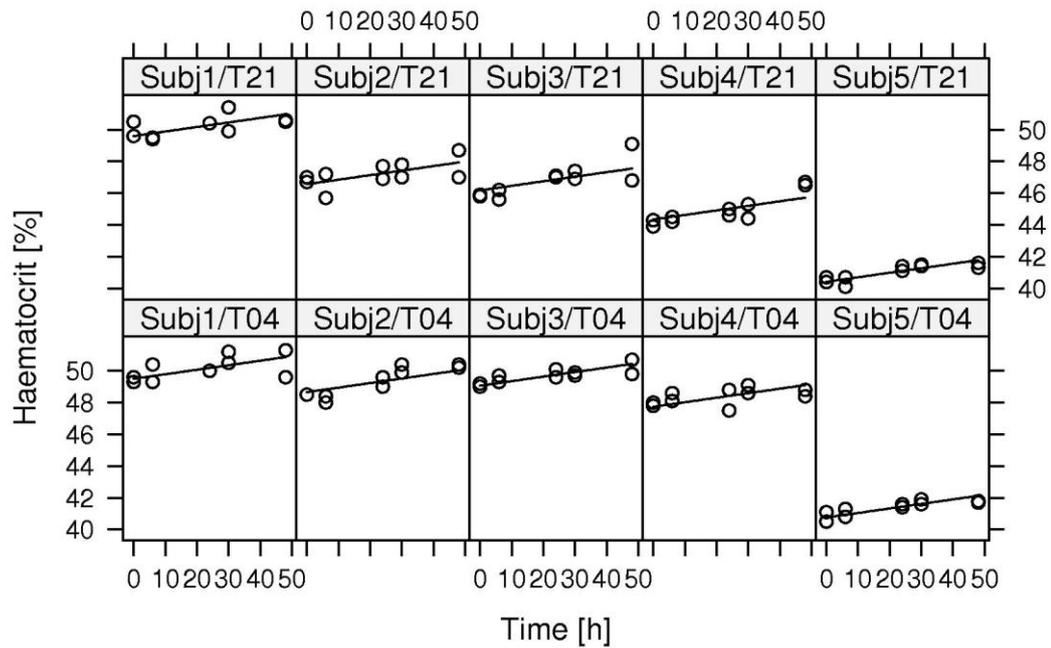


Abb.12: Hämatokrit [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

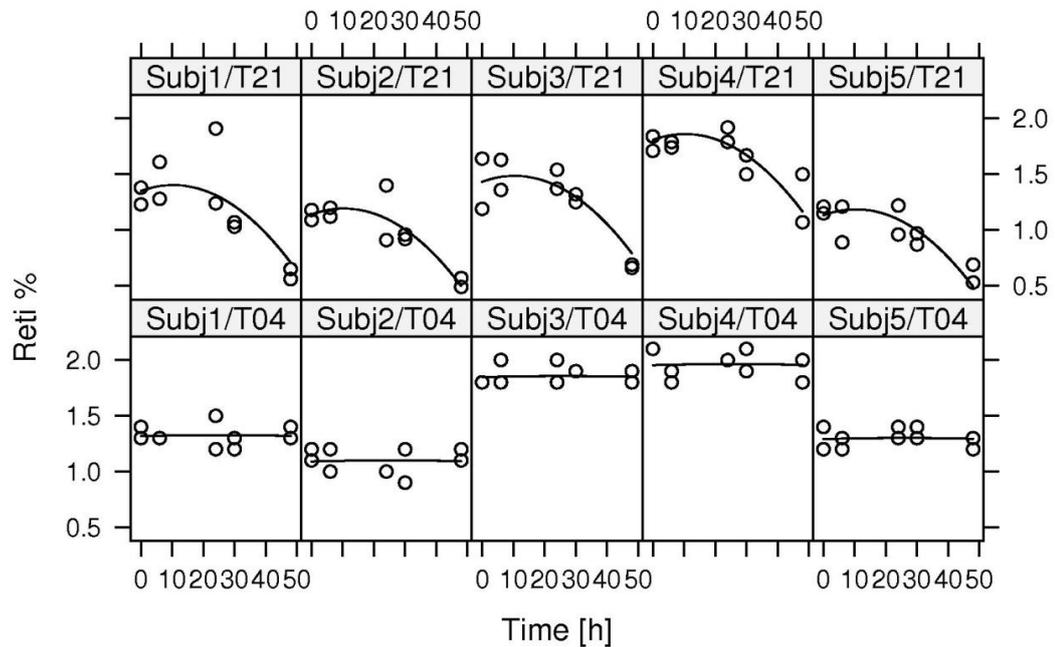


Abb.13: Retikulozyten [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

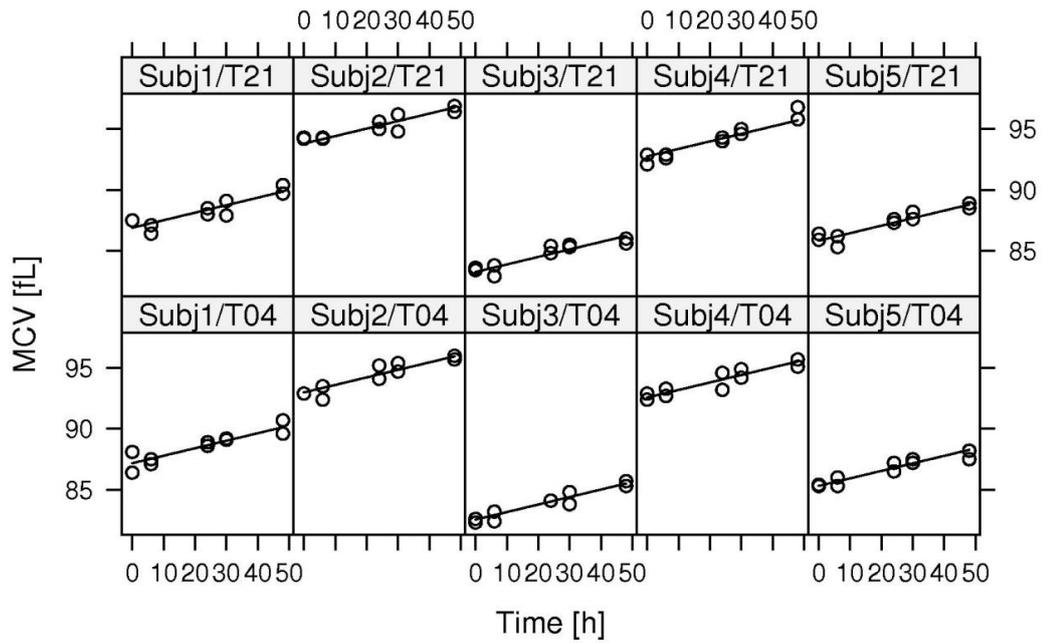


Abb.14: Mittleres Zellvolumen [fL]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

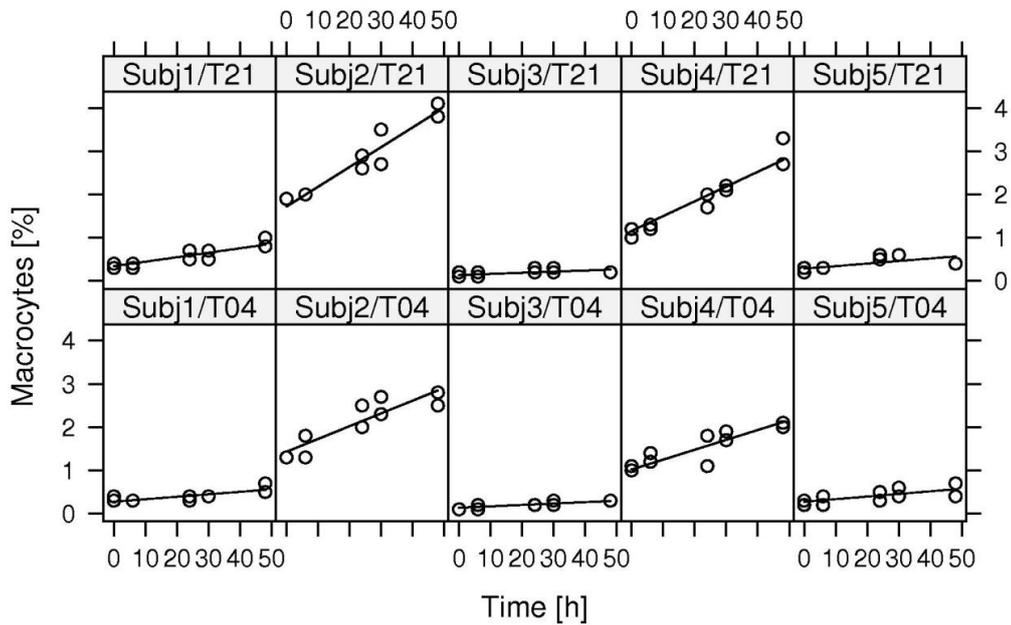


Abb.15: Makrozyten [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

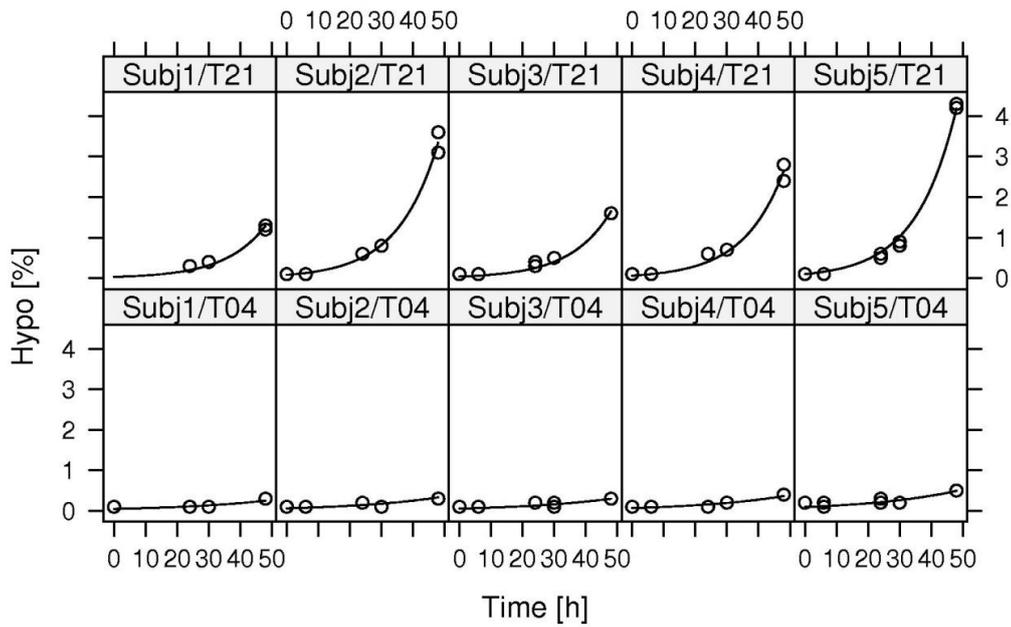


Abb.16: hypochrome Erythrozyten [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

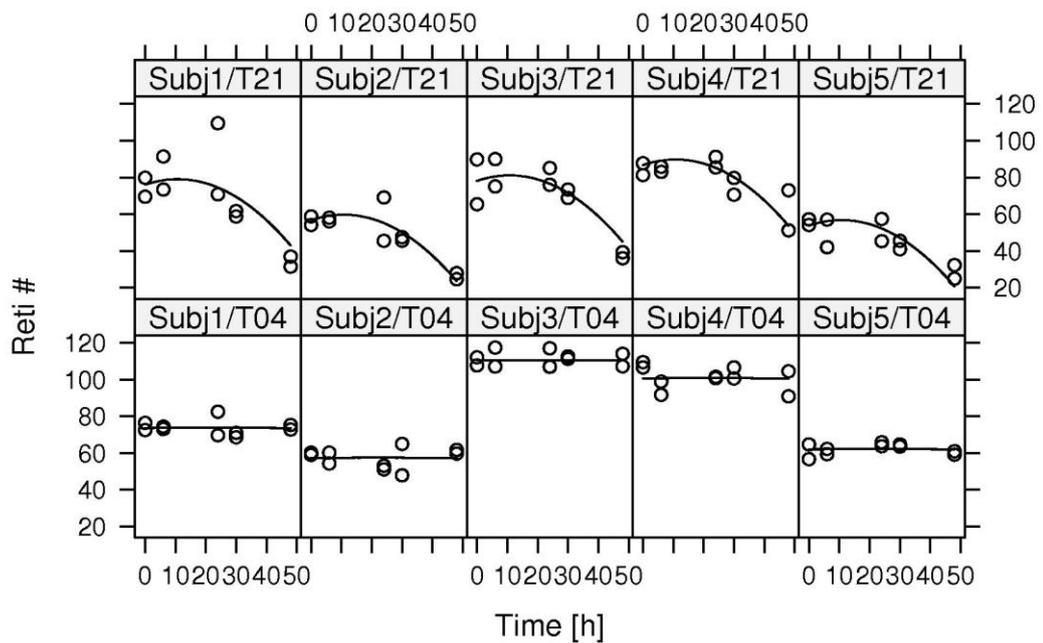


Abb.17: Retikulozytenzahl [$\times 10^9/l$]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

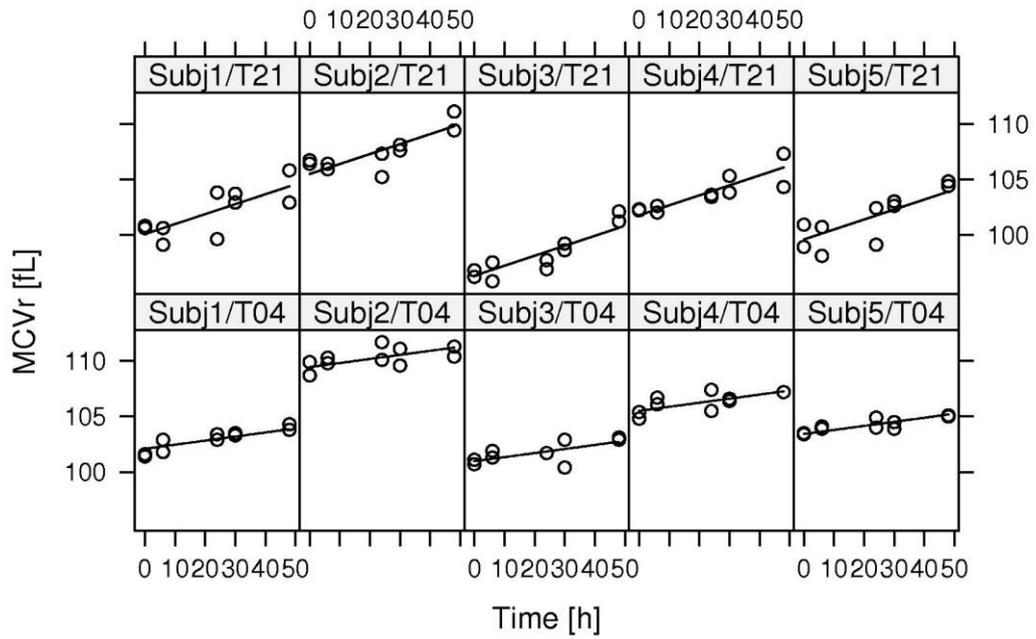


Abb.18: Mittleres Zellvolumen der Retikulozyten. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

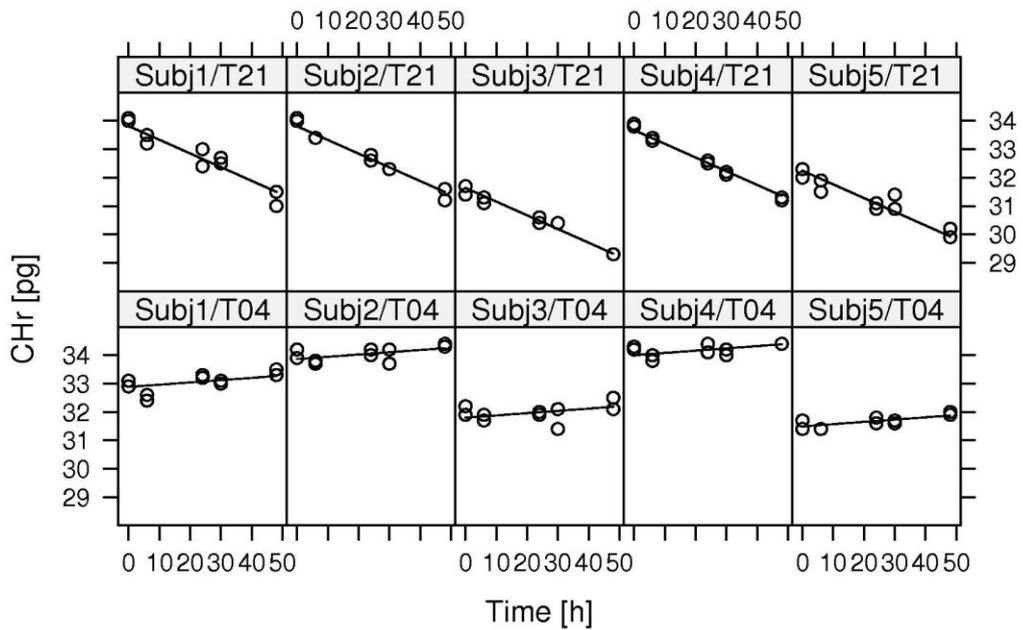


Abb.19: Zellhämoglobin der Retikulozyten. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

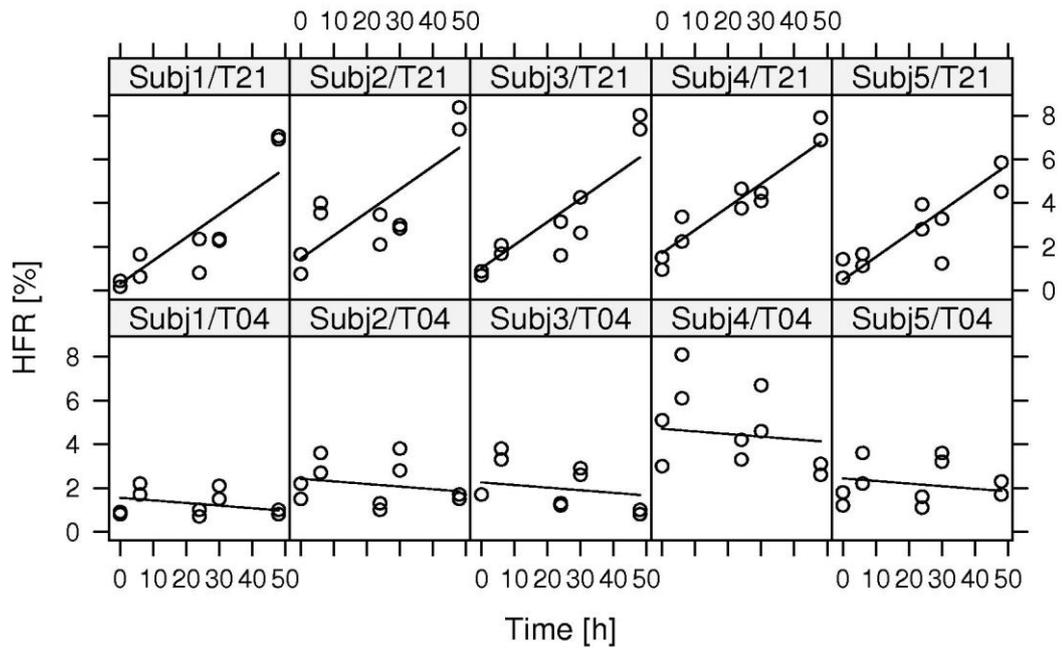


Abb.20: Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

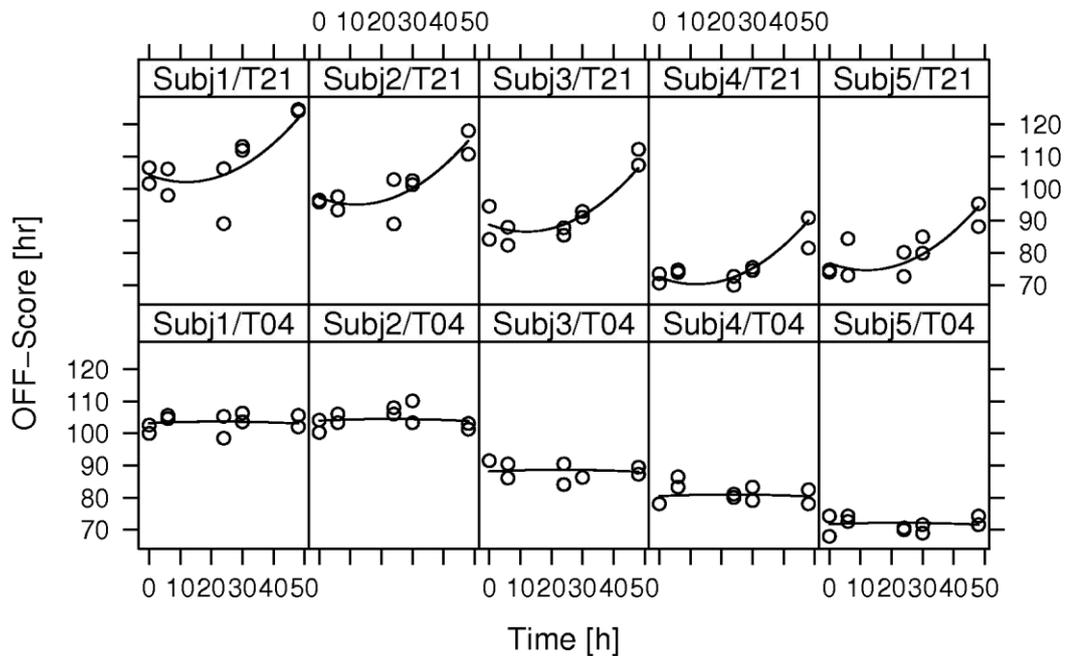


Abb.21: OFF-Score [OFF-hr]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.

Zur Zeit der Studie wurde die Erstellung von individuellen Blutprofilen intensiv diskutiert. Es wurde klar, dass es nicht möglich war, für jeden Wettkampf oder jede Trainingskontrolle das passende Blutanalysegerät zur Verfügung zu haben. Um den gerätebedingten Messfehler niedrig zu halten wurde entschieden die Proben nur in WADA akkreditierten Laboren mit speziellem Qualitätskontrollprogramm messen zu lassen. Die aus dem Transport der Proben resultierende verzögerte Analyse war der Grund für diese Untersuchung.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Kontrolle der präanalytischen Bedingungen sehr wichtig ist. Die möglichen Einflüsse von Lagerungszeit und Lagerungstemperatur sollten immer berücksichtigt werden, bevor verdächtige Blutwerte an Sportverbände oder Anti-Doping Agenturen berichtet werden.

Die von uns identifizierten Parameter mit mangelhafter Stabilität waren meist mit dem Zellvolumen assoziiert. Der Anstieg des Zellvolumens von Erythrozyten und Retikulozyten kann dabei als Ergebnis von osmotischen Vorgängen verstanden werden. Interessanterweise stieg das Zellvolumen der Retikulozyten bei 21°C stärker an als das der Erythrozyten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte der entwicklungsbedingte Abfall der Retikulozyten sein, die sich zu den kleineren Erythrozyten ausdifferenzieren. Durch diesen Vorgang steigt der Anteil von Retikulozyten mit höherem Zellvolumen an. Weitere mit dem Zellvolumen assoziierte Parameter waren Makrozyten und hypochrome Erythrozyten, die beide zur Diagnostik von Anämien genutzt werden. Unsere Ergebnisse zeigten eine hohe Temperaturabhängigkeit bei den hypochromen Erythrozyten, die

daher möglicherweise auch für die Beurteilung der präanalytischen Bedingungen geeignet sein könnten. Sehr hohe Werte könnten ein Zeichen für schlechte Lagerungsbedingungen darstellen. Eine zusätzliche Untersuchung von Ferritin und C-reaktiven Protein könnte dann eine Anämie weitgehend ausschließen.

Eine weitere interessante Beobachtung war die Abhängigkeit des Anstiegs der Makrozyten von ihrem Ausgangswert. Je höher der Ausgangswert, desto höher der Anstieg während der Lagerung. Die Erklärung für dieses Phänomen wurde bei genauerer Betrachtung der Auswertesoftware des Analysegeräts deutlich. Die Bedingung, ab wann eine Zelle als Makrozyt zu bezeichnen ist, wird von der Software durch einen vom Hersteller willkürlich festgelegten Grenzwert definiert. Eine Verlagerung des Mittleren Zellvolumens in Richtung dieses Grenzwerts resultiert in einer stark erhöhten Möglichkeit, den Grenzwert zu überschreiten. Je näher der initiale Mittelwert an der Grenze liegt, desto ausgeprägter der Effekt, was durch die statistische Natur der dahinterliegenden Verteilung zu erklären ist.

Im Gegensatz zu einer früheren Studie von Lippi [78], der die Lagerung von Blutproben bei 4°C über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht hat, wurden in unserer Studie sowohl ein längerer Lagerungszeitraum als auch unterschiedliche Temperaturen betrachtet. Des Weiteren wurden alle Proben in Zweifachmessung bestimmt, was dem aktuellen Standard in Anti-Dopinganalysen entspricht.

Während Robinson [38] eine ähnliche Untersuchung für das Sysmex Gerät durchgeführt hat, war es Ziel dieser Studie die Datenlage für den ADVIA120 zu verbessern. Signifikante Unterschiede wurden für das Mittlere

Zellvolumen, Hämatokrit, Retikulozytenzahl und Retikulozytenprozent ausgemacht. Während unsere Ergebnisse temperaturunabhängige Anstiege in Zellvolumen und Hämatokrit zeigten, verzeichnete Robinson keine Veränderung dieser Parameter bei 4°C, jedoch einen starken Anstieg bei Raumtemperatur. Des Weiteren stellte Robinson in seiner Studie fest, dass die Retikulozytenzahl abfiel, jedoch der prozentuale Anteil der Retikulozyten stabil blieb. Diese Beobachtung war unabhängig von der Lagerungstemperatur. Im Gegensatz dazu konnten wir einen Abfall von Retikulozytenzahl und Retikulozytenprozent nachweisen, der jedoch nur bei Raumtemperatur auftrat.

Zur Harmonisierung der präanalytischen Bedingungen ist eine gekühlte Lagerung um 4°C klar zu favorisieren. Eine Möglichkeit, Unterbrechungen der Kühlkette festzustellen, könnte darin bestehen, spezielle Temperaturlogger mitzuversenden. Bei einer Temperatur von 4°C können die Parameter Erythrozyten, Hämoglobin, Retikulozytenzahl, Retikulozytenprozent, Zellhämoglobin der Retikulozyten, Prozent der hypochromen Erythrozyten, Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz und der OFF-Score bis zu 48 Stunden analysiert werden. Bei einer Lagerungstemperatur von 21°C sollte die Analyse der Proben innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Parameter, die eine ausreichende Stabilität bei 21°C aufweisen, sind Erythrozyten, Hämoglobin, Retikulozytenzahl, Retikulozytenprozent und OFF-Score.

4.2 Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Analysegeräte auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.

Die Hämoglobinwerte zeigten eine Korrelation von $r=0,94$ für Untersuchung 1 (Abb.22), $r=0,98$ für Untersuchung 2 (Abb.24) und $r=0,99$ für Untersuchung 3 (Abb.26). Es wird deutlich, dass die Analyser des gleichen Typs (Sysmex XT2000i), die höchste Korrelation aufwiesen. Die Ergebnisse von Untersuchung 3 wiesen eine durch die niedrige Fallzahl ($n=15$) bedingte Limitierung auf, stimmten jedoch mit den Daten einer von Robinson et al. durchgeführten Studie überein [35]. Innerhalb der Bland Altman Plots (Abb.23, 25, 27) kann man sehen, dass die Hämoglobinwerte am ADVIA120 im Schnitt $0,29$ g/dL (Studie1) und $0,38$ g/dL (Studie2) höher lagen als am Sysmex KX21N, während der Unterschied zwischen den Sysmex XT2000i Geräten nur $0,07$ g/dL betrug. Die Retikulozytenwerte zeigten eine Korrelation von $r=0,61$ für Untersuchung 1 (Abb.28), $r=0,82$ für Untersuchung 2 (Abb.30) und $r=0,95$ für Untersuchung 3 (Abb.32). Hier ist wiederum zu sehen, dass die Analyser des gleichen Typs (Sysmex XT2000i), die höchste Korrelation aufwiesen. Die Fallzahl bedingte Limitierung der Untersuchung 3 ($n=15$), scheint keinen Einfluss auf die Richtigkeit der Daten zu haben, da auch dieses Ergebnis mit den Daten der von Robinson et al. durchgeführten Studie übereinstimmte [35]. Innerhalb der Bland Altman Plots (Abb.29, 31, 33) zeigte sich, dass die Retikulozytenwerte am ADVIA120 im Schnitt $0,33\%$ (Studie1) und $0,3\%$ (Studie2) höher lagen als am Sysmex R500. Der Unterschied zwischen den Sysmex XT2000i Geräten war zwar niedriger, betrug aber immer noch

0,23%. Eine mögliche Erklärung könnte eine leicht unterschiedliche Kalibrierung der Geräte und/oder der Einfluss des Probenverkehrs sein.

Die hier dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass es sowohl Unterschiede zwischen Geräten mit unterschiedlicher als auch mit gleicher Messtechnologie gibt, wobei die Unterschiede bei Geräten gleicher Technologie niedriger ausfallen.

Mit diesem Wissen kann die Vorgehensweise der WADA, sich auf einen Analysegerättyp (Sysmex XT2000i) zu beschränken und die Anzahl an akkreditierten Labors niedrig zu halten, nur unterstützt werden. Die regelmäßige monatliche Durchführung von speziellen Ringversuchen macht es möglich, Ergebnisse von Messungen in unterschiedlichen Kontrolllabors miteinander zu vergleichen und dementsprechend zu interpretieren.

Die analytische Variation der Parameter des biologischen Passes könnte auf Basis der monatlichen Ringversuche oder der Sysmex Qualitätskontrollen vielleicht sogar in die Auswertesoftware der WADA integriert werden und damit die Interpretation der Blutprofile weiter verbessern.

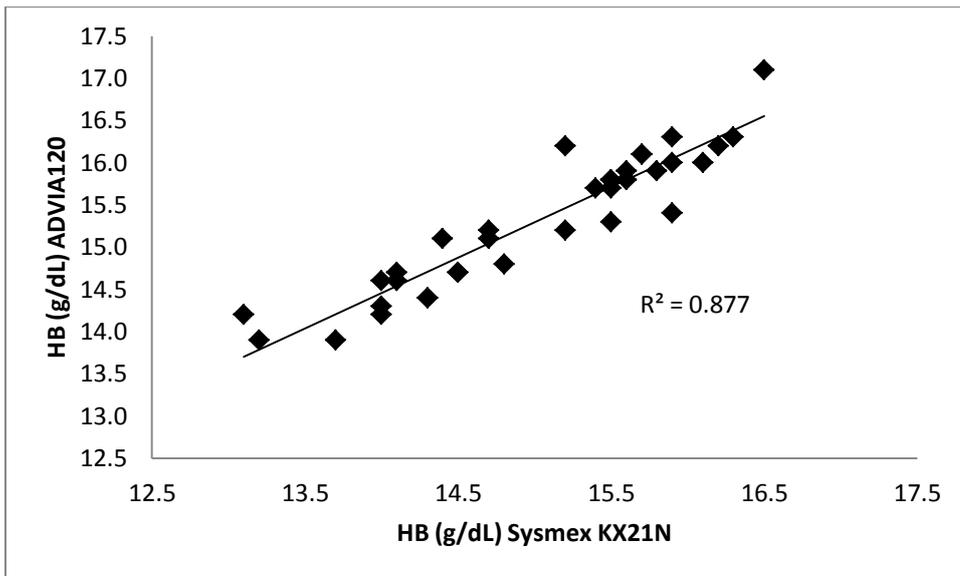


Abb.22: Korrelation der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 1 (n=34).



Abb.23: Bland Altman Plot der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 1 (n=34).

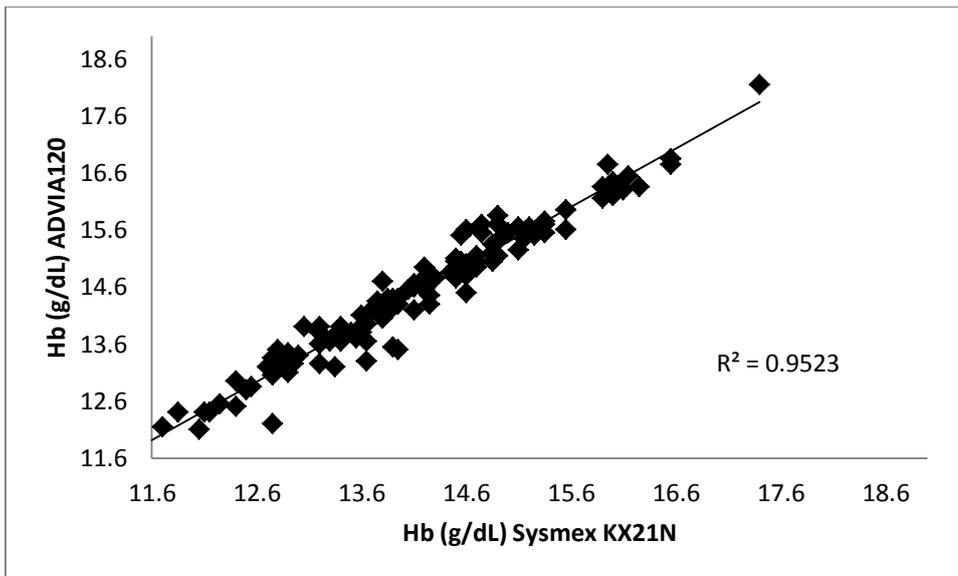


Abb.24: Korrelation der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 2 (n=120).

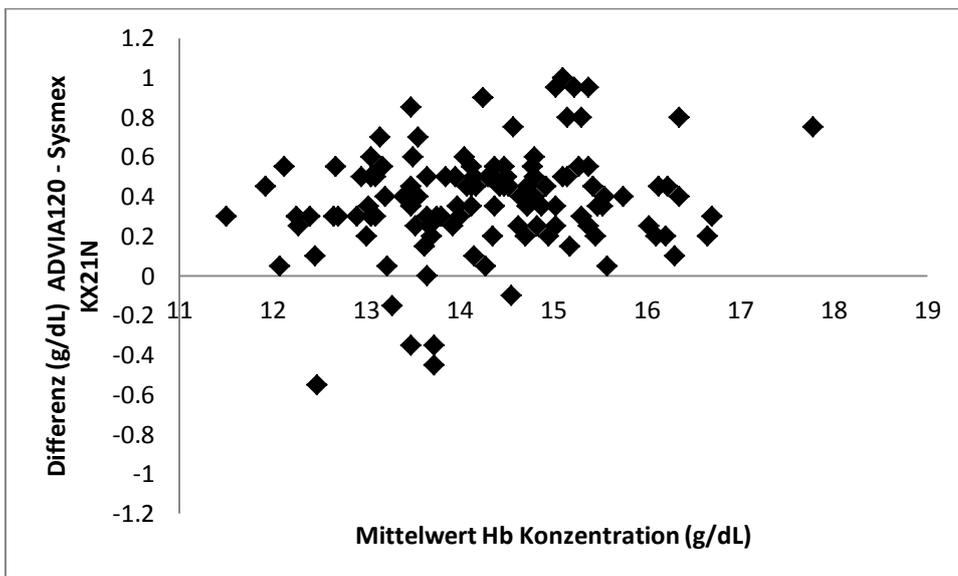


Abb.25: Bland Altman Plot der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 2 (n=120).

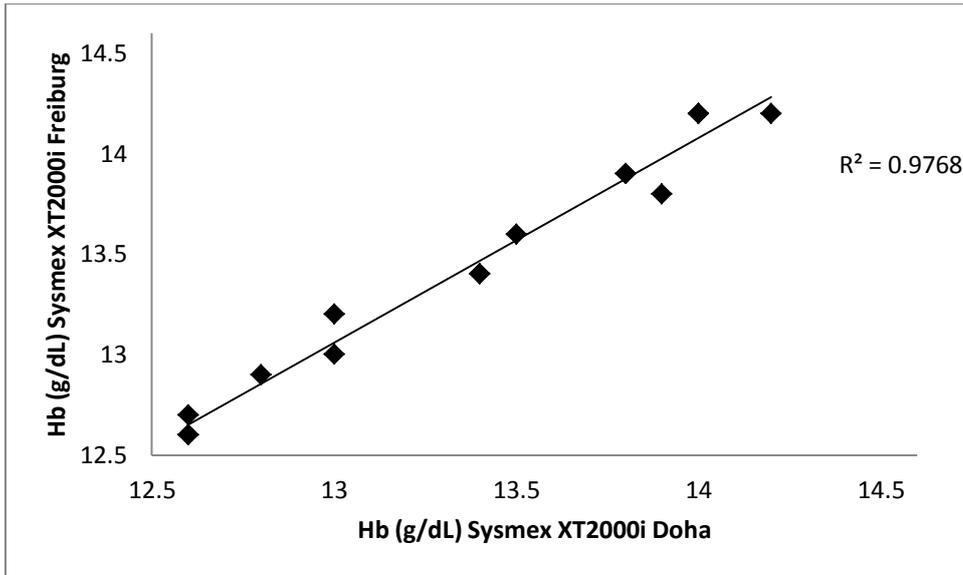


Abb.26: Korrelation der Hämoglobin Konzentration für die beiden Sysmex XT2000i in Untersuchung 3 (n=15).

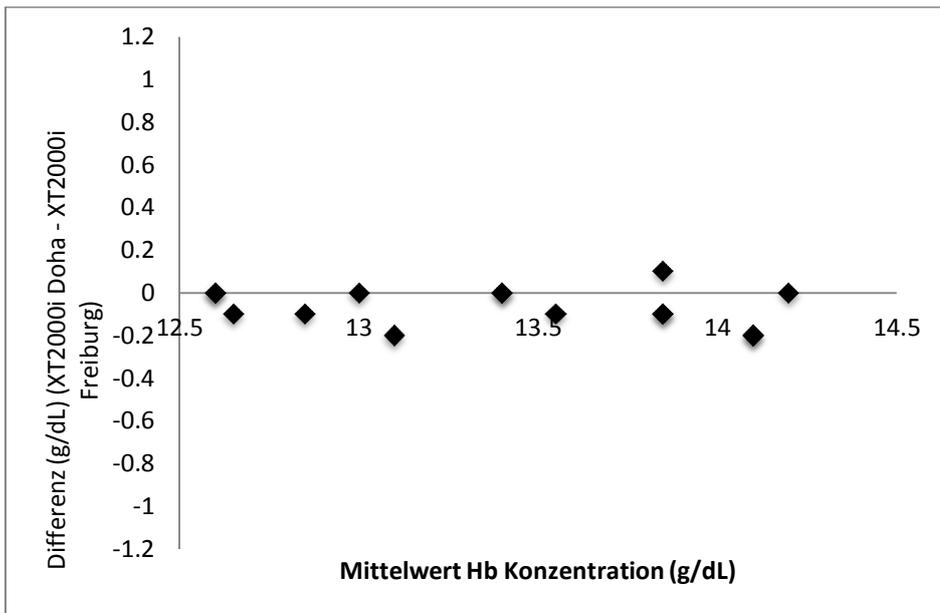


Abb.27: Bland Altman Plot der Hämoglobin Konzentration für die beiden Sysmex XT2000i in Untersuchung 3 (n=15).

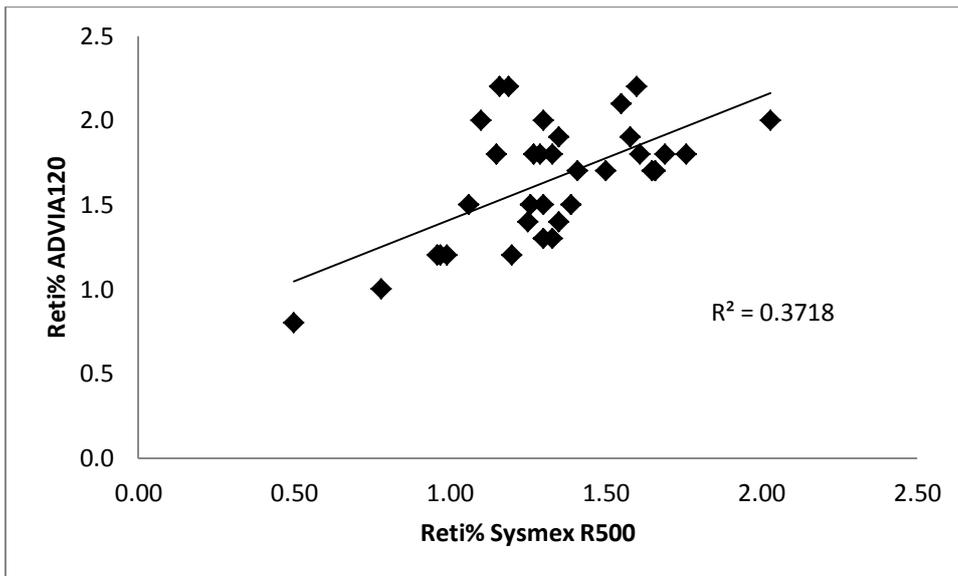


Abb.28: Korrelation der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 1 (n=34).

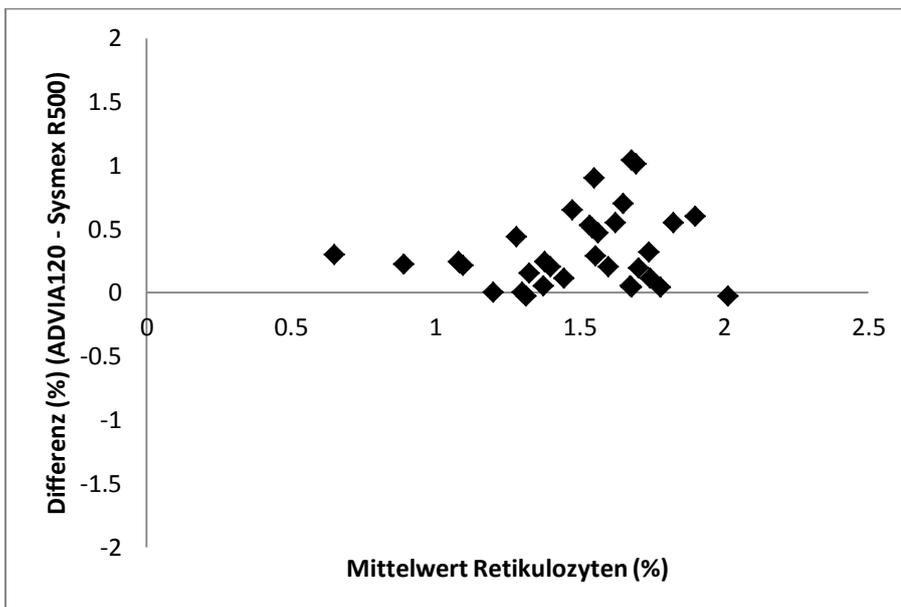


Abb.29: Bland Altman Plot der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 1 (n=34).

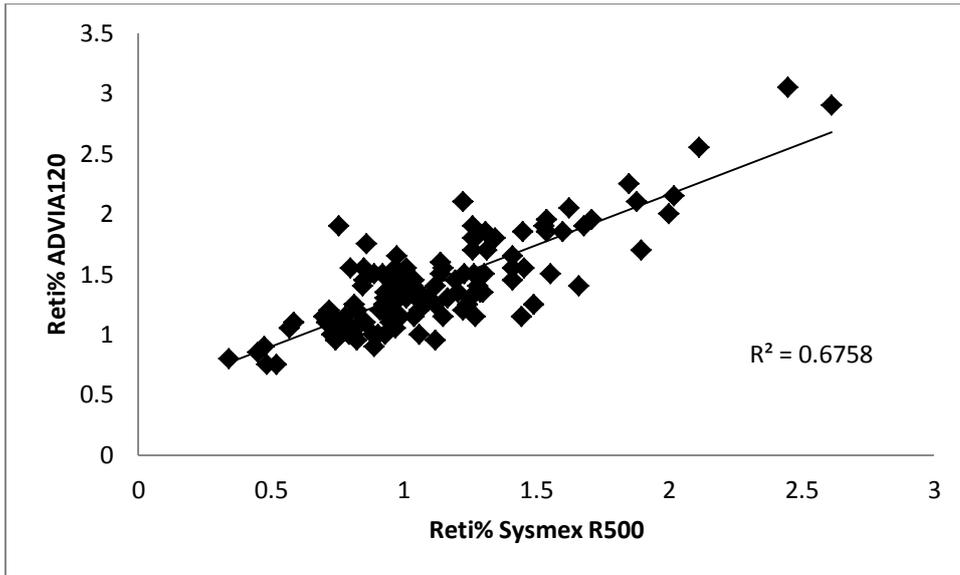


Abb.30: Korrelation der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 2 (n=120).

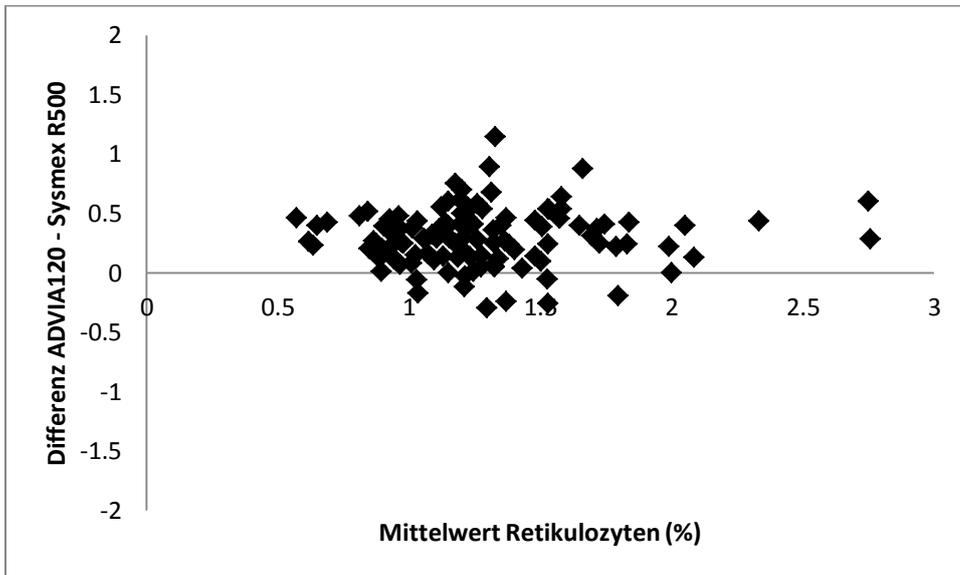


Abb.31: Bland Altman Plot der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 2 (n=120).

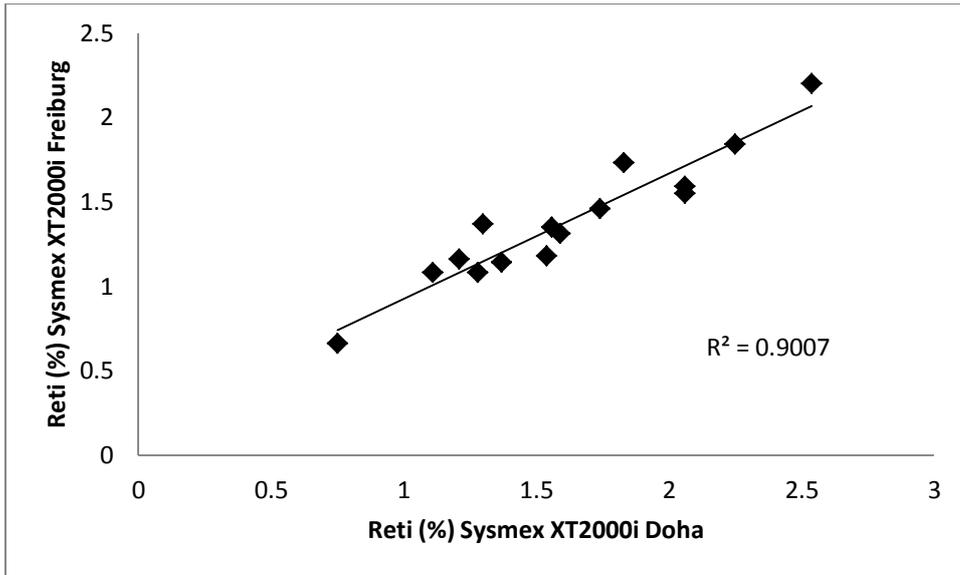


Abb.32: Korrelation der Retikulozyten (%) für die beiden Sysmex XT2000i Geräte in Untersuchung 3 (n=15).

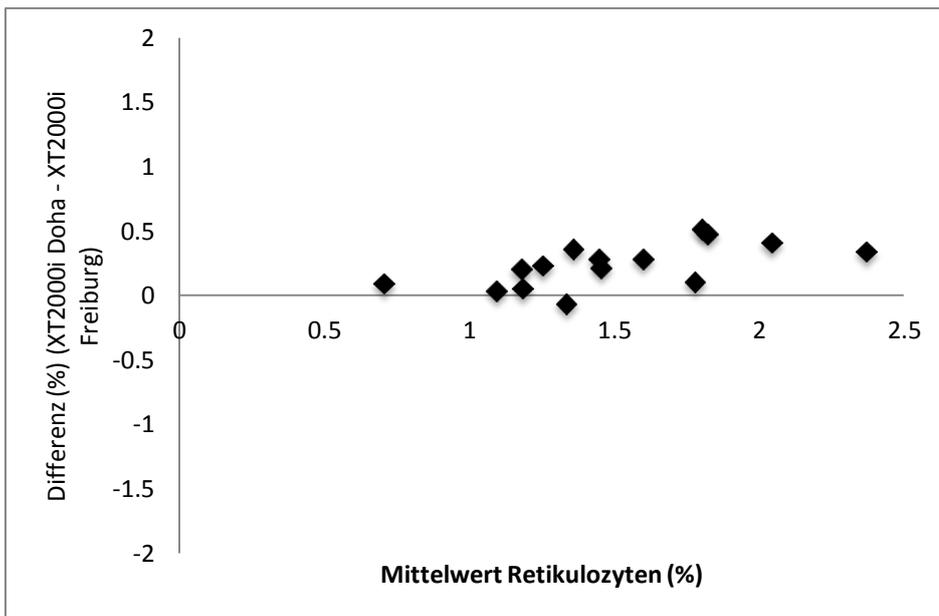


Abb.33: Bland Altman Plot der Retikulozyten (%) für die beiden Sysmex XT2000i Geräte in Untersuchung 3 (n=15).

4.3 Untersuchung zum Einfluss einer Flugreise auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.

Obwohl wir keine exakten Daten zu den Umweltbedingungen in der Kabine des Flugzeugs bekommen konnten, kann angenommen werden, dass die Daten denen eines typischen Langstreckenflugs entsprechen. Dies bedeutet laut Literatur eine Luftfeuchtigkeit von 10-20%, eine Temperatur von etwa 23°C und ein Sauerstoffgehalt entsprechend einer Höhe von 2000m über dem Meeresspiegel [79]. Die Temperatur in Deutschland betrug zu dieser Jahreszeit 8°C, während in Doha 25°C gemessen wurden.

Die Ergebnisse des Körpergewichts am ersten Tag zeigten mit 72,9±5,9 kg am Morgen und 72,5±5,8 kg am Abend keinen signifikanten Unterschied. Die Probanden wiesen mit 982±780ml eine positive Flüssigkeitsbilanz auf. Die Hämoglobinkonzentration fiel von 14,5±0,6 g/dL am Morgen signifikant ($p<0,01$) auf 14,0±0,6 g/dL am Abend (Abb.34). Der prozentuale Anteil der Retikulozyten blieb unverändert (1,09±0,25% vs. 1,03±0,29%). Am zweiten Tag betrug das Körpergewicht der Probanden morgens 71,9±5,8 kg und abends 72,9±5,7 kg. Die Flüssigkeitsbilanz lag bei 407±908ml. Die hohe Standardabweichung sowie der Gewichtsunterschied ließen darauf schließen, dass die Flüssigkeitsbilanz für einige Probanden negativ war. Diese Annahme bestätigte sich, bei genauerer Betrachtung für vier der Probanden. Die Hämoglobinkonzentration fiel, ähnlich wie am Vortag, von 14,9±0,6 g/dL am Morgen signifikant ($p<0,01$) auf 14,2±0,5 g/dL am Abend (Abb.34). Der prozentuale Anteil der Retikulozyten blieb unverändert (1,03±0,30% vs. 1,06±0,32%).

Der Abfall der Hämoglobinkonzentration vom Morgen zum Abend liegt im Rahmen der typischen diurnalen Variation. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Hämoglobin und Hämatokrit bei Messungen am Abend verglichen mit morgendlichen Messungen in der Regel etwa 0,4 g/dL oder 1,5% niedriger liegen [58]. Dieser Unterschied wird mit einem leicht reduzierten Plasmavolumen erklärt, das aus der verminderten Flüssigkeitsaufnahme in der Nacht resultiert.

Da die Retikulozyten als Prozent der Erythrozyten dargestellt werden ist der Einfluss von Veränderungen des Blutvolumens auszuschließen. Obwohl diskutiert werden kann, dass die Umweltbedingungen in der Flugzeugkabine mit vermindertem Sauerstoff zu einer Stimulierung der Erythropoese führen könnten, so ist die Aufenthaltsdauer sehr wahrscheinlich zu kurz. Eine Bestätigung dafür sind die Retikulozytenwerte in unserer Studie, die auch an den Messungen am Folgetag keinen Anstieg aufwiesen.

Die Daten unserer Probanden legen nahe, dass der menschliche Körper trotz der im Flugzeug veränderten Umweltbedingungen seine Flüssigkeitshomöostase während eines Fluges bis zu acht Stunden aufrecht erhalten kann. Für unsere Probanden kann gefolgert werden, dass die Umweltbedingungen eines achtstündigen Fluges mit dem Überqueren von zwei Zeitzonen keinen signifikanten Einfluss auf die hämatologischen Parameter Hämoglobinkonzentration und Retikulozytenprozent hatten, die über die normalen zirkadianen Schwankungen hinausgehen. Die Limitierung dieser Studie ist an der Teilnahme von ausschließlich

männlichen Probanden zu sehen. Zukünftige Studien sollten ebenfalls weibliche Probanden einschließen. Ferner kann, nachdem der Einfluss der Umweltfaktoren im Flugzeug untersucht wurde, der Einfluss des Überquerens von mehreren Zeitzonen auf die hämatologischen Parameter besser erfasst werden.

Bezüglich des biologischen Passes zeigen unsere Daten, dass sich die zur Zeit zum Profiling genutzten Biomarker höchstwahrscheinlich nicht über das Maß der normalen diurnalen Variation verändern. Darüberhinaus sind die hypoxischen Bedingungen während eines Fluges wie oben beschrieben nicht ausreichend, um einen Stimulus der Erythropoese zu erzeugen, der groß genug ist um die Retikulozyten in messbarer Form zu beeinflussen. Befürchtungen von Seiten der Athleten können somit als unbegründet betrachtet werden.

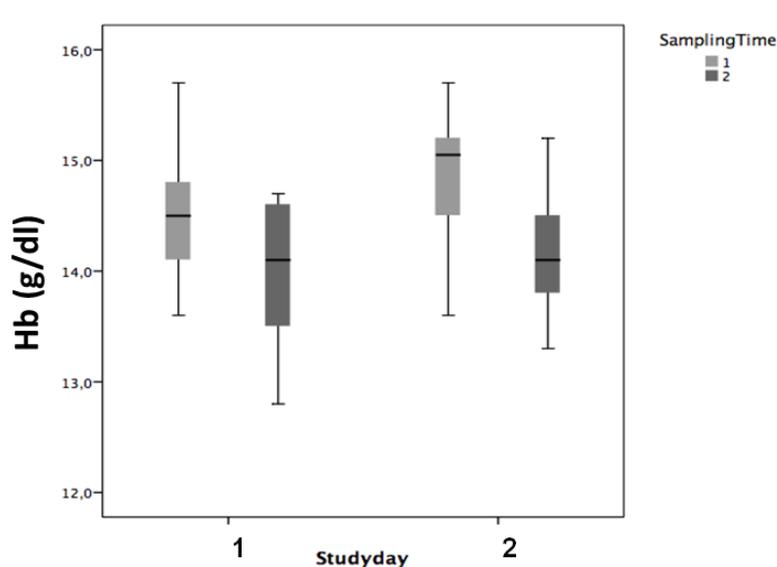


Abb.34: Boxplot Diagramm der Hämoglobinkonzentration (g/dl) für den Tag der Flugreise (Studyday 1) und den Folgetag (Studyday 2). Sampling Time 1 = Morgen-Probe. Sampling Time 2 = Abend-Probe.

4.4 Untersuchung zum diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration vor und während eines Etappenrennens im Radsport.

Die Daten unserer Probanden zeigen über den gesamten Studienverlauf signifikant höhere Werte ($p < 0,01$) der morgendlichen Hämoglobinkonzentration im Vergleich zu der am Abend. Die Ergebnisse sind als Boxplot Diagramm in Abbildung 35 dargestellt. Der mittlere Unterschied des Probandenkollektivs zwischen Proben am Morgen und am Abend betrug 0,52 g/dL. An Tag 17 wurde der höchste Unterschied mit 0,75 g/dL und an Tag 19 der niedrigste Unterschied mit 0,23 g/dL festgestellt.

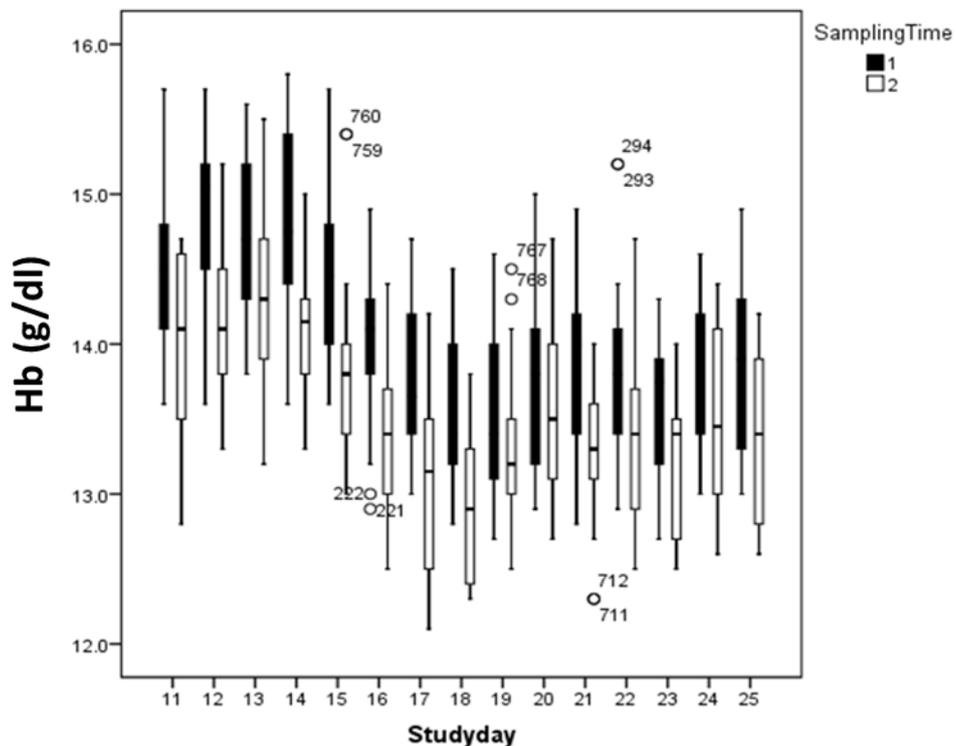


Abb.35: Boxplot Diagramm der Hämoglobinkonzentration (g/dl) der Probanden am Morgen (Sampling Time 1) und am Abend (Sampling Time 2) über den gesamten Studienverlauf.

Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass der diurnale Rhythmus der Hämoglobinkonzentration auch während der extremen Belastung eines Etappenrennens bestehen bleibt. Diese Information sollte im biologischen Pass Berücksichtigung finden und könnte dazu beitragen, Grenzwerte weiter zu individualisieren.

4.5 Untersuchung zum Einfluss von belastungsinduzierten Schwankungen im Plasmavolumen auf die Hämoglobinkonzentration.

Tabelle 13 und 14 zeigen die Ergebnisse der Berechnungen für die Daten der Plasmavolumina der einzelnen Probanden. Die Volumina am Morgen sind in Tabelle 13 und die am Abend in Tabelle 14 dargestellt.

Proband 12 zeigt die niedrigsten und Proband 5 die höchsten Durchschnittswerte für das Plasmavolumen. Für die Werte am Morgen beträgt der maximale Unterschied, über die fünfzehn Studientage, 758 ml für Proband 12 und 1047 ml für Proband 5. Damit verbunden war ein Abfall von 15,1 auf 12,9 g/dl Hämoglobin für Proband 12 und von 15,7 auf 13,2 g/dl Hämoglobin für Proband 5. Betrachtet man die maximalen Unterschiede über die komplette Studie unabhängig von der Tageszeit der Probennahme, so erreicht Proband 12 ein Volumen von 941 ml und Proband 5 ein Volumen von 1389 ml. Für Proband 12 bedeutet das einen Abfall von 15,7 auf 12,4 g/dl Hämoglobin und für Proband 5 von 15,7 auf 12,9 g/dl Hämoglobin. Die hier beschriebenen Werte stimmen mit Ergebnissen von Morkeberg et al

überein, der einen Abfall der Hämoglobinkonzentration bei Radfahrern der Tour de France von bis zu 20,6% beschreibt [80].

Die niedrigste Variation über den gesamten Verlauf der Studie wies Proband 15 mit einem Variationskoeffizient von 4,2% auf. Der maximale Plasmavolumenunterschied betrug bei ihm 531 ml, was mit einem Abfall der Hämoglobinkonzentration von 14,7 auf 13,2 g/dL verbunden war. Die höchste Variation wurde mit 9,1% bei Proband 14 festgestellt. Er wies einen maximalen Plasmavolumenunterschied von 1147 ml auf. Die Hämoglobinkonzentration fiel in diesem Probanden von 15,5 auf 12,6 g/dL.

Es konnte weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Variation des Plasmavolumens zum durchschnittlichen individuellen Plasmavolumen, noch zur maximalen Sauerstoffaufnahme festgestellt werden. Es ist wahrscheinlich das erste Mal, das individuelle Variationen im Plasmavolumen während eines Etappenrennens beschrieben werden.

Tag	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15
1	3413	3272	3628	3905	4271	3362	2910	3660	3919	3671	3072	3035	3798	3111	3191
2	3493	3138	3311	3821	3980	3154	3019	3361	3951	3279	3006	2575	3553	2950	3105
3	3292	2749	3183	3830	4225	3611	3076	3524	3770	3518	3153	2712	3691	2947	3152
4	3343	2792	3107	3972	4286	3411	3112	3591	3845	3370	3032	2570	3489	3102	3151
5	3362	2946	3429	3907	4492	3471	3198	3475	3977	3599	3007	2731	3714	3262	3204
6	3557	3146	3780	4198	4861	3632	3225	3908	3416	3714	3283	3074	3880	3421	3288
7	3646	3333	3995	3959	4733	3407	3520	3810	3749	3937	3517	3167	3835	3753	3220
8	3686	3541	3969	4087	4784	3473	3608	3865	3920	4190	3604	3099	3797	3804	3513
9	3887	3687	4140	4149	4224	3778	3546	3817	4056	3416	3525	3328	3880	3717	3538
10	3772	3505	3708	4158	4561	3806	3635	3315	4218	3279	3353	3045	3801	3511	3387
11	3570	3214	3750	4032	5027	3723	3216	3628	4219	3290	3347	2976	3667	3308	3219
12	3624	3013	3719	4120	4711	3514	3347	3720	4180	3146	3471	3185	3948	3426	3426
13	3614	3230	3773	4009	4781	3633	3504	3720	4260	3605	3608	3108	3793	3427	3508
14	3548	3288	3525	4067	4584	3367	3463	3599	4115	3563	3430	3089	3711	3269	3410
15	3453	3389	3544	4142	4447	3408	3512	3617	4105	3448	3147	2835	3817	3140	3228

Tab. 13: Plasmavolumendaten der Probanden 1 – 15 (P 1-15) am Morgen.

Der Verlauf der Plasmavolumina zeigt erst einen Abfall innerhalb der Taperingphase ohne Belastung (Tag 1-3) und dann einen Anstieg ab Tag 5, der seinen Höhepunkt an Tag 8 erreicht und sich dann an den folgenden Tagen auf einem etwas niedrigeren Level stabilisiert (Abb.36 und 37). Die oben beschriebene Veränderung des Plasmavolumens über die Zeit stimmt mit Untersuchungen von Convertino und Sawka überein [61, 63].

Tag	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15
1	3706	3530	3634	3933	4294	4000	3393	3675	4384	3788	3446	3185	3773	3257	3257
2	3666	3294	3469	4209	4491	3779	3362	3711	4063	3597	3336	3037	4053	3061	3233
3	3726	3131	3518	4140	4551	3748	3249	3783	4184	3394	3146	2730	3738	3372	3357
4	3573	3345	3412	4113	4428	3550	3404	3767	4072	3756	3370	2926	4070	3360	3276
5	3822	3381	3824	4172	4810	3747	3398	3730	4033	3617	3121	3211	3926	3783	3403
6	3912	3477	4057	4601	5248	3729	3741	4066	3890	3907	3439	3196	4097	3966	3494
7	4025	4071	4113	4363	5369	3929	4034	4112	4014	4275	3851	3286	3903	4023	3635
8	4050	3923	4320	4340	4859	3756	3983	4178	4276	4143	4007	3511	4297	4094	3529
9	3986	3769	3972	4292	4848	4019	3931	3793	4140	3666	3482	3261	4214	3856	3485
10	3838	3543	3557	4189	4717	3822	3857	3739	4291	3668	3284	3065	3943	3711	3356
11	3879	3395	3870	4458	4912	3858	3707	3710	4552	3680	3580	3266	4137	3764	3463
12	3848	3383	3838	4238	4930	3705	3717	3956	4438	3405	3525	3240	4166	3608	3493
13	3764	3329	3952	4191	5050	3852	3835	3968	4411	3867	3777	3217	4116	3433	3481
14	3775	3542	3538	4297	4626	3419	3544	3851	4322	4031	3377	2977	4007	3280	3286
15	3750	3707	3613	4306	4599	3605	3627	3936	4337	4088	3520	2965	3980	3417	3446

Tab. 14: Plasmavolumendaten der Probanden 1 – 15 (P 1-15) am Abend.

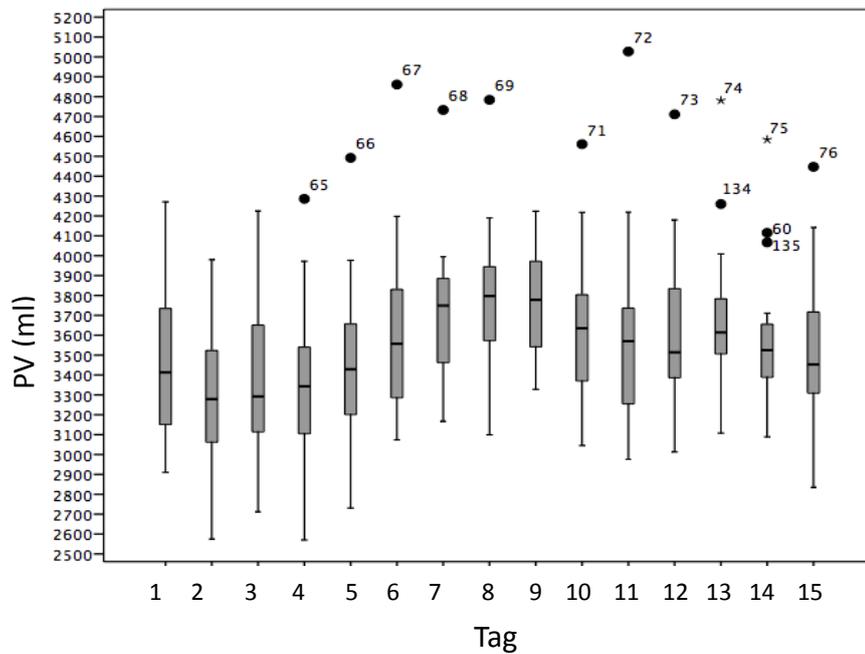


Abb.36: Plasmavolumen am Morgen. Proband 5 (Punkte 65-76) mit höchstem PV. Probanden 4 (60) und 9 (134, 135) mit noch hohem PV am Ende der Studie.

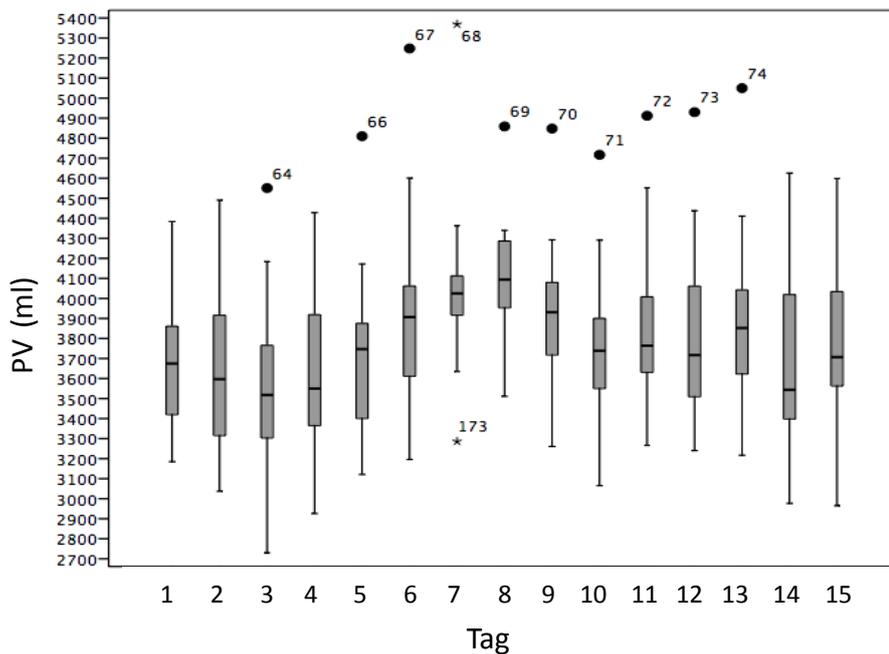


Abb.37: Plasmavolumen am Abend, Proband 5 mit sehr hohen Werten (Punkte 64-74, auch beste VO2max), Proband 12 (173) mit niedrigsten PV wird zum Ausreißer an Tag 7.

Convertino beschreibt einen Abfall des Plasmavolumens bei Inaktivität (Bettruhe) in einer Größenordnung von 10 bis 30 Prozent innerhalb von 24 bis 72 Stunden [63]. Sawka zeigt, dass das Plasmavolumen innerhalb von vier bis fünf Tagen um bis zu 20 Prozent ansteigen kann [61].

In unserer Studie wird deutlich, dass belastungsbedingte Veränderungen des Plasmavolumens in gesunden Radfahrern und Triathleten bis zu 1047 ml ausmachen können, wenn die Messungen zur gleichen Tageszeit stattfinden. Diese Tatsache muss bei der Interpretation von Blutprofilen bedacht werden, da dieser Wert bei Messungen zu unterschiedlichen Tageszeiten (Morgen – Abend) noch höher sein kann. Dies wird ebenfalls in dieser Untersuchung deutlich (Proband 5 mit 1389 ml).

Es konnte gezeigt werden, dass die maximale Expansion des Plasmavolumens innerhalb eines Etappenrennens nach etwa 4 bis 5 Tagen erfolgt. An Renntag 4 wurden 152 km Renndistanz mit drei Sprintwertungen absolviert und an Tag 5 wurde ein Einzelzeitfahren über 44 km durchgeführt. Da dies die beiden Tage mit den höchsten Plasmavolumenwerten sind, können wir leider keine Aussage darüber treffen, welche Rolle das Belastungsvolumen oder die Belastungsintensität für das Plasmavolumen einnimmt. Durch den Mangel einer Kontrollgruppe vor Ort, kann zudem auch leider keine Aussage getroffen werden, welchen Einfluss Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel der Temperaturunterschied von 15°C im Vergleich zum Heimatland, die Plasmavolumenexpansion beeinflusst haben könnte. Hitze wird als Faktor, der das Plasmavolumen beeinflussen kann, diskutiert und

Studien berichten von möglichen Erhöhungen in einem Umfang von bis zu 30 Prozent [81-83].

Eine weiterhin unbeantwortete Frage ist, warum einige Individuen größere Veränderungen im Plasmavolumen zeigen als andere. Einfache Erklärungen könnten Unterschiede im Trinkverhalten und im Bereich der maximalen Ausbelastung sein oder unterschiedliche Anpassungen des Gefäßvolumens durch Kapillarisierung.

Was in dieser Studie jedoch nachgewiesen werden konnte, ist, dass der diurnale Rhythmus der Hämoglobinkonzentration selbst unter maximaler Plasmavolumenexpansion erhalten bleibt und dass es zu einem extremen Abfall der Hämoglobinkonzentration während eines Etappenrennens kommen kann. Der Zeitverlauf der Veränderung des Plasmavolumens unter sportlicher Belastung wird über einen Zeitraum von 15 Tagen dargestellt. Unsere Untersuchung lässt darauf schließen, dass es für korrekte Interpretationen von Kontrollergebnissen notwendig ist, innerhalb des biologischen Passes zu vermerken, wann und unter welchen Umständen eine Blutkontrolle stattfand.

4.6 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung.

Die Reliabilität der Methode zur Hämoglobinmassenbestimmung wurde mit der Microsoft Excel Vorlage von Prof. Dr. W. Hopkins ermittelt ([sportsci.org, Spreadsheets, Reliability](http://sportsci.org/Spreadsheets/Reliability)) und lag in unserer Untersuchung bei einem typischen Fehler von 2,1% (Vertrauensintervall: 1,6%-2,8%) [64]. Das genutzte Verfahren wird in vielen Publikationen zur Beschreibung der Messunsicherheit bei der HB Massen Bestimmung verwendet und unser Ergebnis entspricht den dort beschriebenen Werten [40, 41, 43]. Bei Gabe einer Blutkonserve von 500 ml kommt es zu einer Erhöhung der HB-Masse von etwa 50 g. Innerhalb unserer Messungen, betrug die durchschnittliche Differenz aller Messungen 17,8 g mit einer Standardabweichung von 15,8 g. Der maximale Unterschied in der Hämoglobinmasse bei einem der Probanden betrug 67,3 g, was die dreifache Standardabweichung überschreitet. Während solche Werte in Studien als Ausreisser eliminiert werden können, besteht diese Möglichkeit bei Anti-Doping Tests nicht. Ein solches Ergebnis, möglicherweise von unterschiedlichen Untersuchern in verschiedenen Labors erzielt, könnte zu einer falschen Bewertung des Dopingstatus eines Athleten führen. Damit ist den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen zu Folge die Methode nicht valide genug, um Blutdoping mit einer Empfindlichkeit von 50 g zu detektieren. Der Bland Altman Plot in Abbildung 38 zeigt die Differenzen in Abhängigkeit vom HB-Massen Wert. Es ist kein systematischer Trend zu erkennen. Die Daten der Einzelmessungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

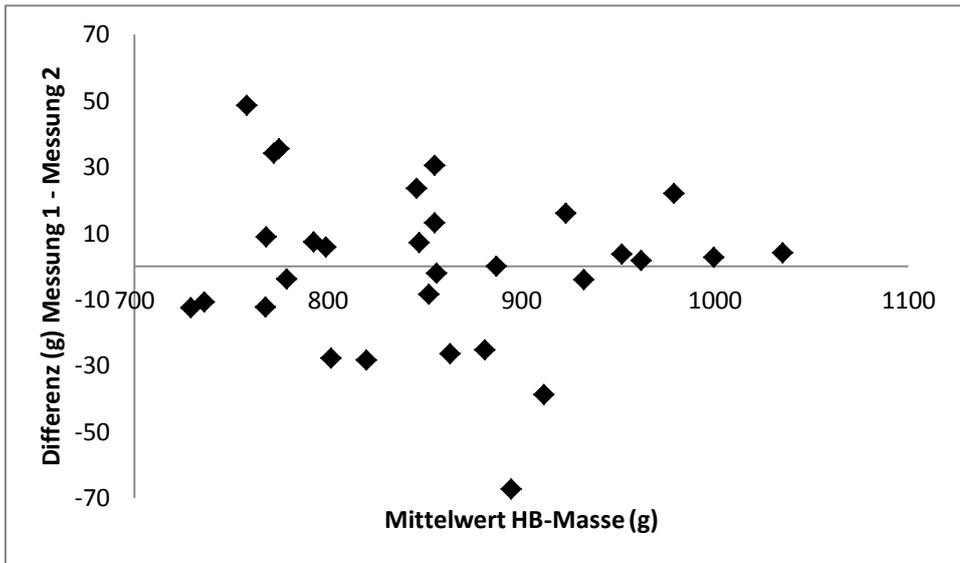


Abb.38: Bland Altman Plot von HB-Massebestimmungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (n=30).

Test	Messung 1 (g)	Messung 2 (g)	Differenz (g)	Differenz Messung 1 zu Messung 2 (%)
1	787,7	815,4	27,7	3,4
2	776,9	780,7	3,8	0,5
3	892,5	931,3	38,8	4,2
4	989,8	967,8	22	-2,3
5	1037,1	1033	4,1	-0,4
6	868,4	893,6	25,2	2,8
7	796,3	789	7,3	-0,9
8	805,8	834,1	28,3	3,4
9	861,2	928,5	67,3	7,2
10	887	887	0	0
11	850	876,5	26,5	3,0
12	730,7	741,5	10,8	1,5
13	963	961,2	1,8	-0,2
14	857,7	834,3	23,4	-2,8
15	789	754,9	34,1	-4,5
16	802	796,2	5,8	-0,7
17	782,5	733,9	48,6	-6,6
18	930,3	934,3	4	0,4
19	953,7	950,1	3,6	-0,4
20	1000,9	998,2	2,7	-0,3
21	851	843,8	7,2	-0,9
22	761,4	773,8	12,4	1,6
23	772,6	763,7	8,9	-1,2
24	848	856,6	8,6	1,0
25	861,9	848,8	13,1	-1,5
26	855,2	857,4	2,2	0,3
27	723	735,6	12,6	1,7
28	931,1	915,1	16	-1,7
29	870,4	839,9	30,5	-3,6
30	792,4	757	35,4	-4,7

Tabelle 15: Daten zur HB-Masse in Doppelbestimmung an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

4.7 Untersuchung zum Einfluss unterschiedlicher Blutgas-analysegeräte auf die Hämoglobinmasse.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Abbildungen 39 bis 44 dargestellt. Die Korrelation der Hämoglobinmasse für die unterschiedlichen Analysegeräte lag zwischen $r=0,92$ und $r=0,97$. Interessanterweise war die Korrelation der beiden Radiometer Geräte zum Roche Gerät ($r=0,97$) höher als die Korrelation zwischen den beiden Radiometer Geräten ($r=0,92$). Der OSM3 erzielte im Schnitt 83 g ($\pm 63,7\text{ g}$) höhere Werte als der Cobas b221 und durchschnittlich $35,4\text{ g}$ ($\pm 91,5\text{ g}$) höhere Werte als der ABL80. Der Cobas b221 wies mit durchschnittlich 849 g die niedrigsten Werte auf. Der Bland Altman Plot zeigte einen Trend zwischen Hämoglobinmasse der Probanden und Unterschied zwischen den Geräten. Je höher die Hämoglobinmasse, desto größer scheint der Unterschied zwischen den Radiometer Geräten und dem Roche Gerät zu sein (Abb.40 und 42).

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Anwendung unterschiedlicher Analysegeräte einen großen Einfluss auf die resultierende HB-Masse haben kann. Studienergebnisse, die mit unterschiedlichen Geräten durchgeführt wurden, sollten deshalb immer auch vor diesem Hintergrund miteinander verglichen werden.

In internationalen Projekten, bei denen die HB Masse bestimmt werden soll, sollte möglichst derselbe Analyser oder zumindest derselbe Gerätetyp benutzt werden. Der Einsatz von portablen Geräten ist deshalb klar zu bevorzugen.

Leider konnte innerhalb dieser Studie nicht die Fragestellung beantwortet werden welchen Einfluss Messungen auf unterschiedlichen Geräten desselben Analysertyps auf die resultierende HB-Masse haben. Zukünftige Studien, bei denen diese Problematik auftreten könnte sollten sich im Rahmen der Ergebnisinterpretation mit dieser Thematik befassen. Eine Anwendung der HB-Masse als Parameter im biologischen Pass der WADA würde voraussetzen, dass die Messunterschiede innerhalb von Geräten desselben Analysertyps minimal sind oder, dass geeignete Qualitätskontrollen einen Gerätevergleich ermöglichen.

Letztendlich ist die HB-Massenbestimmung eine hervorragende Methode zum Einsatz in Studien, bei denen Gruppendurchschnitt und Standardabweichung als Ergebnis einer Intervention verglichen werden sollen oder innerhalb von Längsschnittuntersuchungen von Individuen bei denen nicht von einer Beeinflussung der Werte durch Doping ausgegangen werden kann und die eine Messfrequenz aufweisen, die groß genug ist um Ausreißer eliminieren zu können. Zu aktuellen Zeitpunkt allerdings wird die Methode der CO Rückatmung von zu vielen Faktoren beeinflusst, die zu „falsch-positiven“ oder „falsch-negativen“ Ergebnissen führen können, als dass an eine Routineanwendung in der Dopinganalytik gedacht werden kann. Für Studien im Bereich Anti-Doping, kann empfohlen werden die Messungen in Doppelbestimmung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchzuführen. Daten von Probanden mit zu großen Abweichungen der Messwerte sollten dann von weiteren Auswertungen ausgeschlossen werden.

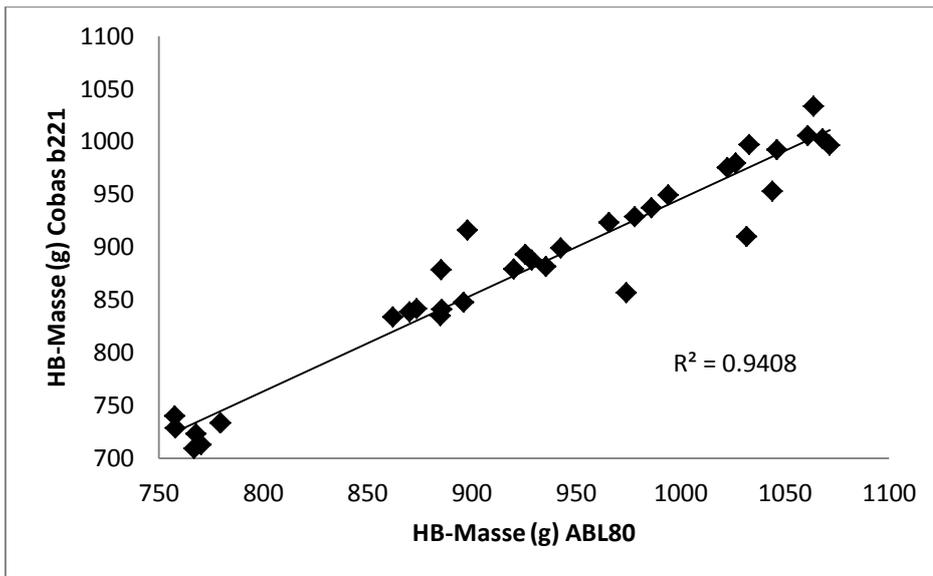


Abb.39: Korrelation der HB-Masse Ergebnisse nach Messung auf dem Radiometer ABL80 und Roche Cobas b221 (n=36).

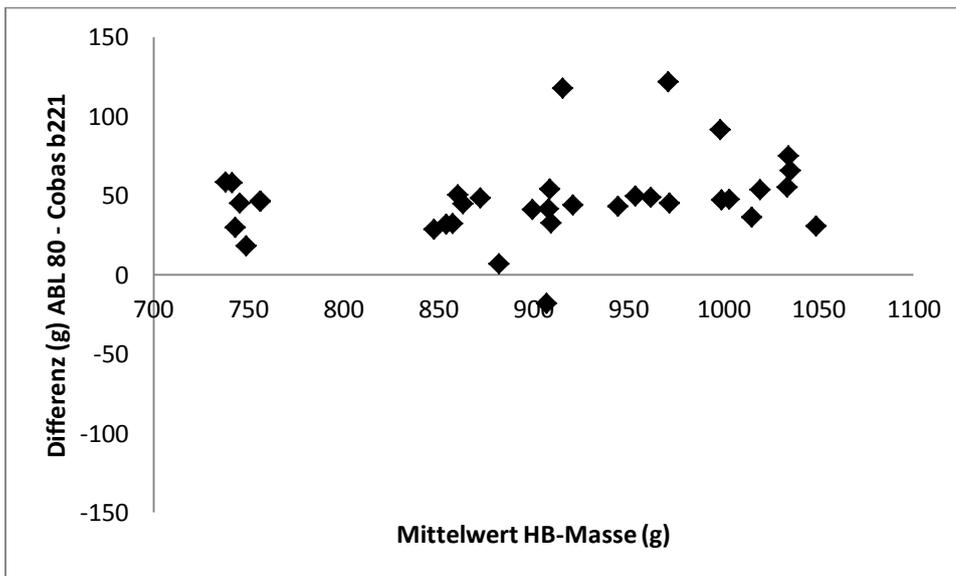


Abb.40: Bland Altman Plot der HB Masse gemessen auf dem Radiometer ABL80 und Roche Cobas b221. Die Geräte zeigen eine durchschnittliche Differenz von 47,7 g mit einer Standardabweichung von 49,8 g (höhere Werte für den ABL80) (n=36).

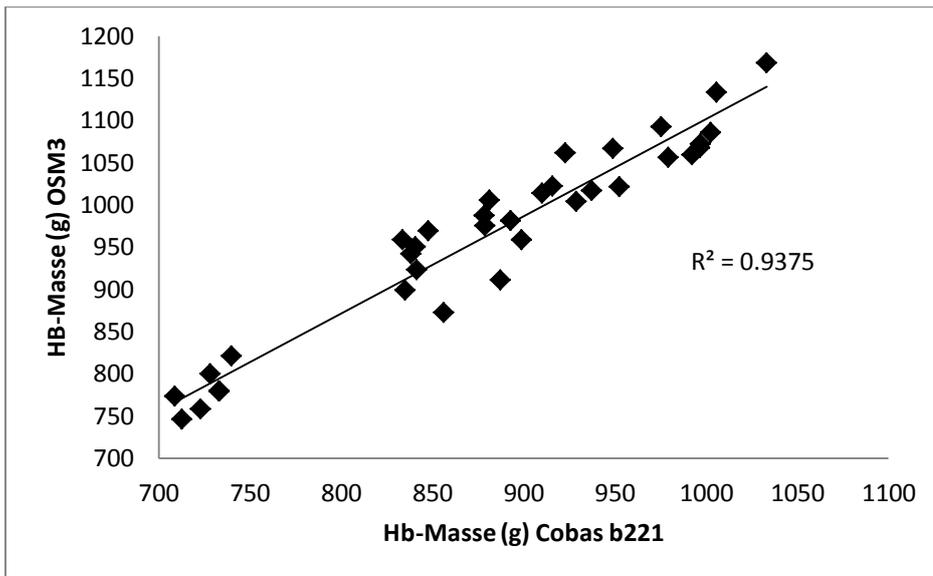


Abb.41: Korrelation der HB-Masse Ergebnisse nach Messung auf dem Radiometer OSM3 und Roche Cobas b221 (n=36).

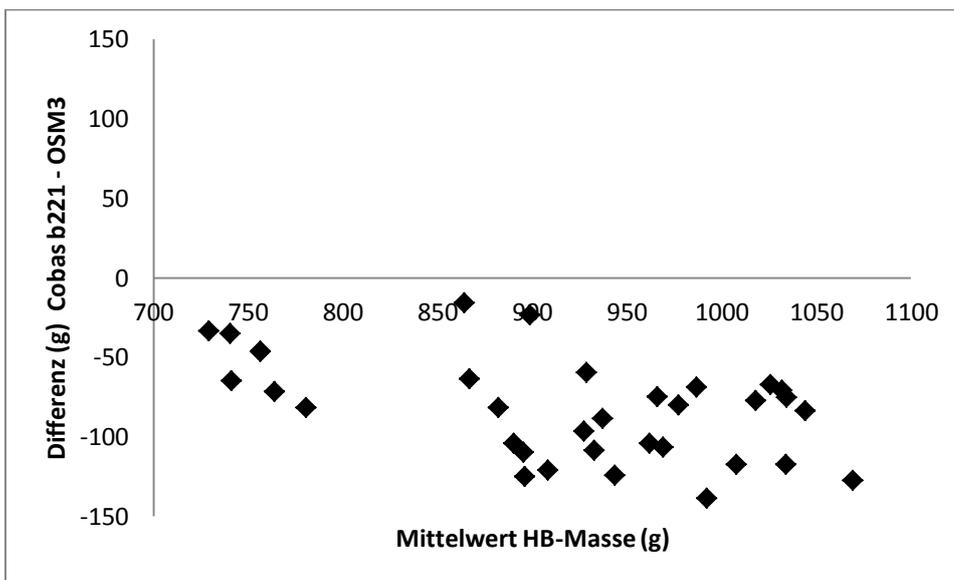


Abb.42: Bland Altman Plot der HB Masse gemessen auf dem Radiometer OSM3 und Roche Cobasb221. Die Geräte zeigen eine durchschnittliche Differenz von 83 g mit einer Standardabweichung von 63,7 g (höhere Werte für den OSM3) (n=36).

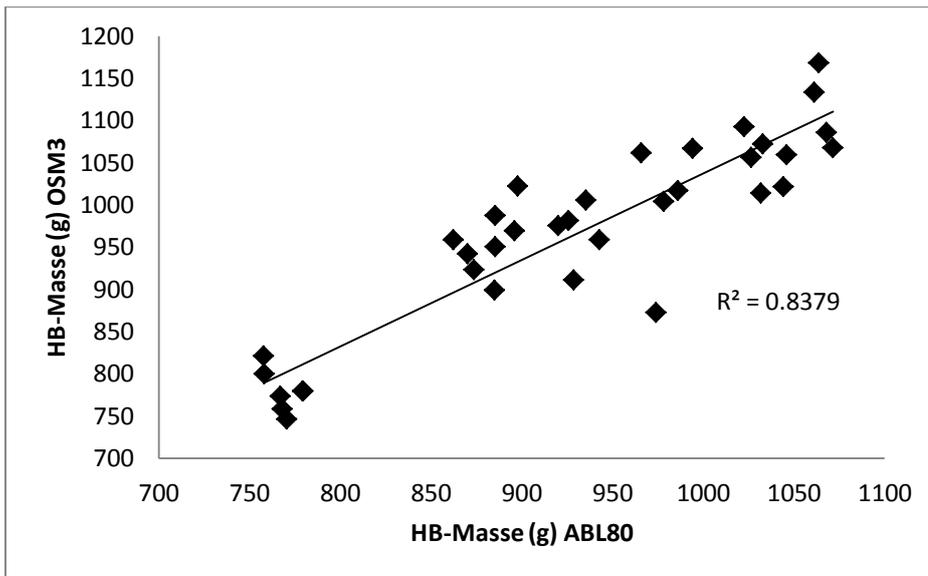


Abb.43: Korrelation der HB-Masse Ergebnisse nach Messung auf dem Radiometer ABL80 und OSM3 (n=40).

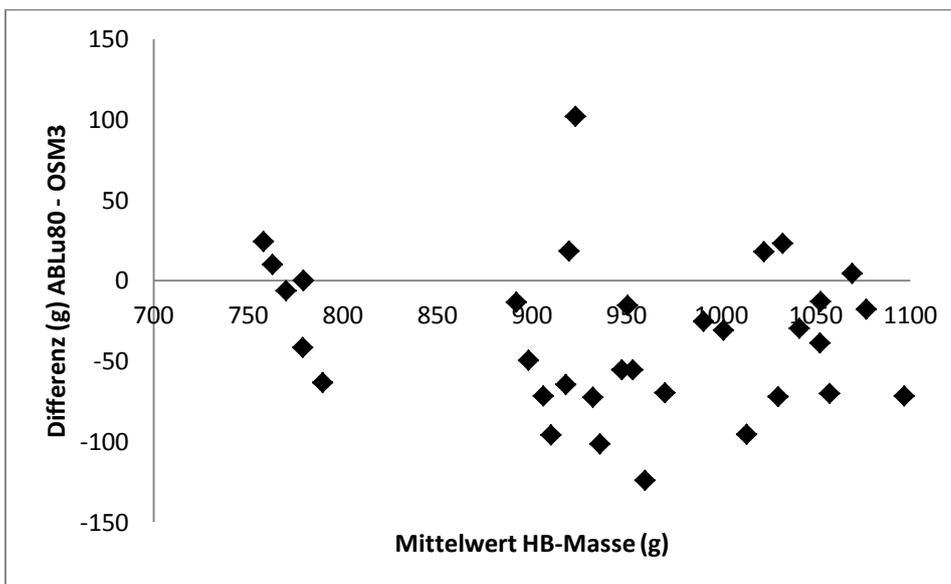


Abb.44: Bland Altman Plot der HB Masse gemessen auf dem Radiometer ABL80 und OSM3. Die Geräte zeigen eine durchschnittliche Differenz von 35,4 g mit einer Standardabweichung von 91,5 g (höhere Werte für den OSM3) (n=36).

4.8 Untersuchung zur Validität der Methode zur direkten Detektion der homologen Bluttransfusion.

4.8.1 Spezifität

Die Analyse der Proben zeigte bei der Durchflusszytometrie wie erwartet keine Doppelpopulation und die Blutgruppen konnten mit der Ausnahme von einer Blutgruppe bei Proband 6 klar bestimmt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei Proband 6 um eine sehr schwache Expression von „e“. Die Ergebnisse der einzelnen Probanden sind codiert in Tabelle 16 aufgeführt.

4.8.2 Präzision

Die Ergebnisse der Präzisionsbestimmung sind in Tabelle 17 als CV% dargestellt. Die Präzision zeigt für die IgM Antikörper C, c, E und e eine, im Vergleich mit den IgG Antikörpern, schlechtere Präzision mit einem CV über 10%. Die Präzision für die IgG Antikörper liegt bei einem CV von unter 5%.

4.8.3 Linearität

Die Linearität wurde mit dem “Mandel” Test überprüft und für alle Antigene bestätigt. Von den Ergebnissen dieser Proben wurde mit der Validat Software außerdem die Nachweisgrenze (LOD), die Quantifizierungsgrenze (LOQ) und die Wiederfindung errechnet (Tabelle 18).

Proband	A	B	AB	0	Rh+ (D+)	Rh- (D-)	C	c	E	e	Jka	Jkb	Fya	Fyb
1		x			x		x	x	0	x	x	x	x	x
2	x				x		0	x	x	x	x	0	x	x
3			x		x		x	x	x	x	0	x	0	x
4		x			x		x	x	0	x	0	x	0	x
5		x			x		0	x	x	x	0	x	x	x
6	x				x		0	x	x	?	x	0	0	x
7	x				x		x	x	x	x	x	x	x	x
8				x	x		x	x	0	x	0	x	0	x
9			x		x		x	x	0	x	x	x	x	0
10		x				x	0	x	0	x	x	0	x	x
11	x				x		x	x	x	x	x	x	0	x
12	x				x		0	x	0	0	x	0	x	x
13				x		x	0	x	0	x	x	0	x	x
14				x	x		x	x	0	x	0	x	x	0
15	x				x		x	0	0	x	0	x	0	x
16		x			x		x	x	0	x	x	x	x	x
17	x				x		x	x	0	x	x	x	x	0
18			x		x		x	0	0	x	0	x	x	x
19				x	x		x	x	0	x	0	x	0	x
20	x				x		x	0	0	x	x	x	0	x
21				x	x		x	0	0	x	x	x	x	0
22	x				x		x	0	0	x	x	0	0	x
23				x	x		x	0	0	x	x	x	x	0
24			x		x		x	x	0	x	x	x	x	0
25		x			x		x	x	x	x	x	0	0	x

Tab.16: Spezifität der Methode. Die Analyse zeigte keine Doppelpopulation (X= Antigen wird exprimiert, 0= Antigen wird nicht exprimiert).

Antikörper	Intra-Tag Präzision (% CV)
C	19,8 %
c	10,4 %
E	11,2 %
e	14,8 %
Fya	4,1 %
Fyb	3,4 %
Jka	2,7 %
Jkb	4,4 %

Tab. 17: Präzision innerhalb eines Tages als CV%.

Antigen	LOD (5% zweiseitig)	LOQ (5% zweiseitig)	Wiederfindung
C	1,7 %	5,8 %	48,8 %
c	2,0 %	6,8 %	23,1 %
E	1,3 %	4,3 %	60 %
e	1,1 %	3,7 %	34,7 %
Fya	0,5 %	1,8 %	100 %
Fyb	0,3 %	1,3 %	98,4 %
Jka	0,5 %	1,8 %	87 %
Jkb	0,4 %	1,4 %	96,7 %

Tab. 18: Nachweisgrenze (LOD), Quantifizierungsgrenze (LOQ) und Wiederfindung.

4.8.4 Robustheit

Die Ergebnisse der Analysen wurden mit der Validat Software überprüft. Die Methode wurde als robust für qualitative allerdings nicht für quantitative Aussagen bewertet.

4.8.5 Verbesserung der Separation einer Mixpopulation durch Signalverstärkung.

Abbildungen 45 und 46 zeigen ein Gemisch von 95% Erythrozyten, die das Antigen C schwach exprimieren mit 5% Erythrozyten, die das Antigen nicht exprimieren. Abbildung 45 zeigt das Ergebnis einer herkömmlichen Aufarbeitung und Abbildung 46 das Ergebnis nach Anwendung der Signalverstärkungsmethode. Beide Abbildungen stellen die Ergebnisse sowohl als Dot-Plot als auch in Histogramm Form dar.

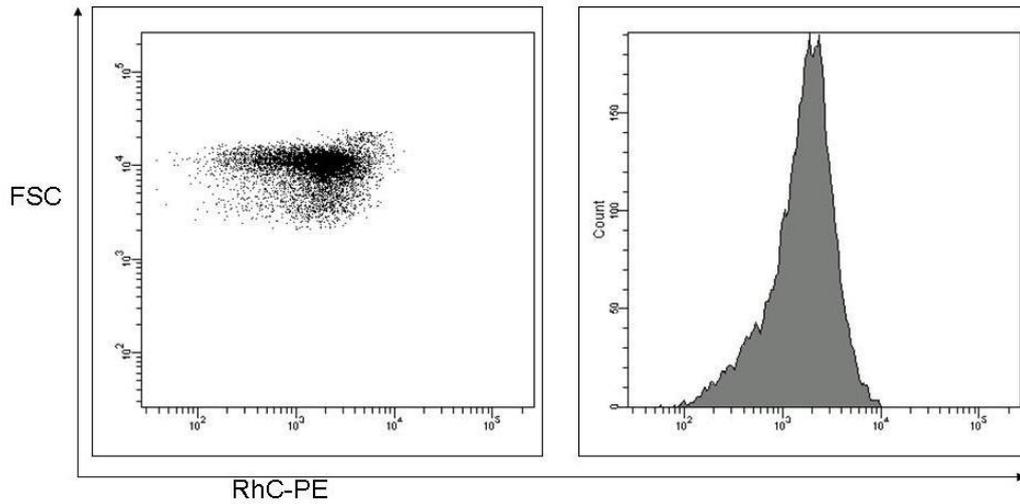


Abb.45: Gemisch von 95% schwach exprimierenden Zellen (Antigen C) mit 5% nicht-exprimierenden Zellen ohne Signalverstärkung. Es ist nur eine Population sichtbar.

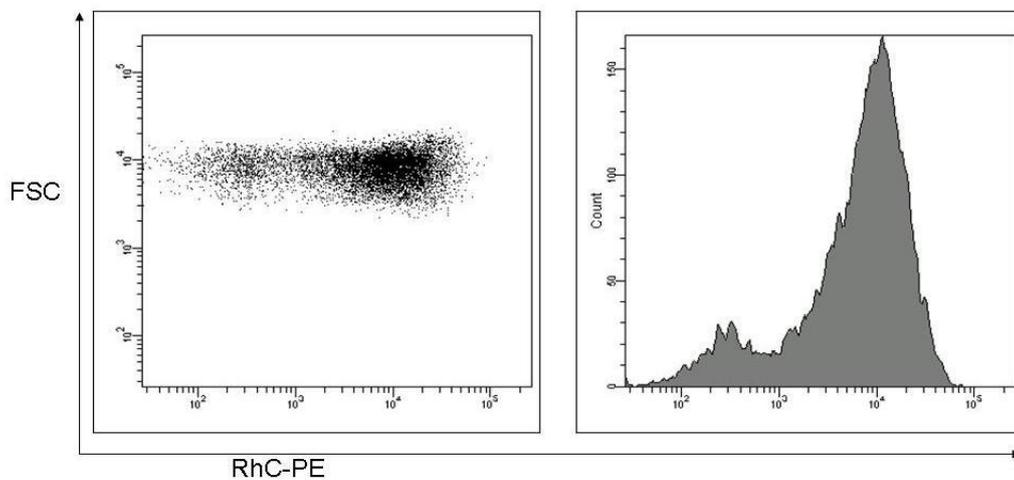


Abb.46: Gleiche Probe wie in Abb.45, jedoch nach Behandlung mit der Signalverstärkungsmethode. Man erkennt zwei Populationen.

Die Technik der Signalverstärkung verbessert die Methode durch eine bessere Trennung bei gemischten Erythrozytenpopulationen. Es wurde keine Veränderung der Fluoreszenzintensität bei den Erythrozyten ohne Antigenexpression festgestellt, woraus gefolgert werden kann, dass eine unspezifische Bindung des Biotins oder Streptavidins ausgeschlossen werden kann. Abbildung 47 zeigt vier verschiedene Situationen sowohl vor und nach Behandlung mit der Signalverstärkungsmethode. Situation 1 zeigt die Behandlung von Erythrozyten ohne Expression des Kidd Antigens Jkb. Es gibt keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität. Situation 2 zeigt Erythrozyten, die Jkb exprimieren. Die Fluoreszenz der Zellen nach Signalverstärkung ist deutlich intensiviert. Situation 3 zeigt ein Gemisch von 90% Erythrozyten ohne Antigen und 10% Erythrozyten mit Antigen. Die Populationen sind nach der Signalverstärkung besser getrennt. Situation 4 zeigt ein Gemisch von 10% Erythrozyten ohne Antigen und 90% Erythrozyten mit Antigen. Auch hier kommt es nach Anwendung der Signalverstärkung zu einer verbesserten Trennung.

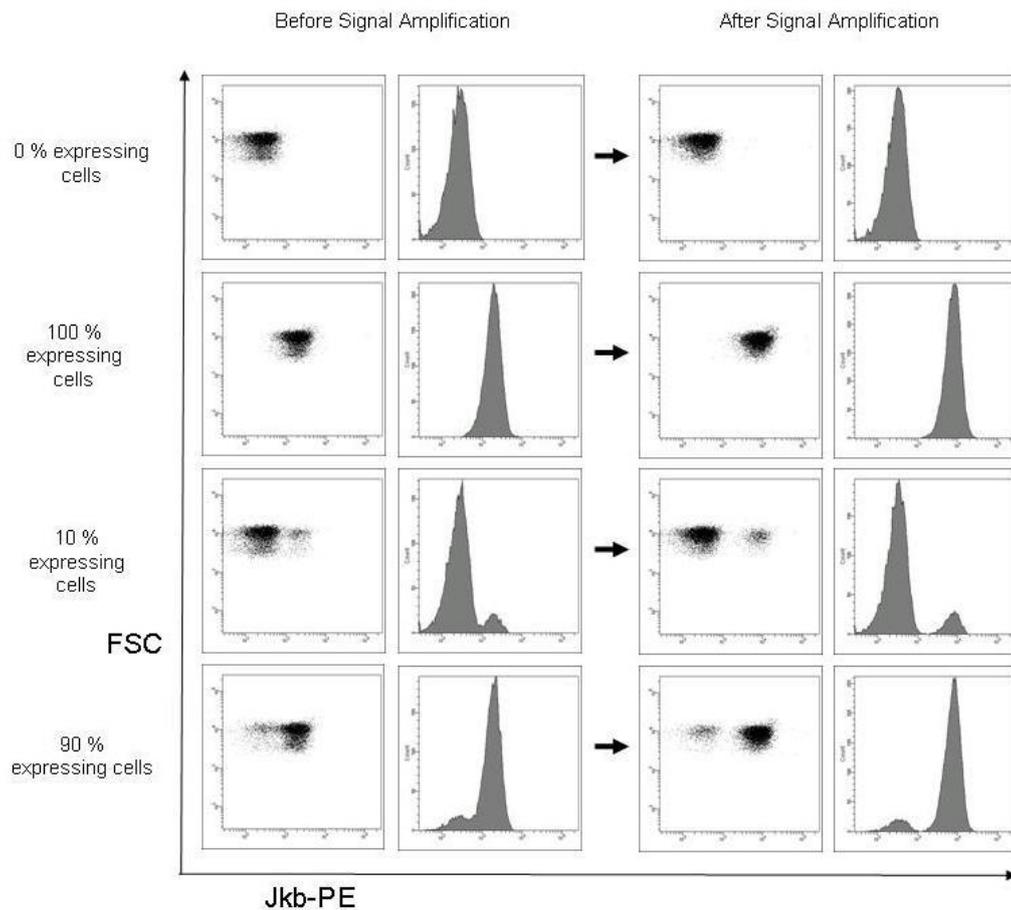


Abb.47: Kontrolle der Signalverstärkungsmethode für unterschiedliche Bedingungen (0%, 100% exprimierende Zellen und Gemische mit 10% und 90% exprimierenden Zellen).

4.8.6 Diskussion der Validierung.

Die Methode ist klar in der Lage Erythrozytenmischpopulationen zu identifizieren. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen wurden in dieser Studie nur acht und nicht zwölf Antigene untersucht. Ein Grund dafür war, dass einige Antigene mit einer sehr hohen Frequenz in der Population (zum Beispiel Kell k 99,8%) nur eine marginale Verbesserung in der Spezifität bieten, ein anderer Grund ein von uns festgestelltes schlechtes Antigen-Antikörper Bindeverhalten (zum Beispiel Anti-S).

Tests für die Robustheit der Methode zeigten, dass die Methode adäquat für qualitative Untersuchungen ist, allerdings nicht für quantitative Aussagen. Die Rhesus Antikörper C, c, E und e zeigten schlechtere Ergebnisse für Nachweis-, Quantifizierungsgrenze und Präzision als die Duffy und Kidd Antikörper, was wahrscheinlich durch den Antikörpertyp IgM bedingt ist, der an mehrere Stellen binden und dadurch Agglutinationen verursachen kann. Die durchschnittliche Nachweisgrenze liegt unter 1% und ist für die meisten Antigene besser als 2%, was unter der Menge Fremdblut liegt, die bei einer Transfusion erwartet wird.

4.9 Überprüfung des Einflusses hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin.

Die Ergebnisse der Belastungstests sind in Tabelle 19 als Durchschnittswerte mit Standardabweichung für alle 20 Probanden dargestellt. Die erreichten Laktatwerte lagen zwischen 8,0 bis 11,0 mmol/l bei den Frauen und 6,6 bis 14,8 mmol/l bei den Männern. Die relative VO_2 max betrug zwischen 41,8 bis 56,7 ml/kg/min bei den Frauen und 52,1 bis 72,9 ml/kg/min bei den Männern. Auf dem SRM Fahrradergometer erzielten die Frauen Werte im Bereich 3,6 bis 5,2 Watt/kg und die Männer 4,1 bis 5,7 Watt/kg.

HR (max)	Watt (max)	Watt (kg/BW)	Laktat (mmol/l)	VO ₂ max (l)	VO ₂ max (ml/kg/min)
181,3±7,9	334,5±66,9	4,8±0,5	10,2±2,4	4,05±1.11	57,0±8,2

Tab.19: Ergebnisse des Ausbelastungstests dargestellt als Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller Probanden.

4.9.1 Einfluss auf die Matrix Urin und urinäre Proteine.

Der pH Wert des Urins sowie die Konzentration der urinären Proteine und von Kreatinin sind in Tabelle 20 aufgelistet, die die Werte vor und nach Belastung darstellt.

	Vor Belastung	Nach Belastung	Signifikanz
Total Protein (µg/ml)	37±18	121±106	p≤0,001
Albumin (µg/ml)	4,2±9,4	61,4±64	p≤0,001
Mikroglobulin-1-α (µg/ml)	0,8±2,2	7,3±7,6	p≤0,001
Kreatinin (µmol/ml)	6,0±4,3	5,8±4,9	n.s.
Erythropoietin (mU/ml)	2,5±1,4	3,4±1,5	p≤0,006
Protein/Kreatinin (µg/µmol)	8,8±5,2	26,1±14,4	p≤0,001
Albumin/Kreatinin (µg/µmol)	1,0±1,2	14,2±11,2	p≤0,001
pH	6,7±0,9	6,2±0,7	p≤0,006

Tab. 20: Urinäre Proteine und Ratios vor und nach Belastung.

Alle Probanden mit der Ausnahme von zwei Probandinnen zeigten einen signifikanten Anstieg der Total Protein und Albumin Konzentration. Nachdem die Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Kreatininwertes für Volumenveränderungen korrigiert wurden, zeigten auch diese Probandinnen einen signifikanten Anstieg. Bei sieben der 20 Probanden, konnte weder vor noch nach Belastung Mikroglobulin-1- α detektiert werden und nur 10 Probanden zeigten einen signifikanten Anstieg dieses Proteins nach der Belastung.

Die durchschnittliche urinäre Erythropoietinkonzentration war signifikant von 2,5 mU/ml vor Belastung auf 3,4 mU/ml nach Belastung erhöht ($p=0,006$).

4.9.2 IEF Ergebnisse vor und nach Belastung.

Bei allen Probanden traten urinäre EPO Isoformen im basischeren Bereich auf. Abbildung 48 zeigt exemplarisch die Elektropherogramme von vier Probanden vor und nach Belastung. Probe Eins ist der Kontrollstandard, zusammengesetzt aus rEPO (BRP) im Bereich der Kathode (oben) und NESP (Aranesp) im Bereich der Anode (unten), zur Definition der Bereiche des endogenen und exogenen EPOs. Die Proben zwei, vier, sechs und acht zeigen die Verteilung der EPO Banden vor Belastung und die Proben drei, fünf, sieben und neun die Verteilung der Banden nach Belastung.

Der Box-Plot in Abbildung 49 demonstriert für alle Probanden den hoch signifikanten Unterschied ($p\leq 0,001$) der EPO-Isoformen mit prozentualem Anteil im basischen Bereich (BAP) wenn Proben vor und nach Belastung

miteinander verglichen werden. Die Punkte 11 und 13 repräsentieren zwei Probanden die schon einen relativ hohen Wert vor Belastung aufwiesen.

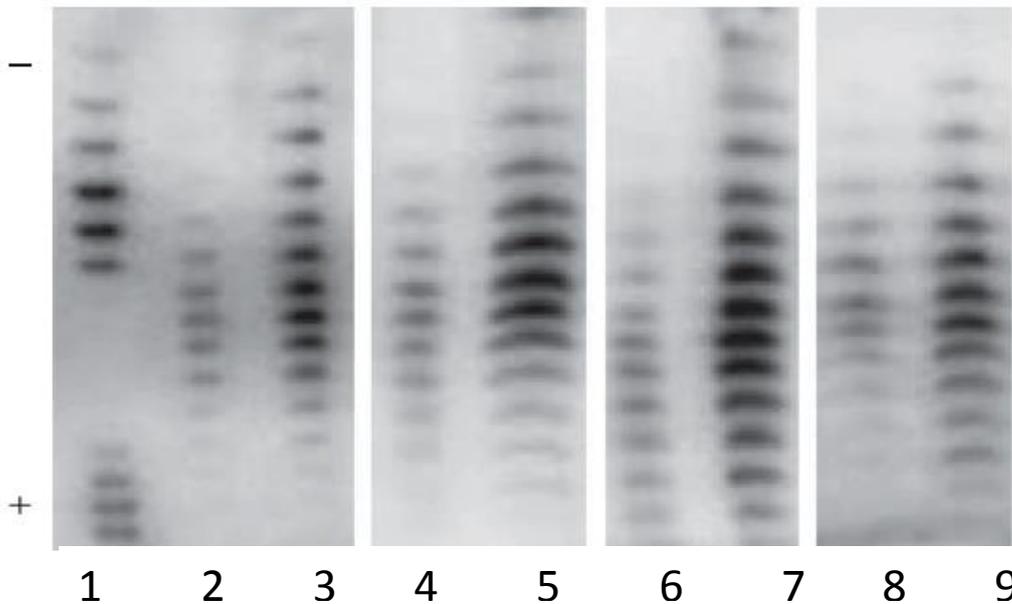


Abb.48: Beispiele für IEF Profile von urinärem Erythropoietin vor und nach hoch intensiver Belastung. Probe 1 zeigt den BRP Kontrollstandard für rekombinante Erythropoietine (Epoetin $\alpha+\beta$). Proben 2, 4, 6 and 8 wurden vor, Proben 3, 5, 7 und 9 nach Belastung abgegeben.

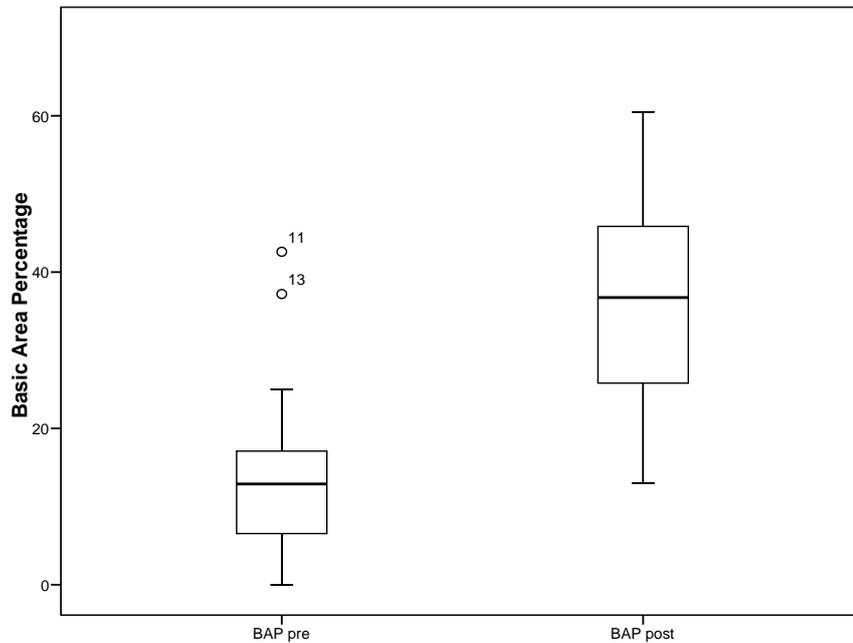


Abb.49: Prozentualer Anteil von EPO Isoformen im basischen Bereich vor und nach hochintensiver Belastung nach Analyse mit der IEF-Technik ($p \leq 0,001$).

4.9.3 SDS-PAGE Ergebnisse vor und nach Belastung

Die Ergebnisse der SDS-PAGE Technik zeigen eine deutlich intensivere EPO Bande für die Proben nach Belastung.

Beispiele für die SDS-PAGE Analyse sind in Abbildung 50 ersichtlich, die Proben von vier Probanden vor und nach hoch intensiver Belastung darstellt. Probe eins zeigt einen positiven Kontrollstandard (Epoetin delta). Die Proben zwei, vier, sechs und acht sind vor Belastung und die Proben drei, fünf, sieben und neun sind nach Belastung entnommen worden. Probe zehn besteht aus dem negativen Kontrollstandard.

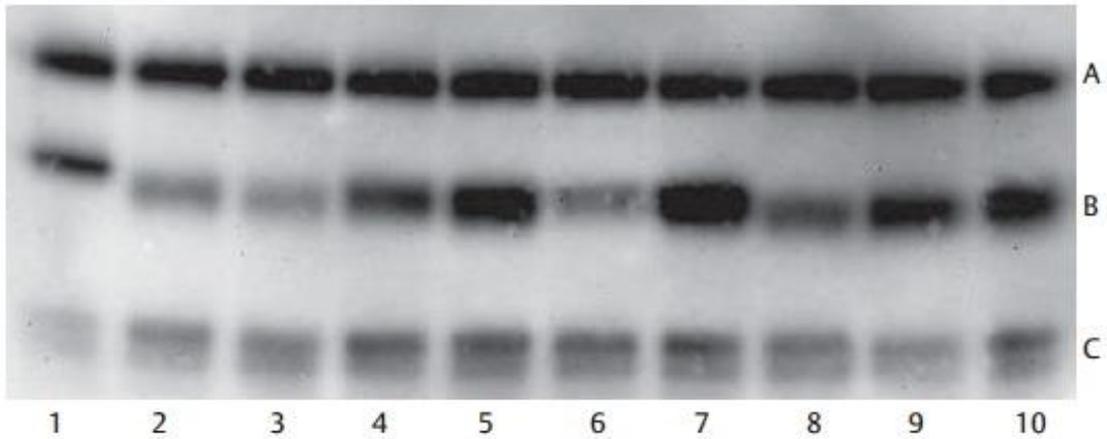


Abb.50: Beispiele für SDS-PAGE Ergebnisse von urinärem Erythropoietin vor und nach hoch intensiver Belastung. Probe 1 repräsentiert einen positiven Kontrollstandard. Proben 2, 4, 6 und 8 sind vor und Proben 3, 5, 7 und 9 Proben nach Belastung. Probe 10 zeigt einen negativen Kontrollstandard. A= NESP, B= Probe, C= Ratten EPO.

Die errechnete relative Mobilität zeigte einen hoch signifikanten Abfall nach Belastung ($p \leq 0,001$), was der Box-Plot in Abbildung 51 darstellt.

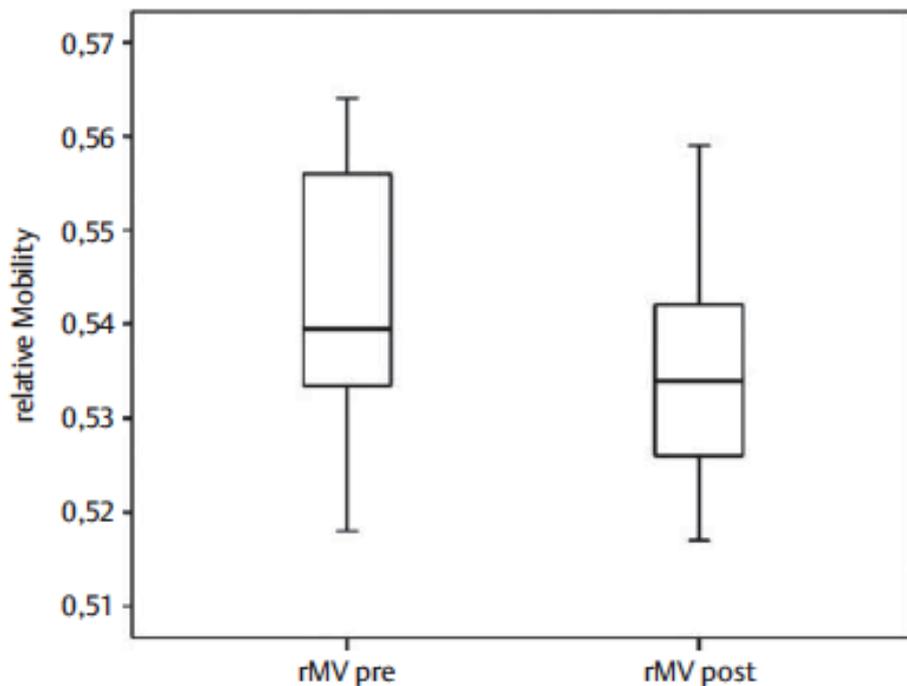


Abb.51: Veränderung der relativen Mobilität von EPO für alle Proben vor und nach hoch intensiver Belastung nach Analyse mit der SDS-PAGE Technik ($p \leq 0,001$).

4.9.4 Diskussion der Ergebnisse

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen $VO_2\max$, Laktatkonzentration, maximaler Wattzahl auf dem SRM und relativer Mobilität oder BAP festgestellt werden. Die Veränderungen waren unabhängig vom Fitnesslevel des jeweiligen Probanden und das Auftreten von Isoformen im mehr basischen Bereich schien nur von der hochintensiven Belastung induziert zu werden. Unklar ist, ob das Auftreten von Banden im höher basischen Bereich der IEF Methode mit einer Ausscheidung von weniger glykosylierten oder sulfatierten endogenen EPO Isoformen zusammenhängt. In einer Veröffentlichung von Lasne [84] zum Unterschied

der isoelektrischen Profile von EPO aus Serum und EPO aus Urin wird beschrieben, dass es zu einer Ansäuerung des EPOs bei Passage der Niere kommen könnte, die in einem strukturellen Unterschied der EPO Isoformen resultiert. Die Autorin schreibt, dass bei belastungsinduzierter Proteinurie dieser Ansäuerungsprozess vermindert sein könnte, so dass eine Mischung von Serum und Urin EPO Isoformen auftritt. Eine weitere Erklärung könnte die höhere EPO Konzentration nach Belastung sein – vorher schwache Banden würden vielleicht durch die höhere Konzentration sichtbar.

Alle Nachbelastungsproben zeigten höhere Werte für die BAP, jedoch wurden die WADA Kriterien zur Definition einer positiven Probe in keinem Fall erfüllt, was die Stabilität der Methode bestätigt.

Als Effekt von Belastung auf die urinäre Proteinausscheidung beschreibt Poortmans das Auftreten einer Mischtyp Proteinurie, die durch eine erhöhte glomeruläre Permeabilität und einer verminderten tubulären Reabsorption gekennzeichnet ist [76]. Bei Anwendung der britischen Richtlinien für chronische Nierenerkrankungen von 2005, die Proteinurie mit einer Protein/Kreatinin Ratio >45 mg/mmol oder Albumin/Kreatinin Ratio >30 mg/mmol definieren, erfüllten allerdings nur drei unserer 20 Probanden diese Kriterien und dies, obwohl sie sich komplett ausbelasteten.

In unserer Untersuchung konnten wir außerdem keine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration der unterschiedlichen Proteine, der Protein/Kreatinin Ratio oder Albumin/Kreatinin Ratio und des Anteils der urinären Isoformen im basischen Bereich (BAP), oder der relativen Mobilität (rMV) des urinären EPOs mit der SDS-PAGE Technik feststellen. Des

Weiteren gab es keine signifikante Korrelation zwischen BAP und rMV vor und nach Belastung zu den oben genannten Parametern.

Interessanterweise stimmen die hier vorgestellten Ergebnisse nicht mit einer vergleichbaren Studie überein, die einen parallelen Anstieg der BAP mit der urinären Proteinkonzentration beobachten konnte [85]. Dieser Unterschied könnte mit der Methode zur Quantifizierung des urinären Proteins, der Anzahl und dem Geschlecht der Probanden oder auch dem Belastungsprotokoll erklärt werden – Parameter, die sich in den Studien unterscheiden.

Aus den Daten unserer Studie können wir schließen, dass die Analyse der urinären Proteinkonzentration keine valide Methode darstellt, um zwischen rekombinatem humanen Erythropoietin und einem belastungsinduziertem Auftreten von EPO-Isoformen im basischen Bereich zu unterscheiden.

Bei den rMVs der SDS-PAGE Technik konnten keine Werte über 0,559 demonstriert werden, was weit unter der Obergrenze des 99,9% Vertrauensintervalls für verdächtige Proben liegt. Die Banden nach Belastung waren intensiver verglichen mit den Werten vor Belastung, was durch eine erhöhte EPO Konzentration in den Nachbelastungsurinen erklärt werden könnte.

Im Allgemeinen konnten wir für die SDS-PAGE Methode eine Verminderung der rMV nach Belastung feststellen und keine Verlagerung der Banden in den Bereich des rekombinanten EPOs, wie es bei der isoelektrischen Fokussierungsmethode der Fall ist.

Als Ergebnis unserer Studie können wir festhalten, dass die hier beschriebene SDS-PAGE Methode eine hervorragende Möglichkeit darstellt

um zwischen Belastungsurinen und rekombinantem humanen Erythropoietin zu unterscheiden. Damit kann diese Methode zur Bestätigung von verdächtigen Proben genutzt werden und somit deutlich das Vertrauen in die Qualität der analytischen Ergebnisse erhöhen.

5 Zusammenfassung/ Fazit

Die hier vorliegende Arbeit hat folgende Themengebiete mit Relevanz in der Dopinganalytik untersucht:

1. Die Lagerungsstabilität von zellulären Blutparametern.
2. Den Einfluss unterschiedlicher Analysegeräte auf Hämoglobinmasse, Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.
3. Die Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung.
4. Den Einfluss einer Flugreise auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten.
5. Den diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration vor und während eines Etappenrennens im Radsport.
6. Den Einfluss von belastungsinduzierten Schwankungen im Plasmavolumen auf die Hämoglobinkonzentration.
7. Die Validität der Methode zur direkten Detektion der homologen Bluttransfusion.
8. Den Einfluss hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin.

Zu 1.:

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass zur Harmonisierung der präanalytischen Bedingungen von Blutproben eine gekühlte Lagerung um 4°C klar gegenüber einer Lagerung um 21°C zu favorisieren ist. Bei einer Temperatur von 4°C können die Parameter Erythrozyten, Hämoglobin, Retikulozytenzahl, Retikulozytenprozent, Zellhämoglobin der Retikulozyten, Prozent der hypochromen Erythrozyten, Retikulozyten mit hoher

Fluoreszenz und der OFF-Score bis zu 48 Stunden analysiert werden. Bei einer Lagerungstemperatur von 21°C sollte die Analyse der Proben innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Parameter, die eine ausreichende Stabilität bei 21°C aufweisen sind die Erythrozyten, Hämoglobin, Retikulozytenzahl, Retikulozytenprozent und OFF-Score.

Zu 2.:

Geräteunterschiede können dazu führen, dass die Differenz der Hämoglobinkonzentration durchschnittlich 0,38 g/dl und die des Retikulozytenprozentwerts durchschnittlich 0,33 % beträgt (Sysmex KX21N und R500 verglichen mit Siemens ADVIA120). Bei der Bestimmung der Hämoglobinmasse mit dem Radiometer OSM3 und dem Roche Cobas 221 konnte ein Unterschied von durchschnittlich 83 g dokumentiert werden. Dies zeigt, dass im Rahmen des biologischen Passes oder in wissenschaftlichen Zeitreihenstudien, Messungen auf dem gleichen Gerätetyp eine Grundvoraussetzung darstellt.

Zu 3.:

Die Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmasse am selben Analysegerät wurde durch Messungen innerhalb von zwei Tagen untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten eine durchschnittliche Abweichung von 17,8 g ($\pm 15,8$ g). Die höchste gemessene Abweichung betrug 67,3 g, ohne dass ein Fehler in der Anwendung der Methode erkennbar war. Aus der Messunsicherheit wird deutlich, dass die Hämoglobinmassenbestimmung in Bereich des biologischen Passes nur beschränktes Potential aufweist. Die Methode ist nicht sensitiv genug, um die Verabreichung eines

Erythrozytenkonzentrates das 50g Hämoglobin enthält, sicher zu detektieren.

Zu 4. und 5.:

Wir konnten zeigen, dass eine achtstündige Flugreise mit zwei Stunden Zeitunterschied keinen Einfluss auf die Hämoglobinkonzentration und den Retikulozytenprozentwert hat und dass der diurnale Rhythmus dieser Parameter selbst während eines Etappenrennens bestehen bleibt – beides wichtige Informationen bei der Interpretation von Daten des biologischen Passes.

Zu 6.:

Belastungsinduzierte Schwankungen des Plasmavolumens weisen eine sehr hohe Relevanz bezüglich der Parameter des biologischen Passes auf. Ein Proband der in dieser Arbeit beschriebenen Studie erreichte innerhalb von 5 Tagen eine Vergrößerung seines Plasmavolumens um 1389 ml, was einen Abfall der Hämoglobinkonzentration von 15,7 g/dl auf 12,9 g/dl bedeutete. Diese Daten machen deutlich, dass der Zeitpunkt der Probennahme und der Einfluss von Belastung in der Interpretation von Blutwerten des biologischen Passes immer berücksichtigt werden müssen.

Zu 7.:

Zur Überprüfung der Validität der durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung von homologen Bluttransfusionen wurde die Spezifität, Präzision, Linearität und Robustheit untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten eine Spezifität von 100%. Die Präzision betrug je nach Antikörper 2,7% bis 19,8%. Antikörper des IgG Typs wiesen verglichen mit dem IgM Typ eine bessere Präzision auf. Die Linearität wurde für alle untersuchten Antigene

bestätigt. Die Methode wurde als robust für qualitative, allerdings nicht für quantitative Aussagen bewertet. Die durchschnittliche Nachweisgrenze liegt unter 1% und ist für die meisten Antigene besser als 2%, was unter der Menge Fremdblut liegt, die bei einer Transfusion erwartet wird.

Zu 8.:

In der Untersuchung zum Einfluss von hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinatem Erythropoietin konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen $VO_2\text{max}$, Laktatkonzentration, maximaler Wattzahl auf dem SRM und relativer Mobilität oder BAP feststellen. Alle Nachbelastungsproben zeigten höhere Werte für die BAP, jedoch wurden die WADA Kriterien zur Definition einer positiven Probe in keinem Fall erfüllt. Die relative Mobilität zeigte keine Werte über 0,559, was weit unter der Obergrenze des 99,9% Vertrauensintervalls für verdächtige Proben liegt. Die relative Mobilität war nach Belastung vermindert und es gab keine Verlagerung der Banden in den Bereich des rekombinanten EPOs. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die SDS-PAGE eine Möglichkeit darstellt, um zwischen Belastungsurinen und rekombinatem humanen Erythropoietin zu unterscheiden.

Fazit:

Die Entwicklung von neuen Nachweisverfahren ist eine ständige Aufgabe im Kampf gegen Doping. Neue Nachweisverfahren werden getestet um den hohen Qualitätsansprüchen von ISO und WADA gerecht zu werden. Bei der Validierung der Methoden werden hauptsächlich analytische Einflüsse untersucht. Es wurde in dieser Arbeit aufgezeigt, dass Methoden, die in der Medizin oder Sportwissenschaft eine ausreichende Validität zeigen, noch lange nicht ohne weiteres in der Dopinganalytik angewandt werden können. Proben in der Dopinganalytik stammen von Hochleistungssportlern, die extremen physiologischen Einflussfaktoren ausgesetzt sein können und die sich in ihrer Prädisposition von „Durchschnittsmenschen“ unterscheiden. Um höchstmögliches Vertrauen in Analyseergebnisse zu gewährleisten sollten analytische Methoden immer interdisziplinär betrachtet werden. Dies erfordert die Expertise von Naturwissenschaftlern, Sportwissenschaftlern und Medizinern.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Benötigtes Equipment zur Hämoglobinmassenbestimmung.
Blutgasanalysegerät nicht abgebildet.
Seite 27

Abb.2: Prinzip der direkten und indirekten Markierung von Oberflächen-
antigenen auf Zellen.
Seite 31

Abb.3: Prinzip der Durchflusszytometrie.
Seite 31

Abb.4: Darstellung unterschiedlicher EPO-Formen als Ergebnis der
isoelektrischen Fokussierung mit anschließendem Doppel-Blot. Modifiziert
nach WADA TD2009EPO
Seite 38

Abb.5: Darstellung unterschiedlicher EPO-Formen als Ergebnis der SDS-
PAGE mit nachfolgendem Blot. Modifiziert nach WADA TD2009EPO. BRP
(Biological Reference Preparation)= Gemisch aus Epoetin α und β . Erypo,
Hemax und Alfaepetina= Epoetin α . Neorecormon= Epoetin β . CERA=
Epoetin β konjugiert mit Methoxypolyethylenglycolpolymer. NESP=
Darbepoetin α . Dynepo= Epoetin Δ . uEPO (NIBSC)= urinäres EPO
(National Institute for Biological Standards and Controls)..
Seite 42

Abb.6: Verdächtige Proben, nach unauffälligem Stabilitätstest, die nicht
den oben beschriebenen Identifikationskriterien entsprechen.
Seite 74

Abb.7: Biosimilars von links nach rechts: rEPO und NESP, Repotin,
unbekanntes EPO aus China Nummer 3, unbekanntes EPO aus China
Nummer 2, EPIAO, rEPO und NESP, unbekanntes EPO aus Russland 1,
unbekanntes EPO aus Russland 2.
Seite 74

Abb.8: Biosimilars von links nach rechts: Dynepo, unbekanntes EPO aus
Russland Nummer 1, unbekanntes EPO aus Russland Nummer 2,
unbekanntes EPO aus China Nummer 1, unbekanntes EPO aus China
Nummer 2, unbekanntes EPO aus China Nummer 3, Repotin, EPO-zeta,
rEPO, NIBSC.
Seite 75

Abb.9: Grafische Darstellung des Belastungsprotokolls.
Seite 77

Abb.10: Erythrozyten [$\times 10^6/\mu\text{l}$]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 81

Abb.11: Hämoglobin [g/dl]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 81

Abb.12: Hämatokrit [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 82

Abb.13: Retikulozyten [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 82

Abb.14: Mittleres Zellvolumen [fl]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 83

Abb.15: Makrozyten [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 83

Abb.16: hypochrome Erythrozyten [%]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 84

Abb.17: Retikulozytenzahl [$\times 10^9/l$]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 84

Abb.18: Mittleres Zellvolumen der Retikulozyten. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 85

Abb.19: Zellhämoglobin der Retikulozyten. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 85

Abb.20: Retikulozyten mit hoher Fluoreszenz. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 86

Abb.21: OFF-Score [OFF-hr]. Die obere Reihe zeigt die Lagerungsdaten des Bluts bei 21°C, die untere für 4°C.
Seite 86

Abb.22: Korrelation der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 1 (n=34).
Seite 92

Abb.23: Bland Altman Plot der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 1. (n=34)
Seite 92

Abb.24: Korrelation der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 2 (n=120).
Seite 93

Abb.25: Bland Altman Plot der Hämoglobin Konzentration für ADVIA120 und Sysmex KX21N in Untersuchung 2. (n=120)
Seite 93

Abb.26: Korrelation der Hämoglobin Konzentration für die beiden Sysmex XT2000i in Untersuchung 3 (n=15)
Seite 94

Abb.27: Bland Altman Plot der Hämoglobin Konzentration für die beiden Sysmex XT2000i in Untersuchung 3. (n=15)
Seite 94

Abb.28: Korrelation der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 1. (n=34)
Seite 95

Abb.29: Bland Altman Plot der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 1. (n=34)
Seite 95

Abb.30: Korrelation der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 2. (n=120)
Seite 96

Abb.31: Bland Altman Plot der Retikulozyten (%) für ADVIA120 und Sysmex R500 in Untersuchung 2. (n=120)
Seite 96

Abb.32: Korrelation der Retikulozyten (%) für die beiden Sysmex XT2000i Geräte in Untersuchung 3. (n=15)
Seite 97

Abb.33: Bland Altman Plot der Retikulozyten (%) für die beiden Sysmex XT2000i Geräte in Untersuchung 3. (n=15)
Seite 97

Abb.34: Boxplot Diagramm der Hämoglobinkonzentration für den Tag der Flugreise (Studyday 1) und den Folgetag (Studyday 2). Sampling Time 1 =

Morgen-Probe. Sampling Time 2 = Abend-Probe.
Seite 100

Abb.35: Boxplot Diagramm der Hämoglobinkonzentration der Probanden am Morgen (Sampling Time 1) und am Abend (Sampling Time 2) über den gesamten Studienverlauf.

Seite 101

Abb.36: Plasmavolumen am Morgen. Proband 5 (Punkte 65-76) mit höchstem PV. Probanden 4 (60) und 9 (134, 135) mit noch hohem PV am Ende der Studie.

Seite 105

Abb.37: Plasmavolumen am Abend, Proband 5 mit sehr hohen Werten (Punkte 64-74, auch beste VO₂max), Proband 12 (173) mit niedrigsten PV wird zum Ausreisser an Tag 7.

Seite 105

Abb.38: Bland Altman Plot von HB-Masse Bestimmungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. (n=30)

Seite 109

Abb.39: Korrelation der HB-Masse Ergebnisse nach Messung auf dem Radiometer ABL80 und Roche Cobas b221. (n=36)

Seite 113

Abb.40: Bland Altman Plot der HB Masse gemessen auf dem Radiometer ABL80 und Roche Cobas b221. Die Geräte zeigen eine durchschnittliche Differenz von 47,7 g mit einer Standardabweichung von 49,8 g (höhere Werte für den ABL80) (n=36).

Seite 113

Abb.41: Korrelation der HB-Masse Ergebnisse nach Messung auf dem Radiometer OSM3 und Roche Cobas b221. (n=36)

Seite 114

Abb.42: Bland Altman Plot der HB Masse gemessen auf dem Radiometer OSM3 und Roche Cobas b221. Die Geräte zeigen eine durchschnittliche Differenz von 83 g mit einer Standardabweichung von 63,7 g (höhere Werte für den OSM3) (n=36).

Seite 114

Abb.43: Korrelation der HB-Masse Ergebnisse nach Messung auf dem Radiometer ABL80 und OSM3. (n=36)

Seite 115

Abb.44: Bland Altman Plot der HB Masse gemessen auf dem Radiometer ABL80 und OSM3. Die Geräte zeigen eine durchschnittliche Differenz von 35,4 g mit einer Standardabweichung von 91,5 g (höhere Werte für den

OSM3) (n=36).
Seite 115

Abb.45: Gemisch von 95% schwach exprimierenden Zellen (Antigen C) mit 5% nicht –exprimierenden Zellen ohne Signalverstärkung. Es ist nur ein Population sichtbar.
Seite 119

Abb.46: Gleiche Probe wie in Abb.32, jedoch nach Behandlung mit der Signalverstärkungsmethode. Man erkennt zwei Populationen.
Seite 119

Abb.47: Kontrolle der Signalverstärkungsmethode für unterschiedliche Bedingungen (0%, 100% exprimierende Zellen und Gemische mit 10% und 90% exprimierenden Zellen).
Seite 121

Abb.48: Beispiele für IEF Profile von urinärem Erythropoietin vor und nach hoch intensiver Belastung. Probe 1 zeigt den Kontrollstandard für rekombinante Erythropoietine. Proben 2, 4, 6 and 8 wurden vor, Proben 3, 5, 7 und 9 nach Belastung abgegeben.
Seite 125

Abb.49: Prozentualer Anteil von EPO Isoformen im basischen Bereich vor und nach hochintensiver Belastung nach Analyse mit der IEF-Technik ($p \leq 0,001$).
Seite 126

Abb.50: Beispiele für SDS-PAGE Ergebnisse von urinärem Erythropoietin vor und nach hoch intensiver Belastung. Probe 1 repräsentiert einen positiven Kontrollstandard. Proben 2, 4, 6 und 8 sind vor und Proben 3, 5, 7 und 9 Proben nach Belastung. Probe 10 zeigt einen negativen Kontrollstandard. A= NESP, B= Probe, C= Ratten EPO.
Seite 127

Abb.51: Veränderung der relativen Mobilität von EPO für alle Proben vor und nach hoch intensiver Belastung nach Analyse mit der SDS-PAGE Technik ($p \leq 0,001$).
Seite 128

6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ungefähre Anzahl der jeweiligen Antigene pro Erythrozyt in Abhängigkeit vom Phänotyp [45].

Seite 32

Tab.2: Auftreten des Duffy Antigens in unterschiedlichen Populationen in Abhängigkeit vom Phänotyp [46].

Seite 34

Tab.3: Auftreten des Kidd Antigens in unterschiedlichen Populationen in Abhängigkeit vom Phänotyp [46].

Seite 35

Tab.4: Kontrollwerte für die Kontrollen NORMAL und ABNORMAL2 für den kompletten Zeitraum der Untersuchung. Dargestellt sind \bar{x} (Durchschnittswert) und CV% (Variationskoeffizient in Prozent).

Seite 47

Tab.5 : Details zu den Probanden. Dargestellt sind \bar{x} (Durchschnittswert) und SD (Standardabweichung).

Seite 50

Tab.6: Details zu den Probanden. Dargestellt sind \bar{x} (Durchschnittswert) und SD (Standardabweichung).

Seite 53

Tab. 7: Details zu den Etappen eins bis fünf.

Seite 56

Tab. 8: Details zu den Etappen sechs bis neun.

Seite 56

Tab. 9: Leistungsfähigkeit der Probanden ausgedrückt als relative maximale Sauerstoffaufnahme.

Seite 59

Tab.10: Details zu den primären Antikörpern.

Seite 67

Tab.11 Details zu den sekundären Antikörpern

Seite 67

Tab. 12: "Kleine" Blutgruppen der Probanden. Expression des Antigens ist mit einem Plus gekennzeichnet (+).

Seite 71

Tab. 13: Plasmavolumendaten der Probanden 1 – 15 (P 1-15) am Morgen.

Seite 103

Tab. 14: Plasmavolumendaten der Probanden 1 – 15 (P 1-15) am Abend.
Seite 104

Tabelle 15: Daten zur HB-Masse in Doppelbestimmung an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen.
Seite 110

Tab.16: Spezifität der Methode. Die Analyse zeigte keine Doppelpopulation.
Seite 117

Tab. 17: Präzision innerhalb eines Tages als CV%.
Seite 117

Tab. 18: Nachweisgrenze (LOD), Quantifizierungsgrenze (LOQ) und Wiederfindung.
Seite 118

Tab.19: Ergebnisse des Ausbelastungstests dargestellt als Durchschnitt und Standardabweichung aller Probanden.
Seite 123

Tab. 20: Urinäre Proteine und Ratios vor und nach Belastung.
Seite 123

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ABPS (Athlete Biological Passport Score)

ATP (Adenosintriphosphat)

BAP (Basic Area Percentage)

BHK (Baby Hamster Kidney)

BRP (Biological Reference Preparation)

C° (Grad Celsius)

CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator)

CFU-E (Colony Forming Unit Erythropoietic)

CHr (Cell Haemoglobin of Reticulocytes)

CO (Carbonmonoxid)

COHb% (Carbonmonoxidhämoglobin Prozent)

CREB (cAMP response element-binding)

CV% (Variationskoeffizient in Prozent)

DARC (Duffy Receptor for Chemokines)

dL (Deziliter)

DSHS (Deutsche Sport Hochschule)

2,3 DPG (2,3 Di-Phosphoglyzerat)

EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

EPO (Erythropoietin)

FIS (Federation International du Ski)

FITC (Fluoreszinisothiocyanat)

g (Gramm)

g/dL (Gramm pro Deziliter)

Hb (Hämoglobin)

Hct (Hämatokrit)

HFR (hochfluoreszente Retikulozyten)

HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1)

HIV (Human Immun Deficiency)

Hypo% (Prozent hypochrome Erythrozyten)

IAF (International Athletic Federation)

IAAF (International Association of Athletics Federations)

IEF (isoelektrische Fokussierung)

IgG (Immunglobulin G)

IgM (Immunglobulin M)

ISU (International Skating Union)

IU (Internationale Einheit)

JAK2 (Janus Kinase 2)

KCN (Kaliumcyanid)

K₂EDTA (Di-Kalium Ethylendiamintetraazetat)

L (Liter)

Macro% (Prozent Makrozyten)

MCH (Mean Cell Haemoglobin)

MCHC (Mean Cell Haematocrit)

MCV (Mean Cell Volume)

mg (Milligramm)

min (Minuten)

ml (Milliliter)

mmol (millimol)

NADA (Nationale Anti Doping Agentur)

NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein)

NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control)

nm (Nanometer)

PE (Phycoerythrin)

PVDF (Polyvinylidenfluorid)

RBC (Red Blood Cells)

rhEPO (recombinant human Erythropoietin)

rEPO (recombinant Erythropoietin)

Reti% (Prozent Retikulozyten)

Reti# (Retikulozytenzahl)

rMV (relative Mobility Value)

SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese)

SLS (Sodiumlaurylsulfat)

SNP (Single Nucleotid Polymorphism)

STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5)

Subj (Subject)

TD (Technical Document)

UCI (Union Cycliste Internationale)

µl (Mikroliter)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VO2max (maximale Sauerstoffaufnahme)

WADA (World Anti Doping Agency)

WHO (World Health Organisation)

7 Literatur

1. WADA. A brief history of Anti-Doping. 2012 [cited 2012 10.10.2012]; Available from: <http://www.wada-ama.org/en/about-wada/history/a-brief-history-of-anti-doping/>.
2. Hollmann W, Strüder HK. Zum Doping, in Sportmedizin. 2009, Schattauer: Stuttgart.
3. Donike, M., Doping, in TRAINERAKADEMIE KÖLN E.V. Ausgesuchte Kapitel, Studienbrief der Trainerakademie Köln des Deutschen Sportbundes. 1990, Hofmann-Verlag Schorndorf: Köln. 185-231.
4. Wikipedia. Doping. 2011 [cited 2011 13.12.2011]; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Doping>.
5. WADA. WADA Prohibited List. 2011 [cited 2011 13.12.2011]; Available from: http://wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/To_be_effective/WADA_Prohibited_List_2011_EN.pdf.
6. Eckstein, Die Pathophysiologie der Blutspende., in Immunhämatologie und Transfusionsmedizin. 2005, Elsevier: München.
7. Schneider, Konservierung menschlichen Blutes, in Klinische Transfusionsmedizin. 1982, Edition Medizin: Weinheim.
8. Eckstein, Die Vollblutkonserve, in Immunhämatologie und Transfusionsmedizin. 2005, Elsevier: München.
9. Eckstein, Das Erythrozytenkonzentrat, in Immunhämatologie und Transfusionsmedizin. 2005, Elsevier: München.
10. Eckstein, Das kryokonservierte Erythrozytenkonzentrat, in Immunhämatologie und Transfusionsmedizin. 2005, Elsevier: München.
11. Mallorquí J, Segura J, de Bolòs C, Gutierrez-Gallego R, Pascual JA: Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. Haematologica, 2008. 93(2): 313-4.
12. Jelkmann, W., Molecular Biology of Erythropoietin. Internal Medicine 2004. 43(8): 649-659.
13. WHO. 2008 [cited 2011 13.12.2011]; Available from: http://www.who.int/medicines/services/inn/CompleteBioRevdoc%2008-11-07_2_.pdf.
14. Nature. [cited 2011 13.12.2011]; Available from: <http://www.nature.com/nbt/journal/v26/n12/full/nbt1208-1322c.html>.
15. Ekblom B, Goldberg AN, Gullbring B: Response to exercise after blood loss and reinfusion. J Appl Physiol, 1972. 33(2): 175-80.

16. Buick FJ, Gledhill N, Froese AB, Spriet L, Meyers EC: Effect of induced erythrocythemia on aerobic work capacity. *J Appl Physiol*, 1980. 48(4): 636-42.
17. Spriet LL, Gledhill N, Froese AB, Wilkes DL: Effect of graded erythrocythemia on cardiovascular and metabolic responses to exercise. *J Appl Physiol*, 1986. 61(5): 1942-8.
18. Sawka MN, Gonzalez RR, Young AJ, Muza SR, Pandolf KB, Latzka WA, Dennis RC, Valeri CR: Polycythemia and hydration: effects on thermoregulation and blood volume during exercise-heat stress. *Am J Physiol*, 1988. 255(3 Pt 2): R456-63.
19. Sawka MN, Dennis RC, Gonzalez RR, Young AJ, Muza SR, Martin JW, Wenger CB, Francesconi RP, Pandolf KB, Valeri CR: Influence of polycythemia on blood volume and thermoregulation during exercise-heat stress. *J Appl Physiol*, 1987. 62(3): 912-8.
20. Robertson RJ, Gilcher R, Metz KF, Skrinar GS, Allison TG, Bahnson HT, Abbott RA, Becker R, Falkel JE: Effect of induced erythrocythemia on hypoxia tolerance during physical exercise. *J Appl Physiol*, 1982. 53(2): 490-5.
21. Ekblom B, Berglund B: Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. *Scand J Med Sci Sports*, 1991. 1: 88-93.
22. Russel G, Gore CJ, Ashenden MJ: Effects of prolonged low doses of recombinant human erythropoietin during submaximal and maximal exercise. *Eur J Appl Physiol*, 2002. 86(5): 442-9.
23. Thomson JJ, Rentsch RL, Robach P: Prolonged administration of recombinant human erythropoietin increases submaximal performance more than maximal aerobic capacity. *Eur J Appl Physiol*, 2007. 101: 481-486.
24. Berglund, B: Effekte und Nebenwirkungen von Blut- und Erythropoietin. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 1999. 50(11+12): 350-354.
25. 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(2): 125-130.
26. Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC: The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovascular Research*, 2003. 59: 538-548.
27. Shi Z, Hodges VM, Dunlop EA, Percy MJ, Maxwell AP, El-Tanani M, Lappin TR: Erythropoietin-Induced Activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK Pathways Promotes Malignant Cell Behaviour in a Modified Breast Cancer Cell Line. *Mol Cancer Res*, 2010. 8: 615-626.
28. Birkeland KL, Donike M, Ljungquist A, Fagerhol M, Jensen J, Hermmersbach P, Offerbro H, Haug E: Blood sampling in doping control. First experiences from regular testing in athletics. *Int J Sports med*, 1997. 18(1): 8-12.

29. Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden MJ, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG: A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica*, 2000. 85(6): 564-572.
30. Parisotto R, Wu M, Ashenden MJ, Emslie KR, Gore CJ, Howe C, Kazlauskas R, Sharpe K, Trout GJ, Xie M: Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica*, 2001. 86(2): 128-137.
31. Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, Stray-Gundersen J, Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Hahn AG: Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, 2003. 88(3): 333-44.
32. Parisotto R, Ashenden MJ, Gore CJ, Sharpe K, Hopkins W, Hahn AG: The effect of common hematologic abnormalities on the ability of blood models to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, 2003. 88(8): 931-940.
33. Ashenden MJ, Gore CJ, Parisotto R, Sharpe K, Hopkins WG, Hahn AG: Effect of altitude on second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*, 2003. 88(9): 1053-1062.
34. Sharpe K, Ashenden MJ, Schumacher YO: A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica*, 2006. 91(3): 356-63.
35. Sottas PE, Robinson N, Saugy M: The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. *Handb Exp Pharmacol*, 2010(195): 305-26.
36. Sharpe K, Hopkins W, Emslie KR, Howe C, Trout GJ, Kazlauskas R, Ashenden MJ, Gore CJ, Parisotto R, Hahn AG: Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica*, 2002. 87(12): 1248-1257.
37. Achtzehn S, de Marees M, Voss SC, Sperlich B, Romberg S, Schänzer W, Mester J: Retikulozyten: Untersuchungen zur Referenzwertermittlung und zum Vergleich unterschiedlicher Laboranalysegeräte. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 2010. 6(9): 208-215.
38. Robinson, N, Sottas PE, Pottgiesser T, Schumacher YO, Saugy M: Stability and robustness of blood variables in an antidoping context. *Int J Lab Hematol*, 2011. 33(2): 146-53.
39. Sottas PE, Robinson N, Rabin O, Saugy M: The athlete biological passport. *Clin Chem*, 2011. 57(7): 969-976.
40. Schmidt W, Prommer N: The optimised CO-rebreathing method: a new tool to determine total haemoglobin mass routinely. *Eur J Appl Physiol*, 2005. 95(5-6): 486-95.

41. Prommer N, Sottas PE, Schoch C, Schumacher YO, Schmidt W: Total hemoglobin mass--a new parameter to detect blood doping? *Med Sci Sports Exerc*, 2008. 40(12): 2112-8.
42. Mørkeberg J, Sharpe K, Belhage B, Damsgaard R, Schmidt W, Prommer N, Gore CJ, Ashenden MJ: Detecting autologous blood transfusions: a comparison of three passport approaches and four blood markers. *Scand J Med Sci Sports*, 2011. 21(2): 235-243.
43. Gough CE, Sharpe K, Ashenden MJ, Anson JM, Saunders PU, Garvican LA, Bonetti DL, Gore CJ, Prommer N: Quality control technique to reduce the variability of longitudinal measurement of hemoglobin mass. *Scand J Med Sci Sports*, 2011. 21(6): 365-371.
44. NCBI. [cited 2012 30.12.2012]; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269.
45. Daniels G, Bromilow I: *Essential Guide to blood groups*. 2010.
46. NCBI. [cited 2012 30.12.2011]; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2272.
47. Lasne F, de Ceaurriz J: Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, 2000. 8(405): 635.
48. WADA. TD2009EPO. 2009 [cited 2011 01.12.2011]; Available from: http://wada-ama.org/Documents/World_Anti_Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA_TD2009EPO_Harmonization_of_the_Method-Identification_Recombinant_Erythropoietins_Analogues_EN.pdf. Zugriff: 01.12.2012
49. Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J: Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem*, 2002. 311(2): 119-26.
50. Kohler M, Ayotte C, Desharnais P, Flenker U, Lüdke S, Thevis M, Völker-Schänzer E, Schänzer W: Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels. *Int J Sports Med*, 2008. 29(1): 1-6.
51. Reichel C, Kulovics R, Jordan V, Watzinger M, Geisendorfer T: SDS-PAGE of recombinant and endogenous erythropoietins: benefits and limitations of the method for application in doping control. *Drug Test Anal*, 2009. 1(1): 43-50.
52. Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik*. 1998, Heidelberg: Spektrum.
53. Voss SC, Flenker U, Majer B, Schänzer W: Stability tests for hematological parameters in antidoping analyses. *Lab Hematol*, 2008. 14(3): 24-9.
54. R Development Core Team: *R: A language and environment for statistical computing*. 2008; Available from: <http://www.R-project.org>. Zugriff: 04.09.2008

55. Bayer, ADVIA120. 2008.
56. Sysmex, Sysmex XT2000i. 2011.
57. Voss SC, Alsayrafi M, Alsowaidi N, Elzain Elgingo M, Bourdon P, Robinson N, Sottas PE, Klodt F, Nonis D, Schumacher YO: The influence of an 8 hour flight on haematological variables used in the athletes` biological passport of WADA. *Br J Sports Med*, 2011. 45(15): A10.
58. Pocock SJ, Ashby D, Shaper AG, Walker M, Broughton PM: Diurnal variations in serum biochemical and haematological measurements. *J Clin Pathol*, 1989. 42(2): 172-9.
59. Voss SC, Alsayrafi M, Alsowaidi N, Elzain Elgingo M, Bourdon P, Robinson N, Sottas PE, Klodt F, Nonis D, Schumacher YO: The influence of exercise and circadian rhythm of haemoglobin concentration associated changes in plasma volume on the biological passport. *Br J Sports Med*, 2011. 45(15): A7.
60. Schumacher YO, Potgiesser T, Ahlgrim C, Ruthardt S, Dickhuth HH, Roecker K: Haemoglobin mass in cyclists during stage racing. *Int J Sports Med*, 2008. 29(5): 372-8.
61. Sawka MN, Convertino VA, Eichner ER, Schnieder SM, Young AJ: Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Med Sci Sports Exerc*, 2000. 32(2): 332-48.
62. Gillen CM, Lee R, Mack GW, Tomaselli CM, Nishiyasu T, Nadel R: Plasma volume expansion in humans after a single intense exercise protocol. *J Appl Physiol*, 1991. 71: 1914-1920.
63. Convertino VA: Blood volume response to physical activity and inactivity. *Am J Med Sci*, 2007. 334(1): 72-9.
64. Hopkins WG: Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Med*, 2000. 30(1): 1-15.
65. Pottgiesser, T., M. Umhau, and C. Ahlgrim, Hb Mass Measurement Suitable to Screen for Illicit Autologous Blood Transfusions. *Med Sci Sports Exerc*, 2007. 39(10): 1748-1756.
66. Gore CJ, Bourdon PC, Woolford SM, Ostler LM, Eastwood A, Scroop GC: Time and Sample Site Dependency of the Optimized CO-Rebreathing Method. *Med Sci Sports Exerc*, 2006. 38(6): 1187-1193.
67. Voss SC, Thevis M, Schinkothe T, Schänzer W: Detection of homologous blood transfusion. *Int J Sports Med*, 2007. 28(8): 633-7.
68. Nelson M: An overview of the use of flow cytometry in the analysis of mixed red blood cell populations. *Pathology*, 1999. 31: 191-198.
69. Nelson M: Analysis of heterogenous red cell populations by flow cytometry. *Methods Cell Sci*, 2002. 24: 19-25.

70. Nelson M, Ashenden M, Langshaw M, Popp H: Detection of homologous blood transfusion by flow cytometry: a deterrent against blood doping. *Haematologica*, 2002. 87(8): 881-2.
71. Nelson M, Popp H, Ashenden M: Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica*, 2003. 88(11): 1284-95.
72. Nelson M, Cooper S, Nakhla S, Smith S, King M, Ashenden M: Validation of a test designed to detect blood-doping of elite athletes by homologous blood transfusion. *Aust J Med Sci*, 2004. 25: 27-33.
73. Voss S, Lüdke A, Romberg S, Schänzer E, Flenker U, deMarees M, Achtzehn S, Mester J, Schänzer W: Effects of high intensity exercise on isoelectric profiles and SDS-PAGE mobility of erythropoietin. *Int J Sports Med*, 2010. 31(6): 367-371.
74. Beullens M, Delanghe JR, Bollen M: False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood*, 2006. 107(12): 4711-4713.
75. Kahn A, Grinyer J, Truong ST: New urinary EPO drug testing method using two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*, 2005. 358(1-2): 119-130.
76. Poortmans JR, Rampär L, Wolfs JC: Renal protein excretion after exercise in men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1989. 58: 476-480.
77. Bajla I, Holländer I, Minichmayr M, Gmeiner G, Reichel C: GASepo - a software solution for quantitative analysis of digital images in EPO doping control. *Comput Methods Programs Biomed*, 2005. 80: 246-270.
78. Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Franchini M, Guidi GC: Stability of blood cell counts, hematological parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematologic analyzer. *J Lab Clin Med*, 2005. 146(6): 333-340.
79. Schumacher YO, Klodt F, Nonis D, Pottgiesser T, Alsayrafi M, Bourdon PC, Voss SC: The impact of long-haul air travel on variables of the athlete's biological passport. *Int J Lab Hematol*, 2012. 34: 641-647.
80. Morkeberg JS, Belhage B, Damsgaard R: Changes in blood values in elite cyclist. *Int J Sports Med*, 2009. 30(2): 130-8.
81. Senay LC, Mitchell D, Wyndham CH: Acclimatization in a hot, humid environment: body fluid adjustments. *J Appl Physiol*, 1976. 40(5): 786-96.
82. Shapiro Y, Hubbard RW, Kimbrough CM, Pandolf KB: Physiological and hematologic responses to summer and winter dry-heat acclimation. *J Appl Physiol*, 1981. 50(4): 792-8.

83. Young AJ, Sawka MN, Quigley MD, Cadarette BS, Neufer PD, Dennis RC, Valeri CR: Role of thermal factors on aerobic capacity improvements with endurance training. *J Appl Physiol*, 1993. 75(1): 49-54.
84. Lasne F, Martin L, Martin JA, Isoelectric profiles of human erythropoietin are different in serum and urine. *Int J Biol Macromol*, 2007. 41(3): 354-357.
85. Lamon S, Martin L, Robinson N, Saugy M, Ceaurriz J, Lasne F: Effects of exercise on the isoelectric patterns of erythropoietin. *Clin J Sport Med*, 2009. 19(4): 311-5.

8 Lebenslauf

Name: Sven Christian Voss

Nationalität: Deutsch

Geburtsdatum: 2. Februar 1977

Geschlecht: Männlich

Familienstatus: verheiratet mit Sabrina Voss Lui

Beruf: Diplom-Sportwissenschaftler

Berufliche Karriere

Seit 2012: "Senior Scientist" im Anti-Doping Labor Qatar.

2008 - 2012 "Head of the Sport Biochemistry Unit" im Aspire Academy Sport Science Department (Leitung: Dr. Dennis Hatcher)

2007 – 2008 Leitung der EPO und Blut Abteilung im Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln (WADA Labor, Leitung: Prof. Dr. W. Schänzer)

2003 - 2006 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln (IOC/ WADA Labor, Direktor: Prof. Dr. W. Schänzer)

2000 - 2003 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln (IOC/ WADA Labor, Direktor: Prof. Dr. W. Schänzer)

2000 Praktikum am Sportkrankenhaus Hellersen, Abteilung Sportmedizin (Leitung: Dr. E. Jakob)

1996 -1997 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Hellersen, Lüdenscheid

Ausbildung

2013 Abschluss der Promotion zum Dr. Sportwiss.

2003 Diplomarbeit an der Deutschen Sporthochschule Köln
Titel: Nachweis von quervernetzten bovinen Hämoglobinen in humanem Plasma mittels HPLC/UV und HPLC/MS. (Prof. Dr. Mario Thevis, Dr. A. Gotzmann)

1998 - 2003 Student an der Deutschen Sporthochschule Köln

1997- 2004 Student an der Universität Köln, Studiengang Lehramt Biologie (Zwischenprüfung und Teile des Hauptstudiums)

1996 Abitur am Anne Frank Gymnasium, Halver

9 Kurzzusammenfassung (Abstract Deutsch)

Die hier vorliegende Arbeit hat folgende Themengebiete mit Relevanz in der Dopinganalytik untersucht: Die Lagerungsstabilität von zellulären Blutparametern (1), den Einfluss unterschiedlicher Analysegeräte auf Hämoglobinmasse, Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten (2), die Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmassenbestimmung (3), den Einfluss einer Flugreise auf Hämoglobinkonzentration und Retikulozyten (4), den diurnalen Rhythmus der Hämoglobinkonzentration vor und während eines Etappenrennens im Radsport (5), den Einfluss von belastungsinduzierten Schwankungen im Plasmavolumen auf die Hämoglobinkonzentration (6), die Validität der Methode zur direkten Detektion der homologen Bluttransfusion (7) und den Einfluss hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin (8).

Zu 1.:

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass zur Harmonisierung der präanalytischen Bedingungen von Blutproben eine gekühlte Lagerung um 4°C klar gegenüber einer Lagerung um 21°C zu favorisieren ist. Bei einer Lagerungstemperatur von 21°C sollte die Analyse der Proben innerhalb von 24 Stunden erfolgen.

Zu 2.:

Geräteunterschiede führten bei der Hämoglobinkonzentration zu Abweichungen von durchschnittlich 0,38 g/dl und bei Retikulozytenprozent zu durchschnittlich 0,33 % (Sysmex KX21N und R500 verglichen mit Siemens ADVIA120). Bei der Bestimmung der Hämoglobinmasse mit dem Radiometer OSM3 und dem Roche Cobas 221 konnte ein Unterschied von durchschnittlich 83 g dokumentiert werden. Dies zeigt, dass im Rahmen des biologischen Passes oder in wissenschaftlichen Zeitreihenstudien, Messungen auf dem gleichen Gerätetyp eine Grundvoraussetzung darstellt.

Zu 3.:

Die Reproduzierbarkeit der Hämoglobinmasse am selben Analysegerät wurde durch Messungen innerhalb von zwei Tagen untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten eine durchschnittliche Abweichung von 17,8 g ($\pm 15,8$ g). Die höchste gemessene Abweichung betrug 67,3 g, ohne dass ein Fehler in der Anwendung der Methode erkennbar war. Aus der Messunsicherheit wird deutlich, dass die Hämoglobinmassenbestimmung in Bereich des biologischen Passes nur beschränktes Potential aufweist. Die Methode ist nicht sensitiv genug, um die Verabreichung eines Erythrozytenkonzentrates das 50g Hämoglobin enthält, sicher zu detektieren.

Zu 4. und 5.:

Wir konnten zeigen, dass eine achtstündige Flugreise mit zwei Stunden Zeitunterschied keinen Einfluss auf die Hämoglobinkonzentration und den Retikulozytenprozentwert hat und dass der diurnale Rhythmus dieser Parameter selbst während eines Etappenrennens bestehen bleibt.

Zu 6.:

Belastungsinduzierte Schwankungen des Plasmavolumens weisen eine sehr hohe Relevanz bezüglich der Parameter des biologischen Passes auf. Ein Proband der in dieser Arbeit beschriebenen Studie erreichte innerhalb von 5 Tagen eine Vergrößerung seines Plasmavolumens um 1389 ml, was

einen Abfall der Hämoglobinkonzentration von 15,7 g/dl auf 12,9 g/dl bedeutete. Diese Daten machen deutlich, dass der Zeitpunkt der Probennahme und der Einfluss von Belastung in der Interpretation von Blutwerten des biologischen Passes immer berücksichtigt werden müssen.

Zu 7.:

Zur Überprüfung der Validität der durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung von homologen Bluttransfusionen wurde die Spezifität, Präzision, Linearität und Robustheit untersucht. Unsere Ergebnisse zeigten eine Spezifität von 100%. Die Präzision betrug je nach Antikörper 2,7% bis 19,8%. Antikörper des IgG Typs wiesen verglichen mit dem IgM Typ eine bessere Präzision auf. Die Linearität wurde für alle untersuchten Antigene bestätigt. Die Methode wurde als robust für qualitative, allerdings nicht für quantitative Aussagen bewertet. Die durchschnittliche Nachweisgrenze liegt unter 1% und ist für die meisten Antigene besser als 2%, was unter der Menge Fremdblut liegt, die bei einer Transfusion erwartet wird.

Zu 8.:

In der Untersuchung zum Einfluss von hochintensiver Belastung auf die Nachweismethoden von rekombinantem Erythropoietin konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen VO₂max, Laktatkonzentration, maximaler Wattzahl auf dem SRM und relativer Mobilität oder BAP feststellen. Alle Nachbelastungsproben zeigten höhere Werte für die BAP, jedoch wurden die WADA Kriterien zur Definition einer positiven Probe in keinem Fall erfüllt. Die relative Mobilität zeigte keine Werte über 0,559, was weit unter der Obergrenze des 99,9% Vertrauensintervalls für verdächtige Proben liegt. Die relative Mobilität war nach Belastung vermindert und es gab keine Verlagerung der Banden in den Bereich des rekombinanten EPOs. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die SDS-PAGE eine Möglichkeit darstellt, um zwischen Belastungsurinen und rekombinantem humanen Erythropoietin zu unterscheiden.

10 Abstract

The investigations performed in this PhD thesis were about: The stability of cellular blood parameters (1), the effect of different analyzers on Hemoglobin (Hb) mass, Hb concentration [Hb] and Reticulocytes (2), the reproducibility of Hb mass estimations (3), the effect of air travelling on [Hb] and Reticulocytes (4), the diurnal rhythm of the [Hb] before and during a cycling stage race (5), the effect of exercise induced variations in plasma volume on the [Hb] (6), the validity of the direct method to detect homologous blood transfusions (7) and the influence of high intense exercise on the direct methods to detect recombinant erythropoietin in urine (8).

To 1:

The results of our investigations showed that blood samples should preferably be stored at 4°C (when compared to 21°C) to harmonize pre-analytical conditions. When stored at 21°C samples should be analyzed within maximum 24 hours.

To 2:

Analyses on different instruments can result in mean differences of 0.38 g/dL for [Hb] and 0.33% for Reticulocytes (%) (Sysmex KX21N and R500 vs. Siemens ADVIA120). Hb mass estimations on the Radiometer OSM3 and the Roche Cobas 221 resulted in mean differences of 83 g. These results confirm that it is required to perform measurements for the biological passport or in scientific time series studies always on the same instrument type.

To 3:

The reproducibility of Hb mass estimations was performed by repeated measurements of the same subjects between two days. Our results showed a mean difference of 17.8 g (\pm 15.8 g). The maximum measured difference was 67.3 g, without any visible error. The observed measurement uncertainty confirms that the Hb mass method has only limited potential for the use in the biological passport. The method is not sensitive enough to safely detect the transfusion of one red blood cell concentrate (50 g Hb).

To 4 and 5:

We could demonstrate that 8 hours of air travelling did not influence [Hb] or Reticulocytes and that the diurnal rhythm of these parameters remained stable even during a cycling stage race.

To 6:

Exercise induced variations in plasma volume play a major role for parameters of the biological passport. In our study we had one subject who had within 5 days a plasma volume expansion of 1389 ml, which correlated with a decrease in [Hb] of 15.7 g/dl to 12.9 g/dl. These results highlight the importance of the time of blood sampling and the influence of exercise.

To 7:

For the flow-cytometric method to detect homologous blood transfusions we investigated the validity by testing specificity, precision, linearity and robustness. Our results showed a specificity of 100%. Depending on the used antibody the precision was within 2.7% to 19.8%. IgG antibodies showed a better precision when compared to IgM antibodies. Linearity was confirmed for all investigated antigens. The method was robust for

qualitative but not for quantitative analyses. The mean limit of detection was below 1% and is for most antigens better than 2%. This is below the amount of homologous blood which is expected after one transfusion.

To 8:

We did not find any significant correlation between VO₂max, lactate concentration or maximal power output (W) on a bicycle ergometer and erythropoietin (EPO) relative mobility (rmv) or EPO basic area percentage (BAP). All post exercise samples showed increased BAP values, however all samples remained negative according to WADA criteria. The rmv showed no values above 0.559, which is far below the 99.9% confidence interval for suspicious samples. The rmv was reduced in post exercise samples and no sample reached the area of recombinant EPO. Our results show that the SDS-PAGE method is a possibility to differentiate between effort urine EPO and recombinant EPO.