
Neue Aspekte zum Nachweis von Erythropoietin-Doping¹

Dieter Böning (Projektleiter), Edgar Cristancho, Yohan Robinson

Freie Universität Berlin
Institut für Sportmedizin

1 Problem

Die Bestimmung von Erythropoetin ist aufwendig. Wenn man einfache Suchgrößen findet, die die Notwendigkeit von Erythropoetinmessungen auf wenige Verdachtsfälle einengen, hat dies für die Dopingkontrolle große Bedeutung. Die Aspartat-Aminotransferase-Aktivität in Erythrocyten (eASAT) bietet sich hierfür an; sie ist in den jungen roten Zellen, die man nach Stimulation des Knochenmarks im Blut vermehrt findet, etwa viermal so hoch wie in alten Zellen (z.B. Schmidt et al., 1987). Wenn der Anteil junger Zellen bei vermehrter Neubildung überproportional zunimmt, ist auch die durchschnittliche eASAT ohne Auftrennung der Erythrocyten nach dem Alter erhöht. Böning et al. (1997) fanden bei Bergsteigern nach einem Aufenthalt im Himalaya eine massive Zunahme (+ 140 % 7-8 Tage, + 80 % 11-12 Tage nach dem Abstieg) bei einer Zunahme der Hämoglobin-(Hb)-Masse von 13-14 %. Wir haben eASAT unter dem Einfluss von Training, Höhe und therapeutischer EPO-Gabe gemessen und gleichzeitig die Messmethodik systematisch vereinfacht.

2 Methoden

Versuchspersonen: Während der dreijährigen Laufzeit des Projekts wurden Untersuchungen an 468 Probanden durchgeführt (Tab. 1): untrainierte Männer und Frauen, Breitensportler sowie Leistungssportler aus Berlin, dazu ähnliche Gruppen, die in Bogotá/Kolumbien in 2600 m Höhe leben. Zusätzlich wurden Blutproben von 50 Nierenkranken während EPO-Behandlung analysiert (2000-18000 I.E. wöchentlich). Bei allen wurde die eASAT in den Erythrocyten gemessen, bei einem großen Teil die Erythropoietinkonzentration im Serum sowie Reticulocytenzahl, Hämoglobinmasse und maximale Sauerstoffaufnahme.

Messmethodik: Venöses Blut wurde in Vacutainer mit K₂ EDTA entnommen und 10 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde bis zur Messung bei -70°C eingefroren; es kann aber ohne signifikanten Aktivitätsabfall zwei Tage lang bei 20°C

¹ VF 0407/03/01/2001-2002

aufgehoben werden. Methodische Untersuchungen zeigten, dass Waschen mit Kochsalzlösung ebenso wie das Abheben der Leukocytenschicht (ca 3 % der eASAT) unnötig war. Das gut gemischte Sediment wurde mit Wasser 1:20 verdünnt und hämolysiert. Zur Bestimmung der eASAT (EC 2.6.1.1) wurde anfänglich ein optimierter UV Test (Sigma Diagnostics Procedure No. DG158-UV, 30 µl Hämolyolat +750 µl Reagenzienmischung, 25°C Messtemperatur) eingesetzt. Da die Messung in einem Laborautomaten (Hitachi 747-400, Reagenzien der Fa. Roche, 37°C) mit der Methodik der Plasmaroutinebestimmung identische Ergebnisse mit sehr geringer Streuung (Differenzen bei Doppelbestimmungen 1,1 %) brachte, haben wir die Methode im Laufe des Projekts umgestellt. Außerdem wurde im Hämolyolat die Hb-Konzentration gemessen (Radiometer OSM 3), so dass die Enzymaktivität direkt auf g Hb bezogen werden konnte. Die Messungen lassen sich auch mit Blut aus dem hyperämisierten Ohrläppchen durchführen (Entnahme in Microvetten-CB 300, Fa. Sarstedt). Alle Aktivitäten sind für 25°C angegeben. Für die Umrechnung auf neue Referenztemperatur 37°C gilt der Faktor 1,664. Für statistische Analysen wurde die Varianzanalyse benutzt.

3 Ergebnisse

Mittelwerte. Die Mittelwerte der eASAT sind zusammen mit der Erythropoetinaktivität in Tabelle 1 dargestellt. Die Daten der Sportler wurden nicht nach Disziplinen aufgeschlüsselt, da sich keine signifikanten Unterschiede fanden. In Berlin liegen die Werte bei den Frauen höher als bei den Männern ($p < 0,01$). Bei Frauen, die Antikonzeptiva nahmen, fand sich eine leicht erhöhte eASAT ($3,1 \pm 0,6 \text{ U} \cdot \text{gHb}^{-1}$ gegen $2,8 \pm 0,6 \text{ U} \cdot \text{gHb}^{-1}$; $p < 0,01$). Langdauerndes Training im Tiefland hat bei beiden Geschlechtern keinen deutlichen Einfluss. Die Erythropoetinwerte sind in allen Gruppen ähnlich und im für Tieflandbewohner erwarteten Bereich. Die Reticulocytenzahlen, die aus logistischen Gründen nicht regelmäßig gemessen wurden, sind bei einem Teil der Sportler erhöht, wodurch die Streuung stark zunimmt.

Untrainierte männliche und weibliche Hochlandbewohner haben keine Veränderung bei eASAT und EPO, dagegen findet man bei trainierten Männern Zunahmen der eASAT mit vergrößerter Streuung. Eine leichte EPO-Erhöhung zeigt sich nur beim weiblichen Geschlecht (signifikant bei Breitensportlerinnen). Die Reticulocytenzahl ist nur bei einzelnen Gruppen vergrößert. Die Werte der mit EPO behandelten Patienten sind im Mittel nur wenig erhöht, haben aber eine verhältnismäßig große Standardabweichung. Da EPO je nach Injektionszeitpunkt schwankt, wurden die Werte bei dieser Gruppe nicht bestimmt.

Tab. 1: Erythrocytäre ASAT-Aktivität und Erythropoetinaktivität (Mittelwerte und Standardabweichung).

	Sportart	n	Alter	eASAT U·gHb ⁻¹	EPO U·l ⁻¹	Retic. ‰	
Männer	Tiefland	Trainiert	90	23 ± 5	2,5 ± 0,4	7,1 ± 2,7	
		Breitensport	25	26 ± 7	2,4 ± 0,4	7,2 ± 3,6	
		Untrainiert	54	24 ± 6	2,5 ± 0,4	8,0 ± 3,2	8 ± 4 (14)
	Hochland	Trainiert	26	24 ± 6	3,1 ± 1,1 ^{h,t}	7,1 ± 1,9 (13)	24 ± 11 (13)
		Untrainiert	15	23 ± 5	2,4 ± 0,4	^a	15 ± 4 ^h
Frauen	Tiefland	Trainiert	32	22 ± 4	2,9 ± 0,7	8,2 ± 3,5(24)	13 ± 9(12)
		Breitensport	108	22 ± 3	2,8 ± 0,6	9,1 ± 5,3	10 ± 3 (46)
		Untrainiert	61	24 ± 6	3,0 ± 0,5	9,2 ± 7,0	9 ± 3 (12)
	Hochland	Trainiert	16	23 ± 6	2,8 ± 0,8	10,5 ± 5,2	14 ± 5
		Breitensport	22	23 ± 3	2,5 ± 0,4	11,8 ± 4,3 ^h	14 ± 9 ^h
		Untrainiert	19	20 ± 7	2,5 ± 0,5	9,1 ± 3,7	9 ± 4
EPO-Pat.	Frauen	22		3,1 ± 0,8			
	Männer	28		2,7 ± 1,0			
^t signifikante Unterschiede gegenüber untrainierten auf gleicher Höhe, ^h Unterschiede durch Höhe bei vergleichbarem Trainingszustand. ^a Die Messungen wurden im Jahr 2000 mit einer Methode durchgeführt, die systematisch höhere Werte ergibt. Nach Schmidt et al. (2002) sind die Werte in Bogotá bei Männern nicht höher als in Deutschland.							

Es lassen sich weder eindeutige Zuordnungen der eASAT zur EPO-Aktivität noch zur Reticulocytenzahl nachweisen. Trotz gesteigerter Erythropoese ist weder im Training noch bei längerem Gebirgsaufenthalt EPO deutlich erhöht. Andererseits schwankt die Reticulocytenzahl bei Trainierten erheblich, da sie ein bis drei Tage nach intensiver Belastung vorübergehend zunimmt, während die eASAT vom gesamten Anteil junger Erythrocyten abhängt. Es ließ sich auch kein signifikanter Zusammenhang mit der Hämoglobinmasse finden, die aber mit der maximalen Sauerstoffaufnahme korreliert war (Böning et al.,

2001, 2004). Der Trainingseffekt auf die Hb-Masse war ausgeprägter als der Höheneffekt. Die Zunahme in Bogotá betrug bei gleicher VO_{2max} für Männer 13 %, für Frauen 7 %.

Häufigkeitsverteilungen: Die Häufigkeitsverteilungen der eASAT für untrainierte und trainierte Männer im Tiefland sind fast gleich und unterscheiden sich nicht von einer Normalverteilung (nicht dargestellt). Es gibt nur einen Wert über $3,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$. Bei Breitensportlern, die nicht so intensiv Sport treiben, fanden wir eine Verteilung ohne Gipfel; es kommt aber keine eASAT über $3 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$ vor. Bei den Frauen gibt es ebenfalls keinen Unterschied zwischen untrainierten und trainierten, deshalb wurden alle in Abbildung 1 zusammengefasst. Die Verteilung ist im Vergleich zu den Männern etwas nach rechts verschoben, oberhalb von $4,0 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$ gibt es acht Werte (max. $4,65 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$). Personen mit hoher eASAT betreiben teilweise Sportarten mit häufigen Sprüngen (Tanz, Volleyball), so dass man an Hämolyse in den Gefäßen der Fußsohle denken kann; andere haben eine leichte Anämie. Einen Extremwert von $6,7 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$ (nicht dargestellt) fanden wir bei einer Frau mit Thalassämie und extremer Reticulocytose (300‰).

In der Höhe liegt bei Männern (Abb. 2) der Gipfel der Verteilung wie im Tiefland bei $2,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$, doch haben einige eine hohe eASAT ab $3,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$. Alle gehören zu den Ausdauertrainierten und haben z.T. auch erhöhte Reticulocytenzahlen. Auch bei den Frauen unterscheidet sich die Verteilung kaum von der im Flachland; ein hoher Wert ($5,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$) findet sich bei einer Mittelstrecklerin mit relativ großer Reticulocytenzahl (2,6 %).

Bei den Dialysepatienten (2000-18000 I.E wöchentlich) findet man eine Zunahme der eASAT mit der EPO-Dosierung und einen erhöhten Anteil von eASAT-Werten über $3,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$, aber auch niedrige Aktivitäten. Der höchste Wert betrug $5,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$.

4 Diskussion

Nach unseren Ergebnissen gibt es eine Obergrenze für die physiologische eASAT bei normaler Erythropoese, die durch langdauerndes Training nicht wesentlich verschoben wird. Offensichtlich befinden sich Bildung und Abbau der roten Blutkörperchen bei Leistungssportlern im Gleichgewicht. Nur bei bisher untrainierten Männern löst Training wegen der akut gesteigerten Erythropoese einen vorübergehenden Anstieg aus, ohne dass $3,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$ überschritten wird (s. auch Schmidt et al., 1988). Daueraufenthalt in mäßiger Höhe ohne Training hat keine Wirkung; Ausdauertraining führt bei einigen Athleten aus dem Hochland zu Werten zwischen 4 und $6,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$. Derartige Zunahmen fanden wir auch nach mehrwöchigem Aufenthalt in großer Höhe (5000 m und höher), wobei die Zunahme der Hb-Masse 14 % betrug (Böning et al., 1997). Ein vierzehntägiges Hypoxietraining nach der Methode sleeping high (2000 m) – training low (800 m) führte dagegen weder zu gesicherten Änderungen der eASAT noch der Hb-Masse (Schick, 2001).

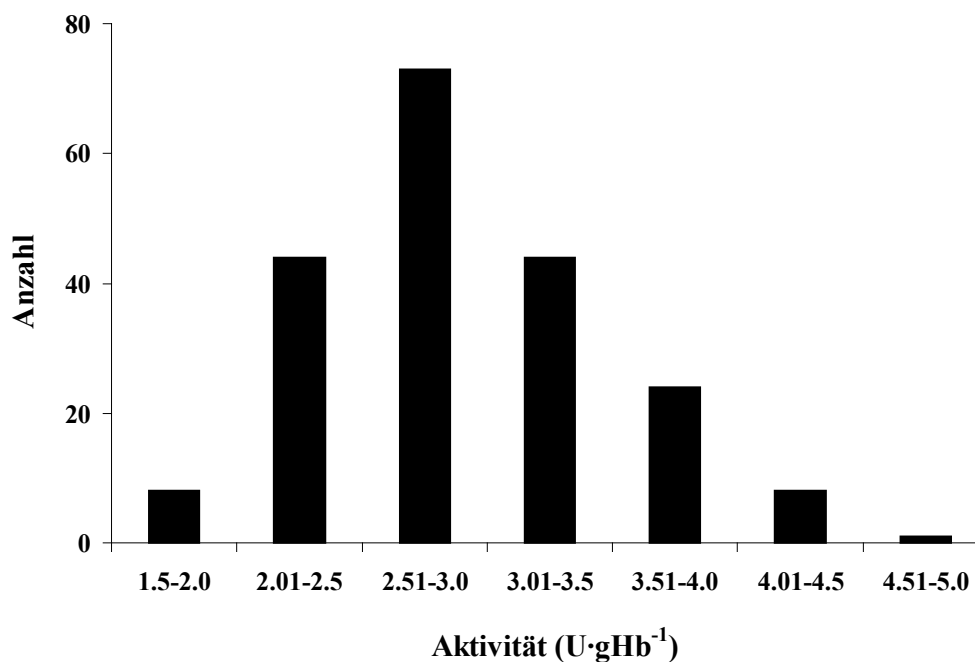


Abb. 1: Verteilung der eASAT bei Frauen aus dem Tiefland (n = 201, untrainiert, halbtrainiert und trainiert)

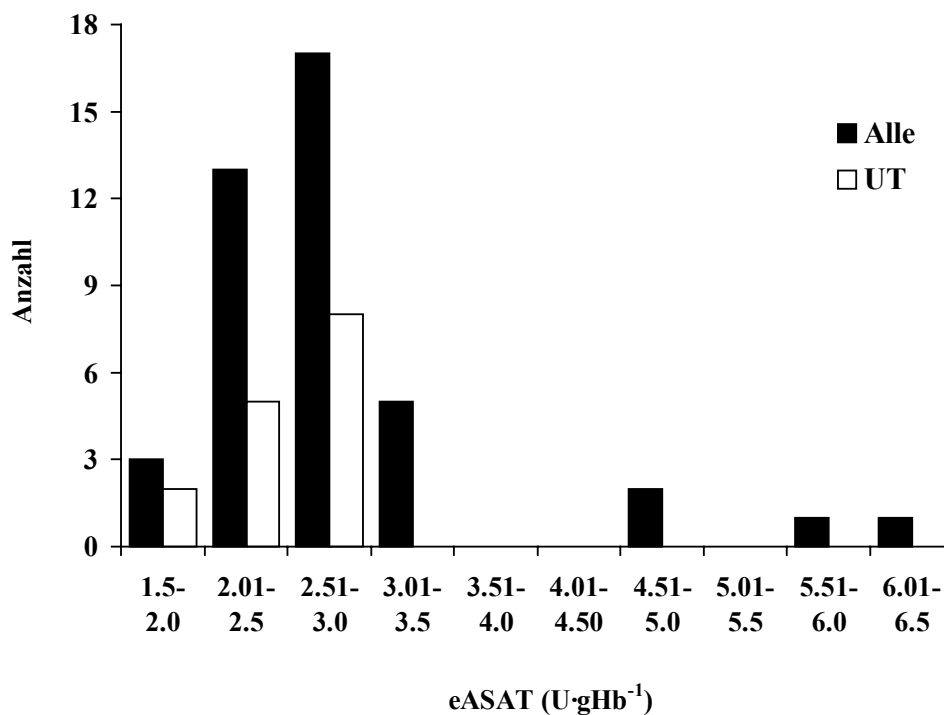


Abb. 2: Verteilung der eASAT bei Männern im Hochland (n = 42)

Reticulocyten enthalten besonders viel eASAT, tragen aber wegen ihrer geringen Zahl von ca. 1 % nur wenig zum Messwert im Zellsediment bei. Erst wenn ihre Anzahl stärker an-

steigt, ist auch eine Zunahme der eASAT zu erwarten. Eine gute Korrelation zwischen beiden Größen findet man aber nicht, da Retikulozyten nach 24 bis 36 Stunden nicht mehr nachweisbar sind, die aus ihnen entstehenden jungen Erythrocyten aber immer noch eine hohe eASAT haben. Der Vorteil der eASAT beim Dopingnachweis ist, dass sie nach dem Absetzen von EPO längere Zeit als die Reticulozytenzahl erhöht bleibt. Nach dem oben erwähnten Aufenthalt in 5000 bis 7000 m Höhe ließen sich deutliche eASAT-Änderungen mindestens zwei Wochen lang messen (Böning et al., 1997), während die Reticulozytenzahl bereits wieder im Normalbereich lag.

Bei Annahme einer Normalverteilung ist nur mit etwa 2 % Messwerten oberhalb des Mittels + 2 x Standardabweichung zu rechnen, so dass man von dieser Grenze an einen Dopingverdacht in Betracht ziehen kann. Bei Mitteln von $2,5 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$ für Männer und $2,9 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$ für Frauen in Berlin liegt die Grenze bei 3,3 bzw. $4,1 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$. Oberhalb der dreifachen Standardabweichung ($3,7$ bzw. $4,8 \text{ U}\cdot\text{gHb}^{-1}$) erwartet man < 0,3 % der physiologischen Werte. Bei Sportlern aus dem Tiefland haben wir solche Werte überhaupt nicht beobachtet. Ein entsprechendes Messergebnis würde den Verdacht auf Doping mit EPO sehr nahelegen.

5 Literatur

- Böning, D., Cristancho, E., Serrato, M., Reyes O., Mora, M., Coy, L. & Rojas, J. (2004). Hemoglobin mass and peak oxygen uptake in untrained and trained female altitude residents. *Int J Sports Med* (im Druck).
- Böning, D., Maassen, N., Jochum, F., Steinacker, J., Halder, A., Thomas, A., Schmidt, W., Noe, G. & Kubanek, B. (1997). After-Effects of a high altitude expedition on blood. *Int J Sports Med*, 18, 179-185.
- Böning, D., Rojas, J., Serrato, M., Ulloa, C., Coy, L., Mora, M. & Hütler, M. (2001). Hemoglobin mass and peak oxygen uptake in untrained and trained residents of moderate altitude. *Int J Sports Med*, 22, 572-578.
- Schick, R. (2001). *Einfluss einer intermittierenden Höhenexposition auf Erythropoese und Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämoglobins bei Sportlern*. Dissertation Freie Universität, Berlin.
- Schmidt, W., Böning, D. & Braumann, K.M. (1987). Red cell age effects on metabolism and oxygen affinity in humans. *Respir Physiol*, 68, 215-225.
- Schmidt, W., Maassen, N., Trost, F. & Böning, D. (1988). Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur J Appl Physiol*, 57, 490-498.
- Schmidt, W., Heinicke, K., Rojas, J., Gomez, J.M., Serrato, M., Mora, M., Wolfarth, B., Schmid, A. & Keul, J. (2002). Blood volume and hemoglobin mass in endurance athletes from moderate altitude. *Med Sci Sports Exerc*, 34, 1934-1940.
- Wissenschaftliche Tabellen GEIGY (1979). *Teilband Hämatologie und Humangenetik*, 8. Auflage. Basel.