

---

## Projekt: Abnormales Steroidprofil nach Testosteronkonsum

Joachim Große<sup>1</sup>, Burkhard Rolf<sup>2</sup>, Detlef Thieme<sup>2</sup> & Sybille Lüderwald<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden

<sup>2</sup>Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Problem

Ausgangspunkt des Projektes war eine begleitende Langzeitstudie zur Überwachung gesundheitlicher Schäden und Nebenwirkungen bei Anabolikakonsum am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilian-Universität in München. Von ärztlicher Seite wurde die einbezogene Probandengruppe eindringlich und umfassend über die gesundheitlichen Risiken des auf ihrer eigenen Entscheidung beruhenden Handelns aufgeklärt, es erfolgte keinerlei Einflussnahme auf das von ihnen gewählte Applikationsmuster. Für den Fall, dass bei im Rahmen der Studie auftretenden erheblichen Nebenwirkungen die Einnahme entgegen dem ärztlichen Rat fortgesetzt wird, wurde ein Abbruch der Begleitung vereinbart.

In einer Vorstudie wurden für einen Probanden neben klinischen Untersuchungen (Sonographie innerer Organe, Ergometrie, Langzeit-EKG/Blutdruckmessung) die in der Dopinganalytik relevanten Parameter einer Steroidapplikation (synthetische Steroide, Testosteron/Epi-testosteron-T/E-Verhältnis und weitere Parameter des endogenen Steroidprofils) sowie Marker des Wachstumshormonmissbrauchs und die Insulinkonzentrationen überwacht. Dabei war auffällig, dass der kritische Grenzwert für den T/E-Quotienten von 4 beim Probanden trotz der erfolgten Aufnahme erheblicher Dosierungen an Testosteronenantat zu keinem Zeitpunkt überschritten wurde. An den Auskünften des Probanden zur Einnahme bestanden keine begründeten Zweifel, da seine Angaben durch andere Analysendaten verifiziert worden waren. So waren die zusätzlich deklarierten Substanzen Wachstumshormon (hGH), Trenbolon und synthetisches Insulin durch entsprechende Analysendaten hinsichtlich Einnahmezeit und Dosierung bestätigt worden. Weiterhin wurden die Identität der verwendeten Testosteronpräparate und insbesondere die Abwesenheit von Epi-testosteron analytisch abgesichert. Ein zweiter Proband wurde nach Einnahme des analogen Präparates erwartungsgemäß mit signifikant erhöhtem T/E-Verhältnis von 33 getestet. Die eingeräumte intramuskuläre Applikation von Testosteron (als Depotpräparat) führte zum signifikanten Anstieg typischer Biotransformationsprodukte des Testosterons (insbesondere Androsteron und Etiocholanolon) und zur nachhaltigen Suppression der Hypothalamus-Hypophysen-Testis-(HPT)-Achse, was an der subnormalen Konzentration des Luteinisierungshormons (LH kleiner 0,1 mIU/ml) ablesbar war. Dennoch blieb das urinäre T/E-Verhältnis, der für die primäre Bewertung einer Dopingkontrollprobe maßgebliche Parameter, im unauffälligen Bereich.

Ziel des Projektes war es, mögliche Ursachen dieses Phänomens zu untersuchen.

## Methode

### Konzentrationsprofile im Urin und im Serum

In allen Urinproben dieser Fallstudie wurde das Konzentrationsprofil der in der Dopinganalytik relevanten endogenen Steroide (Testosteron-*T*, Epitestosteron-*E*, Androsteron-*And*, Etiocholanolon-*Etio*, 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-5 $\alpha$ -*Adiol*, 5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-5 $\beta$ -*Adiol*, Dehydroepiandrosteron-*DHEA* und ergänzend 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron-*DHT*) über einen Zeitraum von 9 Wochen mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Um zu Anhaltspunkten für das metabolische Verständnis des von der Erwartung deutlich abweichenden Eliminationsverhaltens zu gelangen, wurde zudem der Verlauf ausgewählter endogener Steroide (*T*, *E*, 4-Androsten-3,17-dion) in den Serumproben, die als Rückstellproben der klinischen Untersuchungen verfügbar waren, mit den Gerätekombinationen GC-hochauflösende MS (GC-HRMS) und Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verfolgt.

Zusätzlich wurde das Luteinisierungshormons (LH) als Indikator für den funktionellen Zustand der HPT-Achse in den Urinproben immunologisch erfasst.

### Kohlenstoffisotopenverhältnis-Bestimmungen

Mit Hilfe der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) wurden in den Urinproben die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Kohlenstoffisotopenverhältnisse der für den Nachweis synthetischen Testosterons typischen Marker (*And*, *Etio*, *T*, 5 $\alpha$ -*Adiol*) und endogenen Referenzsubstanzen (11 $\beta$ -Hydroxyandrosteron-*11OH-And*, Pregnandiol-*PD*) bestimmt. Besonderes Augenmerk galt der Charakterisierung des nach Testosteronapplikation in erhöhter Konzentration gefundenen Epitestosterons hinsichtlich endogener bzw. exogener Herkunft.

### Untersuchung des Genotyps der an der Steroid-Glucuronidierung beteiligten Enzyme

Als mögliche Ursache für die angesichts der erheblichen Dosierung relativ geringe Wiederfindung von Testosteron im Urin kam der bereits bekannte Polymorphismus des an der Glucuronidierung beteiligten Enzyms vom Typ UGT2B17 in Betracht (Jakobsson et al., 2006; Schulze et al., 2008). Im Falle einer homozygoten Deletion in der kodierenden Gensequenz fehlt dieses Enzym vollständig, was eine deutlich verminderte Bildung und Ausscheidung von Testosteronglucuronid zur Folge hat. Aus diesem Grunde wurde der UGT2B17 Genotyp mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) bestimmt.

## Ergebnisse

Wie in der Vorstudie wurde trotz erheblicher Dosierung von Testosteronen (1750 mg am ersten Tag, weitere 13 mal 500 mg im Abstand von 2 bis 5 Tagen) in keinem Fall der nach den WADA Richtlinien für den T/E-Quotienten kritische Grenzwert von 4 erreicht (siehe Abb. 1).

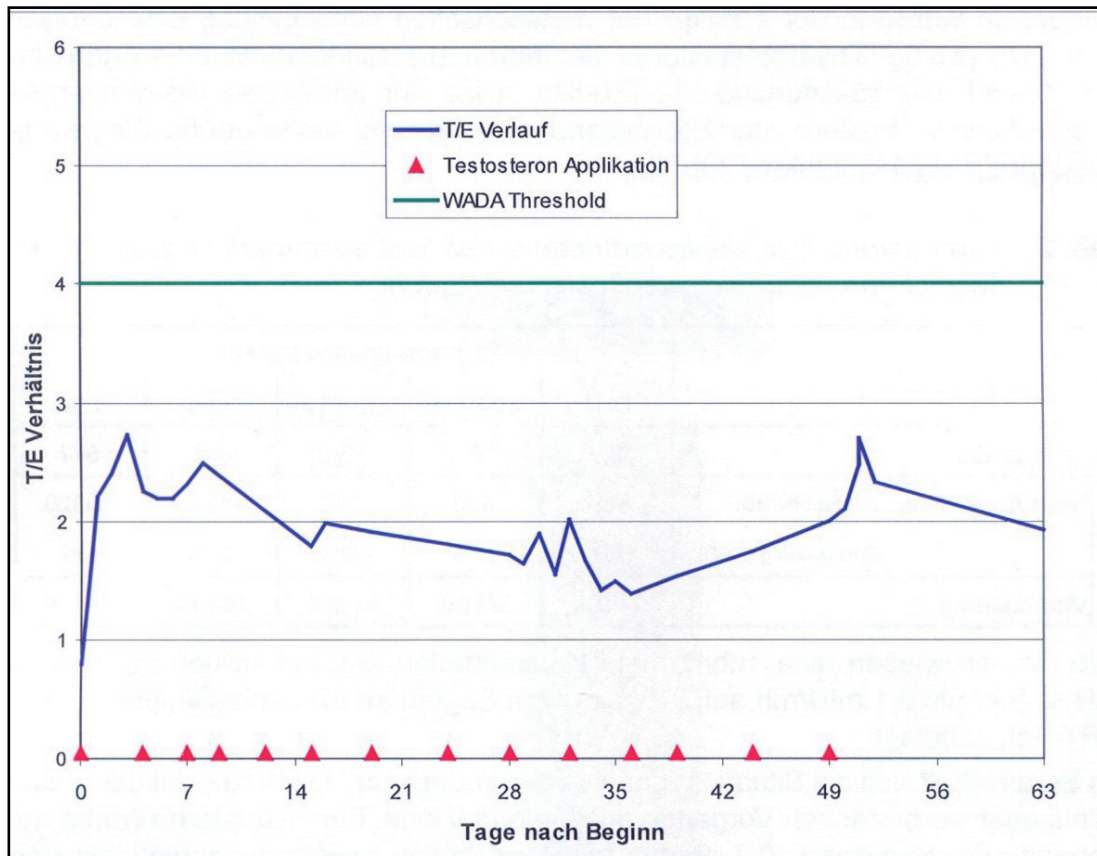


Abb. 1. Unauffälliger Verlauf des urinären T/E-Quotienten trotz massiver Testosteronzufuhr

Ursächlich für dieses Phänomen ist einerseits die gemessen an der massiven Dosierung zu geringe Gesamtmenge an renal ausgeschiedenem Testosteron, zum anderen aber eine signifikante Erhöhung der Konzentration von Epitestosteron im Urin (siehe Tab. 1).

Tab. 1. Veränderung der Urinkonzentrationen von Testosteron, Epitestosteron und dem daraus resultierenden T/E-Quotienten unter massiver Testosteronzufuhr

		Konzentration (ng/ml)		Verhältnis
		T	E	T/E
Basiswerte		2,2	2,8	0,8
nach Applikation	durchschnittlich	81,3	40,5	2,0
	Schwankung (RSD)	34%	34%	18%
Veränderung		<b>3596%</b>	<b>1346%</b>	<b>155%</b>

Außerdem wurde in der Abfolge der metabolischen Umwandlung eine deutliche Erhöhung von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron, der intermediären Metaboliten  $5\alpha$ -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol und  $5\beta$ -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol sowie der terminalen Biotransformationsprodukte Androsteron und Etiocholanolon festgestellt, wobei der  $5\alpha$ -Weg stärker ausgeprägt erscheint (siehe Tab. 2).

Tab. 2. *Veränderung der Urinkonzentration der Biotransformationsprodukte von Testosteron unter massiver Testosteronzufuhr*

	Konzentration (ng/ml)					
	DHT	$5\alpha$ -Adiol	$5\beta$ -Adiol	And	Etio	
Basiswerte	2,5	15,4	23,0	657	877	
nach Applikation	durchschnittlich	18,7	429	326	11295	10320
	Schwankung (RSD)	45%	43%	42%	38%	49%
Veränderung		649%	2688%	1316%	1619%	1077%

Alle Proben wiesen eine subnormale Konzentration des Luteinisierungshormons (LH kleiner als 0,1 mIU/ml) auf, was eine von Beginn an existente Suppression der HPT-Achse belegt.

Im Serum stellt sich die Situation grundlegend anders dar, da dort die mit der renalen Elimination verbundenen Vorgänge ausgeblendet sind. Für Testosteron wurde ausgehend vom Basalwert (0,2 ng/ml) nach Applikation erwartungsgemäß ein deutlicher Anstieg auf durchschnittlich  $31 \pm 9$  ng/ml gefunden, während Epitestosteron nicht detektierbar war. Für 4-Androsten- $3,17$ -dion als wahrscheinliches Intermediat bei der Bildung von Epitestosteron aus Testosteron wurde eine geringfügige Zunahme von 0 auf  $1,1 \pm 0,6$  ng/ml registriert.

Die bei den Kohlenstoffisotopenverhältnis-Bestimmungen erhaltenen Resultate weisen im Vergleich zu den endogenen Referenzsubstanzen eine signifikante Erniedrigung der  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Werte von mehr als 4 ‰ sowohl für die Marker einer erfolgten Anwendung synthetischen Testosterons als auch für Epitestosteron aus (siehe Tab. 3).

Tab. 3. *Erniedrigung der  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Werte für die Marker exogenen Testosterons und Epitestosteron im Vergleich zu den endogenen Referenzsubstanzen in der untersuchten Fallstudie unter erheblicher Testosteronzufuhr*

		Differenzen Dd	
		Endogene Referenzverbindungen	
d $^{13}\text{C}$ [‰]		11-Hydroxyandrosteron	Pregnandiol
		-23,4	-24,6
<i>Marker</i>			
Testosteron	-28,8	<b>-5,4</b>	<b>-4,2</b>
Etiocholanolon	-30,2	<b>-6,8</b>	<b>-5,6</b>
Androsteron	-29,4	<b>-6,0</b>	<b>-4,8</b>
5 $\alpha$ -Androstandiol	-30,1	<b>-6,7</b>	<b>-5,5</b>
<i>spezielle Zielsubstanz</i>			
Epitestosteron	-29,3	<b>-5,9</b>	<b>-4,7</b>

Auf diese Weise wurde gezeigt, dass sich zum einen auch ohne initiale Grenzwertüberschreitung des T/E-Quotienten die exogene Herkunft des Testosterons eindeutig beweisen lässt, und zum anderen in diesem speziellen Fall ganz offensichtlich Epitestosteron aus dem applizierten Testosteron gebildet wurde, was wiederum den diagnostischen Wert des T/E-Quotienten als maßgeblichen Selektionsparameter einschränkt.

Mit Hilfe der PCR wurde der Genotyp hinsichtlich des für die Glucuronidierung von Testosteron hauptsächlich verantwortlichen Enzyms UGT2B17 als homozygot deletiert (*del/del*) bestimmt. Bei dieser Konstellation wird dieses Enzym nicht gebildet, was im untersuchten Fall zur beobachteten deutlichen Verminderung der renalen Ausscheidung von Testosteron entscheidend beiträgt, da die Glucuronidierung des Testosterons ausschließlich von anderen, dafür weniger spezifischen Isoformen (UGT2B15) getragen wird.

## Diskussion

Ursächlich für das in der untersuchten Fallstudie beobachtete Phänomen eines trotz hochdosierter Anwendung von Testosteron unauffälligen T/E-Quotienten im Urin ist einerseits die durch den Genotyp des für die Glucuronidierung von Testosteron (*Phase-II-Metabolisierung*) verantwortlichen Enzyms UGT2B17 bedingte relativ geringe Gesamtmenge an renal ausgeschiedenem Testosteron, zum anderen eine signifikante Erhöhung an Epitestosteron im Urin. Während der Polymorphismus bezüglich UGT2B17 und dessen Einfluss auf die Testosteronausscheidung und den urinären T/E-Quotienten seit einigen Jahren bekannt ist, widerspricht die Beobachtung einer deutlich erhöhten Epitestosteronkonzentration im Urin nach Testosterongebrauch den bisherigen Erfahrungen aus zahlreichen Applikationsstudien. Diese hatten zu der These geführt, dass nach einer Applikation von Testosteron dieses im

Zuge der Biotransformation **nicht** zu Epitestosteron umgewandelt wird, was infolge der Erhöhung der Testosteronkonzentration selbst zu einem signifikanten Anstieg des Quotienten aus den Konzentrationen von Testosteron und Epitestosteron als initiales Verdachtsmoment führt.

Da die Glucuronidierung von Epitestosteron hauptsächlich von der Isoform UGT2B7 gesteuert wird und somit unabhängig vom beschriebenen Polymorphismus hinsichtlich UGT2B17 ist, kommen als mögliche Ursachen für die Bildung von Epitestosteron aus Testosteron am ehesten spezifische Vorgänge im Phase-I-Metabolismus des Testosterons in Frage. Die offensichtlich beschleunigte Bildung von Biotransformationsprodukten lässt Sättigungseffekte oder, als Folge einer damit einhergehenden Enzyminduktion, die Aktivität einer 17 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase vermuten.

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass der T/E-Quotient als primärer Selektionsparameter allein zu unspezifisch ist, da er sowohl zu den hier beschriebenen falsch-negativen Befunden führen kann als auch, bedingt durch die biologische Variabilität, eine erhebliche Anzahl von falsch-positiven Verdachtsbefunden verursacht. Letztere stellen weniger ein inhaltliches Problem dar, da sie sich in der Regel als physiologisch bedingte Grenzwertüberschreitungen erweisen, sondern berühren eher die Frage einer effizienten Herangehensweise, da eine Vielzahl aufwändiger Zusatzuntersuchungen dann in der Regel zu negativen Befunden führt. Um dieses Dilemma zu vermeiden, sind ausgehend von den Ergebnissen dieser Fallstudie und allgemeinen Beobachtungen in der Praxis, weitere Parameter als wichtige Elemente für die Verdachtsgewinnung zu berücksichtigen. Dazu gehören bei männlichen Athleten die Information zum funktionellen Zustand der HPT Achse (LH Suppression) und zum UGT2B17 Genotyp. Außerdem sind die seit längerem avisierten individuellen Steroidprofilaten stärker zur Herausfilterung von Proben mit auffälligen Datensätzen heranzuziehen, um diese dann gezielt klärenden Untersuchungen, zu denen aus gegenwärtiger Sicht vorrangig die Kohlenstoffisotopenverhältnis-Bestimmung gehört, zuführen zu können.

## Literatur

- Jakobsson, J., Ekström, L., Inotsume, N., Garle, M., Lorentzon, M., Ohlsson, C., Roh, H.K., Carlström, K. & Rane, A. (2006). Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 91 (2), 687-693.
- Schulze, J.J., Lundmark, J., Garle, M., Skilving, I., Ekström, L. & Rane, A. (2008). Doping test results dependent on genotype of uridine diphospho-glucuronosyl transferase 2B17, the major enzyme for testosterone glucuronidation. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*, 93 (7), 2500-2506.