

Nachweis von autologem Blutdoping anhand Markern der molekularen Immunantwort auf die sogenannte „storage lesion“

(AZ 070303/10-11)

Torben Pottgiesser (Projektleiter)¹, Sandy Mosig², Paul Fisch³, Markus Umhau⁴, Thomas Sander¹, Nina Linder¹ & Manfred Baumstark¹

¹Medizinische Universitätsklinik Freiburg, Abteilung Rehabilitation, Prävention und Sportmedizin

²Universitätsklinikum Jena, Arbeitsgruppe Molekulare Hämostaseologie

³Universitätsklinik Freiburg, Institut für Pathologie

⁴Universitätsklinikum Freiburg, Zentrale Einrichtung Transfusionsmedizin

1 Problem

Bis heute existiert keine direkte Nachweismethode für den Missbrauch von autologen Bluttransfusionen, die nach den aktuell gültigen Regeln der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) als verbotene Methode im Sport definiert sind (M1. Manipulation of blood and blood components) (www.wada-ama.org). Gemessen an den Geständnissen vieler Athletinnen bzw. Athleten und Erkenntnissen über organisiertes Doping im professionellen Sport muss davon ausgegangen werden, dass diese Methode weiterhin angewendet wird. Zwischenzeitlich existieren einige Ansätze für indirekte Nachweisverfahren, die außer dem vielversprechenden sog. Biologischen Pass der Athletin bzw. des Athleten (ABP) (www.wada-ama.org) jedoch nicht fest etabliert sind (z. B. zusätzliche Messung der Hämoglobingehaltmenge (Pottgiesser et al., 2012), Messung von Metaboliten der sog. „Plasticizer“ im Urin (Weichmacher des Kunststoffes der Transfusionsbeutel) (Monfort et al., 2010), Messung von Proteomveränderungen der Erythrozytenzellmembran unter Lagerung (Marrocco et al., 2012).

Eine weitere Nachweismethode könnte auf Messungen der Immunantwort basieren, die sich spezifisch auf die Applikation von gelagertem Eigenblut detektieren ließe. Die Rationale hinter diesem Ansatz erschließt sich aus den vielfach beschriebenen Veränderungen, die durch die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten oder Vollblut entstehen und die im englischen Sprachgebrauch als „storage lesion“ bekannt sind (z. B. erhöhte Anzahl von Membranvesikeln (Greenwalt, 2006) und Veränderungen der gelagerten alternden Erythrozyten mit Phospholipidasymmetrie sowie Modifikationen von Bande-3-Protein (Bessos & Seghatchian, 2005). Diese Veränderungen sollen die Zellen zur Entfernung aus der Zirkulation markieren, eine direkte Prozessierung durch das Immunsystem ist in der Konserve jedoch nicht möglich, so dass die angehäuften alten Zellen und ihre „Abfallprodukte“ als Zelldetritus bei der autologen Reinfusion dem Immunsystem des Empfängers plötzlich in großer Menge präsentiert werden. In einer Pilotstudie konnte durch unsere Arbeitsgruppe auf Genexpressionsebene gezeigt werden, dass nach autologer Transfusion eine Immunantwort von T-Lymphozyten detektierbar ist (Pottgiesser et al., 2009), Aussagen zu Veränderungen auf Proteinexpressionsebene waren jedoch nicht möglich.

Bei fortgeführten Literaturrecherchen fiel auf, dass nach autologen Bluttransfusionen bei nicht-anämischen Testpersonen das Phänomen der Neozytolyse eine besondere Rolle spielen könnte, durch das das rote Blutzellvolumen reguliert wird, wenn es exzessiv und der Situation unangepasst ausgeprägt ist. Dabei sollen die jungen zirkulierenden roten Blutzellen (Neozyten) selektiv durch Phagozyten des retikuloendothelialen Systems hämolysiert werden (Rice & Alfrey, 2005). Dazu existieren in Zusammenhang mit autologen Transfusionen bisher keine Erkenntnisse.

Zur Evaluation der molekularen Immunantwort auf autologe Transfusionen und der Veränderungen der Erythrozytenpopulation wurden folgende Arbeitspakete und Experimente geplant:

1. ‚*In vitro*‘ Untersuchung der Immunantwort anhand von Oberflächenmarkern auf Monozyten und T-Lymphozyten.
2. ‚*In vivo*‘ Untersuchung der Immunantwort auf autologe Transfusionen anhand eines erweiterten Immunprofils unter Berücksichtigung von Monozyten, T-Lymphozyten, T-Zellaktivierung und NK-Zellen.
3. Evaluation der Erythrozytenpopulation nach autologer Transfusion anhand von Dichteseparation und erythrozytärer Antigenmarkierung.

2 Methoden

2.1 Arbeitspaket 1

Diese Experimente erfolgten in Kooperation mit Herrn Dr. Sandy Mosig und der Arbeitsgruppe Molekulare Hämostaseologie des Uniklinikums Jena. Es wurden 10 Testpersonen eingeschlossen (30 ± 5 Jahre, $70,8 \pm 3,3$ kg, 175 ± 11 cm), deren Erythrozytenkonzentrate (EKs) nach Vollblutspende von 500 ml je über zwei unterschiedliche Zeiträume (30 und 45 Tage) gelagert und dann mit individuell mittels Biocoll frisch gewonnenen PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) für drei Tage in Zellkultur genommen wurden (EK-PAGGS-M). Als Kontrollen dienten frisch isolierte Erythrozyten in Zellkultur mit PBMCs (EK-frisch) sowie PBMCs selbst, die nicht mit EKs inkubiert wurden (PBMC ohne EK). Zu definierten Zeitpunkten (Tag 1 und Tage 3 in Zellkultur) folgten mehrere parallel durchgeführte Experimente mit durchflusszytometrischer Erfassung (BD FACS Canto II) von Markern auf Erythrozyten (CD235a, EMA-Färbung (*eosin-5-maleimide*), Annexin V, CD44, CD47, CD71), Monozyten (CD14, CD16, CD235a, HLA-DR-DP-DQ (*MHC-II-Klasse-Moleküle*), EMA-Färbung) und T-Lymphozyten (CD3, CD4, CD8, TLR4, TLR5, TLR6 (*TLR: Toll-Like-Rezeptor*)). Zwischen der Wiederholung der Arbeitspakete lag ein Zeitraum von 4 Wochen. Nach Abschluss der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte das Gating und die Analyse der Daten mit der Software FlowJo 9.4.2. (Treestar Software, OH, USA). Die Unterschiede der hier dargestellten „mean fluorescence intensity“ (MFI) der verschiedenen Marker zwischen den einzelnen Zellkulturen, der Inkubationsdauer (1 vs. 3 Tage) sowie der unterschiedlichen Lagerungsdauer (30 vs. 45 Tage) wurden statistisch mit einem gepaarten T-Test geprüft. Aufgrund der arbiträren Einheit der MFI ist keine direkte Vergleichbarkeit verschiedener Marker möglich, da diese auch von der Kompensation und der Einstellung des FACS-Geräts abhängig ist.

2.2 Arbeitspaket 2

Dieses Arbeitspaket wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. P. Fisch (Immunpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinik Freiburg) bearbeitet. Insgesamt wurden 22 Testpersonen eingeschlossen und auf 2 Gruppen (Intervention und Kontrolle, je $N = 11$, je 10 Männer und 1 Frau). Wichtig war, dass die Testpersonen der Interventionsgruppe keine Lizenz eines der NADA oder der WADA unterworfenen Sportfachverbandes besitzen und/oder an Wettkämpfen aktiv teilnehmen, um nicht gegen gültige Anti-Doping Regeln zu verstoßen. Gleichzeitig war die Gegenzeichnung einer Anti-Doping-Verpflichtung Voraussetzung zur Teilnahme. Sowohl Blut-Abnahme als auch Reinfusion fanden ausschließlich in der zentralen Einrichtung „Transfusionsmedizin“ nach international gültigen Standards für eine Blutbank statt.

Vor und zu definierten Zeitpunkten nach autologer Transfusion eines EK erfolgte eine venöse Blutabnahme und Markierung von PBMCs mit diversen Antikörpern, die zur besseren Übersichtlichkeit in Abbildung 1 dargestellt sind. Diese dienten zur Erfassung der Immunantwort von verschiedenen Zelltypen (A = Monozyten, B = T-Lymphozyten und TLRs, C = T-Zellaktivierung, D = regulative T-Zellen) mittels modernem Durchflusszytometer (Beckmann Coulter Navios). Dabei gelang es, die Kontrollen an allen Messzeitpunkten der Interventionsgruppe mitzumessen. So könnten mögliche analytische Schwankungen aufgedeckt werden, auch wenn der 6 h-Wert nicht direkt kontrolliert werden konnte. Die Rohdaten wurden exportiert und mit der Software „Kaluza“ (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) ausgewertet. Dabei erfolgte das Gating individuell für jeden Datensatz anhand vorher festgelegter Diagramme für jeden Zelltyp. Anschließend wurden die exportierten FACS Daten mit der „R statistics software“ (Version 2.15.1, THE R Foundation for Statistical Computing, GNU General Public License) ausgewertet. Zur Evaluation des Faktors Zeit wurden ein Friedman-Test sowie außerdem ein Wilcoxon Test für paarweise Vergleiche angewendet.

Röhrchen Nr.	488nm					633nm			405nm	
	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-A700	APC-A750	PacBlue	KromeOrange
Monozyten	CD227	CD86	CD14	CD80	CD235a	CD1a	CD16	CD11b	HLA-DR	CD45
T-Zellen	TLR5	TCR $\alpha\beta$	CD56	TCR $\gamma\delta$	TLR4	TLR6	CD8	CD3	CD4	CD45
T-Aktivierung	CD11a	TCR $\alpha\beta$	CD56	TCR $\gamma\delta$	CD69	CD28	CD8	CD3	CD4	CD45
Reg. T-Zellen	CD25	CD127					CD8	CD3	CD4	CD45

Abb. 1: Markerprofil der 4 unterschiedlichen Testansätze Monozyten, T-Zellen, T-Aktivierung und regulative T-Zellen unter Angabe des Fluorochroms und der Verteilung auf die Laser.

2.3 Arbeitspaket 3

In dieses Arbeitspaket wurden insgesamt 20 männliche Probanden eingeschlossen und auf zwei Gruppen je 10 Probanden verteilt (Intervention: Alter 25 ± 3 Jahre, Größe $178,4 \pm 5,0$ cm, Gewicht $71,3 \pm 6,2$ kg vs. Kontrolle: Alter 25 ± 3 Jahre, Größe $179,7 \pm 5,1$ cm, Gewicht $71,3 \pm 6,6$ kg). Erneut war von Bedeutung, dass die Probanden der Interventionsgruppe keine Lizenz eines der NADA oder der WADA unterworfenen Sportfachverbandes besitzen und/oder an Wettkämpfen aktiv teilnehmen.

Vor und mehrfach nach autologer Transfusion eines EK (Lagerungsdauer 49 Tage) wurde zu definierten Zeitpunkten (ein, drei, sieben und zehn Tage nach Transfusion) venös Blut (EDTA, Blutbild und Serum) entnommen. Folgende Messgrößen wurden erfasst: kleines Blutbild, Blutmarker der Hämolyse sowie Ferritin, high sensitive C-reaktives Protein (hsCRP) und Serum-Erythropoietin (EPO). Außerdem wurden Erythrozyten mittels Percoll-Technik (4-schichtiger, diskontinuierlicher Dichtegradient) zu 3 Zeitpunkten (1 Tag vor Transfusion, 3. und 7. Tag nach Transfusion) nach ihrer Dichte in 3 Fraktionen (gering/mittel/hoch) aufgetrennt und eine nicht separierte Probe isoliert. Zur Beschreibung verschiedener Oberflächenmarker auf Erythrozyten nach Transfusion wurden die Zellen der einzelnen Dichtebanden mit fluoreszenzfarbstoff-konjugierten FITC-Antikörpern gegen CD44, CD47, CD58, CD59 und CD71 sowie die Isotypen-Kontrollen IgG1, IgG2a und IgG2b (alle BD Pharmingen FITC mouse IgG antibody class, BD Biosciences) in einzelnen Ansätzen angefärbt und mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCalibur) in einem hämatologischen Labor der Universitätsklinik Freiburg unter Verwendung des primären 488 nm Laser gemessen, dabei waren Spülmedium und der Puffer (PBS/2mM EDTA) isoosmotisch. Anschließend wurden die FACS Daten mit dem „flowcore package“ (Release 2.10) der „R statistics software“ (Version 2.15.1) ausgewertet. Die statistischen Berechnungen für diesen Studienteil erfolgten mit JMP (Version 7.0.1 und 9.0.2, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) sowie IBM SPSS 20.0 (IBM Deutschland, Ehningen, Germany). Ein Kruskal-Wallis Test bzw. ein Mann-

Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben wurde durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe zu erkennen.

3 Ergebnisse

3.1 Arbeitspaket 1

Erythrozyten: Für die gelagerten Erythrozyten ließen sich Veränderungen nachweisen, die der sog. „storage lesion“ entsprechen und so als Grundvoraussetzung eine Immunreaktion auslösen können. Dabei zeigte sich beispielsweise ein signifikanter Anstieg der EMA-Färbung und erhöhte Präsenz von Phosphatidylserin gemessen durch erhöhte Annexin V-Bindung sowohl nach 30 ($p = 0,033/p = 0,008$) als auch nach 45 Tagen Lagerung ($p = 0,022/p = 0,006$). Die Lagerungsdauer (30 vs. 45 Tage) war dabei ohne Einfluss auf die Expression dieser Marker. Ebenfalls signifikant erhöht fand sich das transmembranöse Glykoprotein CD47 (Integrin-assoziiertes Protein) sowohl nach 30 als auch 45 Tagen Lagerung, dessen Bedeutung nicht ganz eindeutig geklärt ist. Auf der einen Seite scheint gesichert, dass bei Verlust von CD47 eine Phagozytose-vermittelte Entfernung von Erythrozyten induziert wird (Oldenborg et al., 2000). Auf der anderen Seite existieren neue Daten, die darauf hinweisen, dass CD47 als ein „molekularer Schalter“ funktioniert und in veränderter Konformation als Signal für Phagozytose wahrgenommen wird, insbesondere bei alten Erythrozyten (Burger et al., 2012). In diesen Zusammenhang würde gut passen, dass das Zelladhäsionsmolekül CD44 in der Rolle als Phagozytose vermittelnder Rezeptor (Vachon et al., 2007) zwar (noch) nicht nach 30 Tagen, jedoch nach 45 Tagen Lagerung signifikant gegenüber frisch gewonnenen Erythrozyten erhöht ist.

Monozyten: Außer bei den technisch erschwerten Messungen bei Verwendung der EMA-Färbung mit nur unzureichend zu isolierenden Monozyten, fanden sich in den übrigen Ansätzen der untersuchten Monozyten ein signifikant erhöhtes CD235a sowohl auf Monozyten, die mit 30 Tage gelagerten EK-PAGGS-M kultiviert wurden ($p = 0,005$), jedoch deutlich geringer ausgeprägt als auf Monozyten, die mit EK-frisch für einen Tag kultiviert wurden ($P = 0,001$). Das gleiche Verhältnis zeigte sich auch nach 3-tägiger Inkubation in Zellkultur, dabei war CD235a in EK-frisch allerdings signifikant stärker detektierbar als nach einem Tag ($p = 0,008$). Das gleiche Bild ergab sich bei der Wiederholung des Versuchs mit einer 45-tägigen Lagerungsdauer von EK-PAGGS-M, ein Einfluss der Lagerungsdauer auf die Ausprägung von CD235a konnte dabei nicht festgestellt werden (siehe Abb. 2). Hinsichtlich der MHC-II-Klasse Moleküle fiel auf, dass diese unter Verwendung des Antikörpers gegen HLA-DR-DP-DQ auf mit EK-PAGGS-M kultivierten Monozyten nicht signifikant gegenüber PBMC-ohne-EK erhöht waren, wohl aber auf mit EK-frisch kultivierten Monozyten, die zu allen Zeitpunkten sowohl gegenüber 30 als auch 45 Tage gelagerten Erythrozyten nach einem und drei Tagen Zellkultur eine erhöhte Expression an der Zelloberfläche gezeigt haben (für alle $p < 0,01$). Gleichzeitig ließ sich feststellen, dass nach 3-tägiger Kultivierung von PBMCs ohne Erythrozyten HLA-DR-DP-DQ auf Monozyten signifikant geringer ausgeprägt ist ($p = 0,003$ für Kultur als Kontrolle 30 Tage, $p = 0,035$ für Kultur als Kontrolle 45 Tage).

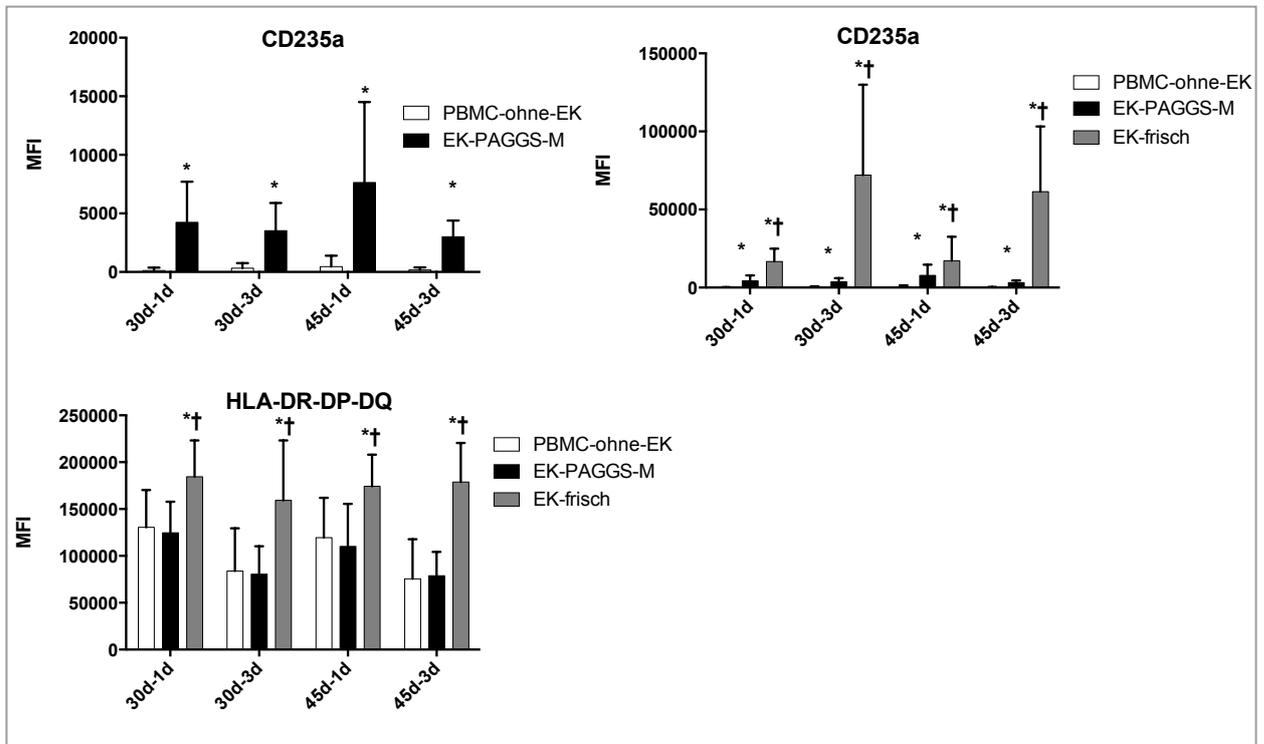


Abb. 2: MFI von CD235a und HLA-DR-DP-DQ auf Monozyten in Co-Kultivierung mit EK-PAGGS-M, EK-frisch sowie ohne Erythrozyten (PBMC-ohne-EK). Aufgrund der arbiträren Einheiten der MFI wurde die Skalierung der Ordinate zur besseren Darstellung angepasst. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen PBMC-ohne-EK und EK-PAGGS-M werden diese zunächst getrennt und dann im Vergleich zu EK-frisch dargestellt. Signifikante Unterschiede im gepaarten t-Test im Vergleich zu PBMC-ohne-EK sind durch einen **Stern**, signifikante Unterschiede zwischen EK-PAGGS-M und EK-frisch sind durch einen **Dolch** markiert.

T-Lymphozyten: Nach drei Tagen Co-Kultivierung kam es zu einem signifikanten Anstieg der TLR4-Expression auf allen Subpopulationen der T-Lymphozyten (pan CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, alle $p < 0,01$) und verglichen mit der Expression nach einem Tag Co-Kultivierung (alle $p < 0,02$). Dagegen bestand kein Unterschied der TLR4-Expression zwischen der Kultivierung mit EK-frisch und EK-PAGGS-M (siehe Abb. 3). Bei der Expression von TLR5 zeigten sich wenige statistisch signifikante Effekte bei Konstanz der TLR5-Expression. Das Expressionsmuster von TLR6 zeigte dagegen fast das Muster von TLR4. Es fand sich eine erhöhte TLR6-Expression auf allen Subpopulationen nach 3 Tagen Co-Kultivierung mit sowohl für 30 als auch 45 Tagen gelagerten EK-PAGGS-M, die gegenüber EK-frisch außer auf CD3+CD8+ auch auf panCD3+ und CD3+CD4+ signifikant erhöht war (EK-PAGGS-M 30 Tage $p < 0,05$, EK-PAGGS-M 45 Tage $p < 0,01$). Der Anstieg der TLR6-Expression auf T-Lymphozyten war auch im direkten Vergleich von EK-PAGGS-M zwischen einem und drei Tagen Co-Kultivierung signifikant ($p < 0,01$). Die Lagerungsdauer von EK-PAGGS-M für 30 oder 45 Tage blieb ohne signifikanten Effekt bei allen gemessenen TLRs für alle untersuchten Populationen und die unterschiedliche Kultivierungsdauer.

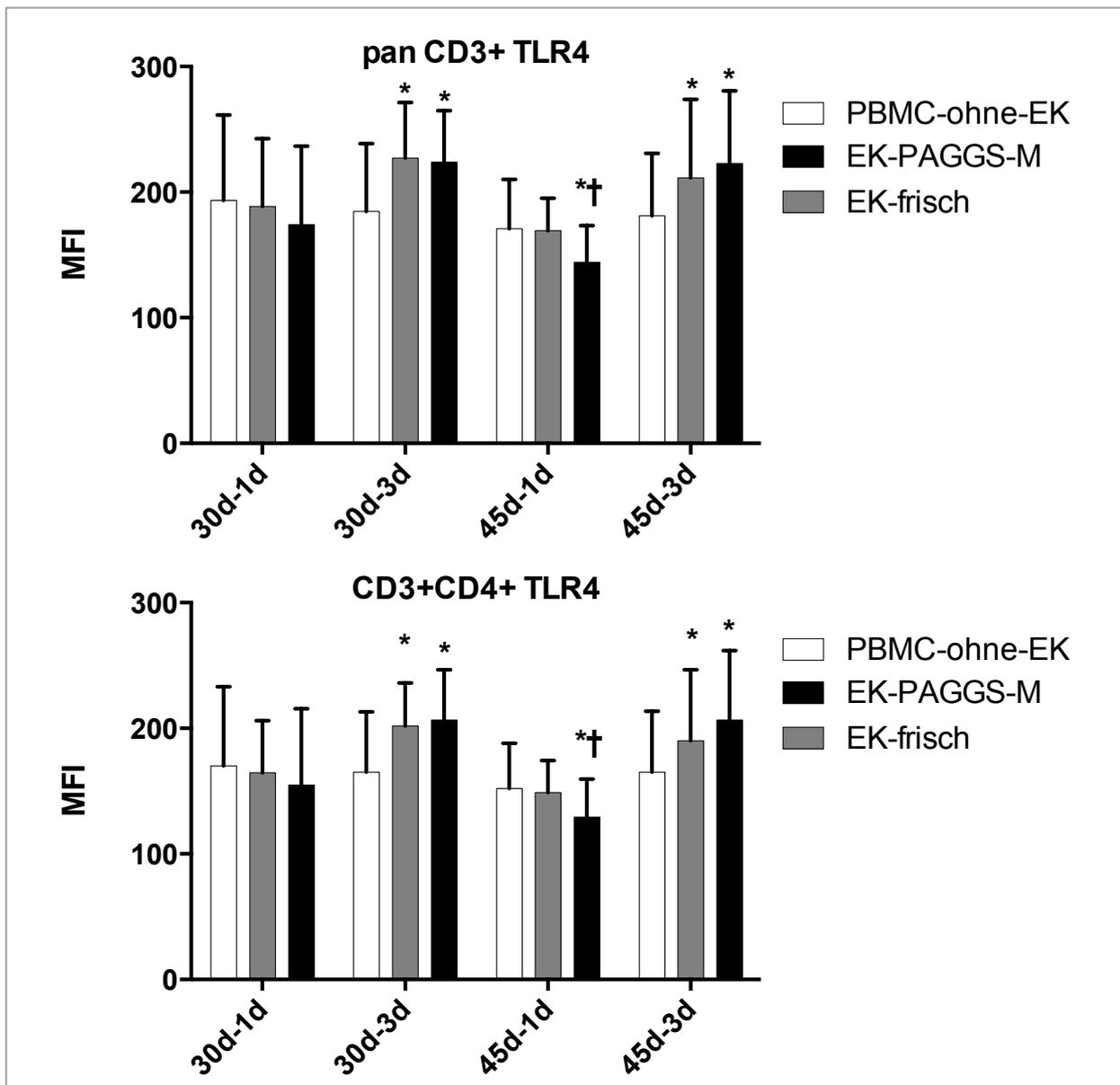


Abb. 3: MFI von TLR4 auf T-Lymphozyten (pan CD3+ sowie CD3+CD4+) in Co-Kultivierung mit EK-PAGGS-M, EK-frisch sowie ohne Erythrozyten (PBMC-ohne-EK). Aufgrund der arbiträren Einheiten der MFI wurde die Skalierung der Ordinate zur besseren Darstellung angepasst. Signifikante Unterschiede im gepaarten t-Test im Vergleich zu PBMC-ohne-EK sind durch einen **Stern**, signifikante Unterschiede zwischen EK-PAGGS-M und EK-frisch sind durch einen **Dolch** markiert

3.2 Arbeitspaket 2

Testansatz Monozyten und weitere Leukozyten: Zum Zeitpunkt 6 h nach Transfusion fanden sich die deutlichsten Effekte. So kam es zu einem diskreten Anstieg der klassischen Monozyten mit dem Aktivierungsmarker CD80, der ein für die T-Zellaktivierung notwendiges co-stimulatorisches Signal darstellt (Peach et al., 1995). Außerdem fiel auf, dass das Tandemmolekül für die T-Zellaktivierung CD86 (13) sowohl bei den klassischen Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻) als auch bei den nicht-klassischen

Monozyten (CD14+CD16++) 6 h nach Transfusion erhöht scheint. CD11b (aus der Integrin Familie) war auf verschiedenen Zelltypen in erhöhter Expression messbar. CD11b ist bekannt auf verschiedenen Immunzellen exprimiert und reguliert die Adhäsion und Migration von Leukozyten, was hier als Hinweis auf eine inflammatorische Antwort auf die autologe Transfusion gewertet werden kann. In dem gleichen Zusammenhang könnte die vermehrte Expression des Oberflächenrezeptors HLA-DR auf klassischen Monozyten stehen, das potentiell fremde Antigene an den T-Zellrezeptor präsentiert und hier als Marker der Immunstimulation interpretiert werden darf. Beispielhaft für dieses Arbeitspaket ist der Verlauf verschiedener semiquantitativ positiv gateder Zelltypen sowie die MFI (hier Median-Fluoreszenz-Intensität) einzelner Marker in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt.

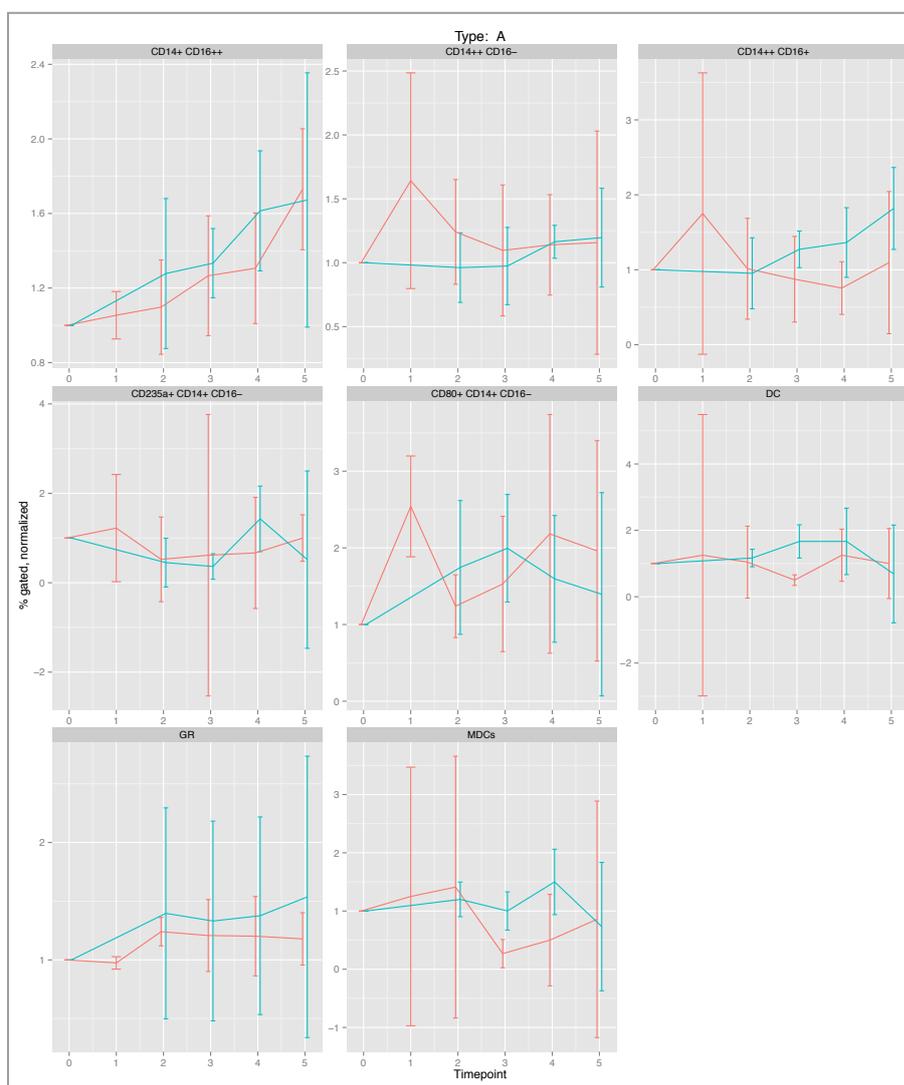


Abb. 4: Type A: Monozyten und weitere Leukozyten: auf den Zeitpunkt 1 normalisierte Daten der entsprechend semiquantitativ gateden Zellen (relative Anzahl aller „events“ je Ansatz, die nicht der quantitativen Anzahl gleichzusetzen ist) im zeitlichen Verlauf nach autologer Transfusion (0 = vor Transfusion, 1 = 6 h nach Transfusion, 2-5 = Tag 1-4 nach Transfusion): CD14+ CD16- (klassische Monozyten), CD14++CD16+ (intermediäre Monozyten), CD14+CD16++ (nicht klassische Monozyten), DC (dendritische Zellen), GR (Granulozyten), MDC (myeloide dendritische Zellen). Marker CD235a und CD80. Rot: Interventionsgruppe. Grün: Kontrollgruppe. Die Linie beschreibt jeweils den Median, die vertikalen Linien sind angenäherte 95 % Konfidenzintervalle.

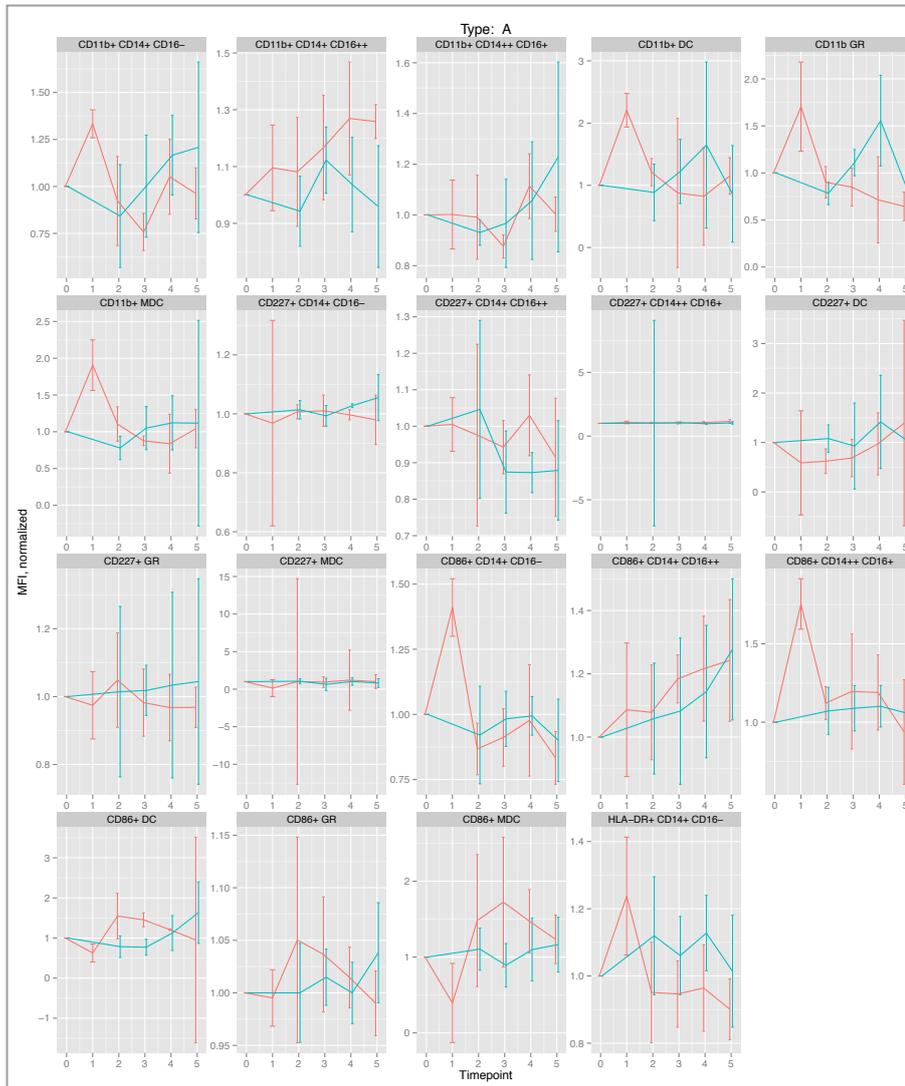


Abb. 5: Type A: Monozyten und weitere Leukozyten: Median fluorescence intensity (MFI) als auf den Zeitpunkt 1 normalisierte Daten im zeitlichen Verlauf nach autologer Transfusion (0 = vor Transfusion, 1 = 6 h nach Transfusion, 2-5 = Tag 1-4 nach Transfusion): Auswahl der interessantesten Marker von CD45+ Zellen: CD14+ CD16- (klassische Monozyten), CD14++CD16+ (intermediäre Monozyten), CD14+CD16++ (nicht klassische Monozyten), DC (dendritische Zellen), GR (Granulozyten), MDC (myeloide dendritische Zellen). Rot: Interventionsgruppe. Grün: Kontrollgruppe. Die Linie beschreibt jeweils den Median, die vertikalen Linien sind angenäherte 95 % Konfidenzintervalle.

Testansatz T-Lymphozyten und TLRs (Type B): Hier ergab sich im Friedmann-Test ein über den Faktor Zeit ein signifikanter Verlauf insbesondere für die TLR-4 positiven NK-Zellen ($p = 0,044$) und TLR4- positiven NK CD8+ positiven Zellen ($p = 0,035$). NK-Zellen spielen bei der angeborenen Immunantwort eine Rolle, eine Aktivierung von NK-Zellen durch TLRs wird diskutiert (Lauzon et al. 2007).

Testansatz T-Lymphozyten und T-Zellaktivierung (Type C): Nach 6 h fällt eine verminderte relative Anzahl der NK-Zellen auf, die auch im Rahmen der beschriebenen Immunmodulation als Antwort auf allogene Transfusionen beschrieben wurde (Vamvakas & Blajchman, 2007). Außerdem scheinen $\alpha\beta$ T-Lymphozyten 6 h nach Transfusion bei einigen Testpersonen vermindert. Hinsichtlich der insgesamt in geringerer Menge vorkommenden CD8+ $\gamma\delta$ T-Zellen scheint eine größere Anzahl dieser

Zellen 6 h nach Transfusion positiv für den Marker CD69, der in Zusammenhang mit der Aktivierung von T-Zellen steht (Simms & Ellis, 1996) und hier ebenso eine Reaktion auf die autologe Transfusion darstellen könnte. Außerdem scheint die Expression der mittleren Intensität von CD11a insbesondere auf CD8+ $\alpha\beta$ T-Lymphozyten und CD8+ NK Zellen im Verlauf nach der Transfusion erhöht exprimiert.

Testansatz regulative T-Lymphozyten (Type D): Schließlich sollte durch die Analyse von regulatorischen T-Zellen untersucht werden, ob die Transfusion von autologem Blut zu einer vermehrten Aktivität dieser Zellen und damit zu einer Suppression des Immunsystems führt (Hori et al., 2003), die so eine bessere Toleranz auf die Transfusion von körpereigenem Zellmaterial und Detritus erwarten lassen könnte. Wesentliche Unterschiede lassen sich bei der Gruppenanalyse hier nicht feststellen, die MFI des klassischen Markers der regulatorischen T-Zellen, CD25 scheint nach Transfusion leicht vermindert. Dagegen zeigt sich bei der semiquantitativen Analyse eine vermehrte Anzahl CD127+ regulatorischer T-Zellen zwei Tage nach der Transfusion. Eine erhöhte Expression von CD127+ wird derzeit als Aktivierungsmarker von regulatorischen T-Zellen verstanden (Simonetta et al., 2010).

3.3 Arbeitspaket 3

Nach Transfusion der EKs mit einer Lagerungszeit von 49 Tagen kam es zu einem Anstieg der Hb-Konzentration ($p = 0,054$). Der Spiegel von sEPO fiel signifikant bis zum Tag 10 um $34,0 \pm 32,7\%$ ab (Sander, 2013). Außerdem zeigte sich ein sowohl zum Zeitpunkt vor Retransfusion als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhtes Ferritin beobachtet werden (Anstieg bis zu $116 \pm 110\%$ an Tag 1). Die Retikulozyten zeigten dagegen keine wesentliche Änderung. Abb. 6 zeigt die absolute Verteilung der Zellen in den Dichtebanden.

Hier zeigt sich passend zur Theorie der Neozytolyse eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion der Zellen mit geringer Dichte, wenn diese als junge Zellen gedeutet werden (Lutz et al., 1992). Gleichzeitig kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Zellen mit hoher Dichte, der sich in ähnlicher Ausprägung auch bei der Kontrollgruppe finden lässt. An Tag 7 waren diese Veränderungen verglichen mit den Werten vor Transfusion (Tag-1) leicht regredient, jedoch in der Interventionsgruppe noch zugunsten der hohen Dichte verschoben. Der Anteil der Zellen mit mittlerer Dichte sind weitgehend unverändert, nur zum Zeitpunkt Tag 7 in der Interventionsgruppe verglichen mit den Kontrollen erhöht ausgeprägt.

Hinsichtlich der erythrozytären Oberflächenmarker erscheint das Expressionsmuster von CD44 am interessantesten, das bei Zellen mit geringer Dichte am Tag 3 nach Transfusion signifikant intensiver nachzuweisen ist, nicht aber bei der Kontrollgruppe. Da dieses Zelladhäsionsmolekül eine Rolle als Phagozytose vermittelnder Rezeptor spielt (Vachon et al., 2007; Vachon et al., 2006; Anstee et al., 1991), könnte es in Zusammenhang mit einer erhöhten Destruktion der jungen Erythrozyten gesehen werden.

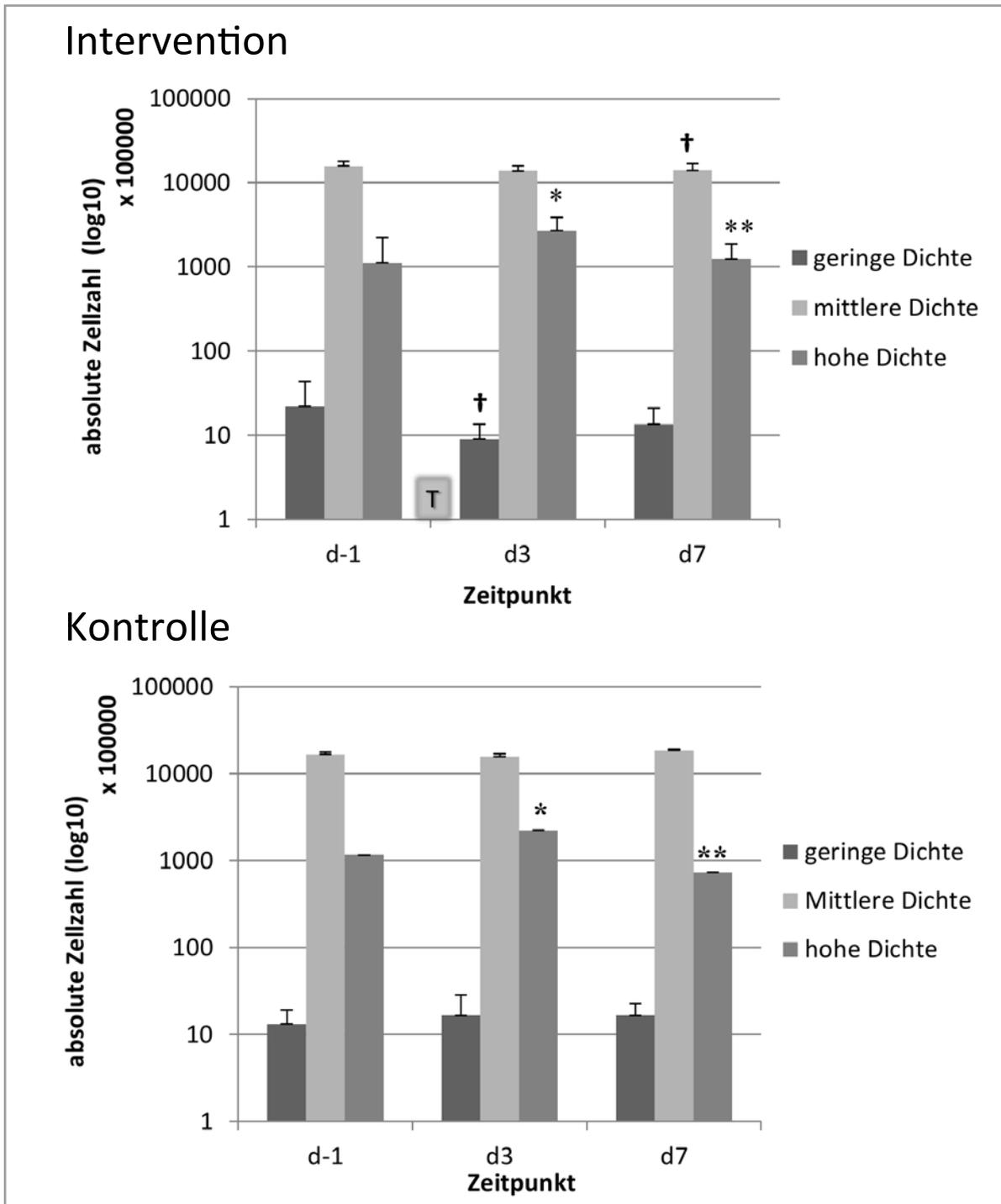


Abb. 6: Absolute Erythrozytenverteilung nach Dichte (A: Interventionsgruppe, B: Kontrollgruppe). Jede Säule stellt die Mittelwerte mit Standardabweichungen der Erythrozyten geringer, mittlerer und hoher Dichte dar. Zur besseren Übersicht wurden die Daten logarithmisch aufgetragen. (T = Transfusionstag, * zeigt eine signifikante Veränderung zum Tag vor Transfusion (d-1), ** bedeutet signifikanter Unterschied zwischen Tag 3 und Tag 7, † steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt). Abbildungen aus und modifiziert nach (Sander, 2013).

4 Diskussion

Durch dieses Projekt konnte gezeigt werden, dass es am ehesten als Reaktion auf die sog. „storage lesion“ eine detektierbare Immunantwort gibt, die hier zunächst *in vitro* beschrieben wurde. Dabei fiel vor allem eine mögliche Phagozytose von erythrozytärem Debris durch Monozyten auf sowie eine Beteiligung der Toll-like Rezeptoren an der Immunantwort sowohl der T-Helfer als auch der zytotoxischen T-Zellen. Zuvor konnten morphologische Änderungen der gelagerten Erythrozyten mit Ausprägung eines vermehrten seneszenten Phänotyps als Grundlage für eine mögliche Immunantwort identifiziert werden.

Eine mögliche Erklärung für die unerwartet hohe Expression von CD235a von mit frischen Erythrozyten kultivierten Monozyten könnte durch ein vermehrtes Auftreten von technisch bedingten Trümmern gefunden werden, die zu einer vermehrten Aufnahme durch Monozyten und hierdurch zu einem gegenüber den verbleibenden Testkonditionen erhöhten EMA und CD235a Signal geführt haben. In dem ersten Arbeitspaket konnten auf Proteinexpressionsebene wesentliche Ergebnisse der Genexpressionsstudie (Pottgießer et al., 2009) verifiziert werden. Interessanterweise existieren neue Daten aus dem Jahr 2012, die zeigen, dass TLR4 auf CD4+-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems autoimmune Entzündungsprozesse fördert und so Aufgaben in der Regulation der T-Zellaktivierung übernimmt (Reynolds et al., 2012). Dieser Prozess wäre auch als Reaktion auf autologes Blut möglich, so dass insbesondere TLR4 als Marker für den Nachweis autologer Transfusionen weiter untersucht werden sollte.

Auch *in vivo* (2. Arbeitspaket) fanden sich Veränderungen der Immunantwort, insbesondere zum Zeitpunkt 6 h nach Transfusion. Dabei zeigten sich die deutlichsten Effekte bei Monozyten, die vor allem durch eine Erhöhung der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 auffielen. Auch für die Beteiligung von TLR4 fanden sich erneut Hinweise, die jedoch noch genauer evaluiert werden sollten. Einschränkend muss für dieses Studienteil festgestellt werden, dass sich die Veränderungen hauptsächlich nur kurzfristig nach autologen Transfusionen feststellen lassen und durch biomathematische Modelle aufgrund der komplexen Zusammenhänge und Interaktionen noch genauer untersucht werden sollten. Daher konnte ein eindeutiges Testverfahren auf autologe Bluttransfusionen (noch) nicht abgeleitet werden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass ein beispielsweise sechsstündiges Nachweisfenster nicht praxisnah ist. Gemessen an der normalerweise auf einen Reiz später auftretende T-Zellantwort bestand vorher die berechnete Hoffnung, Effekte zu finden, die zumindest für einige Tage eindeutige Veränderungen zeigen. Folglich konnte die ursprünglich in dem Arbeitsplan vorgesehene Applikationsprüfung in einem zertifizierten Anti-Doping Labor nicht durchgeführt werden. Dagegen könnten die Ergebnisse neben der Applikation im Bereich „Anti-Doping“ Bedeutung für klinisch durchgeführte autologe Transfusionen haben und im Gegensatz zu der bekannten Immunmodulation auf allogene Transfusionen (Vamvakas & Blajchman, 2007) eine Immunreaktion auch auf autologe Transfusionen nachweisen. Folglich werden in einem durch die Abteilung Sportmedizin Freiburg finanzierten Folgeprojekt statistische Analysen mit dem Versuch einer biomathematischen Modellerstellung durchgeführt, die helfen sollen, bei der Vielzahl von untereinander abhängigen Markern die Immunreaktion besser zu charakterisieren und ggf. noch eine spätere Immunantwort nach Tagen zu beschreiben. Gleichzeitig wird in Zusammenarbeit mit Prof. Fisch unter Berücksichtigung der bisherigen und zukünftigen statistischen Ergebnisse eine Publikation über die immunmodulatorischen Effekte einer autologen Transfusion angestrebt.

Durch die Ausweitung der Analysen auf die Veränderung der Erythrozytenpopulation konnte mit diesem Projekt eine neue Gruppe von Biomarkern abgeleitet werden, die sich für einen Nachweis

von autologen Transfusionen eignen könnten. Es finden sich erste Hinweise darauf, dass es durch die autologe Transfusion von für 49 Tage gelagertem Blut zu einer Umverteilung der Population mit Reduktion der jungen Erythrozyten kommt, die durch das Konzept der Neozytolyse erklärt werden könnten (Sander, 2013; Alfrey et al., 1997).

Bei individueller Betrachtung der Zusammensetzung der Dichtebanden fällt auf, dass teilweise eine große interindividuelle Variabilität besteht. Hier kann diskutiert werden, dass dies durch die Herstellung von diskontinuierlichen Dichtegradienten und der nachfolgenden Quantifizierung mittels Neubauer-Zählkammer bedingt sein kann, wobei insbesondere die Herstellung der Gradienten und der Bandenisolation fehleranfällig sein kann (Lutz et al. 1992). Insbesondere könnte der parallele Anstieg der Zellen mit hoher Dichte an Tag 3 nach Transfusion methodisch bedingt sein, auch wenn die Bedingungen in diesem Versuch bestmöglich kontrolliert wurden und kein offensichtlicher Fehler bei der Durchführung vorlag. Daher sollte zukünftig versucht werden, auf eine besser zu standardisierende Methode wie kontinuierliche Dichtegradienten zurückzugreifen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte erfolgreich ein Projekt mit Förderung durch die WADA beantragt werden (Förderjahr 2012: 11B16TP: „Detection of autologous blood transfusion by analysis of erythrocyte density fractions and flow cytometry“). Außerdem gelang es unserer Arbeitsgruppe, eine neue Methode zur Beschreibung der Erythrozytenform zu publizieren (Ahlgrim et al., 2013), die im Rahmen des WADA Projekts für autologe Transfusionen überprüft wird. Vor dem Hintergrund der neuen Ergebnisse und der Erkenntnisse dieser Untersuchung werden ebenfalls weitere Publikationen vorbereitet.

Parallel zu den hier beschriebenen Experimenten des Arbeitspakets 3 wurde vor und im Verlauf nach autologer Transfusion Serum abgenommen, das in Kooperation mit dem Anti-Doping Labor Lausanne durch Dr. Nicolas Leuenberger durch dortige Finanzierung (Mittel aus „Partnership for Clean Competition (PCC)“ and “Exiqon grant program”) auf micro-RNAs (miRNAs) untersucht wurde. Hier zeigte sich eine klare Veränderung des Musters von zirkulierenden miRNAs (14 signifikant hochregulierte miRNAs, von denen miR-30b, miR-30c und miR-26b die größten Veränderungen zeigten). Die diesbezügliche Publikation wurde im Journal “PLOS One” publiziert (Leuenberger et al., 2013). Auch diese Ergebnisse könnten zukünftig in einem erweiterten multifaktoriellen Modell berücksichtigt werden, beispielsweise im ABP, und autologe Bluttransfusionen durch eine verbesserte Sensitivität besser erkennen lassen.

5 Literatur

- Ahlgren, C., Pottgiesser, T., Sander, T., Schumacher, Y. O. & Baumstark, M. W. (2013). Flow Cytometric Assessment of Erythrocyte Shape through Analysis of FSC Histograms: Use of Kurtosis and Implications for Longitudinal Evaluation. *Plos One*, 8 (3), e59862.
- Alfrey, C. P., Rice, L., Udden, M. M. & Driscoll, T.B. (1997). Neocytolysis: physiological down-regulator of red-cell mass. *Lancet*, 349 (9062), 1389–1390.
- Anstee, D. J., Gardner, B., Spring, F. A., Holmes, C. H., Simpson, K. L., Parsons, S. F., et al. (1991). New monoclonal antibodies in CD44 and CD58: their use to quantify CD44 and CD58 on normal human erythrocytes and to compare the distribution of CD44 and CD58 in human tissues. *Immunology*, 74 (2) 197–205.
- Bessos, H., & Seghatchian, J. (2005). Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells. *Transfusion and apheresis science*, 32 (2), 227–232.
- Burger, P., Hilarius-Stokman, P., de Korte, D., van den Berg, T. K. & van Bruggen, R. (2012). CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis. *Blood*, 119 (23), 5512–5521.
- Greenwalt, T. J. (2006). The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion (Paris)*, 46 (1), 143–152.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 14 (299) (5609):1057–1061.
- Lauzon, N. M., Mian, F. & Ashkar, A. A. (2007). Toll-like receptors, natural killer cells and innate immunity. *Advances in experimental medicine and biology*, 598, 1–11.
- Leuenberger, N., Schumacher, Y. O., Pradervand, S., Sander, T., Saugy, M. & Pottgiesser, T. (2013). Circulating microRNAs as biomarkers for the detection of autologous blood transfusion. *Plos One*, 8 (6), e66309.
- Lutz, H. U., Stammler, P., Fasler, S., Ingold, M. & Fehr, J. (1992). Density separation of human red blood cells on self forming PercollR gradients: correlation with cell age. *Biochimica et biophysica acta*, 1116 (1), 1–10.
- Marrocco, C., Pallotta, V., D'alessandro, A., Alves, G. & Zolla, L. (2012). Red blood cell populations and membrane levels of peroxiredoxin 2 as candidate biomarkers to reveal blood doping. *Blood transfusion (Trasfusion sangue)*, 10 (2), 71–77.
- Monfort, N., Ventura, R., Latorre, A., Belalcazar, V., López, M. & Segura, J. (2010). Urinary di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in athletes as screening measure for illicit blood doping: a comparison study with patients receiving blood transfusion. *Transfusion (Paris)*, 50 (1), 145–149.
- Pottgiesser, T., Ehteler, T., Sottas, P.-E., Umhau, M. & Schumacher, Y. O. (2012). Hemoglobin mass and biological passport for the detection of autologous blood doping. *Medicine and science in sports and exercise*, 44 (5), 835–843.
- Pottgiesser, T., Schumacher, Y. O., Funke, H., Rennert, K., Baumstark, M. W., Neunuebel, K., et al. (2009). Gene expression in the detection of autologous blood transfusion in sports – a pilot study. *Vox sanguinis*, 96 (4), 333–336.
- Oldenborg, P. A., Zheleznyak, A., Fang, Y. F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D. & Lindberg, F. P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 16 (288) (5473), 2051–2054.

- Peach, R. J., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A., et al. (1995). Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28. *The journal of biological chemistry*, 270 (36), 21181–21187.
- Reynolds, J. M., Martinez, G. J., Chung, Y. & Dong, C. (2012). Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109 (32), 13064–13069.
- Rice, L. & Alfrey, C.P. (2005). The negative regulation of red cell mass by neocytolysis: physiologic and pathophysiologic manifestations. *Cellular physiology and biochemistry*, 15 (6), 245–250.
- Sander, T. (2013). *Veränderungen erythrozytärer Marker im kurzfristigen Verlauf nach autologer Bluttransfusion*. Dissertation Albert-Ludwigs- Universität Freiburg.
- Simms, P. E. & Ellis, T. M. (1996). Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 3 (3), 301–304.
- Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., et al. (2010). Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *European journal of immunology*, 40 (9), 2528–2538.
- Vachon, E., Martin, R., Kwok, V., Cherepanov, V., Chow, C.-W., Doerschuk, C. M., et al. (2007). CD44-mediated phagocytosis induces inside-out activation of complement receptor-3 in murine macrophages. *Blood*, 110 (13), 4492–4502.
- Vachon, E., Martin, R., Plumb, J., Kwok, V., Vandivier, R. W., Glogauer, M., et al. (2006). CD44 is a phagocytic receptor. *Blood*, 107 (10), 4149–4158.
- Vamvakas, E.C. & Blajchman, M. A. (2007). Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood reviews*, 21 (6), 327–348.
- WADA (2012). *The World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2013 prohibited list. International Standard*. 10 September 2012, WADA. <http://www.wada-ama.org>.
- WADA (2012). *World Anti-Doping Code. Athlete Biological Passport Operating Guidelines and Compilation of Required Elements. V3.1*, WADA, <http://www.wada-ama.org>.