Neuentwicklungen bei Dopingnachweisverfahren

18.10.2010

Prof. Dr. Wilhelm Schänzer
Institut für Biochemie
Deutsche Sporthochschule Köln

Verbesserungen in der Dopinganalytik sind zuletzt in verschiedenen Bereichen erzielt worden.

SARMs (Selektive Androgen Rezeptor Modulatoren): Diese neuen Substanzen, die bereits Anfang 2009 von der WADA auf die Verbotsliste unter andere anabole Wirkstoffe gesetzt wurden, sollen vergleichbare Wirkungen wie die verbotenen anabolen Steroidhormone aufweisen, wobei die Nebenwirkungen im Vergleich zu den Anabolika deutlich geringer sein sollen. Das zur Zeit für die medizinische Anwendung am Weitesten entwickelte SARM ist Ostarine, das allerdings noch in der 3. klinischen Phase untersucht wird und nicht zugelassen ist. Seit Ende 2009 wird bereits ein Schwarzmarkthandel mit einem weiteren SARM S4 Andarine beobachtet. Nachweismethoden zu dieser Substanzgruppe konnten in den letzten Jahren zeitnah entwickelt und in den Dopingkontrolllaboratorien etabliert werden. Die ersten positiven Befunde mit dieser Substanz wurden in diesem Jahr bekannt.

EPO-Nachweis: Beim Nachweis von Erythropoietin (EPO) konnte neben der bisher bekannten IEF-Methode eine neue Technik, die SDS-Page-Methode, etabliert werden, die von der WADA als zusätzliche Methode zur Absicherung und Bestätigung positiver Befunde anerkannt wurde. Damit wird der EPO-Nachweis durch eine weitere unabhängige Methode deutlich verbessert und frühere Kritikpunkte hinsichtlich nicht ausreichender Spezifität der Antikörper, Verschiebungen der EPO-Profile durch „aktive" Urine und durch sportliche Belastung können problemlos entkräftet werden.
Bei der Bestimmung des unter dem Namen Mircera® (auch als CERA bezeichnet) bekannt gewordenen Präparates wird im Anfangstest ein spezifischer ELISA-Test für Blutproben eingesetzt. Die Bestätigungsanalyse kann nun sowohl mit der IEF-Technik als auch mit der SDS-PAGE-Technik erfolgen. Aufgrund der Modifikation des EPO-Moleküls (Verknüpfung mit einem polymeren PEG) und der langen Halbwertzeit ist die Substanz bis zu 2 Wochen oder länger nachweisbar.
Ein neues EPO-Präparat namens Hematide®, das für den medizinischen Einsatz noch nicht zugelassen ist und sich in der 3. klinischen Phase befindet, kann allerdings mit den bisherigen Techniken nicht nachgewiesen werden.
Zur Zeit werden Forschungsprojekte von der WADA unterstützt, die einen Nachweis von Hematide mittels eines ELISA-Tests favorisieren. Ein weiteres Verfahren mittels eines

eindeutigen massenspektrometrischen Nachweises ist am Zentrum für Präventive Dopingforschung der DSHS Köln in der Entwicklung.
Im Vergleich zu den bisherigen EPO-Präparaten hat Hematide eine deutlich unterschiedliche Struktur. Es wird allerdings in größeren Mengen appliziert, was den Nachweis wesentlich erleichtern wird.

Wachstumshormon: Ein Testverfahren für Wachstumshormon, das von den Wissenschaftlern Straßburger und Bidlingmeier entwickelt wurde, konnte auf der Basis kommerziell hergestellter Antikörper mit Unterstützung der WADA umfangreich validiert werden. Das Verfahren wird weltweit eingesetzt und hat im Laufe des Jahres auch zu ersten positiven Befunden geführt. An der Verbesserung des Verfahrens wird zur Zeit geforscht, insbesondere sind Untersuchungen mit Antikörpern für das 20kD-HGH, die Erfassung von indirekten Blutparametern wie IGF-1 und Präkollagen-III sowie Verfahren zur HGH-Isomerenbestimmung mittels 2D-Elektrophorese in Bearbeitung.
Zunehmend werden sogenannte HGH-Releasingpeptide beworben und angeboten, deren Wirkung eine Steigerung der endogenen HGH-Produktion ist. Eine Anwendung lässt sich dann nicht mit dem HGH-Test nachweisen. Hier greifen bereits entwickelte massenspektrometrische Verfahren, die einen Nachweis ermöglichen, da HGH-Releasingpeptide überwiegend andere Strukturen aufweisen als das körpereigene HGH-Releasinghormon (GHRH). Letzteres wird allerdings in so geringer Menge natürlich ausgeschieden, so dass der Nachweis von humanem GHRH in einer Urinprobe auf eine nicht erlaubte Anwendung schließen lässt.

Insulin-Nachweis: Nachweisverfahren für synthetische Insuline, die auf massenspektrometrische Techniken beruhen, werden mittlerweile in mehreren WADA akkreditierten Laboratorien angewendet. Auch bei den Olympischen Winterspielen 2010 in Vancouver wurde auf synthetische Insulinpräparate getestet. Der Nachweis erfasst allerdings nicht das körperidentische Insulin (Humaninsulin), sondern nur synthetisch modifizierte Insuline. Bei synthetischen Insulinen sind in der Regel eine oder mehrere Aminosäuren verändert, so dass eine Differenzierung zum körperidentischen Insulin analytisch möglich ist.

Gendoping:
Gendoping wird von der WADA in zwei Bereiche gegliedert:
1. Anwendung genetisch modifizierter Zellen (das entspricht zum einen der Gentherapie mittels DNA-Transfer, zum anderen umfasst es auch die Anwendung von RNA und RNA-Sequenzen (z.B. siRNA).
2. Substanzen, die eine Aktivitätsänderung (Genexpression) von Genen bewirken können (ausgewiesene Beispiele GW1516 und AICAR).
Zu 1) Zum verbotenen Transfer von DNA wurden aktuell Nachweismöglichkeiten der Arbeitsgruppe von Perikles Simon publiziert, die als mögliche erfolgversprechende Ansätze zu sehen sind. Zum Bereich RNA-Transfer wurden erstmals Forschungen zu

Nachweismöglichkeiten von sogenannten siRNAs publiziert. Bei siRNA (small interfering RNA) handelt es sich um kurzkettige RNA-Abschnitte von etwa 21-28 Nucleotiden, die bei der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen und diese modulieren können.
Zu 2) Die Anwendung von GW1516 und AICAR kann zur vermehrten Bildung sogenannter Typ I Muskelfasern ("Ausdauermuskulatur") sowie von Enzymen zur verbesserten Energiegewinnung aus Fetten führen (Nachweis in Tierversuchen). Im Sport könnten diese beiden Substanzen zur Steigerung der Ausdauerleistungsfähigkeit missbraucht werden. Zum Nachweis von GW1516 wurde ein massenspektrometrisches Nachweisverfahren entwickelt, das in den WADA Kontrolllaboratorien eingesetzt wird. Für die zweite Substanz AICAR gestaltet sich der Nachweis schwieriger, da AICAR auch natürlich gebildet wird. Zur Zeit werden die Möglichkeiten zur Festlegung von Grenzwerten im Urin untersucht.

Blutpass-Programm (Athlete's Biological Passport): Seit Anfang 2009 hat die Welt Anti-Doping Agentur (WADA) mit dem Regelwerk des Welt Anti-Doping Codes die Möglichkeit geschaffen, dass Verlaufskontrollen von Blutwerten auch zum Dopingnachweis verwendet werden können. Um ein solches "Indirektes Nachweisverfahren" erfolgreich anwenden zu können, wird eine Harmonisierung angestrebt, zu der die WADA Anfang 2010 Empfehlungen (Guidelines) mit Vorgaben für die Probenabnahme, Transport, Analyse im Labor und Datenauswertung erarbeitet hat. Zur Bewertung der verschiedenen hämatologischen Blutparameter wird zur Zeit ein statistisches Modell favorisiert, das von Sotas et al. ausgearbeitet wurde: Abnormal Blood Profile Score (ABPS). Dabei handelt es sich um eine statistische Berechnung (Bayes Statistik) individueller Blutwerte, wobei auch weitere Daten wie z.B. Höhenaufenthalt usw. berücksichtigt werden. Anhand dieser Statistik werden individuelle Grenzwerte berechnet, so dass statistisch gesicherte Abweichungen bei zeitlich folgenden Blutkontrollen als Dopingverstoß bewertet werden können.

Blutdoping: (Nachweis von Weichmachern) Neben dem Blutpass-Programm wurde in den letzten Wochen ein mögliches Nachweisverfahren diskutiert, das eine Bestimmung von Metaboliten des Weichmachers Diehtylhexylphthalat (DEHP) erfasst. DEHP wird als wesentlicher Weichmacher in Blutbeuteln, die für Bluttransfusionen verwendet werden, eingesetzt. In den ersten Stunden nach einer Bluttransfusion können deutlich erhöhte Werte der DEHP-Metaboliten im Urin detektiert werden und geben somit Hinweise auf ein möglich angewendetes Blutdoping. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass erhöhte Werte an DEHP-Metaboliten auch durch andere Expositionen zu DEHP möglich sind (hierzu sind weitere Forschungen erforderlich), können die Daten zur Zeit nur als zusätzliche Informationen zu auffälligen Blutwerten verwendet werden.