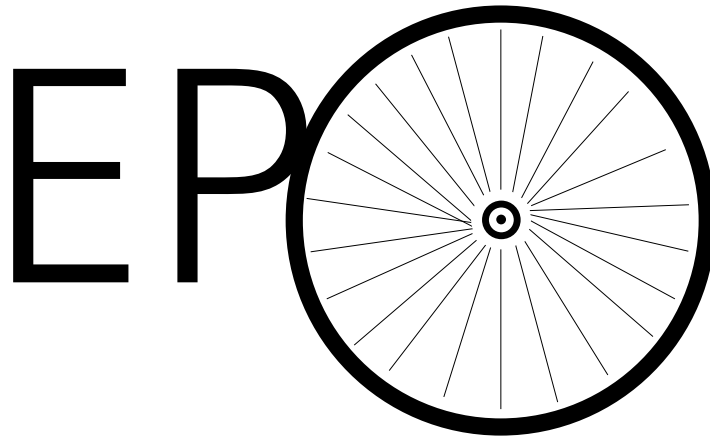




AF BIOANALYTIKER HELLE WITHEN
KLINISK BIOKEMISK AFDELING
FREDERIKSSUND HOSPITAL

VEJLEDER: BIOANALYTIKERUNDERVISER CONNY EGEBJERG, CVU ØRESUND
ARTIKLEN ER SKREVET SOM EN EKSAMENSOPGAVE PÅ DIPLOMMODULET, KLINISK
BIOKEMI VED DEN SUNDHEDSFAGLIGE DIPLOMUDDANNELSE, CVU ØRESUND

Spor af



Jagten på idrætsudøvere, der bruger ulovlige midler for bedre præstationer, er lang og virker nærmest uendelig. I denne artikel sætter jeg fokus på rekombinant humant erythropoitin, rhEPO. Jeg gennemgår beregningsmodeller, der kan bruges til at spore rhEPO og undersøger de forskellige modellens begrænsninger og styrker.

Der eksisterer i dag både direkte og indirekte metoder, der kan afsløre eller indikere et rhEPO-dopingmisbrug. Den direkte metode måler koncentrationen af rhEPO i urin, mens den indirekte beregner rhEPO's påvirkning af forskellige hæmatologiske parametre.

Hvis man vælger at måle på urin, er det muligt at afsløre rhEPO direkte. Løsningen giver imidlertid problemer med sensitivitet, da rhEPO har en halveringstid på 2-4 dage (1), mens effekten af rhEPO holder sig i 3-4 uger (2). Derfor forsøger forskere at finde indirekte metoder, der kan indikere en udefrakommende påvirkning af organismen.

Brug af indirekte metoder medfører imidlertid helt andre problemer. Det drejer sig nu ikke længere om kvalitative målinger: Er stoffet der eller ej? I stedet er omdrejningspunktet kvantitet: Hvor meget har indtagelsen af EPO ændret allerede eksisterende celler/parametre?

EPO findes naturligt i kroppen

Det kunstigt fremstillede hormon rhEPO (eksogent EPO) er en næsten nøjagtig kopi af hormonet erythropoitin, EPO. EPO stimulerer erythropoiesen, altså dannelsen af nye erythrocytter. Grunden til, at sportsfolk ønsker flere erythrocytter, er disse cellers evne til at transportere ilt og dermed energi.

Det er primært nyrerne, der naturligt producerer og frigiver EPO, når de registrerer nedsat ilttryk i blodet. Medicinsk bruges rhEPO bl.a. til patienter med nyresvigt eller HIV-infektion for at undgå blodtransfusioner (3), som vil være en unødvendig belastning af en i forvejen meget syg krop. Når nyrerne ikke fungerer, dannes der ikke EPO nok til at opretholde en acceptabel hæmoglobin-koncentration, hvilket yderligere vil forringe patientens livskvalitet.

Stoffets erythrocytproducerende virkning gør også rhEPO til et attraktivt præparat for atleter i sportsgrene, der kræver maksimal udholdenhed, f.eks. triatlon, cykling, maratonløb, langrend på ski, roning og lignende.

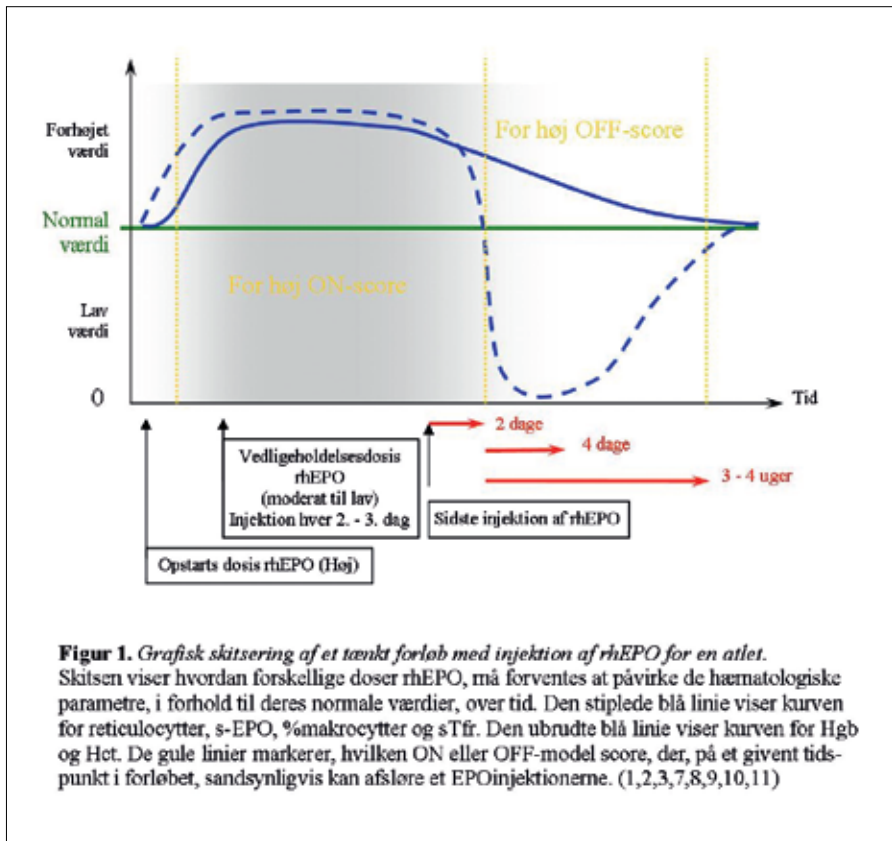
Direkte blod- og urintest er utilstrækkelige

De forbudte stoffer er samlet på Dopinglisten, der hvert år revideres af World Anti-Doping Agency, WADA. På Dopinglisten findes rhEPO. Ifølge WADA skal en atlet stille op til doping-kontrol

både under konkurrencer og uden for konkurrencer; hvor som helst, når som helst og uden varsel (4). Prøvematerialet kan både være blod og urin. Ifølge Anti Doping Danmark bruges der her i landet kun urinprøver (5,6). Urinen screenes vha. forskellige analysemetoder for at afdække de forbudte stoffer, man screener for.

Når urin screenes for rhEPO, vælges analysemetoder, der er i stand til at differentiere rhEPO fra endogent EPO, altså kroppens eget hormon. Man kan gøre det ved isoelektrisk fokusering af EPO på en polyacrylamid gel, hvor de to typer EPO vil vise sig som forskellige bånd (7). Denne metode er godt 6½ gang dyrere end en indirekte screening af blod (2) og finder ikke rhEPO-misbrugere, der stopper deres injektioner umiddelbart før en turnering, men alligevel opnår fordel af præparatets virkning.

Set i lyset af bioteknologiens fortsatte udvikling vil det sandsynligvis heller ikke vare længe, før forskerne kunstigt kan fremstille proteiner og hormoner, der gør det umuligt at skelne mellem endogene og eksogene produkter. Et eksempel herpå er DYNEPO, der virker præcist som rhEPO, men er fremstillet af en human cellelinje, så det på overfladen er identisk med endogent EPO (2). Der er altså flere argumenter for at udvikle indirekte metoder, der



kan bruges til at finde doping-misbrugere på andet end det stof, de indtager.

EPO ændrer hæmatologiske parametre

Der er lavet undersøgelser af, hvilke hæmatologiske parametre der påvirkes, når organismen tilføres rhEPO. Disse parametre er ligeledes undersøgt for, hvordan de matematisk skal beskrives for at optræde normalfordelt. Dvs. om de optræder normalfordelt, som de er, eller om de skal logaritmeres, kvadreres eller på anden måde udsættes for matematiske livtag for at få en normalfordelingskurve (2). De parametre, der her er i spil, er Hæmoglobin (Hgb), Hæmatokrit (Hct), procent reticulocytter (%Retic), reticulocyt hæmatokrit (RetHct), procent Makrocytter (%Makro), serum Erythropoietin (s-EPO) og soluble (opløselig) Transferrin receptor (sTfr).

Figur 1 viser, hvordan parametrene udvikler sig i forhold til opstart af rhEPO-injektion, vedligeholdelse af et ønsket niveau, og hvad der sker, når injektionerne stopper. Den stiplede blå linje repræsenterer de parametre, der stimulerer hæmopoiesen til øget aktivitet eller bliver forhøjede af den øgede aktivitet. Disse parametre falder til næsten 0, når rhEPO-injektionerne stopper. Organismen vil hurtigst muligt forsøge at vende tilbage til normalt niveau.

Den ubrudte blå linje viser de parametre, der er resultat af en accelereret hæmopoiese. Altså de parametre, der

hænger sammen med antallet af erythrocytter. De falder derfor ikke med samme hastighed som de øvrige, men i takt med det naturlige henfald af erythrocytter.

ON- og OFF-modeller afslører rhEPO

Der er udviklet modeller, der vha. nogle af de nævnte hæmatologiske parametre giver en indirekte indikation af, om en atlet har brugt rhEPO. Modellerne kaldes ON- og OFF-modeller. ON-modellerne kan vise, om en atlet på et givet tidspunkt injicerer rhEPO, da alle parametre i det tilfælde vil være forhøjede. Samspillet mellem udvalgte parametre (figur 1) bør resultere i en høj ON-score, der kan forstærke indikationen af, at noget ikke er, som det skal være.

OFF-modellerne er baseret på, at de erythrocyt-afhængige parametre (den ubrudte blå linje) gennem en periode er forhøjede, samtidig med at de parametre, der skal indikere en aktiv hæmopoiese, er unormalt lave eller helt fraværende (8) som vist på figur 1. Til sammen kan de forstærke indikationen af, at hæmopoiesen for nylig har været kunstigt accelereret og give en OFF-score, der er højere, end den burde være.

Formålet med disse modeller er, at man ved et doping-kontrolbesøg samtidig med urinprøven tager blodprøver og analyserer alle parametre. Derefter beregnes både ON- og OFF-scorer for hver enkelt atlet. Hvis en af scorene

SOLUBLE TRANSFERRIN RECEPTOR

Parameter der kan bruges til udredning af anæmi.

Forhøjede værdier ses ved:

- Øget behov for jern
- Hvis hastigheden, hvormed erythropoiesen forløber, er accelereret.

falder positivt ud, kan man vælge at iværksætte yderligere undersøgelser.

En positiv ON-score kan foranledige en 2.-kontrol af blod efter nogle dage og/eller en rhEPO-screening af urinprøven fra 1. kontrolbesøg.

En positiv OFF-score kan også foranledige en 2.-kontrolblodprøve, hvormod det ikke er sandsynligt at finde rhEPO i urinprøven.

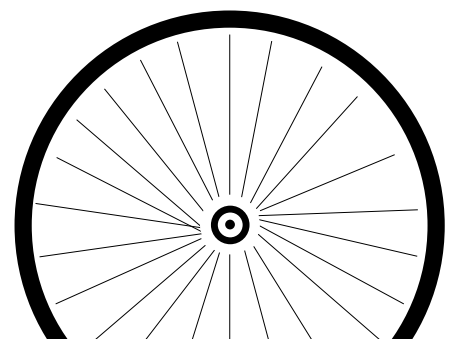
Første ON-model bruger Hct

Den første ON-model blev introduceret under OL i Sydney 2000 og ser ud som følger (8):

$$ON = 3,721Hct + 30,45RetHct + 0,1871\ln(s-EPO) + 0,1268\ln(sTfr) + 0,1115\ln(\%Makro + 0,1)$$

Modellen har en god evne til at identificere atleter, der bruger rhEPO som doping. Gentagne forsøg viser, at den kan finde 94-100 % (10). Det viser sig dog, at sensitiviteten af denne ON-model falder ved moderate og lave doser rhEPO (2).

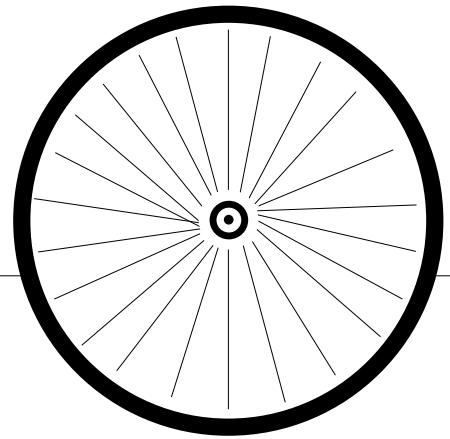
Denne ON-modelscore har også andre ulemper. Den tydeligste er, at det er en lang og indviklet formel med mange parametre. Generelt kan man sige, at jo flere parametre der indgår, jo flere analytiske variationer kan påvirke resultatet. Derudover indeholder modellen volumenafhængige parametre (Hct og retHct), hvilket reducerer holdbarheden af prøvematerialet, da erythrocytter svulmer op under opbeva-



● ON- OG OFF-MODELLER BRUGT I CYKELSPORT

- Cykelsporten er udsat for kraftig dopingmistanke, da rhEPO med stor fordel kan bruges. Team CSC har netop lanceret et stort internt dopingprogram. De ønsker at blive renset for mistro. I samarbejde med læge Rasmus Damsgaard fra Bispebjerg Hospital har de udviklet et program, der bl.a. baseres på OFFhr-scoren. Alle ryttere skriver under på, at de skal stille op til dopingkontrol hvor som helst og når som helst (12). Ved kontrollerne sammenlignes den enkelte rytters testresultater udelukkende med hans egne tidligere resultater.

Hvis et sådant program er seriøst og veldokumenteret, er det et godt bud på at komme på sporet af rhEPO.



>>>

ring og transport (2).

Den korte holdbarhed af blodprøverne gør det essentielt, at analysen kan udføres tæt på kontrolstedet. Da denne ON-model er baseret på Hct, spiller forskellen på standardmetoden og de automatiske metoder en væsentlig rolle. Standardmetoden er en volumenratio af erythrocytter efter centrifugering, mens den automatiske metode er baseret på elektriske impulser. Da der er diskrepans mellem de to metoder, komplicerer det en standardisering af flere forskellige udstyr.

Nyere ON-modeller bruger Hgb

Holdbarhed af fuldblodsprøverne og ønsket om bedre standardisering af parametre er årsag til at udvikle mere simple beregningsmodeller (2).

I en nyere ON-model har man valgt at bruge Hgb i stedet for Hct. Både Hgb og Hct er gode til at afsløre en accelereret hæmopoiese, men Hgb er et mere direkte, præcist og standardiseret parameter (2).

I stedet for kun en beregning i en ON-model med færre parametre har man valgt at benytte to forskellige beregninger. Den ene, ON_{he} , er udelukkende baseret på Hgb og s-EPO, mens den anden, ON_{hes} , har vægtet s-EPO mindre og tilføjet et fokus på sTfr (2).

$$ON_{he} = Hgb + 9,74 \ln(s-EPO)$$
$$ON_{hes} = Hgb + 6,62 \ln(s-EPO) + 19,4 \ln(sTfr)$$

Sensitiviteten på den første ON-model er generelt bedre i perioder med høj dosis rhEPO, mens ON_{he} og ON_{hes} giver bedre sensitivitet i perioder med lav dosis rhEPO. ON_{hes} er lidt bedre end ON_{he} (2). Dvs. især ON_{hes} er god til at fange atleter, der kun tager en lav dosis rhEPO for at vedligeholde et bestemt Hgb-niveau.

ON-modellerne har alle den fordel, at hvis en atlet vil forsøge at minimere risikoen for at dumpe en 2.-kontrol og stopper med at tage rhEPO, vil det vise

sig ved et signifikant fald i ON-modelscoren af den næste blodprøve (9), da nogle af de før så høje værdier nu næsten er 0 (se figur 1).

s-EPO og sTfr som parametre

Samtlige ON-modeller benytter sig af parametrene s-EPO og sTfr. Undersøgelser viser, at disse parametre ikke ændrer sig signifikant under en træningssæson for atleter, der ikke bruger rhEPO (9). Derimod er de to parametre signifikant ændret under hele injektionsperioden hos rhEPO-dopede atleter samt i de første to uger efter, at atleten er holdt op med at få injektioner af stoffet (10).

I forhold til holdbarhed af prøvemateriale viser begge parametre høj stabilitet i serum (10). Det gør s-EPO og sTfr til valgte parametre i disse modeller, og desuden kan de fryses og transporteres til analysering på ét bestemt udstyr.

Forskellen på ON-modellerne er derfor valget mellem Hct og Hgb. Da Hgb er en veldokumenteret analyse, med meget stabile resultater og gode muligheder for brug af små transportable analyseapparater, vil man med ON_{he} - og ON_{hes} -modellerne kunne skabe rimeligt stabile og ens resultater ved dopingkontrol.

Første OFF-model på Hct

Sammen med den første ON-model blev følgende OFF-model introduceret i 2000 (9):

$$OFF = 6,149Hct - 92,87RetHct - 0,1463 \ln(s-EPO)$$

Denne OFF-model er ikke ret sensitiv. Hvis man rammer mellem dag 11 og 15 efter ophør af injektioner med rhEPO, er der 50 % chance for at få en OFF-score over normal, hvis atleten tidligere har taget moderat dosis rhEPO. Ved lav dosis rhEPO finder denne beregningsmodel ingen misbrugere (2,10). Man formoder, at en atlet, der bruger rhEPO,

tager lav dosis for at vedligeholde et fastlagt niveau. Niveauet fastlægges givetvis ud fra flere kriterier: Der skal være en gavnlig effekt på præstationen, livet skal ikke sættes på spil, og man skal kunne bestå en evt. start-prøve (2). (Nogle forbund kræver f.eks. en Hct under 50 % for at give en udøver lov til at deltage i en konkurrence (10)). Derfor er det meget relevant at kunne spore ophør af lav dosis injektion med rhEPO.

To nyere OFF-modeller på Hgb

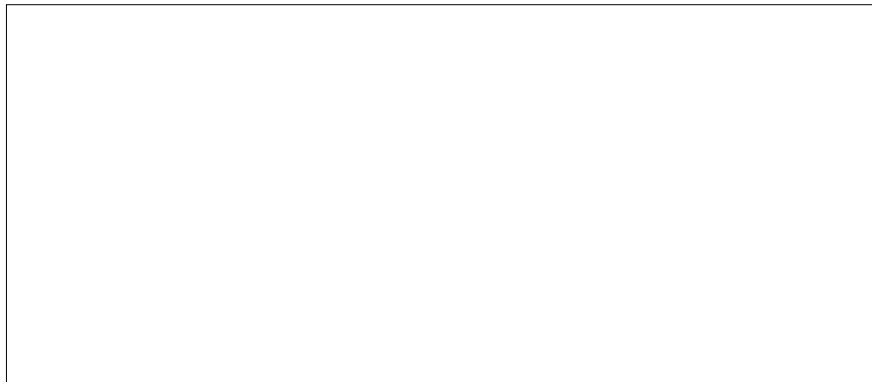
En anden OFF-model baseres, som i de nyere ON-modeller, på Hgb i stedet for Hct. Derudover bruges %Retic og s-EPO. Dette gør igen holdbarheden af fuldblodsprøverne bedre, da den procentvise andel af reticulocytter i forhold til det totale antal erythrocytter ikke ændrer sig, selvom cellerne svulmer op under opbevaring (2).

$$OFF_{hr} = Hgb - 60\sqrt{(\%Retic)}$$
$$OFF_{hre} = Hgb - 50\sqrt{(\%Retic)} - 7 \ln(s-EPO)$$

Disse to OFF-modeller viser langt højere sensitivitet over længere tid. Ved moderat dosis rhEPO finder modellerne tæt på 100% af alle atleter, der er stoppet med rhEPO-injektioner for 5 til 20 dage siden. Ved lav dosis findes 25-50% (2). Det er en klar forbedring i forhold til den tidligere model. OFF_{hes} har en lidt højere sensitivitet end OFF_{he} . Da effekten af rhEPO er helt væk efter 3-4 uger (2,10), er det acceptabelt.

Modellernes udfordringer

For at kunne anvende disse modeller må man se på, hvad der kan påvirke resultaterne. I denne sammenhæng er det relevant at se på, om de parametre, der indgår, ændrer sig over en sæson hos atleter, der ikke bruger nogen form for doping, samt se på forskelle på køn og



sportsgren. Abellan m.fl. (10) har set på et mindre antal (mellem 6 og 16) atleter inden for sportsgrene, der stiller forskellige krav til styrke og udholdenhed.

Undersøgelsen tyder ikke på signifikant forskel mellem køn for parametrene s-EPO, sTfr og %Retic, hvorimod der er signifikant forskel på Hgb-værdierne for mænd og kvinder.

Der ses ikke signifikante forskelle i baselineresultaterne for Hgb, sTfr og s-EPO mellem en kontrolgruppe og eliteatleter målt efter en længere hvileperiode. Over sæsonen og mellem de forskellige sportsgrene er der heller ikke noget, der indikerer signifikante forskelle. Hverken mellem sportsgrene eller i forhold til, hvor langt atleterne er i træningsperioden. %Retic svinger derimod en del, men det statistiske grundlag er lille, og værdierne er i forvejen lave, derfor er det svært at sige noget sikkert.

Undersøgelsen viser desuden, at alle atleter, på nær en enkelt ON-score, ligger under de fastlagte cut-offværdier for falskpositive resultater (10). Cut-off værdierne er fastlagt, så der er 1 ud af 100 falskpositiv på ON_{he} og ON_{hes} -modellerne, mens der er 1 ud af 1000, der giver falskpositivt resultat for OFF_{hr} og OFF_{hre} -modellerne (2). Det fremgår ikke, hvorledes grænserne for falskpositive cut-offscorer er valgt. Et bud er, at en positiv ON-score kan be- eller afkræftes af en urinprøve. Dette er ikke muligt ved en positiv OFF-score. Der kunne altså ligge et krav om større sikkerhed i resultatet bag valget af cut-offscorer.

En anden undersøgelse (9) forsøger at udvikle referenceintervaller for ON- og OFF-scorer. Her ser man på forskelle i etnicitet, sportsgren, træning i forskellige højder over havet, sygdomme samt biologisk variation over tid. Undersøgelsen viser, at det godt kan lade sig gøre at udvikle referenceintervaller for ON- og OFF-scorer, men der er uoverskue-

ligt mange faktorer, der spiller ind. Man kan ikke bare have et referenceinterval for mænd og et for kvinder. Højde over havet, etnicitet, sportsgren osv. har en betydning (9). Der ville være brug for ekstremt mange referenceintervaller, hvis man skulle tage højde for alle faktorer.

En tredje stor undersøgelse (11) ser på, hvordan atleter med jernmangel, med eller uden anæmi, vil score. Som forventet ligger deres ON-score en smule lavere end for raske atleter, OFF-scoren ligger på niveau med eller lidt over. Jernmangel giver altså ikke falskpositive resultater.

Konklusion

De parametre, der er valgt i de nye ON-/OFF-modeller, har bedre holdbarhed og dermed bedre analysekvalitet. Det gør, at ON_{he} , ON_{hes} , OFF_{hr} og OFF_{hre} kan betragtes som stabile modeller til at spore rhEPO.

Udfordringen for disse modeller er de variationer, der kommer udefra. Forskelle i køn er et overskueligt problem, men hvis man også skal tage hensyn til, hvor højt over havets overflade atleten har trænet, etnicitet, sportsgren og biologisk variation over tid, skal der bestemmes et utal af referenceintervaller.

Grundlaget for samtlige modeller er sammenligning. Hvis man derfor udelukkende sammenligner den enkelte atlet med egne tidligere resultater, vil man komme ud over problematikken med de mange udefrakommende variationer.

Man behøver kun et base-lineresultat for at have et godt sammenligningsgrundlag (9). ♦

LITTERATURLISTE

- (1) Souillard A, Audran M, Bressolle F, Gareau R, Duvallet A, Chanal JL.; Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control; Br J Clin Pharmacol. 1996 Sep;42(3):355-64.
- (2) 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 Mar;88(3):333-44.
- (3) Delanghe JR, Bollen M, Beullens M; Testing for recombinant erythropoietin; Am J Hematol. 2008 Mar;83(3):237-41.
- (4) World Anti-Doping Agency; <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=264>; (hentet d. 28.5.2008)
- (5) Anti Doping Danmark; www.antidoping.dk/visArtikel.asp?artikelID=70; (hentet d. 19.5.2008)
- (6) Anti Doping Danmark; www.antidoping.dk/visArtikel.asp?artikelID=75; (hentet d. 19.5.2008)
- (7) Lamon S, Robinson N, Sottas PE, Henry H, Kamber M, Mangin P, Saugy M.; Possible origins of undetectable EPO in urine samples; Clin Chim Acta. 2007 Oct;385(1-2):61-6. Epub 2007 Jul 10.
- (8) 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 Feb;86(2):128-37.
- (9) 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 Dec;87(12):1248-57.
- (10) Abellan R, Ventura R, Pichini S, Palmi I, Bellver M, Olive R, Pacifici R, Pascual JA, Zuccaro P, Segura J; Effect of physical fitness and endurance exercise on indirect biomarkers of recombinant erythropoietin misuse; Int J Sports Med. 2007 Jan;28(1):9-15. Epub 2006 Jun 26.
- (11) 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 Aug;88(8):931-40.
- (12) Team CSC; www.team-csc.com/upload/MidYear.pdf; (hentet d. 28.5.2008)

