

2) *Informeer sporters uitvoerig over de mogelijke gevolgen van genetische doping*

De gevolgen van het misbruik van genetische therapieën met het doel de sportprestaties te verbeteren, kunnen ernstig tot levensbedreigend zijn. In een poging de beste te zijn, zullen sporters hun grenzen verleggen. Sommige sporters kunnen zelfs doping gaan gebruiken en in het ergste geval doping uit alternatieve bronnen gebruiken, zoals tetrahydrogestrinon (THG) of experimentele medicijnen (zoals RSR-13). Om te voorkomen dat genetische doping de voorkeursdoping van sporters wordt, moeten sporters en hun begeleiders uitvoerig worden voorgelicht over de ernstige gevolgen voor hun gezondheid. Topsporters en sporters in sportscholen lijken de primaire doelgroepen.

3) *Evalueer de huidige regelgeving aangaande genetische materialen vanuit het oogpunt van doping*

In Nederland is de klinische toepassing van genterapie aan strenge regels gebonden door middel van het Besluit Genetisch Gemodificeerde Organismen op basis van twee Europese richtlijnen. De klinische toe-

passing van genterapie kan echter in vele opzichten verschillen van de toepassing voor dopingdoeleinden. Genterapie voor dopingdoeleinden kan plaatsvinden buiten de reguliere klinische omgeving en er kunnen illegale laboratoria bij betrokken zijn. Deze verschillen rechtvaardigen een evaluatie van de huidige regelgeving vanuit het oogpunt van misbruik voor dopingdoeleinden.

Summary

Gene doping. Haisma HJ, Hon O de. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006;31: 19-21

New research in genetics will not only be used to diagnose and treat disease but also for other purposes. Gene doping will be used in the near future to attempt to enhance the physical performance of sportsmen. To protect the health of sportsmen by an uncontrolled use of gene doping, preventive measures are required. The introduction of (new) legal regulations, education, and research and development of new methods for detection of gene doping based on proteonomics, seem the most promising preventive actions.

Key-words: gene therapy; gene doping, sport, NeCeDo.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 21-27

Manipulatie van de hemoglobineconcentratie door EPO

J.J.M. MARX¹ en M. de METZ²

Verbetering van de zuurstoftoevoer naar de weefsels door gebruik van recombinant humaan erythropoëtin (rhEPO) is, evenals de al eerder toegepaste autologe bloedtransfusie, een zeer effectieve vorm van doping. Injectie van rhEPO veroorzaakt kenmerkende veranderingen in de fysiologie van de erythropoëse en de ijzerstofwisseling die met routinelaboratoriumonderzoek detecteerbaar zijn. Bovendien zal er interferentie plaatsvinden met het gecompliceerde antihypoxiesysteem dat gedirigeerd wordt door anti-hypoxiafactor-1-alpha (HIF-1 α). Tot voor kort kon alleen maar een indicatie verkregen worden voor gebruik van rhEPO door meting van de hematocriet of de hemoglobineconcentratie. Vanaf het jaar 2000 is er echter een methode beschikbaar waarmee rhEPO kan worden opgespoord in plasma en urine door het onderscheid

in glycosylering van dit eiwit met endogene vormen van erythropoëtin. Inmiddels zijn er diverse varianten van de oorspronkelijke rhEPO-test gepubliceerd die de detectie van misbruik gevoeliger, meer gebruiksvriendelijk en daardoor effectiever zullen maken.

Trefwoorden: EPO; erythropoëtin; doping; sport

Sporters hebben er veel voor over om tot zo goed mogelijke prestaties te komen. Algemeen geaccepteerd zijn daarbij het toepassen van moderne trainingmethoden, het benaderen of passeren van fysieke grenzen van het lichaam, het trotseren van gevaren, zelfs voor eigen leven, en het gebruik van voedingssupplementen. Bij optimaal gebruik van geoorloofde middelen is het leveren van topprestaties echter in hoge mate afhankelijk van de, meestal genetisch bepaalde, fysieke en psychologische constitutie van een sporter. Een van die genetisch bepaalde factoren is de hoogte van de hemoglobineconcentratie (Hb), van eminent belang voor de zuurstofvoorziening van de weefsels. Indien er een anemie bestaat door een deficiëntie van ijzer, foliumzuur of vitamine B12, dan mag dat gecorrigeerd worden. Het is echter

Eijkman - Winkler Centrum, UMC Utrecht en Afdeling Klinische Chemie, UMC Nijmegen¹, Afdeling Klinische Chemie, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen²

Correspondentie: prof. dr. J.J.M. Marx, Afdeling Medische Microbiologie, UMC Utrecht, postnr. G04.614, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
E-mail: jmarx@azu.nl

mogelijk om het Hb tot boven de eigen fysiologische grenzen op te voeren. Dat mag door hoogtraining, maar gebruik van bloedtransfusies en recombinant humaan erythropoëtin (rhEPO) mag niet. Aangezien juist deze twee verboden manipulaties uitermate effectief zijn om de prestaties te verhogen en zich derhalve mogen verheugen in een grote belangstelling van topsporters en malafide begeleiders, is er overkoepelende sportinstanties veel aan gelegen om effectieve methoden te ontwikkelen die het gebruik van dergelijke competitievervalsende methoden ontmoedigen. In de toekomst dreigen echter nog andere gevaren zoals: EPO-mimetica, gemodificeerd EPO met verlengde werking, zuurstoftransmitters bestaande uit gemanipuleerd hemoglobine zoals Hemopure, HemoLink en HemAssist (1). Er zijn ook middelen die binden aan eigen Hb en de zuurstofafgifte vergroten (RSR-13). Dit soort middelen zal echter redelijk goed detecteerbaar zijn of maar kortdurend werken. Een groter gevaar lijkt toepassing van genetische manipulatie. In dit artikel beperken we ons echter tot het gebruik van EPO.

Het gebruik van bloeddoping en EPO in de sport

De effectiviteit van bloeddoping werd al in 1972 aangetoond. Onderzoek werd verricht bij gezonde vrijwilligers en goed getrainde atleten, met gelijk resultaat. Na afname van 800-1200 ml bloed zag men aanvankelijk een afname van het prestatievermogen met geleidelijk herstel na 4 weken. Binnen een dag na transfusie was er een toename van de maximale zuurstofopname (10%) en van het uithoudingsvermogen (30%) (2). Door de Amerikaanse olympische ploeg is bloeddoping toegepast tijdens de Olympische Spelen van 1976 en 1984.

Ook het gunstige effect van rhEPO-gebruik is overtuigend aangetoond. Bij subcutane toediening van rhEPO 3 maal per week gedurende 7 weken aan gezonde sporters steeg de hematocriet (Ht) van 0,445 naar 0,497 en was er een toename van de VO_2 max van 16% en nam de volhoudtijd, bij opklimmende inspanning, toe met 16% (3). Na twee weken waren de gunstige effecten van EPO geheel verdwenen en normaliseerden Hb en Ht door onderdrukking van de eigen EPO-productie.

Regulatie en werkingsmechanisme van erythropoëtin

Het organisme tracht de Ht binnen nauwe grenzen te reguleren voor een optimale weefseloxygenatie. Voor regulatie van de Ht is coördinatie nodig tussen plasmavolume en volume van de rode celmassa. In de nieren wordt het erythrocytenvolume gereguleerd door EPO en het plasmavolume door excretie van water en zout. Men veronderstelt dat voor deze regulatie in de nieren de zuurstofdruk in een functionele unit verantwoordelijk is, die gelokaliseerd is op de top van het corticale labyrinth bij de juxtamedullaire regio (4). Behoudens renale hypoxie blijkt ook de totale massa van erythrocytenprecursors een onafhankelijke determinant van de serum-EPO-concentratie te zijn. Bij stijging van de massa erythrocytenprecursors daalt het serum-EPO (5). De oorzaak daarvan is waarschijnlijk simpelweg de utilisatie van EPO door de EPO-recep-

tor op erythroblasten waardoor de concentratie in het plasma daalt.

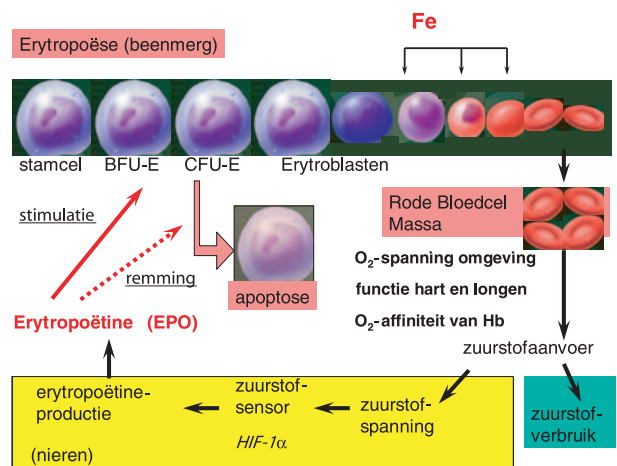
Het glycoproteïne EPO, met een molecuulgewicht van 34.000 D, kan in meerdere organen worden geproduceerd, b.v. in de Kupffer-cellen in de lever. Dat gebeurt m.n. in de prenatale periode, maar de lever kan die functie in geval van nood weer opnemen. Daarom toont men ook na totale nefrectomie nog EPO in plasma aan.

De functie en de regulatie van EPO is samengevat in figuur 1. Tot voor kort werd als meest belangrijke functie van EPO gezien de stimulatie van de proliferatie van voorlopers van de erythrocyt in het beenmerg, alsmede versnelling van de differentiatie naar rijpe erythrocyten. Thans is echter bekend dat een mogelijk nog belangrijker functie van EPO bestaat uit de remming van apoptose van deze voorlopers waardoor meer cellen kunnen uitrijpen tot erythrocyten.

Doordat er als gevolg van de werking van EPO meer rijpe erythroblasten beschikbaar komen is er ook meer hemoglobine nodig om de cellen te vullen. Hierdoor ontstaat een grotere behoefte aan ijzer, hetgeen gepaard gaat met een toegenomen productie van transferrinreceptoren (TfR), mobilisatie van ijzer uit de depots en een grotere ijzerabsorptie.

Hypoxia-inducible factor-1 alpha als universele regulator van zuurstofhomeostase

Bij hypoxie reageert het lichaam niet alleen met een verhoogde productie van erythropoëtin maar treden tal van aanpassingsmechanismen in werking. Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) speelt een centrale rol bij de regulatie van de productie van een zeer groot aantal moleculen die zorgen voor een adaptatie bij hypoxie. In de cel wordt de hoeveelheid HIF-1 α gereguleerd op posttranslationeel niveau doordat bij voldoende zuurstofspanning in de cel HIF-1 α wordt afgebroken in het proteasoom. Bij hypoxie wordt er een complex gevormd met HIF-1 β dat de conformatie van HIF-1 α verandert en de stabiliteit verhoogt. Het nu actieve HIF-1 α -complex bindt aan DNA op de herkenningsplaats HRE, in combinatie met de coactivator p300 en andere transcriptiefactoren. Dit resulteert in activatie van de transcriptie van hypoxiegereguleerde genen. Een daarvan is het erythropoëtin (6).



Figuur 1. Regulatie en productie van erythropoëtin.

Het aantal genen dat, afhankelijk van de weefseloxygenatie, door HIF-1 α wordt gereguleerd is schier eindeloos en groeit nog steeds (7). Opvallend is dat verschillende genproducten een belangrijke rol spelen in de ijzerstofwisseling, zoals transferrine, de TfR en hemoxygenase-1. Daarnaast zijn er ook nog een groot aantal hypoxiegevoelige genen die op een andere wijze gereguleerd worden (8). Het moge duidelijk zijn dat farmacologisch ingrijpen d.m.v. toediening van rhEPO in een dergelijk complex systeem ingrijpende effecten kan hebben, soms gunstig, soms ongunstig voor de gezondheid van een sporter. Het betreft immers niet een patiënt met anemie als gevolg van een gestoorde productie van endogeen EPO, maar iemand met een voortreffelijk functionerende fysiologie als uitgangspunt, echter wel met een grote variatie in weefseloxygenatie, afhankelijk van de grootte en de duur van inspanning bij sportbeoefening.

HIF-1 α wordt geactiveerd door hypoxie in alle kernhoudende cellen en het speelt een cruciale rol bij de respons op hypoxie van cardiovasculaire en respiratoire systemen (9). Dat gebeurt o.a. door regulatie van 'vascular endothelial growth factor' (VEGF) en endothelin-1 (ET-1), gepaard gaande met 'remodeling' van vaten. Veranderingen in deze systemen worden uiteraard ook gezien bij sportbeoefening. Bij hoogtraining van zwemmers gedurende 3 weken werd geen stijging waargenomen van Hb en Ht, maar wel van endogeen EPO en het aantal erythrocyten. Serum-VEGF toonde een tijdelijke daling 10 dagen na start van de hoogtraining, maar daarna een stijging van gemiddeld 23 naar 46 pg/ml en was pas een maand later weer gedaald naar het uitgangsniveau (10).

Effecten van erythropoëtine op andere weefsels

Apoptoseremming is een belangrijk effect van EPO in het beenmerg. Doordat minder erythroïde voorlopercellen in apoptose geraken zullen meer cellen uitrijpen tot erythrocyten. Het apoptoseremmende effect van EPO, met bescherming van orgaanintegriteit, wordt ook waargenomen in andere weefsels. Bepaalde cytokines kunnen apoptose induceren via stikstofmonoxide (NO), o.a. bij experimenten met vasculaire gladde spiercellen (VSMC) van ratten. RhEPO had een duidelijk remmend effect op de apoptose van VSMC (11). RhEPO heeft experimenteel een duidelijk beschermend effect op ischemiereperfusieschade van het myocard met een remmend effect op apoptose en een gunstig effect op de hartfunctie (12). EPO wordt ook geproduceerd door de hersenen en geeft daar bescherming van neuronen in modellen van ischemie en degeneratieve schade door oxidatieve stress (13). Activatie van neuronale EPO-receptoren kon apoptose verhinderen. De positieve effecten van rhEPO bij atleten zouden dus verder kunnen gaan dan alleen een verbetering van de zuurstofsuppletie van de musculatuur.

Anemie, ijzermetabolisme en erythropoëtine

Sportanemie is in het bijzonder bij duursporters een bekend fenomeen (14). Een belangrijke oorzaak is ijzerverlies bij intravasculaire hemolyse, waarbij Hb-

monomeren uitgeplast worden. Dit is een bekend fenomeen bij lopers (marshematurie) maar werd o.a. ook gevonden bij langeafstandswimmers, aantonend dat duursport een belangrijkere oorzaak van ijzerverlies is dan compressie van vaten onder de voetzool bij hardlopers (15). Bij intensieve en langdurige inspanning treedt mogelijk oxidatieve reperfusieschade in de darm op na hypocirculatie in het splanchnicusgebied. Dit is aannemelijk gemaakt door nauwkeurig onderzoek van de ijzerabsorptie en van fecaal ijzerverlies m.b.v. radioactief ijzer (^{59}Fe). Bij mannelijke langeafstandlopers werd vaak een verhoogde ijzerabsorptie gevonden, een gevoelig teken van ijzergebrek. Opmerkelijk was dat in een rustperiode het, aan de hand van ^{59}Fe -verlies berekende, fecale bloedverlies ongeveer 1,5 ml bedroeg, hetgeen tijdens intensieve training opliep naar een equivalent van 4,9 tot 6,6 ml bloedverlies per dag (16).

Ijzergebrek komt veel voor, met name bij jonge vrouwelijke atleten. Dit is gemakkelijk te verhelpen met ijzersuppletie en daarom behoort evaluatie van de ijzerstatus bij een goede sportmedische begeleiding (17). Omdat bloedverlies een belangrijke oorzaak is van sportanemie wordt er door vele sporters routinematig ijzermedicatie gebruikt, veelal intraveneus ijzer. Men weet kennelijk ook heel goed dat ijzersuppletie nodig is voor een optimaal effect van rhEPO, reden waarom gebruikers van dit middel veel ijzer toegediend krijgen. Bij onvoldoende medische begeleiding kan er een secundaire ijzerstapeling ontstaan. Het bleek inderdaad dat bij professionele wielrenners excessief hoge ferritineconcentraties gevonden werden (18).

Toediening van rhEPO heeft een zeer grote invloed op erythrocytaire en een aantal ijzerparameters, zowel bij patiënten met een nierinsufficiëntie als bij gezonde personen (19). Dat komt doordat door EPO een forse toename ontstaat van het aantal erythroblasten waardoor opeens een grote behoefte aan ijzer ontstaat voor de Hb-productie. De bevindingen bij nierpatiënten zijn niet zo relevant voor topsporters. Wel interessant zijn de gegevens die verkregen werden bij 62 gezonde personen, die meededen aan een onderzoek naar het transfusiesparend effect van EPO bij autologe bloeddonatie voorafgaand aan een electieve heupoperatie. Bij 32 van hen werd gedurende 3 weken 2 maal per week rhEPO toegediend in een dosering van 500 u/kg lichaamsgewicht. Iedereen kreeg orale ijzersuppletie (20). De Hb-concentratie was bij de EPO-groep na 3 weken weer op het uitgangsniveau, terwijl een daling van ongeveer 15% persisteerde bij de controlegroep. De serumferritineconcentratie daalde in beide groepen, maar sterker in de EPO-groep. Er waren geen verschillen in de (geringe) veranderingen in serumijzer, -transferrine en -ijzerverzadiging. Als teken van de toegenomen erythropoïese was er een 4-voudige stijging van de serum-sTfR-concentratie, terwijl deze waarde niet veranderde bij de controles. In beide groepen trad een stijging op van het aantal reticulocyten. Bij EPO-gebruik was deze stijging echter veel groter, maar deze daalde, bij persisterende toediening, weer in week drie. Zeer opmerkelijk was de forse stijging bij EPO-gebruik van het vrije erythrocytaire

protoporfyrine (FEP), de directe nog ijzervrije voorloper van haem, net zoals de stijging in de serum-sTfR-concentratie wijzend op een groot relatief ijzer tekort in de erythroblast. Deze gegevens uit medisch onderzoek gaven al duidelijk aan op welke parameters gelet zou moeten worden bij periodiek bloedonderzoek en het aanleggen van een 'gezondheidspaspoort' ter detectie van rhEPO-misbruik.

Het stimulerend effect van EPO op de erythropoëse wordt beperkt door de beschikbaarheid van ijzer, vooral bij patiënten (maar ook sporters) met ontstekingsprocessen die immers gepaard gaan met ontstekingsanemie. Daarbij is zowel het transport van ijzer uit de depots als de ijzerabsorptie verminderd. Sinds kort weet men dat voor dit fenomeen het onlangs ontdekte hormoon hepcidin, geproduceerd in hepatocyten, verantwoordelijk is (21). Hepcidin modificeert de expressie van ferroportin, het eiwit dat ijzer als Fe(II) transporteert door de plasmamembraan van macrofagen en van darmepitheelcellen. Bij ijzeregebrek gaat de productie van hepcidin omlaag (meer ferroportin, ijzertransport gaat omhoog), bij ontsteking gaat het hepcidin omhoog (minder ferroportin, minder ijzerabsorptie, ijzerretentie in macrofagen).

Bepaling van de hematocriet: een 'gezondheidstest'

Omdat een directe methode om gebruik van EPO aan te tonen ontbrak heeft de Union Cycliste Internationale (UCI) in 1997 de hematocrietest geïntroduceerd. Bij de wielerveden worden regelmatige controles van de Ht gedaan en bij een waarde boven 0,50 bij mannen en boven 0,47 bij vrouwen wordt een startverbod voor de duur van 15 dagen opgelegd om 'gezondheidsredenen' (UCI, 1998). Andere sportbonden hanteren andere normen of laten controle geheel achterwege. Omdat de limietwaarden vallen binnen het gebied van Ht-waarden die gevonden worden bij de normale populatie zullen een aantal atleten onterecht worden uitgesloten en gestigmatiseerd (22). Vooral atleten die wonen en trainen op grote hoogte hebben veelal een fysiologisch bepaalde hoge Ht (23). De condities waaronder bloed voor een Ht-bepaling wordt afgenomen luisteren heel nauw. Een langdurige stuwings kan b.v. resulteren in een stijging van de Ht met potentiële uitsluiting van een atleet (24).

Detectie van EPO-gebruik: veranderingen in geselecteerde laboratoriumparameters

Een meer geavanceerde benadering dan de Ht-meting om rhEPO-misbruik aannemelijk te kunnen maken is het vaststellen van een aantal relevante laboratoriumparameters die veranderen bij toediening (25). Een model (genaamd het ON-model) was in staat het gebruik van rhEPO aan te tonen gedurende de laatste 2 weken van toediening van het medicament. Het OFF-model kon personen identificeren die in een periode van 12-21 dagen voorafgaande aan de test rhEPO gebruikt hadden. In deze testen werd gebruik gemaakt van de hemoglobineconcentratie, serumerythropoëetine, serum-sTfR en het percentage reticulocyten. Aan deze parameters werd, op basis van computeranalyse, een weegfactor toegekend en daaruit werden formules afgeleid die voor zowel het ON-model als het

OFF-model reproduceerbare, specifieke en sensitieve testen opleverden. Beide modellen werden zeer uitvoerig gevalideerd onder een groot aantal voor topsport relevante omstandigheden en men maakte uiteraard gebruik van een voldoende grote placebogroep. Effecten van o.a. hoogtetra training, etnische en nationale variatie en ook van ijzersuppletie werden bij beide modellen nagegaan. De ON- en OFF-modellen kunnen worden gebruikt als voorscreening voor een rhEPO-test in urine. Positieve sporters moeten kunnen rekenen op frequente controles, ook buiten competitie. De Australische onderzoekers die verantwoordelijk waren voor bovengenoemd model hebben inmiddels een verbeterde versie gepubliceerd (26).

Veel professionele ploegen controleren periodiek een aantal bloedwaarden die in staat zijn om, bij patroonmatige veranderingen, dopinggebruik te signaleren. Invoering van een dergelijk 'gezondheidspaspoort' lijkt een zinvolle preventieve maatregel om ook buiten competitie dopinggebruik te kunnen signaleren. De parameters die het meest sterk veranderen bij gebruik van recombinant EPO zijn: de serum-'soluble'-transferrinereceptor (sTfR), serum EPO, de FEP en het aantal reticulocyten (m.n. de jonge vormen). Indien er een discrepantie tussen deze waarden en de Hb- en de EPO-concentraties in serum bestaat, dan betekent dit een sterke aanwijzing voor het gebruik van rhEPO. Van de andere kant, indien de parameters zich (m.n. in verhouding tot elkaar) binnen fysiologische grenzen blijven bevinden, dan is dit een sterk argument tegen het gebruik van rhEPO. Uiteraard vereist het bijhouden van zulk een paspoort een forse organisatorische inspanning en een fraudebestendig beheer van de administratie door een onafhankelijke instantie, dus niet de medische begeleiders van een professionele ploeg.

Onderzoek van een panel van parameters, zoals geïntroduceerd bij het IOC-erythropoëtineproject in 2000, of zelfs maar van de Ht of het Hb, levert voor een individu misschien geen waterdicht bewijs op voor rhEPO-gebruik. Indien met een dergelijke methode groepen van sporters onderzocht worden levert dat wel opmerkelijke resultaten op. Er werd tijdens een wereldkampioenschap crosscountryskiën een onderzoek verricht naar het hematologische profiel dat past bij EPO-gebruik (27). Opmerkelijk was dat van de medaillewinnaars 50%, van degenen op de 4^e tot 10^e plaats 33%, en van deelnemers eindigend op plaats 41 tot 50 slechts 3% sterk abnormale (verdachte) hematologische waarden had. Kennelijk komt manipulatie van het Hb niet alleen veel voor maar is het ook zeer effectief bij crosscountryskiërs.

Detectie van EPO: directe aantoning van rhEPO in plasma en urine

Goede methoden om m.b.v. een ELISA of een chemiluminescentie-immunoassay EPO in serum te bepalen zijn er al langere tijd (28), maar voor dopingonderzoek worden methoden vereist die onderscheid kunnen maken tussen het lichaamseigen en ingespoten rhEPO. Het recombinant humaan EPO lijkt weliswaar heel veel op endogeen EPO, maar toch zijn er kleine verschillen. RhEPO bevat geen 166, zoals het

endogene EPO, maar 165 aminozuren. Daarnaast zijn er verschillen in glycosylering van het recombinant eiwit dat in hamstercellen wordt geproduceerd. Er bestaan echter ook bij ieder individu nogal veel isovormen van endogeen EPO die onderscheiden moeten kunnen worden van rhEPO. De kleine verschillen in glycosylering geven een iets andere elektrische ladingsverdeling van EPO, voldoende om een verschil in elektroforetische mobiliteit te veroorzaken. Een bruikbare methode om rhEPO in plasma en urine te detecteren werd in principe al in 1995 gepubliceerd (29). Het was mogelijk om endogeen van rhEPO te onderscheiden, zowel in serum als in urine. Dit lukte bij alle proefpersonen 24 uur na injectie. Daarna nam de sensitiviteit echter snel af en na 48 uur was bij vrijwel niemand nog rhEPO aan te tonen. De techniek was kennelijk nog niet geschikt om in de praktijk voor dopingcontroles te gebruiken.

In 2000 werd door het Franse nationale anti-doping laboratorium voor het eerst een methode gepubliceerd waarmee rhEPO in de urine kon worden aangetoond (30). Door gebruik van een immunoblotting-procedure, die het iso-elektrische patroon van EPO in de urine zichtbaar maakte, kon rhEPO goed onderscheiden worden van de endogene isovormen. Men toonde aan dat toediening van rhEPO snel daarna een opmerkelijke verandering liet zien in het iso-elektrisch patroon in de urine. De test werd door het IOC voor het eerst toegepast tijdens de Olympische Spelen in Sydney in 2000, dus kort na publicatie van de test. Ook met deze methode was detectie alleen mogelijk gedurende 2 tot 3 dagen na de laatste injectie. De test is zeer bewerkelijk en werd daarom slechts toegepast bij atleten bij wie op basis van de bovengenoemde combinatie van laboratoriumparameters (ON- en OFF-methoden) verdenking bestond op gebruik van rhEPO. De oorspronkelijke test werd later verbeterd, waarbij de storende invloed van verontreinigende eiwitten en proteïnaseactiviteit in de urine vermindert werd, terwijl de sensitiviteit werd verhoogd (31).

In 1997 werden de eerste resultaten gepubliceerd van bloedcontroles door de International Association of Athletics Federations (IAAF) bij atleten gedurende wedstrijden in 1993 en 1994. Het bleek dat de endogene serum-EPO-concentraties veel lager waren dan bij controlepersonen, bij 58% zelfs beneden de detectielimiet. Dit werd geïnterpreteerd als 'This may be due to high-altitude residence prior to testing' (32). Meer waarschijnlijk is gebruik van rhEPO voorafgaand aan de competitie. Bij toediening van rhEPO daalt de lichaamseigen productie en derhalve de concentratie van endogeen EPO. Bij hoogtetraining treedt een, individueel strek verschillende, stijging van endogeen EPO op (33). Echter zware inspanning op zichzelf, evenals andere vormen van stress zoals hittebelasting, gebrek aan slaap en gebrek aan voeding, kunnen tot een verlaagde productie van EPO leiden, die dan niet samenhangt met recent gebruik van rhEPO. Anderzijds werd bij marathonlopers aangetoond dat de EPO-concentratie in serum 31 uur na een loop zeer fors was gestegen (34). Dit liep parallel met een (schijnbare) daling van het aantal rode bloedcellen door hemodilutie. Dat betekent dat men voor-

zichtig moet zijn met de interpretatie van de hoogte van endogeen EPO in relatie tot het gebruik van rhEPO.

Nieuwe methoden voor EPO-detectie

Onderzoekers in vele laboratoria hebben inmiddels geprobeerd om de oorspronkelijke rhEPO-test te verbeteren. Met een capillaire iso-elektrische focusseringstechniek werd een eenvoudig toepasbare en nauwkeurige test ontworpen (35). Veelbelovend is een methode die gebruik maakt van planaire gelelektroforese en 'matrix-assisted laser desorption/ionisation linear time-of-flight' (MALDITOF) massaspectrometrie (36). Het is goed mogelijk om hiermee verschillende vormen van rhEPO, EPO-alpha, EPO-beta en 'novel erythropoiesis stimulating protein' (NESP) te onderscheiden op basis van hun precieze molecuulgewicht. Detectie is reeds mogelijk bij concentraties van 25 fmol. Door kwantitatieve analyse van digitale beelden, veroorzaakt door EPO-isovormen in iso-elektrischfocussingsgels, gevolgd door dubbel blotting en chemoluminescentiedetectie, kunnen banden met een karakteristieke vorm en locatie voor rhEPO goed en reproduceerbaar herkend worden. Verbetering van de analyse van rhEPO m.b.v. de thans gangbare methoden is dus mogelijk (37).

Indien, bij gebruik van de door IOC en WADA (?) geaccrediteerde methode, de EPO-antistoffen vervangen worden door een panel van plantenlectinen dan kan het maximale aantal isovormen van EPO gedetecteerd worden (38). Endogeen en rhEPO verschillen slechts in de samenstelling van hun N- en O-glycanen en lectinen kunnen onderscheid maken op basis van minieme verschillen in de glycanenstructuur. Lectinen kunnen ook gebruikt worden voor zuivering en verrijking van rhEPO waardoor detectie gedurende een langere periode na gebruik van dit middel mogelijk kan worden.

Detectie van genetische manipulatie

Al tien jaar geleden werd bij muizen een langdurige stijging van lichaamseigen EPO verkregen na intramusculaire injectie van een plasmide DNA vector waarbij een effectieve gentransfer verkregen werd (39). Verhoogde en langdurige expressie van het EPO gen kon eveneens worden verkregen bij apen, gebruik makend van een adenovirusvector (40). Door genterapie kan echter een moeilijk controleerbare, doorschietende EPO-productie ontstaan die dan met aderaltingen behandeld zou moeten worden. Het lijkt erop dat genetische doping met erythropoëtine-cDNA in spieren van primaten nu al detecteerbaar is, en dat is een goed bericht (41).

De productie van erythropoëtine vindt vooral plaats in de nieren. Expressie van EPO wordt gereguleerd door hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α), m.n. door veranderingen van de zuurstofspanning in cellen van de juxtamedullaire regio. Fysiologische aanpassing van de EPO-productie vindt plaats bij veranderingen in de atmosferische zuurstofspanning, in functie of activiteit van het cardiovasculaire en pulmonale systeem en in zuurstofaffiniteit van hemoglobine. Het

belangrijkste effect van EPO wordt gezien in het beenmerg alwaar de erythropoëse wordt gestimuleerd door bevordering van de delingsactiviteit van voorlopercellen van erythrocyten en door afremming van de apoptose van deze cellen. Door de toename van de erythrocytaire celmassa is er ook een aanzienlijke toename van de ijzerbehoefte voor de hemoglobineproductie. Bij toediening van rhEPO kan dat aanleiding geven tot ijzergebrek waarbij, voor een optimaal effect van rhEPO, vaak ijzersuppletie noodzakelijk is.

Literatuur

- Audran M, Connes P, Varlet-Marie E. Oxygen blood transport and doping. *Bull Acad Natl Med* 2003; 187: 1669-1679.
- Eklblom B, Goldbarg AN, Gullbring B. Response to exercise after blood loss and reinfusion. *J Appl Physiol* 1972; 33: 175-180.
- Eklblom BBB. Effect of erythropoietin administration on maximal aerobic power. *Scand J Med Sci Sports* 1991; 1: 88-93.
- Donnelly S. Why is erythropoietin made in the kidney? The kidney functions as a 'critmeter' to regulate the hematocrit. *Adv Exp Med Biol* 2003; 543: 73-87.
- Cazzola M, Guarneri R, Cerani P, Centenara E, Rovati A, Beguin Y. Red blood cell precursor mass as an independent determinant of serum erythropoietin level. *Blood* 1998; 91: 2139-2145.
- Dachs GU, Coralli C, Hart SL, Tozer GM. Gene delivery to hypoxic cells in vitro. *Br J Cancer* 2000; 83: 662-667.
- Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 47-53.
- Greijer AE, Kemming D, Shvarts A, Semenza GL, Meijer GA, Wiel MA van de, Belien JA, Diest PJ van. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol* 2005; 206: 291-304.
- Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Appl Physiol* 2004; 96: 1173-1177.
- Asano M, Kaneoka K, Nomura T, Asano K, Sone H, Tsurumaru K, Yamashita K, Matsuo K, Suzuki H, Okuda Y. Increase in serum vascular endothelial growth factor levels during altitude training. *Acta Physiol Scand.* 1998; 162: 455-459.
- Akimoto T, Kusano E, Inaba T, Iimura O, Takahashi H, Ikeda H, Ito C, Ando Y, Ozawa K, Asano Y. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *Kidney Int* 2000; 58: 269-282.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 79-85.
- Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001; 412: 641-647.
- Hoepelman IM, Marx JJM. [Anemia caused by participation in sports; an innocent 'side effect' of a healthy hobby]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1986; 130: 155-157.
- Selby GB, Eichner ER. Endurance swimming, intravascular hemolysis, anemia, and iron depletion. New perspective on athlete's anemia. *Am J Med* 1986; 81: 791-794.
- Nachtigall D, Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Gabbe EE. Iron deficiency in distance runners. A reinvestigation using Fe- labelling and non-invasive liver iron quantification. *Int J Sports Med* 1996; 17: 473-479.
- Constantini NW, Eliakim A, Zigel L, Yaaron M, Falk B. Iron status of highly active adolescents: evidence of depleted iron stores in gymnasts. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2000; 10: 62-70.
- Zotter H, Robinson N, Zorzoli M, Schattenberg L, Saugy M, Mangin P. Abnormally high serum ferritin levels among professional road cyclists. *Br J Sports Med* 2004; 38: 704-708.
- Kooistra MP, Es A van, Struyvenberg A, Marx JJM. Iron metabolism in patients with the anaemia of end-stage renal disease during treatment with recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 1991; 79: 634-639.
- Biesma DH, De WA van, Beguin Y, Kraaijenhagen RJ, Marx JJM. Erythropoietic activity and iron metabolism in autologous blood donors during recombinant human erythropoietin therapy. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 426-432.
- Ganz T. Hcpicidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102: 783-788.
- Marx JJM, Vergouwen PC. Packed-cell volume in elite athletes [letter; comment] [see comments]. *Lancet* 1998; 352: 451.
- Vergouwen PC, Collee T, Marx JJM. Haematocrit in elite athletes [see comments]. *Int J Sports Med* 1999; 20: 538-541.
- Troost FJ, Schrauwen P, Saris WHM. The impact of venous occlusion on the athletic health test cut-off value. *Eur J Clin Invest* 30 [Suppl 1]; 5: 2000.
- Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, Ashenden MJ, Brugnara C, Howe C, Martin DT, Trout GJ, Hahn AG. A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica* 2000; 85: 564-572.
- 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; 88: 333-344.
- Stray-Gundersen J, Videman T, Penttila I, Lereim I. Abnormal hematologic profiles in elite cross-country skiers: blood doping or? *Clin J Sport Med* 2003; 13: 132-137.
- Abellan R, Ventura R, Pichini S, Remacha AF, Pascual JA, Pacifici R, Di Giovannandrea R, Zuccaro P, Segura J. Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35: 1169-1177.
- Wide L, Bengtsson C, Berglund B, Eklblom B. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27: 1569-1576.
- Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 2000; 405: 635.
- Lasne F, Martin L, Crepin N, Ceaurriz J de. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem* 2002; 311: 119-126.
- Birkeland KI, Donike M, Ljungqvist A, Fagerhol M, Jensen J, Hemmersbach P, Oftebro H, Haug E. Blood sampling in doping control. First experiences from regular testing in athletics. *Int J Sports Med* 1997; 18: 8-12.
- Friedmann B, Frese F, Menold E, Kauper F, Jost J, Bartsch P. Individual variation in the erythropoietic response to altitude training in elite junior swimmers. *Br J Sports Med* 2005; 39: 148-153.
- Schwandt HJ, Heyduck B, Gunga HC, Rocker L. Influence of prolonged physical exercise on the erythropoietin concentration in blood. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1991; 63: 463-466.
- Lopez-Soto-Yarritu P, Diez-Masa JC, Cifuentes A, De Frutos M. Improved capillary isoelectric focusing method for recombinant erythropoietin analysis. *J Chromatogr A* 2002; 968: 221-228.

36. Stubiger G, Marchetti M, Nagano M, Reichel C, Gmeiner G, Allmaier G. Characterisation of intact recombinant human erythropoietins applied in doping by means of planar gel electrophoretic techniques and matrix-assisted laser desorption/ionisation linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19: 728-742.
37. Bajla I, Hollander I, Gmeiner G, Reichel C. Quantitative analysis of images in erythropoietin doping control. *Med Biol Eng Comput* 2005; 43: 403-409.
38. Nagano M, Stubiger G, Marchetti M, Gmeiner G, Allmaier G, Reichel C. Detection of isoforms of recombinant human erythropoietin by various plant lectins after isoelectric focusing. *Electrophoresis* 2005; 26: 1633-1645.
39. Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, Goldwasser E, Margalith M, Hobart PM, Leiden JM. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1996; 93: 10876-10880.
40. Svensson EC, Black HB, Dugger DL, Tripathy SK, Goldwasser E, Hao Z, Chu L, Leiden JM. Long-term erythropoietin expression in rodents and non-human primates following intramuscular injection of a replication-defective adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1797-1806.
41. Lasne F, Martin L, Ceaurriz J de, Larcher T, Moullier P, Chenuaud P. 'Genetic Doping' with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther* 2004; 10: 409-410.

Summary

Manipulation of the haemoglobin concentration by EPO. Marx JJM, Metz M de. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 21-27

Improvement of tissue oxygenation by use of recombinant human erythropoietin (rhEPO) is, like the earlier introduced autologous blood transfusion, a very effective means of doping. Injection of rhEPO causes characteristic changes in the physiology of erythropoiesis and iron metabolism offering a strong indication for its use by routine laboratory methods. In addition one must suspect interference with the complicated anti-hypoxia defence system of the organism that is conducted by anti-hypoxia factor-1 alpha (HIF-1 α). Until recently it was only possible to suspect use of rhEPO by estimation of hematocrit or haemoglobin concentration. From the year 2000 on, however, methods are available that can detect rhEPO in plasma and urine, discriminating it from endogenous erythropoietin due to differences in glycosylation. Meanwhile a number of improved detection methods of rhEPO have been published appearing to be more sensitive and user-friendly, and allowing a more effective detection of rhEPO misuse.

Key words: EPO; erythropoietin; doping; sport

The advertisement features a collage of athletes in various sports (tennis, basketball, soccer, etc.) at the top. Below them is the NZVT logo, which consists of the letters 'NZVT' in a stylized green font inside a white oval with a green border. The text 'Nederlands Zekerheidssysteem Voedingssupplementen Topsport' is written above the logo. The main message is 'Doping hoef je niet te slikken' in large, bold, black letters. Below this, it says 'check je supplementen op' and 'www.necedo.nl/nzvt' in white text on a black background. At the bottom, there are three logos: the NOC*NSF logo (Netherlands Olympic and Sports Federation), the NeCeDo logo (Nederlands Centrum voor Dopingvraausturen), and the NPN logo (Netherlands Professional Nutritionists).