

AUS DEM INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
VORSTAND PROF. DR. MED. MATTHIAS GRAW

Clenbuteroldoping

Haaranalytik als
Differenzierungsmöglichkeit zwischen
Missbrauch und Kontamination

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der
Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität**

Vorgelegt von

Lena Maria Gfrerer

aus

München

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dennis Nowak

Priv. Doz. Dr. Johannes Scher

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2016

Eidesstattliche Versicherung

Gfrerer, Lena Maria

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Clenbuteroldoping – Haaranalytik als Differenzierungsmöglichkeit
zwischen Missbrauch und Kontamination**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, _____

Lena Gfrerer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1 Clenbuterol ein β -Mimetikum	3
2.1.1 Indikationen	3
2.1.2 Chemische Eigenschaften	5
2.1.3 Wirkungen und Nebenwirkungen	5
2.1.4 Missbräuchliche Anwendungen	7
2.2 Doping	8
2.2.1 Definition	9
2.2.2 Geschichte	10
2.2.3 Geschichte des Clenbuteroldopings	12
2.2.4 Übersicht über Dopingsubstanzen und Nebenwirkungen	13
2.3 Haare	15
2.3.1 Aufbau	15
2.3.2 Wachstum	18
2.3.3 Pigmentierung	20
2.3.4 Inkorporation von Fremdmaterialien	21
2.3.5 Inkorporation von Clenbuterol in Haare	26
3. Material und Methoden	26
3.1 Studienkollektiv	26

3.2 Voruntersuchungen	28
3.3 Studiendurchführung.....	29
3.4 Probengewinnung.....	30
3.4.1 Haar	30
3.4.2 Urin.....	30
3.4.3 Blutplasma.....	31
3.5 Probenanalyse.....	31
3.5.1 Haar	32
3.5.2 Urin.....	33
3.5.3 Blutplasma.....	34
3.6 Statistische Methoden	34
4. Ergebnisse.....	35
4.1 Methodvalidierung für die Haaranalyse	35
4.2 Kontroll- und Applikationsstudien	36
4.2.1 Haar Clenbuterolkonzentrationen	36
4.2.2 Serum Clenbuterolkonzentrationen	40
4.2.3 Urin Clenbuterolkonzentrationen	43
4.3 Hochrisikostudie	44
4.3.1 Haar-Clenbuterolkonzentrationen.....	44
4.3.2 Urin-Clenbuterolkonzentrationen.....	46
5. Diskussion	48
5.1 Case report.....	48
5.2 Clenbuterolrückstände in Haarproben	49

5.3 Clenbuterolrückstände in Urin und Serum	55
6. Literaturverzeichnis	57
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	65
7.1 Abbildungsverzeichnis	65
7.2 Tabellenverzeichnis.....	66
8. Zusammenfassung.....	67
9. Anhang.....	69
9.1 Studienprotokoll	69
9.2 Antrag an die Ethikkommission- Antragsformular für Nicht- AMG/Nicht-MPG- Studien	72
9.3 ProbandInneninformationen	78
9.3.1 Kontrollgruppe	78
9.3.2 Applikationsgruppe 1	82
9.3.3 Applikationsgruppe 2	88
9.4 Anamnese- und Untersuchungsbogen	93
10. Danksagung	96

1. Einleitung

Clenbuterol ist ein β 2-Agonist, der zur Therapie von obstruktiven Lungenerkrankung erfunden wurde (Hida et al. 1985). Die Anwendung dieses Medikaments im Sport ist durch die World Anti Doping Association (WADA) verboten (WADA 2015), da es in entsprechender Dosierung anabole Wirkungen zeigt. So wurde eine Zunahme der Muskelmasse und der Abbau von Körperfett beobachtet (Kim et al. 2011). Aus diesem Grund wurde das Medikament zur Leistungssteigerung bei Sportlern und zur Maststeigerung bei Tieren genutzt (Prather et al. 1995). Der Einsatz von Clenbuterol zur Maststeigerung bei Tieren ist in den Vereinigten Staaten von Amerika und der europäischen Union, wegen der potentiellen Auswirkungen bei Verzehr auf den Menschen verboten. In Europa ist die Maststeigerung mit Clenbuterol seit 1985 verboten (Richtlinie 96/22/EG des Europäischen Parlaments und Rates 2003). In anderen Teilen der Welt wird Clenbuterol jedoch noch häufig zur schnelleren Gewichts- und Muskelzunahme von Tieren eingesetzt. Bei der Untersuchung mexikanischen Fleisches (darunter Kalb-, Rind-, und Hühnerfleisch sowie Fisch), welches zum Verzehr freigegeben war, wurde in einer Studie bei 30% der Proben Clenbuterol nachgewiesen (Thevis et al. 2013).

Clenbuterol ist eine der Substanzen auf der Doping-Verbotsliste, für die es derzeit keinen Schwellenwert gibt. So ist jeder positive Befund in Urinproben als Regelverstoß zu bewerten. In den letzten Jahren wurden bei einigen Sportlern sehr niedrige Clenbuterolwerte im Urin detektiert. Ähnlich niedrige Clenbuterolwerte im Urin zeigten sich bei Reisenden aus China (Thevis et al. 2013). Dies führt zur Frage, ob diese Befunde Resultat eines Missbrauchs, oder einer Kontamination sind und ob dies differenzierbar ist. 1995 zeigten Hemmersbach et al., dass der Konsum von kontaminiertem Fleisch zu Clenbuterolfunden im Urin von Werten zwischen 30 und 850pg/ml führen kann.

Die Resultate dieser Studie zeigten die Notwendigkeit einer Untersuchung. Die Haaranalyse könnte eine Option darstellen um zwischen Missbrauch, therapeutischer Anwendung und Kontamination mit Clenbuterol zu differenzieren. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines Grenzwertes um Clenbuterolfunde im Haar in eine der oben genannten Kategorien einzuordnen.

Haare haben sich als geeignetes Material gezeigt um die regulären Dopingkontrollen im Urin zu ergänzen. Ausgehend von einem durchschnittlichen Wachstum von 1cm pro Monat (menschliches Haar, 0,56-1,5cm/Monat), ist auch ein Rückschluss auf den Aufnahmezeitpunkt von Fremdstoffen möglich (Madea 2004). Unter Miteinbeziehung von Störfaktoren wie beispielsweise interindividuellen Schwankungen in der Geschwindigkeit des Haarwachstums ist eine geringe Verschiebung oder Verbreiterung des positiven Haarsegments möglich. Haaranalytik ist damit nicht geeignet die etablierte Urindiagnostik nach dem internationalen Laborstandard zu ersetzen, jedoch eventuell eine geeignete Ergänzung.

Clenbuterol ist ein basisches, lipophiles Molekül, welches an das Haarpigment Melanin bindet. Dadurch wurde eine starke und permanente Inkorporation von Clenbuterol in Haare bewiesen (Gaillard et al. 1997, Machnik et al. 1999, Schlupp et al. 2004).

Eine vorangegangene Applikationsstudie mit vier Pferden hat gezeigt, dass bereits einzelne oder gelegentliche therapeutische Anwendungen ausreichen um Clenbuterol im Haar nachzuweisen (Schlupp et al. 2004). Mehrere Studien zeigten bereits den Einfluss der Haar-Pigmentierung auf die Inkorporation von Clenbuterol ins Haar (Jia et al 2013, Gleixner et al. 2011, Vulic et al. 2011, Schlupp et al. 2004). In einer Studie von Jia et al wurden bei 60,3% der Studienpersonen die in Shanghai leben Clenbuterol im Haar nachgewiesen.

Das Anliegen der vorliegenden Studie war die Erforschung des Auftretens von Clenbuterol in Haaren und dessen statistische Signifikanz nach Niedrigdosisapplikation. Dazu wurde eine Applikationsstudie mit subtherapeutischen Dosen von Clenbuterol durchgeführt bei der Clenbuterol 20 gesunden ProbandInnen in einer geringen Dosis von insgesamt 30ug an fünf aufeinander folgenden Tagen verabreicht wurde. Dadurch wurde eine kontinuierliche Niedrigdosis-Aufnahme simuliert. Zum Vergleich wurden außerdem eine negative Kontrollgruppe (Niedrigrisiko für Kontamination) und eine Gruppe mit hohem Risiko für Kontamination (in Kooperation mit der FIFA in Mexiko gesammelt) getestet (siehe 3. Material und Methoden).

2. Grundlagen

2.1 Clenbuterol ein β -Mimetikum

Clenbuterol ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der β 2-Mimetika, der zur oralen oder inhalativen Behandlung von obstruktiven Atemwegkrankungen entwickelt wurde.

2.1.1 Indikationen

Clenbuterol wurde zur Behandlung von chronisch obstruktiven Atemwegkrankungen mit reversibler Atemwegverengung, wie zum Beispiel Asthma bronchiale, oder chronischer obstruktiver Bronchitis, mit und ohne Emphysem, für Menschen unter dem Namen Spiropent® von Boehringer Ingelheim entwickelt (Boehringer Ingelheim 2011).

Clenbuterol wird in die Gruppe der oral wirksamen, kurz- und langwirksamen β 2-Mimetika eingeordnet. Therapeutisch werden Erwachsenen täglich Tabletten mit zweimal 0,01-0,02mg Clenbuterol und Kindern Tropfen mit 0,0008-0,0015mg/kg Clenbuterol empfohlen. Die zulässige Höchstdosis für Erwachsene sollte 0,1mg pro Tag nicht überschreiten (Karow und Lang-Roth 2012). Clenbuterol spielt in der Leitlinientherapie des Asthma bronchiale mittlerweile eine untergeordnete Rolle. Dies ist durch ein ungünstigeres Nebenwirkungsprofil zu erklären. Indiziert ist Clenbuterol jedoch weiterhin, wenn zum Beispiel wegen neurologischer Defizite die Bedienung eines Inhalators nicht möglich ist, oder eine weitere Bronchodilatation angestrebt wird (AWMF 2011). In der Leitlinie der COPD ist Clenbuterol nicht zu finden.

Nachforschungen bei Pulmologen und Allgemeinärzten, sowie Apotheken haben ergeben, dass Clenbuterol nur noch selten zu therapeutischen Zwecken bei Erwachsenen verwendet wird. In der Pädiatrie wird jedoch ein Kombinationspräparat aus Clenbuterol und Ambroxol (Spasmo Mucosolvan) bei obstruktiver infektiöser (bakterieller und viraler) akuter Bronchitis angewendet. 5ml Saft enthalten 6,84mg Ambroxol und 0,004mg Clenbuterol, oder als Tablette 27,36mg Ambroxol und 0,018mg Clenbuterol. Laut Aussage von Frau Prof. Muntau vom Dr.-von-Hauerschen-Kinderhospital wird vor allem der Spasmomukosolvansaft angewendet. Die Häufigkeit der Verschreibungen sei jedoch in den letzten zwei Jahren aus ihr unbekanntem Gründen zurückgegangen.

In der Schweiz ist der Wirkstoff nur in der Veterinärmedizin zur Behandlung von Atemwegkrankungen zugelassen (z.B. Ventipulmin® ad us vet)(PharmaWiki 2013).

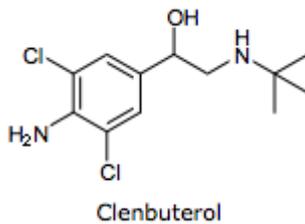
Weiterhin hat Clenbuterol eine starke tokolytische Wirkung, die bei verfrühten Wehen vor allem in der Tiermedizin genutzt wird (Wischnik et al. 1986).

2.1.2 Chemische Eigenschaften

Spiropent® enthält den Wirkstoff Clenbuterolhydrochlorid, 1ml Lösung (20Tropfen) enthalten 0,059mg Clenbuterolhydrochlorid. Weitere Bestandteile sind Benzalkoniumchlorid, Natriumedetat und Wasser für Injektionszwecke. Clenbuterol ist strukturverwandt mit anderen β 2-Sympathomimetika, wie zum Beispiel Salbutamol.

Clenbuterol ist ein Phenylethylaminderivat und ein Racemat.

Abbildung 1: Clenbuterolmolekül (Pharma Wiki 31.07.2013)



Clenbuterol ist ein sehr lipophiles Molekül. Dadurch hat es eine starke Tendenz durch Membranen zu diffundieren und kann sich sehr gut in Haare einlagern (Vgl. 2.3.4 Haar, Inkorporation von Fremdmaterialien).

2.1.3 Wirkungen und Nebenwirkungen

Clenbuterol wirkt an den β 2-Rezeptoren sympathikomimetisch. Durch Anlagerung an die β 2-Rezeptoren der Lunge wirkt es stimulierend an den β 2-Adrenozeptoren und damit bronchodilatativ. Die Wirkung tritt nach 5-20 Minuten ein und hält bis zu 20 Stunden an. Außerdem wirkt es tokolytisch, vasodilatatorisch und hemmt die Histaminfreisetzung.

Die Nebenwirkungen zeichnen sich vor allem durch die in hohen Dosierungen vorhandene Wirkung an den β_1 -Rezeptoren aus. Diese entstehen vor allem durch die sympathomimetische Wirkung. Von kardialer Seite zeigen sich vor allem Tachykardie, Angina pectoris-Symptomatik, Ischämien und Extrasystolen. Weiterhin können Tremor, Kopfschmerzen, Unruhe, Übelkeit, Reflux, Schwindel, Myalgien, Muskelkrämpfe, Nervosität, allergische Reaktionen und Harnverhalt auftreten. Der Tremor, sowie Kopfschmerzen und Muskelkrämpfe nehmen nach einer Therapiedauer von 7-14 Tagen meist ab. Clenbuterol erhöht auch die Neigung zur Hyperglykämie und Hypokaliämie (Karow und Lang-Roth 2012, Kohler et al. 2008).

Im Zusammenhang mit Clenbuteroleinnahme und -missbrauch kam es vereinzelt zu lebensbedrohlichen, oder tödlichen Wirkungen. Micheli et al. (1991) berichten von Spätdyskinesien nach mehrjähriger therapeutischer Clenbuteroleinnahme. Huckins und Lemons (2013) beschreiben zwei Fälle von Myokardischämien bei Clenbuterolmissbrauch. Es gibt einige weitere Fälle, in denen vor allem von kardialen Komplikationen berichtet wird (Goldstein et al. 1998).

Kontraindiziert ist eine Behandlung mit Clenbuterol bei Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff, oder einen der anderen Bestandteile. Besonders streng wird die Indikation gestellt, wenn der Patient an koronarer Herzkrankheit, schwerer Hypertonie, Aneurysmen, Hyperthyreose, schwer kontrollierbarem Diabetes mellitus oder einem Phäochromozytom leidet (Boehringer Ingelheim 2011).

Die Wirkungen, die Clenbuterol für die Leistungssteigerung interessant machen, sind in ihrem Wirkumfang umstritten und werden sehr kontrovers diskutiert. Clenbuterol wirkt anabol, wie ein leichtes Steroid, jedoch ohne die spezifischen Steroidnebenwirkungen zu zeigen. Es zeigen sich bei Tieren und Menschen eine Erhöhung der Muskelmasse und Muskelkraft, sowie die Verminderung des Fettanteils im Körper (Grupe et al. 2010).

Im Tierversuch wurde eine Hemmung der Lipogenese durch β 2-Stimulation nachgewiesen (Peterla 1990). Durch Stimulation des β 2-Rezeptors wird via zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) die Glykogenolyse in Leber und Skelettmuskel angeregt. Im Fettgewebe werden Triglyceride gespalten und Fettsäuren freigesetzt. Auch das Muskelwachstum wird gesteigert. In einer Arbeit von Morton et al. (1995) wurde gezeigt, dass der Muskelgehalt bei Ratten durch Clenbuterolapplikation signifikant gesteigert wird. Auch andere Studien bewiesen einen Anstieg des gesamten Muskel-Proteins und RNA-Gehalts des Muskels, sowie eine Vergrößerung der Faser-Querschnittfläche (Maltin et al. 1987).

2.1.4 Missbräuchliche Anwendungen

Clenbuterol findet neben dem therapeutischen Einsatz auch Anwendung zur Maststeigerung bei Tieren und zur Leistungssteigerung beim Menschen.

Alle oben genannten anabolen Effekte werden zum Doping genutzt. Dabei fungiert Clenbuterol vor allem als Aufbaumedikament vor einem Wettkampf. Sportler und vor allem Bodybuilder nutzen den antikatabolen Effekt von Clenbuterol. Dies wird vor allem nach einer Steroideinnahme geschätzt, da die anschließende katabole Phase (durch Kortisonüberschuss und verminderte Testosteronproduktion) etwas gemindert wird (Anabolika 2013).

Neben dem illegalen Einsatz als Dopingmittel findet Clenbuterol auch in der Maststeigerung von Tieren Anwendung. Die durch Fleischverzehr entstehende mögliche Clenbuterolanreicherung beim Menschen wird von Sportlern teilweise als Erklärung eines Clenbuterolnachweises angeführt: Kontaminiertes Fleisch sei für den Fund verantwortlich. In Europa ist die Maststeigerung mit Clenbuterol seit 1985 verboten (Richtlinie 96/22/EG des Europäischen Parlaments und Rates 2003). In anderen Teilen der Welt wird Clenbuterol jedoch noch häufig eingesetzt. Laut

Studien wurden in Mexiko in 18-30% der entnommenen Fleischproben (zum menschlichen Verzehr vorgesehen) Clenbuterol nachgewiesen (Thevis et al. 2013, Pöttgen 2012).

2.2 Doping

Sport spielt in unserer Gesellschaft eine wichtige Rolle und erfüllt eine Vielfalt von Aufgaben. So bietet er Identifikationsmöglichkeit und kann zur Völkerverständigung beitragen. Verschiedenste Schichten der Gesellschaft finden durch Sport zusammen und Randgruppen werden dadurch integriert. Auch zur Prävention und Rehabilitation trägt er bei. Besonders bei jüngeren Menschen hat Sport eine Vielzahl von positiven Effekten. So wird soziale und emotionale Kompetenz gefördert, Selbstwertgefühl und eine gesunde körperliche Entwicklung unterstützt. Auch als Wirtschaftsfaktor spielt der Sportsektor mittlerweile eine große Rolle. (Parzeller und Centamore 2008).

Der hohe Stellenwert von Sport zeigt sich schon darin, dass 66% der erwachsenen Einwohner der Bundesrepublik Deutschland regelmäßig Sport treiben. 27 Millionen Menschen in Deutschland sind Mitglieder eines Sportvereins (Parzeller und Centamore 2008).

Neben dem aktiven Ausüben von Sport, nimmt auch die Anteilnahme als Zuschauer, also der passive Sportkonsum, eine wichtige Rolle in unserer Gesellschaft ein. Die positiven Auswirkungen sowohl von aktivem als auch passivem Sport sind jedoch nur gegeben, wenn Sport weiterhin seinen fairen Charakter behält und das Image von Spitzensport nicht durch Doping zerstört wird.

2.2.1 Definition

Die Definition von Doping hat sich über viele Jahre immer wieder verändert. Eine einfache Erklärung aus dem Jahre 1952 lautet: „Jedes Medikament- ob es wirksam ist oder nicht-, mit der Absicht der Leistungssteigerung vor Wettkämpfen gegeben, ist als Doping zu betrachten“ (Grupe et al. 2010). Diese Definition ist zwar gut verständlich, erfasst den komplexen Begriff aber nicht völlig.

Um den Begriff Doping spezifiziert abzugrenzen, erfordert es einer umfassenden und ausführlichen Definition: Das Anti-Doping-Regelwerk der Welt Anti-Doping-Agentur (WADA) definiert Doping als das Vorliegen eines oder mehrerer Verstöße gegen die Anti-Doping-Bestimmungen. Dies gilt seit dem 01.01.2004.

Doping ist definiert als ein ein- oder mehrmaliger Verstoß gegen die Anti-Doping-Regeln wie sie in Artikel 2.1 bis 2.8 ausgewiesen sind:

Die folgenden Artikel stellen Verstöße gegen die Anti-Doping-Regeln dar:

- 2.1 Die Anwesenheit einer verbotenen Substanz, deren Metaboliten oder eines Markers in einer dem Athleten entnommenen
- 2.2 Die Anwendung bzw. der Versuch der Anwendung einer verbotenen Substanz oder einer verbotenen Methode
- 2.3 Verweigerung oder Nichterfüllung (ohne ausreichende Begründung) der Abgabe einer Probe nach Aufforderung zur Dopingkontrolle entsprechend der Autorisierung durch die Anti-Doping-Regeln
- 2.4 Verhinderung der Verfügbarkeit bei Kontrollen außerhalb des Wettkampfes einschließlich des Unterlassens der Aufenthaltsmeldepflicht
- 2.5 Betrug oder der Versuch eines Betrages bei der Dopingkontrolle
- 2.6 Besitz von verbotenen Substanzen oder verbotenen Methoden

2.7 Weitergabe jeglicher verbotenen Substanz oder verbotenen Methode

2.8 Anstiftung, Mitbeteiligung, Unterstützung oder Ermutigung zur Anwendung oder zum Versuch einer Anwendung einer verbotenen Substanz oder verbotenen Methode oder jegliche Art der Beteiligung an einem Verstoß gegen die Anti-Doping Regeln

(Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln 2013)

2.2.2 Geschichte

Das Thema Doping ist keineswegs eine Erfindung der Neuzeit. Ganz im Gegenteil, es wurde bereits ab 700 vor Christus davon berichtet, dass vor olympischen Wettkämpfen Stierhoden zur Leistungssteigerung gegessen wurden. In Südamerika wurden zur Stimulation Kokablätter gekaut, in Afrika Khatblätter (Frater et al. 2008).

In der Literatur taucht der Begriff „Doping“ erstmals 1889 in einem englischen Lexikon auf und beschreibt eine Mischung aus Opium und Analgetika. Ursprünglich lässt sich das Wort wahrscheinlich auf das afrikanische Wort „dop“ zurückführen, welches ein anregendes Getränk beschreibt (Raschka 2008). In der Neuzeit rückte Doping ins gesellschaftliche Interesse als der Radprofi Arthur Linton 1896 beim Rennen Bordeaux- Paris durch eine Überdosis Stimulanzien (häufig wird das nicht existierende Trimethyl als Substanz angegeben) zu Tode kam. Im Jahr 1960 gab es den ersten Dopingtoten bei olympischen Spielen zu beklagen. Knut Enemark Jensen fiel mit einem Hitzschlag von seinem Fahrrad und starb. Bei ihm wurde eine Überdosis von Amphetaminen und Ronicol festgestellt. 1967 starb der englische Radprofi Tom Simpson nach der Einnahme von Aufputzmitteln (Frater et al. 2008).

Als Reaktion auf diese und weitere Todesfälle wurden 1967 zunächst Narkotika und Stimulanzien im Wettkampf verboten (Kohler et al. 2008). Im Jahr 1972 wurden bei

den olympischen Spielen zum ersten Mal umfassende Dopingkontrollen durchgeführt. Vom International Olympic Committee (IOC) wurde die erste umfassende Verbotliste veröffentlicht. Dieser wurden über die Jahre einige Substanzen bzw. Methoden beigelegt. Eine Ergänzung des IOC im Jahre 1993 verbot anabole Wirkstoffe, die nun in anabole Steroide und β 2-Agonisten wie Clenbuterol unterteilt wurden. 1989 wurde vom Europarat das erste internationale Abkommen gegen Doping geschlossen. Die erste Antidoping-Weltkonferenz in Lausanne (1999) beschloss die Gründung der Anti-Doping-Weltagentur (WADA). Die Gründung der Stiftung Nationale Anti Doping Agentur (NADA) fand 2002 statt. Der Welt-Anti-Doping-Code wurde 2003 in Kopenhagen unterzeichnet. Dieser beinhaltet einheitliche Tests während des Trainings und der Wettkämpfe. Auch Sanktionen sind dadurch geregelt (Grupe et al. 2010; Frater et al. 2008).

Ein großer Dopingskandal ereignete sich bei der Tour de France 2006. Viele der Favoriten auf den Sieg, darunter der Deutsche Jan Ullrich, wurden vor dem Rennen von der Teilnahme ausgeschlossen. Auch der spätere Sieger Floyd Landis wurde positiv auf Testosteron-Doping getestet. Sie alle sollen vom spanischen Dopingarzt Eufemiano Fuentes „betreut“ worden sein (Frater 2008).

Den jedoch bisher größten Dopingskandal lieferte der Radfahrer Lance Armstrong, der Ende 2012 alle sein Titel von 1999 bis 2005 abgeben musste. Nach langem Leugnen gestand er Anfang 2013 in einer Talkshow den systematischen Betrug (Stern 2013).

Der Jahresbericht 2012 der NADA verzeichnete insgesamt 8.567 Trainingskontrollen und 5.480 Wettkampfkontrollen. Dabei wurden 97 mögliche Verstöße gegen Anti-Doping Bestimmungen vermerkt; in 64 dieser Fälle gab es eine positive Analyse und eine verbotene Substanz wurde festgestellt. 22 Athleten wurden entweder gesperrt, verwahrt oder wurden zu einer Geldstrafe verurteilt. Die anderen Sportler

konnten ihre positiven Tests mit einem Attest oder einer TUE (Therapeutic Use Exemption) erklären (NADA 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Menschen schon seit sehr langer Zeit versuchen ihre körperliche Leistungsfähigkeit zu steigern. Auch die Entwicklung von Anti-Doping-Arbeit und-Regeln hat sich immer weiter entwickelt. Durch umfassende Reglements und Kontrollen werden immer wieder Sportler des Dopings überführt. Sowohl im Leistungssport als auch im Breiten- und Amateursport werden jedoch weiterhin regelmäßig Dopingsubstanzen angewendet. Die illegale Leistungssteigerung scheint im Wettlauf mit den Nachweismethoden und Regelwerken der Anti-Doping-Institutionen zu stehen. Immer ausgefallenerere Methoden machen es den Kontrolleuren schwer, jeden Betrug als solchen zu erkennen und zu sanktionieren. Der aussichtslos erscheinende Kampf gegen Doping führt zu Forderungen wie, Doping bei Spitzensportlern unter ärztlicher Aufsicht zu erlauben, da man es sowieso nicht verhindern könne (Grupe et al. 2010).

2.2.3 Geschichte des Clenbuteroldopings

Das Medikament Clenbuterol wurde in einer Vielzahl von Fällen zur Leistungssteigerung und Maststeigerung missbraucht.

1988 wurde der Wirkstoff durch den Kälbermastskandal im Münsterland bekannt. Dabei hatten Züchter ihren Tieren zur Wachstumsbeschleunigung Clenbuterol verabreicht. Bei einer Dopingkontrolle wurde das Medikament erstmals 1991 vom IOC-Labor in Kanada in entnommenen Proben detektiert. Laut Frau Prof. Ayotte wurde bis 1992 in 9 Urinproben Clenbuterol identifiziert, diese stammten vor allem von Bodybuildern. Ebenfalls 1992 wurde der Fall der Sprinterin Katrin Krabbe (Weltmeisterin 1991 über 100m und 200m) und ihrer Trainingspartnerinnen Breuer und Derr bekannt. Bei ihnen war das β -Mimetikum in einer Urinprobe

nachgewiesen worden. Die Sportlerinnen wurden bis 1995 gesperrt. Zur gleichen Zeit wurde den Gewichthebern Saxton und Davies der Clenbuterolmissbrauch nachgewiesen. 1993 wurden Clenbuterol und β 2-Agonisten als anabole Wirkstoffe auf die Verbotsliste gesetzt (Grupe et al. 2010). 2010 wurde die Sportwelt erneut auf Clenbuterol aufmerksam, nachdem der Tour-de-France Sieger Alberto Contador positiv getestet wurde. Rückwirkend wurden ihm alle Siege von August 2010 bis August 2012 aberkannt (Stern 2013). Ebenfalls 2010 wurde der deutsche Tischtennispieler Dimitrij Ovtcharov nach einer positiven Clenbuterolprobe suspendiert. Nachuntersuchungen von vorangegangenen Dopingkontrollen sowie der Urinproben anderer Athleten, die sich zeitgleich mit Ovtcharov in Asien aufhielten unterstützten die Annahme, die Spuren des Medikaments seien durch kontaminiertes Fleisch in seinen Körper gelangt und führten dazu, dass auf ein Disziplinarverfahren verzichtet wurde (Wikipedia 2013).

2.2.4 Übersicht über Dopingsubstanzen und Nebenwirkungen

Um einen Überblick über die immer größere Anzahl von Dopingmöglichkeiten zu erhalten, ist es sinnvoll, eine Auflistung der verbotenen Substanzen und Methoden zu betrachten (siehe Tabelle 1).

Trotz umfassender Regelwerke und Dopingverbote wird sowohl im Spitzensport als auch im Breiten- und Amateursport immer wieder gedopt. Dies führt bei den meisten Anwendern zu spezifischen Nebenwirkungen und in einigen Fällen sogar zum Tod.

Tabelle 1: Verbotene Substanzen, Dopingliste der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA), Stand 1.1.2010

1. Verbotene Substanzen und Methoden während und außerhalb des Wettkampfes

S1. Anabole Wirkstoffe

Anabol Androgene Steroide (AAS)

a) exogene AAS

b) endogene AAS

Andere anabole Wirkstoffe

S2. Peptidhormone, Wachstumsfaktoren und verwandte Verbindungen

S3. β 2-Agonisten

S4. Hormonantagonisten und Modulatoren

S5. Diuretika und andere maskierende Substanzen

M1. Verbesserung des Sauerstofftransports

M2. Manipulationen

M3. Gendoping

2. Verbotene Substanzen während des Wettkampfes

S6. Stimulanzien

S7. Narkotika

S8. Cannabinoide

S9. Glucocorticosteroids

3. Verbotene Substanzen in speziellen Sportarten

Alkohol

Beta-Blocker

2.3 Haare

Um Haaranalytik durchzuführen, bzw. die Ergebnisse zu verstehen, ist es wichtig, die Grundlagen der Materie Haar nachzuvollziehen. Im Folgenden sollen Aufbau, Wachstum, Pigmentierung und Grundlagen der Inkorporation von Fremdmaterialien in Haar erläutert werden.

2.3.1 Aufbau

Haare bedecken die gesamte Körperoberfläche des Menschen bis auf Hand- und Fußsohlen, Brustwarzen und Lippenrot. Sie erfüllen wichtige Aufgaben, wie den Schutz vor Sonne und Kälte. Weiterhin haben sie große ästhetische Relevanz.

Es gibt drei zu unterscheidende Haartypen. Das so genannte Lanugohaar, welches den Körper bis circa zum sechsten Lebensmonat wie ein Flaum überdeckt, das Vellushaar, ein feines markloses Haar (Wollhaar) das den Körper flächig bedeckt und das kräftige so genannte pigmentierte Terminalhaar.

Der menschliche Körper besitzt circa fünf Millionen Haarfollikel, davon etwa eine Million am Kopf. (Pötsch und Skopp, 2004). Die Langhaare des Kopfes werden Capilli genannt. Sie gehören zu den so genannten Nichtsexualhaaren (Kopfhaar, Augenbrauen, Wimpern), da sie im Gegensatz zu Sexualhaaren (beim Mann Barthaare, Ohrenhaare, obere Schamhaare) nicht androgenabhängig wachsen. Die Anzahl der Kopfhaare variiert individuell, es ist jedoch eine Abhängigkeit von der Haarfarbe zu beobachten. So haben blonde Menschen durchschnittlich 150.000, Schwarzhäufige 110.000, Brünette 100.000 und Rothäufige 80.000 Haare. Dadurch

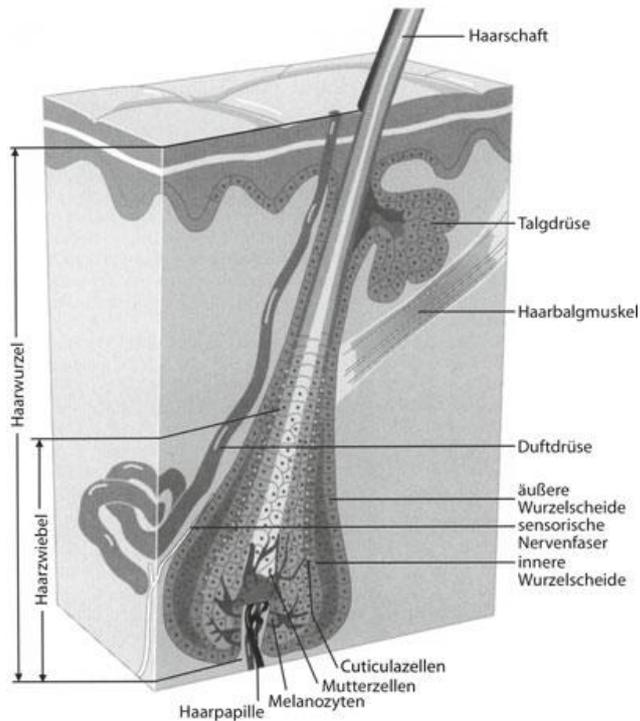
ergibt sich eine durchschnittliche Haardichte von circa 200Haaren/cm² über alle Haarfarben hinweg (Raab 2012).

Aufgebaut ist das Haar aus Keratinfasern, die über Disulfidbrücken und Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Chemisch gesehen setzen sich Haare aus Kohlenstoff (50%), Sauerstoff (23%), Stickstoff (17%), Wasserstoff, Schwefel und Wasser zusammen (Raab 2012).

Ein Haarfollikel hat einen Durchmesser von 50-100µm (Guohua und Bharat 2006). Als Haarschaft wird der aus der Haut herausragende Teil des Haares bezeichnet. Der Teil darunter heißt Radix pili (Haarwurzel) und reicht von der Epidermis bis zur Dermis bzw. sogar Subcutis. Der untere Teil der Haarwurzel wird als Bulbus pili (Haarzwiebel) bezeichnet und enthält die das Haar versorgenden Kapillaren und Nerven, sowie die Haarpapille mit den aktiven Matrixzellen/Mutterzellen, die alle drei Schichten des Haares bilden. Sie gehören zu den aktivsten Zellen des menschlichen Körpers und treten alle 24 Stunden in eine neue Mitose ein (Moll 2010).

Weitere Strukturen um die Haarwurzel sind der Musculus arrector pili, dessen Kontraktion das Aufstellen der Haare bewirkt, sowie Talgdrüsen, deren Ausführungsgänge in den Haarfollikel münden. Weiterhin gibt es sowohl ekkrine, als auch apokrine Schweißdrüsen (Duftdrüsen). Apokrine Drüsen sind vor allem in Achsel und Genitalbereich vorhanden und kommen nur vereinzelt am Kopf vor. Ekkrine Drüsen sind in großer Zahl auf der Kopfhaut zu finden. Das Sekret beider Drüsentypen mündet in der Nähe des Haarfollikels. Es sind etwa 900Schweißdrüsen/cm² und circa 300Talgdrüsen/cm² im Bereich der behaarten Kopfhaut zu finden (Pötsch und Skopp 2004).

Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Haarfollikels mit Talgdrüse (Bährle-Rapp 2012)

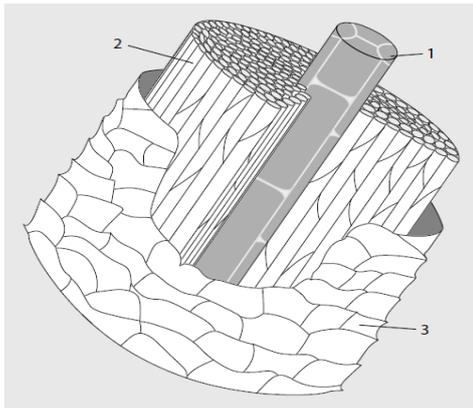


Jedes einzelne Haar lässt sich im Querschnitt in drei Schichten teilen. Das innere Mark (Medulla), die Rinde (Kortex) in der Mitte und die äußere Schuppenschicht (Cuticula).

Das Haarmark ist nicht in allen Haaren vorhanden. Oft ist es unterbrochen oder fehlt in dünnen Haaren ganz. Der Kortex besteht aus längs angeordneten Keratinfilamenten, die sich zu Fibrillen und Makrofibrillen zusammenfassen. Diese sind durch eine amorphe Substanz aneinandergeheftet. Der Kortex ist die stärkste der drei Schichten und bestimmt Elastizität und Reißfähigkeit des Haares. Außerdem sitzen in dieser Schicht die für die Haarfarbe entscheidenden Melanosome (melaninhaltige Einschlusskörperchen). Die äußere Cuticula dient als Schutzschicht und besteht aus circa zehn übereinanderliegenden Schichten von dachziegelartig übereinander gelegten verhornten Zellschuppen. Die gesamte Schicht ist mit einer Fettschicht von 18-Methyleicosansäure überzogen. Am Zustand

der Cuticula (sichtbar in der Rasterelektronenmikroskopie) lässt sich der Grad der Haarschädigung ablesen (Harkey 1993).

Abbildung 3: Aufbau des Haars (Raab 2012)



■ Abb. 2.2 Aufbau des Haars: 1 Mark (Medulla), 2 Rinde (Kortex, Faserschicht) und 3 Cuticula (Schuppenschicht) (Aus Raab u. Kindl 2004 mit freundlicher Genehmigung)

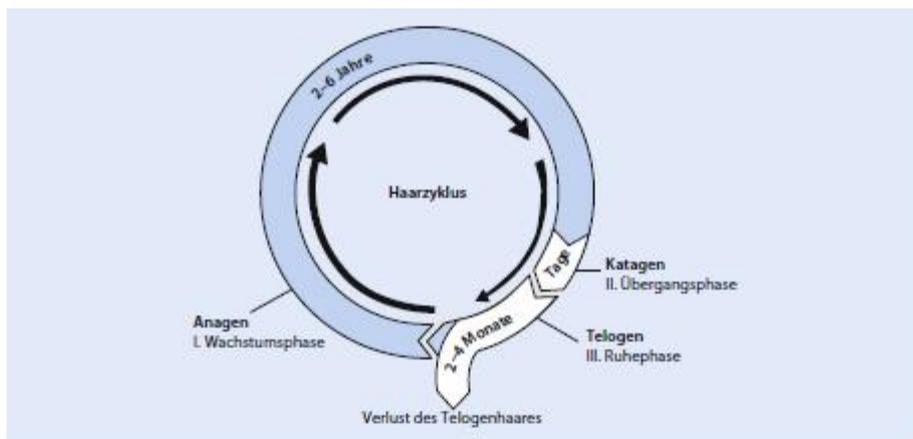
2.3.2 Wachstum

Im Durchschnitt wächst ein menschliches Kopfhaar monatlich zwischen 0,8 – 1,3cm/Monat (Sachs 1995). Die Wachstumsgeschwindigkeit hängt jedoch von Hormonstatus, Ernährung und eventueller Medikamenteneinnahme ab. In der vorliegenden Arbeit wird mit einem Zentimeter Wachstum pro Monat gerechnet.

Das menschliche Haar wächst in einem dreistufigen Haarzyklus. Jeder Follikel durchläuft diesen Zyklus unabhängig von den umliegenden Follikeln. So ergibt sich beim Menschen, im Gegensatz zu manchen Tieren, ein kontinuierliches Haarwachstum (zyklisches Haarwachstum, beispielsweise beim Schaf). Diese drei Wachstumsphasen werden als Anagen-, Katagen- und Telogenphase bezeichnet. Die Dauer der einzelnen Phasen variiert wiederum individuell und wird je nach Literatur verschieden lang angegeben. Die längste Phase ist die Wachstumsphase (Anagenphase) deren Dauer mit 48-72Monaten angegeben wird. Dem folgt die Übergangsphase, oder Katagenphase, die einige Tage bis Wochen dauert, bis der

Haarfollikel schließlich in die zwei bis sechsmonatige Telogenphase eintritt (Sachs 1995).

Abbildung 4: Der Haarzyklus (Raab 2012)

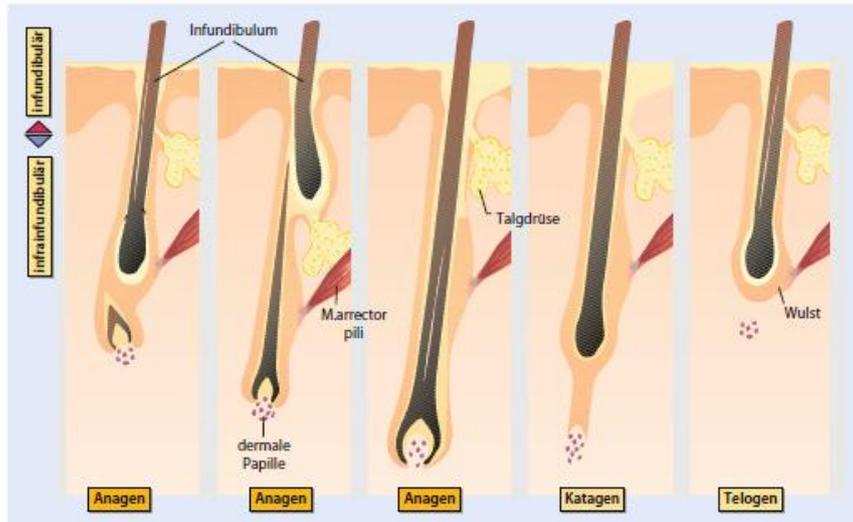


In der Anagenphase wächst das Haar kontinuierlich. 90% aller menschlichen Kopfhare befinden sich in dieser Phase. Die hochaktiven Haarmatrixzellen teilen sich dabei circa einmal pro Tag und bilden alle drei Schichten des Haars. Die innere Wurzelscheide keratinisiert und das Haar wird zur Follikelöffnung geschoben.

In der darauf folgenden Phase, der Übergangs- oder Katagenphase stoppt die Teilung der Matrixzellen, der Haarfollikel beginnt zu schrumpfen und das Haar löst sich von der Papille. Circa 1% aller Haare befinden sich in dieser Phase.

Die Telogen- oder Ruhephase dient dazu den „alten“ Haarfollikel aus der Haarwurzel zu schieben. Das Haar wird zu diesem Zeitpunkt auch Kolbenhaar genannt und ist völlig schmerzfrei zu ziehen. Währenddessen erneuert sich die Haarpapille und es entsteht eine neue Haarmatrix aus der dann ein neues Haar entsteht. Circa 8% des Haares befinden sich in dieser Ruhephase. Dadurch ergibt sich ein physiologischer Haarausfall von 70-100 Kopfharen täglich (Herrmann und Trinkkeller 2007).

Abbildung 5: Phasen des Haarwachstums (Raab 2012)



Mit zunehmendem Alter verringern sich Wachstumsgeschwindigkeit durch die abnehmende Aktivität der Matrixzellen. Weiterhin werden die Haarzyklen mit der Zeit kürzer. Diese Veränderungen sind durch die schlechtere Zufuhr mit Sauerstoff und anderen wachstumsrelevanten Metaboliten bedingt. Die Konsequenz dieser Veränderungen ist weniger dichtes, dünneres und auch kürzeres Haar. (Raab 2012)

2.3.3 Pigmentierung

Die Haarfarbe eines Individuums wird durch den Melaningehalt in seinen Haaren bestimmt. Alle möglichen Haarfarben von Schwarz, Braun und Blond bis hin zu Rot entstehen durch das jeweilige Verhältnis von zwei Melanintypen. Dieses Verhältnis, sowie die Produktion des Pigments sind auf weniger als zwanzig Genen kodiert. Man unterscheidet das dunkle, grobkörnige Eumelanin und das rötliche, feinere Pheomelanin.

Das Pheomelanin ist das vorherrschende Melanin in rotem und rot-blondem Haar. Bei allen andern Haarfarben ist ein relatives konstantes (geringes) Maß an

Pheomelanin zu beobachten. Alle anderen „Schattierungen“ sind durch einen kleineren, oder größeren Anteil an Eumelanin gekennzeichnet. Der Gehalt nimmt von blondem zu schwarzem Haar zu (Ito und Wakamatsu 2011).

Diese Pigmente werden in den Melanozyten gebildet, die sich im Haarbulbus befinden. Während der Anagenphase eines Haares bilden diese Zellen melaninhaltige Einschlusskörperchen, so genannte Melanosomen, die in die Kortexschicht des Haares eingelagert werden (Harkey 1993).

Alle Melanosomen besitzen das Enzym Tyrosinase, welches das Schlüsselenzym der Melanogenese darstellt. Bei dieser enzymatischen Reaktion wird L-Tyrosin in L-Dopachinon umgewandelt. In weiteren Schritten werden spezifische Melaninpigmente hergestellt, die bei jeder Haarfarbe ein verschiedenes Mischverhältnis von Eumelanin und Pheomelanin aufweisen (Ito und Wakamatsu 2011).

Das Ergrauen (Canities) der Haare lässt sich mit der verringerten Aktivität der Tyrosinase erklären. Es kann kein Pigment mehr entstehen und in den Haarschaft werden Luftbläschen eingeschlossen. Optisch wirkt das Haar nun weiß. Nachdem jedes Haar individuell den Haarwuchszyklus durchläuft und nicht bei allen Haaren gleichzeitig die Tyrosinaseaktivität abnimmt gibt es zeitweise eine Mischung von „weißen“ und weiterhin pigmentierten Haaren. So entsteht der optische Eindruck von grauen Haaren (Neste und Desmond 2004).

2.3.4 Inkorporation von Fremdmaterialien

Haar ist ein sehr geeignetes Medium um vor allem im Langzeitverlauf den Kontakt eines Menschen mit Pharmaka und Schadstoffen anzuzeigen. Durch den vergleichsweise sehr geringen Metabolismus in Haaren können Stoffe sehr lange

nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Blut und Urin, in denen Stoffe lediglich Stunden bis Tage nach dem Konsum nachgewiesen werden können, dient die Matrix Haar als langfristige Nachweismöglichkeit (Pötsch und Skopp 2004).

Ein prominentes Beispiel der frühen Nutzung von Haaranalysen ist die Bestimmung des Arsengehalts im Haar von Napoleon Bonaparte, die 1961 von Forshufvud et al. durchgeführt wurde. Diese Untersuchung ließ den Schluss zu, dass Napoleon höchstwahrscheinlich an einer Arsenvergiftung gestorben ist.

Dies ist nur ein Beispiel für die Nutzung von Haaranalytik. Sie wird mittlerweile zur Klärung forensischer, aber auch klinischer Fragestellungen benutzt. Durch die zunehmende Sensitivität der Nachweismethoden können eine Vielzahl von Medikamenten, Drogen und Dopingsubstanzen nachgewiesen werden (Thieme 2004).

Auch Stoffwechselprodukte können nachgewiesen werden, und damit zum Beispiel Hinweis auf eine bestimmte Erkrankung geben. So zeigten Paisey et al. 1984 eine vermehrte Glykosilierung der Haare von Diabetikern im Vergleich zu einer gesunden Vergleichsgruppe.

Insgesamt lässt sich das Haar als „toxikologischer Fahrtenschreiber“ bezeichnen (Rook und Dawber 1995). Um die Inkorporationsphänomene forensisch nutzen zu können, ist es wichtig, die Mechanismen der Einlagerung von Fremdmaterialien, hier im Speziellen von Pharmaka zu kennen. Die Inkorporationsmechanismen in Haare sind bis heute noch nicht gänzlich geklärt. Es lassen sich jedoch einige Faktoren benennen, die bei der Einlagerung eine wichtige Rolle spielen.

Um die Einlagerung quantifizieren zu können hat sich die ICR, die Inkorporationsrate bewährt. Diese errechnet sich aus dem Quotienten der Konzentration des Pharmakons im Haar zur AUC, der Area Under the Concentration, im Plasma (Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve) (Nakahara und Kikura 1996).

Es lassen sich in der Fachliteratur zwei Erklärungsansätze erkennen. Zunächst das einfache Inkorporationsmodell: Hierbei wird davon ausgegangen, dass Substanzen im Blutkreislauf, also auch den Haarfollikeln zirkulieren und dann in anagene Haare eingebaut werden.

Der Melaningehalt spielt eine wichtige Rolle bei der Fremdstoffinkorporation. So werden Substanzen besser in stärker pigmentierte Haare eingelagert. Die Fremdstoffe haben beim Fluss durch den Haarfollikel Kontakt zu den Melanozyten. Es gibt einen deutlichen Unterschied zwischen Blut und den Melanozyten im Bezug auf den pH-Wert (Nakahara et al. 1995). Im Gegensatz zum basischen Blut mit einem pH-Wert von 7,4 sind Melanozyten mit einem pH-Wert von 3-5 sauer (Pötsch et al. 1997). Dieser Gradient bewirkt eine Anhäufung von basischen Stoffen im Zytoplasma. Die Fremdstoffmoleküle binden an Melanin und es kommt zu einer Protonierung, die eine Rückdiffusion ins Blut erschwert. Dies führt zu einem dauerhaft erhöhten Einstrom von basischen Molekülen und zur Anreicherung in Melanozyten. Nachdem die Melanozyten in den Melanosomen gereift sind werden sie von den Matrixzellen aufgenommen und erhöhen so den Anteil des nicht-körpereigenen Stoffes in den Zellen. Je mehr Pigment in den Haaren vorhanden ist, desto mehr Fremdstoff wird in das Haar eingelagert (Pötsch und Skopp 2004).

Wichtig ist auch die Beschaffenheit der Zellmembran im Haarfollikel. Durch jede Membran können solche Stoffe besonders gut diffundieren, die lipophil, ungeladen und nicht proteingebunden sind. Aber auch die Beschaffenheit der Zelle, zu der die Membran gehört spielt eine Rolle. Hier ist es wichtig die undifferenzierte Matrixzelle vom hochdifferenzierten Melanozyt zu unterscheiden. Der Differenzierungsgrad bedingt vermutlich unterschiedliches Aufnahmeverhalten. Aber auch die andere Seite, in diesem Fall das Fremdmolekül selbst, ist wichtig. Relevant sind dabei Größe, Proteinbindung, funktionelle Gruppen, Ionisationsgrad und Lipophilie (Pötsch und Skopp 2004). Weiterhin interessant ist es, dass in Haaren die Konzentration der Muttersubstanz wesentlich höher ist als die ihrer Metabolite.

Dies ist vor allem insofern verwunderlich, als in Urin und Blut typischerweise eine höhere Konzentration der Metaboliten zu finden ist (Wilkins et al. 1997). Dies lässt sich vermutlich durch die Polarität der Metaboliten erklären, die schlechter durch die Zellmembran diffundieren als die Muttersubstanz (Pötsch und Skopp 2004).

Das zweite komplexere Inkorporationsmodell bezieht neben der Aufnahme über die Blutversorgung auch andere, auf den Gesamtorganismus wirkende Faktoren, mit ein. So können Stoffe über das interzelluläre Flüssigkeitssystem der Haut, über Talg, Schweiß, Epidermis oder direkte Stoffantragung eingelagert werden (Pötsch und Skopp 2004). Es gab und gibt äußerst kontroverse Diskussionen darüber, ob eine externe Kontamination, also eine Einlagerung in bereits keratinisierte Haare möglich ist und welche Rolle sie bei der Analyse spielt (Pötsch und Skopp 2004). Der Disput lässt sich auf die beiden Extrempositionen der Forschungsgruppen von Kidwell und Baumgartner zurückführen. Kidwell et al. (2000) sahen die Fremdstoffaufnahme ins keratinisierte Haar als erwiesen an, wohingegen Baumgartner et al. (1989) die äußere Kontamination als unwahrscheinlich und unwesentlich einschätzten. Bis heute lässt sich die Kontroverse nicht ganz klären (Pötsch und Skopp 2004).

Der Körper kann Fremdstoffe aktiv über Injektion oder Ingestion, also die Aufnahme durch den Mund beziehungsweise Verdauungstrakt, aufnehmen. Weiterer Aufnahmeweg ist die Inhalation, welche sowohl aktiv als auch passiv erfolgen kann. Zu den passiven Aufnahmemechanismen wird außerdem noch die dermale Aufnahme gezählt. Bei der Inkorporation hängt die Dauer der Aufnahme in Haare von den „(...) pharmakokinetischen Parametern der Substanz, ihrer Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten des Organismus bzw. ihrer Gewebefindung (...)“ (Pötsch und Skopp 2004) ab.

Wie bereits beschrieben sind im Bereich der behaarten Kopfhaut sowohl Talg-, als auch Schweißdrüsen zu finden. Der Film auf der Haut (und im Trichter des Haarfollikels) setzt sich aus den Sekreten dieser Drüsen, also Schweiß und Talg

zusammen. Der Schweiß aus den ekkrinen Drüsen ist sauer (pH: 4,0- 6,8) und enthält vor allem Wasser und Elektrolyte. Der zunächst flüssige Talg besteht zu zwei Dritteln aus Triglyceriden und zu einem weiteren Drittel aus Wachsestern. Wenn sich im Hautfilm Fremdstoffe befinden, ist es möglich, dass diese in den Haarbulbus eindringen und aufgenommen werden. Je nachdem ob sich der Fremdstoff in Schweiß oder Talg einlagert findet die Inkorporation zu verschiedenen Zeitpunkten statt. Substanzen werden im Schweiß innerhalb von Stunden ausgeschieden, wohingegen beim Talg einige Wochen vergehen. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Einlagerungsmechanismus Fremdschubstanzen im Haar erklären kann, dass aber die jeweilige Substanz und deren Morphologie eine große Rolle spielen. Auch der Zustand des Haares spielt eine Rolle. So ermöglicht poröses Haar eine bessere Einlagerung, als ungeschädigtes Haar. Dies erklärt die vermehrte Einlagerung in gebleichtes und damit „aufgespaltenes“ Haar im Vergleich zu unbehandeltem (Pötsch und Skopp 2004).

Zur Inkorporation von Fremdmaterialien kann auch eine direkte Stoffantragung über „(...) Stäube, Aerosole oder Gase (...)“ (Pötsch und Skopp 2004) beitragen. Der Fremdstoff legt sich an die Haut an, kann dann in den oben genannten Hautfilm eingebaut werden und über den Haarbulbus in das Haar „einwachsen“. Alternativ wird die Substanz in Sekrete emulgiert, die dann über die Haut resorbiert wird und auf den gesamten Organismus wirken kann. Die Relevanz dieses Mechanismus hängt von der Expositionsdauer, und-konzentration ab. Auch hier sind Substanzmorphologie und Haarstruktur von Bedeutung. Die Anwendung von Waschschrillen vor der Analyse soll den Einfluss durch Stoffantragungen aus der Umwelt reduzieren (Pötsch und Skopp 2004).

Durch all diese Inkorporationsmechanismen lässt sich die Fremdstoffeinlagerung erklären. Es ist jedoch nicht möglich, eine Aussage zur quantitativen Bedeutung der oben genannten Mechanismen zu machen (Pötsch und Skopp 2004).

2.3.5 Inkorporation von Clenbuterol in Haare

Die Substanz Clenbuterol zeichnet sich durch ihre ausgezeichnete Nachweisbarkeit in Haaren aus. Dabei ist für das Inkorporationsverhalten folgendes entscheidend: Clenbuterol wird sehr gut an Melanin gebunden und findet sich deshalb in pigmentierten Strukturen, wie Augen und Haaren. In Haaren vor allem in dunklen Haaren mit viel Melanin. Weiterhin zeigt das Medikament eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit, da sich der Stoff durch zwei Chloratome sehr zuverlässig und sensitiv nachweisen lässt. Dies lässt auch Rückschlüsse auf die Wachstumskinetik zu. In der Analytik zeigt sich Clenbuterol sehr stabil, es sind keine Auswaschungen zu beobachten (Thieme 2004).

All dies macht Clenbuterol zu einem ausgezeichneten Modellstoff um Einlagerungsmechanismen zu erforschen. Aber auch in der Praxis sind Kontrollen von Clenbuterolmissbrauch sowohl bei Menschen, als auch bei Tieren möglich und sinnvoll. Dabei lässt sich nicht nur die Einnahme beweisen, sondern auch der Einnahmezeitpunkt genauer eingrenzen.

3. Material und Methoden

3.1 Studienkollektiv

Die Applikationsstudien fanden nach Einholen des Ethikvotums am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig Maximilians Universität München statt. Die Versuche wurden unter ärztlicher Aufsicht an freiwilligen, erwachsenen, aufklärungs- und

zustimmungsfähigen ProbandInnen durchgeführt. Die ProbandInnen der Studie waren gesunde Menschen, die zur Zeit der Untersuchung keine Medikamente einnahmen. Dies wurde durch eine körperliche Untersuchung, sowie eine Blutuntersuchung gewährleistet. Die ProbandInnen wurden durch Aushänge in der Universität, sowie Mundpropaganda akquiriert.

Es wurden jeweils 20 ProbandInnen für die Applikations-, und 20 für die Kontrollgruppe gesucht. 75% der ProbandInnen waren Männer, 25% Frauen. Im Anschluss an die erste Applikation (im Folgenden Applikationsstudie 1) fand eine zweite Applikationsstudie mit 11 der 20 ProbandInnen aus der Interventionsgruppe statt, welche zufällig ausgewählt wurden (im Folgenden Applikationsstudie 2). In Applikationsstudie 2 waren 73% der ProbandInnen männlich, 27% waren weiblich.

Das Alter der TeilnehmerInnen der Interventionsgruppe lag zwischen 18 und 28 Jahren. Im Mittel lag das ProbandInnenalter bei 24,4 Jahren. Die ProbandInnen wogen im Mittel 74,8kg und waren 179cm groß.

Geplant war ebenfalls eine Gruppe von ProbandInnen, die Clenbuterol therapeutisch einnehmen. Trotz Aushang in Arztpraxen und Apotheken und mehrfachen Anfragen bei allgemeinärztlichen und pulmologischen Praxen, Apotheken und auch der Hersteller-Firma konnten keine ProbandInnen gefunden werden. Der Einsatz von Clenbuterol zu therapeutischen Zwecken ist heutzutage laut den befragten ÄrztInnen sehr selten geworden.

Zusätzlich wurde eine Hochrisiko-Vergleichsgruppe herangezogen. Hierfür wurden im November 2012 Proben von 66 Fußballspielern aus Mexiko analysiert. Die Sportler waren zum Untersuchungszeitpunkt in Vereinen tätig, welche drei verschiedenen Fußballteams angehören: das U20 Team (n = 20), U17 Team (n = 26) und dem lokalen Amateur-Team (n = 20). Diese Daten wurden zu

Vergleichszwecken für diese Arbeit vom Institut für Dopinganalytik in Kreischa, Deutschland, (IDAS) zur Verfügung gestellt.

Alle Informationen und Daten wurden streng vertraulich behandelt. Die Daten wurden zahlenkodiert gespeichert. Ein Rückschluss auf ProbandInnen von Seiten Dritter ist nicht möglich. Nur die Leiter der Studie hatten im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den vertraulichen Daten. Diese unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Die Weitergabe der sekundär anonymisierten Daten in In- und Ausland erfolgte ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken. Die gesondert aufbewahrten personenbezogenen Daten werden nach Ablauf von zwei Jahren vernichtet.

Die ProbandInnen wurden mündlich aufgeklärt, jede/r ProbandIn erhielt zusätzlich eine schriftliche ProbandInneninformation. (siehe 9.3 Anhang, ProbandInneninformationen)

3.2 Voruntersuchungen

Bei den ProbandInnen der Applikationsgruppen 1 und 2 wurden folgende Voruntersuchungen durchgeführt: Um die gesundheitliche Eignung der ProbandInnen festzustellen, erfolgte unter ärztlicher Aufsicht eine Anamnese und eine orientierende körperliche und laborchemische Untersuchung. Dabei wurden GOT, GPT, gGT, alkalische Phosphatase, Bilirubin, kleines Blutbild und Kreatinin bestimmt. Es erfolgt ein Ausschluss bei gesundheitlichen Einschränkungen, Allergien, dauerhafter Medikamenteneinnahme und insbesondere auch bei Schwangerschaft. Dies führte zum Ausschluss von drei potentiellen ProbandInnen. Sie wiesen jeweils einen erhöhten Bilirubin-Wert auf.

Bei den ProbandInnen der Kontrollgruppe und der mexikanischen Hochrisiko-Gruppe wurde lediglich nach dauerhafter Medikamenteneinnahme gefragt, welche zum Ausschluss führte. Alle ProbandInnen der Kontrollgruppe wurden in die weitere Analyse inkludiert.

Um eine mögliche Kontamination mit Clenbuterol durch Fleischkonsum abzuklären wurden bei den ProbandInnen der Kontroll- und Applikationsgruppen die Ernährungsgewohnheiten, insbesondere in Hinsicht auf den Fleischkonsum erfasst. Hierbei wurde nach Häufigkeit des Fleischkonsums pro Woche und der Art des Fleisches gefragt. (siehe 9.4 Anhang, Anamnese- und Untersuchungsbogen)

3.3 Studiendurchführung

Die ProbandInnen der Kontrollgruppe gaben nach ihrer Einverständniserklärung eine Haar- und eine Urinprobe ab.

Den ProbandInnen der Applikationsgruppe wurde nach allen Voruntersuchungen am ersten Tag jeweils eine Blut-, Urin- und Haarprobe (Blankprobe) entnommen. Bei der ersten Applikationsgruppe wurden in 24-stündlichen Abständen 2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg Clenbuterol per os verabreicht. An allen fünf Tagen wurden jeweils 90min nach Applikation eine Urin - und eine Blutprobe entnommen. Einen Monat nach Versuchsbeginn wurden nochmal jeweils eine Haar-, Blut- und Urinprobe genommen.

Im Rahmen der zweiten Applikation wurden einem Teil der ProbandInnen der Applikationsgruppe 1 (11/20) erneut insgesamt 30µg Clenbuterol appliziert. Diese bilden die im weiteren Verlauf genannte Applikationsgruppe 2. Die 30µg wurden in Einzeldosen von je 6µg an jedem der fünf Tage verabreicht. Jeweils 90min nach der

Einnahme wurde eine Urinprobe abgegeben. Wiederum vor der ersten Einzeldosis und einen Monat nach Versuchsbeginn wurden Urin- und Haarproben entnommen.

Von den Probanden der Hochrisiko-Gruppe aus Mexiko wurden einmalig eine Haar- und eine Urinprobe gesammelt. (siehe 9.1 Anhang, Studienprotokoll)

3.4 Probengewinnung

3.4.1 Haar

Die Haarproben bestanden jeweils aus einer insgesamt circa bleistiftdicken Haarsträhne, die an drei Stellen okzipital, sehr kopfhautnah abgeschnitten wurde. Nach der Probenentnahme wurden die Strähnen in Aluminiumfolie eingepackt, wobei die kopfhautnahe Seite markiert wurde. Die Proben wurden bis zur Durchführung der Analyse lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert.

Die ProbandInnen der Kontrollgruppe und der Hochrisiko-Gruppe gaben einmalig eine Haarprobe ab die nach demselben Vorgehen verpackt und aufbewahrt wurde. Bei den TeilnehmerInnen der Applikationsgruppen wurden Haarproben zu Beginn der Studie als Blankprobe entnommen. Außerdem wurde einen Monat nach Versuchsbeginn erneut eine Probe entnommen.

3.4.2 Urin

Bei den untersuchten Urinproben wurden von den ProbandInnen jeweils mindestens 10ml Urin abgegeben, die unmittelbar nach der Abgabe gekühlt wurden, und innerhalb von 24 Stunden bis zur Durchführung der Labor-Analyse bei -20°C eingefroren wurden. Von den TeilnehmerInnen der Kontrollgruppe und der

Hochrisiko-Gruppe wurde einmalig eine Urinprobe in derselben Menge abgegeben. Die ProbandInnen der Applikationsgruppen gaben zunächst eine Nullprobe vor der Testung ab. Zudem jeden Tag während der Applikation, jeweils 90 Minuten nach der Medikamenteneinnahme. Eine weitere Urinprobe folgte einen Monat nach Versuchsbeginn.

3.4.3 Blutplasma

Das Blutplasma stammt ausschließlich von den TeilnehmerInnen der ersten Applikationsgruppe 1. Diesen wurde jeweils 90 Minuten nach Medikamentenapplikation, sowie einen Monat nach Versuchsbeginn eine Blutmenge von 3ml entnommen. Zur Blutentnahme wurde das Vacutainer-Blutentnahmesystem genutzt. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Blutröhrchen aufrecht stehend gekühlt. Innerhalb von 24 Stunden wurde das Vollblut für 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abgetrennt und bei -20°C bis zur Analyse tiefgefroren.

3.5 Probenanalyse

Die Analyse der Haar- und Serumproben wurde im Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden in Kreischa, Deutschland, durchgeführt. Die Urinproben wurden im Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln in Köln, Deutschland, analysiert.

3.5.1 Haar

Zunächst wurden Gesamtlänge der Haarprobe und die Haarfarbe erfasst. Anschließend erfolgte die Segmentierung. Bei der Applikationsgruppe wurden jeweils bei Blank- und Post-Applikationsprobe mehrere Einzelsegmente, sowie eine Gesamtprobe analysiert. Bei der Kontrollgruppe wurden das wurzelnahe Segment (1cm) und eine Gesamthaarprobe untersucht.

Der Segmentierung folgte die Einwaage der einzelnen Abschnitte. Das erfasste Gewicht diente der Relativierung der erhobenen Messwerte.

Jeder Probe wurde der interne Standard von 50pg (absolut) D9-Clenbuterol (bei konventionellem Clenbuterol wurde an neun Stellen ein H⁺-Ion durch eine Deuterium-Ion ersetzt, die molare Masse ändert sich dadurch von 277 bei normalem Clenbuterol zu 286 bei D9-Clenbuterol) zugegeben. Die basische Hydrolyse der Haarproben erfolgte nach Zugabe von KOH (1,5ml, 0,5N) bei 80°C bis zur vollständigen Homogenisierung (circa 4-8 Stunden).

Die KOH-Extrakte wurden durch die Festphasenextraktion SPE zentrifugiert und gereinigt. Zur Festphasenextraktion wurden Kartuschen von Woters und Oasis Polymerfilter genutzt. Zunächst wurden alle Kartuschen mit Methanol und Wasser konditioniert. Danach folgte die Beladung mit der Probe, dann ein Waschschrift mit basischem Methanol (60Vol-% Methanol, 40Vol-% 2-prozentiger Ammoniak und Wasser). Anschließend der Elutionsschrift mit leicht saurem Methanol (90Vol-% Methanol, 2Vol-% Essigsäure, 8Vol-% Wasser).

Die Produkte der Festphasenextraktion wurden anschließend unter Stickstoffstrom bei 80°C eingedampft. Es folgte die Resuspension mit 15µl Acetonitril und 30µl LC (Liquid Chromatographie)- Puffer.

Anschließend wurde die Messung mittels LC-MS-MS (Liquid Chromatography und Tandem-Massenspektrometrie) durchgeführt.

Für die Chromatographie wurde das Liquid Chromatography-System verwendet. Die Trennung wurde bei 25°C, unter Nutzung eines binären Mobile-Phase-Systems mit einem linearen Gradienten durchgeführt.

Nach der Chromatographie wurde eine Tandemmassenspektrometrie durchgeführt. Bei der ersten Massenspektrometrie wurde die molare Masse des Mutterions des untersuchten Stoffs gemessen. Diese beträgt bei Clenbuterol wie oben genannt 277, bzw. bei Clenbuterol D-9 286. Vor der zweiten Massenspektrometrie wurde das Molekül fragmentiert. Anschließend wurde der charakteristische Hauptübergang detektiert. Dieser ist beim untersuchten Stoff 203. Um in der untersuchten Probe das Clenbuterol noch sicherer zu erkennen wurde teilweise ein zusätzlicher Qualifier (hier bei 168) gesucht.

Um durch die Analyse eine Quantifizierung des Clenbuterolgehalts in den Haaren möglich zu machen, wurden neben den Proben auch jeweils eine Blankprobe mit internem Standard, sowie Kalibrierungsproben mit 50, 100, 500, 1000, 5000, 10.000fg/mg Clenbuterol auf eine Einwaage von 20mg, analysiert.

3.5.2 Urin

Die Urinproben wurden nach einem bereits bekannten Protokoll vorbereitet und verarbeitet. Es handelte sich dabei um ein hoch sensitives und reliables Instrument zur Clenbuterolquantifikation im niedrigen pg/ml-Bereich (Duddat et al. 2012, Thevis et al. 2005). Zu den Aliquoten des Urins (5ml) wurden 0,3ng D9-Clenbuterol und 50µl Kaliumhydroxid (5M, pH12,0) zugefügt. Die Flüssig/Flüssig-Extraktion wurde unter Verwendung von Tert-Butyl-Methyl-Ether durchgeführt. Nach Rütteln

(10min) und Zentrifugation (1250g, 5min) wurde die obere Etherschicht abgetragen. Zur Re-Extraktion wurden 400µl Salzsäure (0,06M) benutzt. Nach Rütteln und Zentrifugation (vgl oben) wurde die Etherschicht verworfen. Die verbleibenden Extrakte wurden durch Zugabe von 50µl Phosphatpuffer (0,8M, pH7) stabilisiert und in das LC-MS/MS-System eingespeist.

3.5.3 Blutplasma

Bei der Analyse der Blutseren wurde ein Aliquot von 1ml Serum durch einen Milliliter Milli-Q-Wasser (Reinstwasser) verdünnt. Dem folgte die Zugabe des internen Standards D9-Clenbuterol von 50pg (absolut). Durch Zugabe von 2ml KOH (0,5N) wurde der pH-Wert der Probe auf circa 9-10 gebracht. Zur Erhöhung der Extraktionskraft diente eine Spatelspitze Na₂SO₄. Es folgte die Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Methyl-*tert*-Butylether (3ml). Die Lösung wurde 15min im Überkopfschüttler belassen und anschließend 10min bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dabei trennten sich Ether- und wässrige Phase. Die Etherphase wurde abgetrennt und unter N₂-Strom bei 80°C eingedampft. Es folgte die Wiederaufnahme in den Analysen-/HPLC-Puffer (15µl Acetonitril, 30µl wässrige Pufferlösung). Abschließend wurden die Proben mittels HPLC-MS/MS-Technologie (AB Sciex 6500) gemessen.

3.6 Statistische Methoden

Die statistische Untersuchung der Daten fand mittels des Statistikprogramms SPSS von IBM statt.

Die deskriptiven Daten wurden mittels absoluter und relativer Häufigkeit, sowie Mittelwert, Median und Standardabweichung dargestellt. Weiterhin wurden Analysen der Mittelwertunterschiede (t-Tests), Varianzanalysen (ANOVA) und Zusammenhangsanalysen (Korrelationen) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Methodenvalidierung für die Haaranalyse

Zunächst erfolgte die Validierung der Messmethode (LC-MS-MS) um eine verlässliche Ergebnislage garantieren zu können. Dabei wurden Analysen von 10 verschiedenen Haar-Blankproben durchgeführt die zeigten, dass es keine störenden Matrix-Signale im Speicherungsereich von Clenbuterol (3,59+ 0,5min) gibt. Kalibrierungsproben zeigten eine lineare Korrelation ($y = 0,4051 x + 0,0048$, Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,9998$) zwischen 0,1pg/mg und 10pg/mg. Werte von 0,02pg/mg und 0,09pg/mg wurden jeweils als Nachweisgrenze (Limit of detection LOD) und der Bestimmungsgrenze (Limit of quantification LOQ) errechnet. Validierungsstandards (0,1; 1,0 und 10pg/mg) wurden genutzt um die Messgenauigkeit während eines Tages (Intra-Tages CV) sowie zwischen mehreren Tagen (Inter-Tages-Bias) festzulegen. Die folgenden Intra-Tages CVs und Inter-Tages-Bias wurden jeweils errechnet: 0,1pg/mg Clenbuterol: 9,3% und 6%, 1pg/mg Clenbuterol: 8,8% und -6,1%, 10pg/mg Clenbuterol: 5,3% und 0,4%.

4.2 Kontroll- und Applikationsstudien

4.2.1 Haar Clenbuterolkonzentrationen

In den Haarproben der Kontrollgruppe, sowie den Blankproben vor der Clenbuterolgabe bei der Applikationsgruppe 1 wurde kein Clenbuterol nachgewiesen. Die Clenbuterolkonzentrationen aller untersuchten Haarsegmente der Applikationsgruppen sind in Tabelle 2 (Applikationsstudien: Clenbuterolgehalt im Haar) nachzulesen.

Tabelle 2: Applikationsstudien: Clenbuterolgehalt im Haar

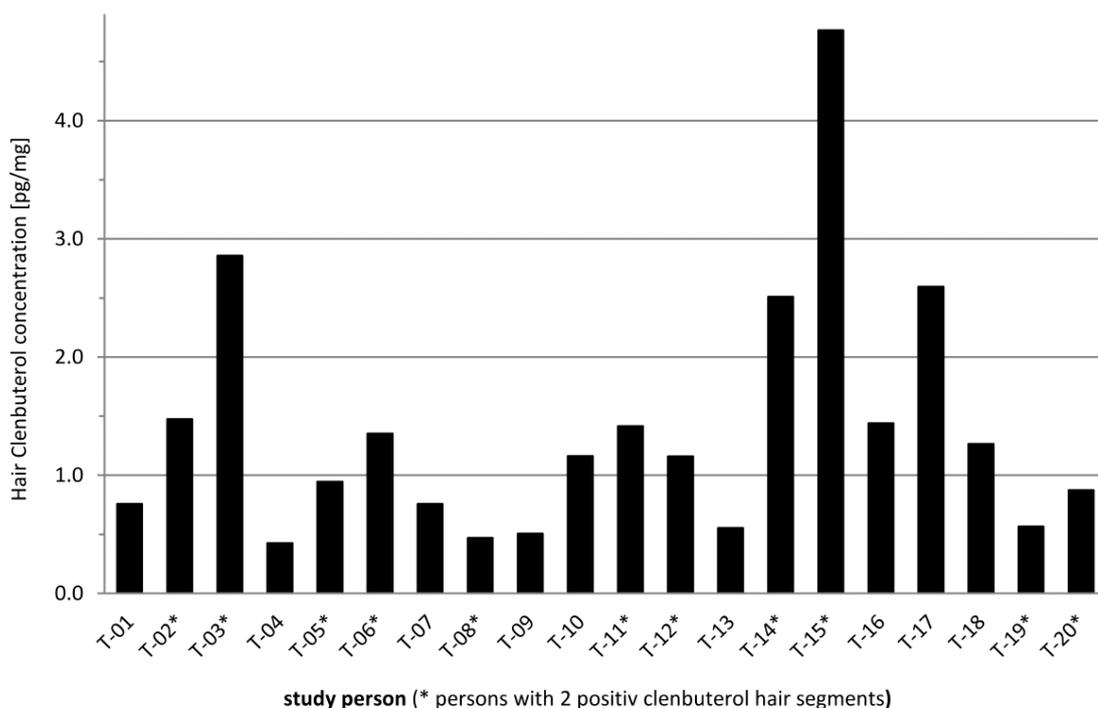
Studienperson	Segment	Segmentlänge (cm)	Clenbuterolgehalt Appl. Studie 1 (pg/mg)	Clenbuterolgehalt Appl. Studie. 2 (pg/mg)
T-01	1	0 -1cm	0,76	0,41
	2	1-2cm	0	0,07
	3	2-5cm	0	0,257
		Gesamt	0,24	0,19
T-02	1	0 -1cm	1,47	1,08
	2	1-2cm	0,13	0,03
	3	2-4,5cm	0	
		Gesamt	0,48	0,49
T-03	1	0 -1cm	2,86	
	2	1-2cm	0,18	
	3	2-5,5cm	0	
		Gesamt	1,01	
T-04	1	0 -1cm	0,43	
	2	1-2cm	0	
	3	2-7,5cm	0	
		Gesamt	0,11	

T-05	1	0 -1cm	0,95	0,73
	2	1-2cm	0,18	0,35
	3	2-3cm	0	0,34
		Gesamt	0,07	0,33
T-06	1	0 -1cm	1,35	1,15
	2	1-2cm	0,17	0,17
	3	2-4,5cm		0,84
		Gesamt	0,74	0,64
T-07	1	0 -1cm	0,76	
	2	1-2cm	0	
	3	2-5cm	0	
		Gesamt	0,34	
T-08	1	0 -1cm	0,47	
	2	1-2cm	0,18	
	3	2-3cm	0	
		Gesamt	0,19	
T-09	1	0 -1cm	0,51	
	2	1-2cm	0	
	3	2-3cm	0	
		Gesamt	0,15	
T-10	1	0 -1cm	1,16	1,89
	2	1-2cm	0	0,13
	3	2-7cm	0	0,11
		Gesamt	0,28	0,47
T-11	1	0 -1cm	1,42	0,6
	2	1-2cm	0,3	0,24
	3	2-4,5cm	0	0,77
		Gesamt		0,452
T-12	1	0 -1cm	1,16	0,64
	2	1-2cm	0,21	0,47
	3	2-3cm	0	0,71

		Gesamt	0,525	0,27
T-13	1	0 -1cm	0,56	0,47
	2	1-2cm	0	0,15
	3	2-5,5cm	0	0,11
		Gesamt	0,09	0,32
T-14	1	0 -1cm	2,51	
	2	1-2cm	0,13	
	3	2-5cm	0	
		Gesamt	0,5	
T-15	1	0 -1cm	4,76	2,84
	2	1-2cm	0,86	0,59
	3	2-5,5cm	0	2,5
		Gesamt	1,03	1,21
T16	1	0 -1cm	1,44	0,88
	2	1-3,5cm	0	0,45
		Gesamt	0,42	0,65
T-17	1	0 -1cm	2,6	
	2	1-2cm	0	
	3	2-5cm	0	
		Gesamt	0,92	
T-18	1	0 -1cm	1,27	
	2	1-3,5cm	0	
		Gesamt	0,54	
T-19	1	0 -1cm	0,57	
	2	1-2cm	0,24	
	3	2-9,5cm	0	
		Gesamt		
T-20	1	0 -1cm	0,88	0,6
	2	1-2cm	0,27	0,29
	3	2-3cm	0	0,56
		Gesamt	0,25	0,44

Die höchsten Clenbuterolkonzentrationen in der Applikationsgruppe 1 wurden jeweils im proximalen Haarsegment (0-1cm) gefunden, dieses entspricht zeitlich dem ersten Monat nach der Applikation. Die gemessenen Konzentrationen in diesem Segment reichten von 0,43 bis 4,76pg/mg (Median= 1,16pg/mg, Mittelwert: 1,39pg/mg). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Clenbuterolkonzentrationen der proximalen Haarsegmente einen Monat nach Studienbeginn in Abbildung 6 (Clenbuterolkonzentration im proximalen Haarsegment, Applikationsgruppe 1) dargestellt. Bei 11 der 20 ProbandInnen wurde auch im zweiten, weiter distal liegenden Haarsegment eine geringe Menge Clenbuterol gefunden. Auch diese sind in Abbildung 6 markiert.

Abbildung 6: Clenbuterolkonzentration im proximalen Haarsegment, Applikationsgruppe 1 (Krumbholz et al. 2014)



In allen untersuchten Haarsegmenten der Applikationsgruppe 2 wurde Clenbuterol gefunden. Die proximale Haarsträhne, welche dem Zeitraum der zweiten

Applikationsstudie entspricht, zeigte Clenbuterolwerte von 0,877pg/mg bis 2,843pg/mg (Mittelwert = 1,027pg/mg). Im dritten Haarsegment, sofern dieses von der Haarlänge her noch gemessen werden konnte, wurden Werte zwischen 0,110pg/mg und 2,50pg/mg gemessen (Mittelwert= 0,689pg/mg). Dieses Haarsegment entspricht dem Zeitraum der ersten Applikation drei Monate zuvor.

Ein t-Test für unabhängige Stichproben zur Überprüfung des Einflusses von Geschlecht auf die Clenbuterolkonzentration im Haar zeigte keine bedeutsamen Unterschiede zwischen Männern und Frauen ($t(1,16) = 1,82$, $p = 0,087$). Das Gleiche trifft auf den Einfluss der Körpergröße sowie des Gewichts ($F(1,16) = 0,608$, $p = 0,782$) sowie das Alter ($F(1,7) = 0,877$, $p = 0,556$) der ProbandInnen zu.

In der aktuellen Studie konnten die Unterschiede zwischen ProbandInnen mit verschiedenen Haarfarben, wie sie in vorangegangenen Studien (Schlupp et al. 2004, Jia et al. 2013, Gleixner et al. 2011 und Vulic et al. 2011) gefunden wurden, nicht repliziert werden: in keinem der Haarsegmente beider Applikationsgruppen konnte ein bedeutsamer Unterschied in Hinsicht auf die Konzentration des Clenbuterol zwischen ProbandInnen mit braunem beziehungsweise dunkelbraunem Haar gefunden werden (alle $p > 0,141$).

In einer weiterführende Korrelationsanalyse zeigte sich, dass ein starker Zusammenhang zwischen der Konzentration im proximalen Haarsegment bei der ersten Applikation von Clenbuterol (Applikationsgruppe 1) und der Konzentration im ersten Haarsegment bei der zweiten Applikation (Applikationsgruppe 2) besteht ($r = 0,861$, $p = 0,001$).

4.2.2 Serum Clenbuterolkonzentrationen

Blutserum wurde nur den TeilnehmerInnen der Applikationsstudie 1 abgenommen. Die gemessenen Konzentrationen von Clenbuterol im Serum wurden in Tabelle 3

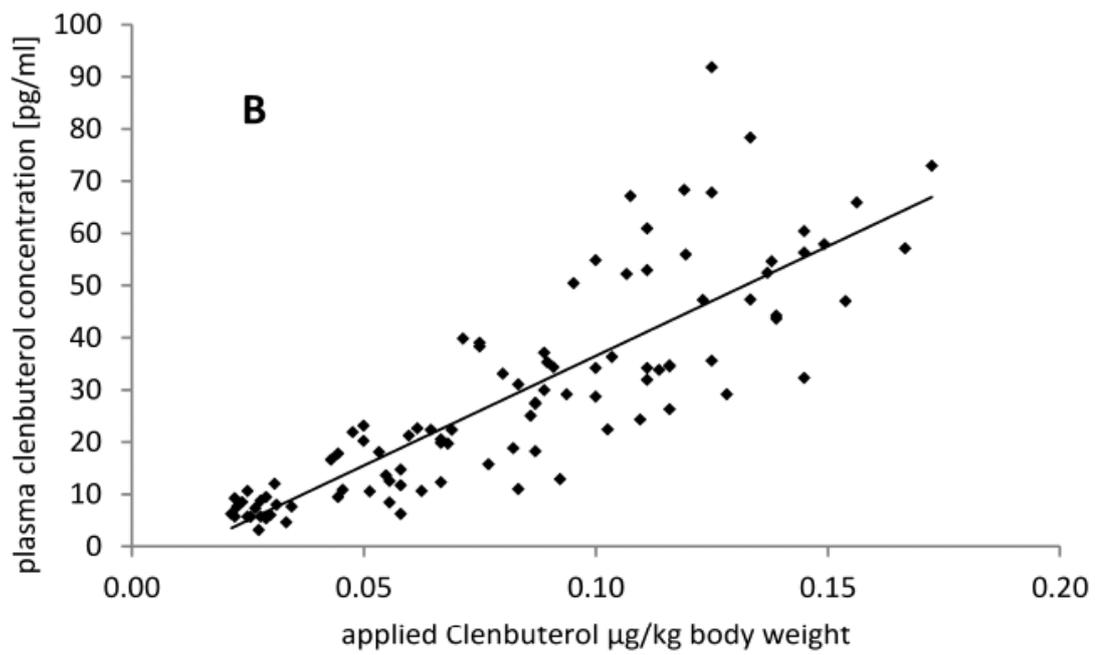
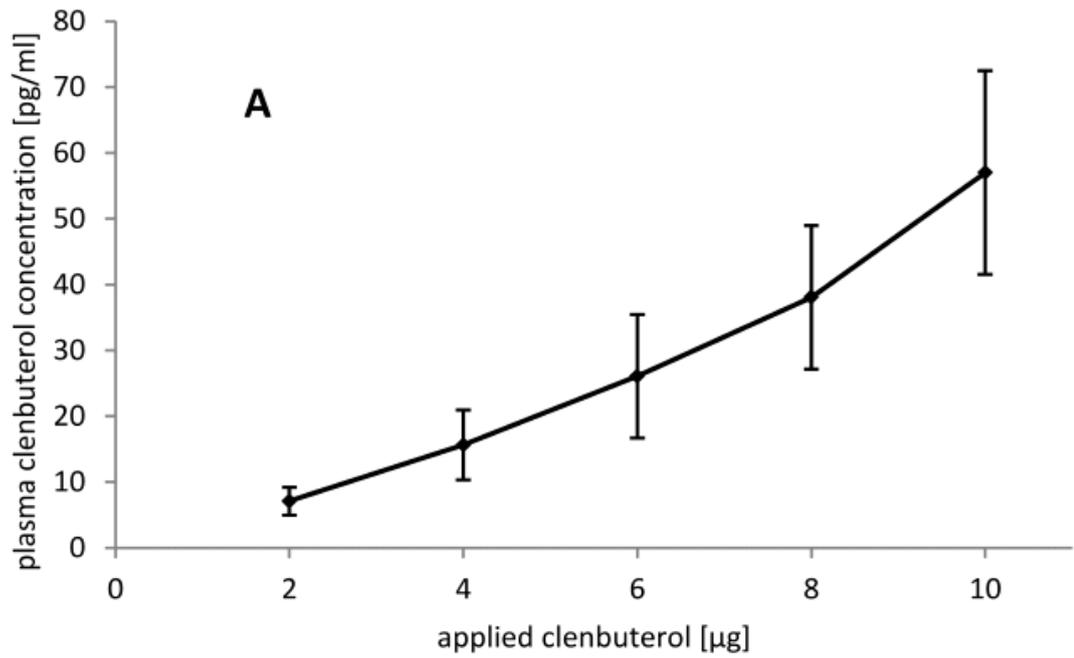
(Clenbuterolkonzentrationen im Serum) dargestellt. Auch im Serum ließen sich bei der Probe vor Applikation bei keinem der ProbandInnen Clenbuterol feststellen. Die gemessenen Serumkonzentrationen korrelierten mit der applizierten Clenbuteroldosis (Pearson: $r = 0,862$, $p = 0,01$). Je höher die applizierte Clenbuterolmenge, desto höher die Serumkonzentration und deren Streuung (Abbildung 7: Clenbuterolkonzentrationen im Serum). Die durchschnittlichen Konzentrationen unterscheiden sich je nach verabreichter Dosis signifikant voneinander (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,005$). Einen Monat nach der ersten Applikation wurde bei keinem der ProbandInnen mehr Clenbuterol im Serum nachgewiesen.

Eine Korrelationsanalyse legt nahe, dass die Konzentration von Clenbuterol im Serum nicht direkt mit der nachweisbaren Konzentration in den Haarproben zusammenhängt (alle $p > 0,28$).

Tabelle 3: Clenbuterolkonzentrationen im Serum

Probe	Mittlere Konzentration (pg/ml)	SD (pg/ml)	Median (pg/ml)	Min. (pg/ml)	Max. (pg/ml)
1 (nach 2µg Applikation)	7,1	2,1	6,8	3,1	12
2 (nach 4µg Applikation)	15,6	5	15,7	6,2	23,1
3 (nach 6µg Applikation)	26,1	9,4	27,4	11	39,8
4 (nach 8µg Applikation)	38,1	10,9	34,6	22,4	55,9
5 (nach 10µg Applikation)	57	15,5	57,5	29,1	91,8
6 (1Monat nach Applikation)	0	0	0	0	0

Abbildung 7: Clenbuterolkonzentrationen im Serum (Krumbholz et al. 2014)



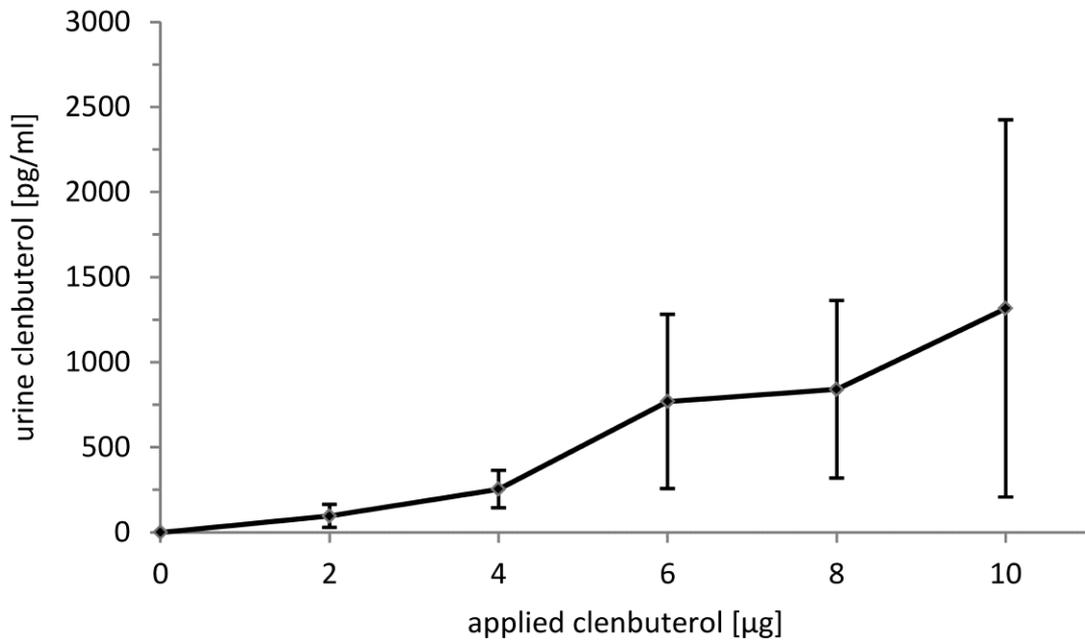
4.2.3 Urin Clenbuterolkonzentrationen

Die gemessenen Clenbuterolkonzentrationen im Urin der Applikationsgruppe 1 wurden in Tabelle 4 (Clenbuterolkonzentrationen im Urin Applikationsstudie 1) dargestellt. Die gemessenen Werte im Urin korrelieren ebenfalls mit der applizierten Clenbuterolmenge (Pearson: $r=0,632$, $p=0,01$) (Abbildung 8: Clenbuterolkonzentration im Urin Applikationsstudie1). Die durchschnittlich gemessenen Konzentrationen unterscheiden sich signifikant zwischen den Proben 0 und 1, 1 und 2, 2 und 3 (Mann-Whitney-U-Test, $p<0,001$), jedoch nicht zwischen den Proben 3 und 4 ($p=0,613$) und den Proben 4 und 5 ($p=0,191$). In den Urinproben einen Monat nach Applikation wurde kein Clenbuterol mehr gefunden.

Tabelle 4: Clenbuterolkonzentrationen im Urin (Applikationsstudie 1) (Krumbholz et al. 2014)

Probe	Mittlere Konzentration (pg/ml)	SD (pg/ml)	Median (pg/ml)	Min. (pg/ml)	Max. (pg/ml)
0 (vor 1. Applikation)	0	0	0	0	0
1 (nach 2µg Applikation)	96	68	94	0	262
2 (nach 4µg Applikation)	254	110	227	86	524
3 (nach 6µg Applikation)	769	512	701	136	2280
4 (nach 8µg Applikation)	840	522	851	117	2160
5 (nach 10µg Applikation)	1316	1109	1070	148	4530
6 (1Monat nach Applikation)	0	0	0	0	0

Abbildung 8: Clenbuterolkonzentration im Urin Applikationsstudie 1 (Krumbholz et al 2014)

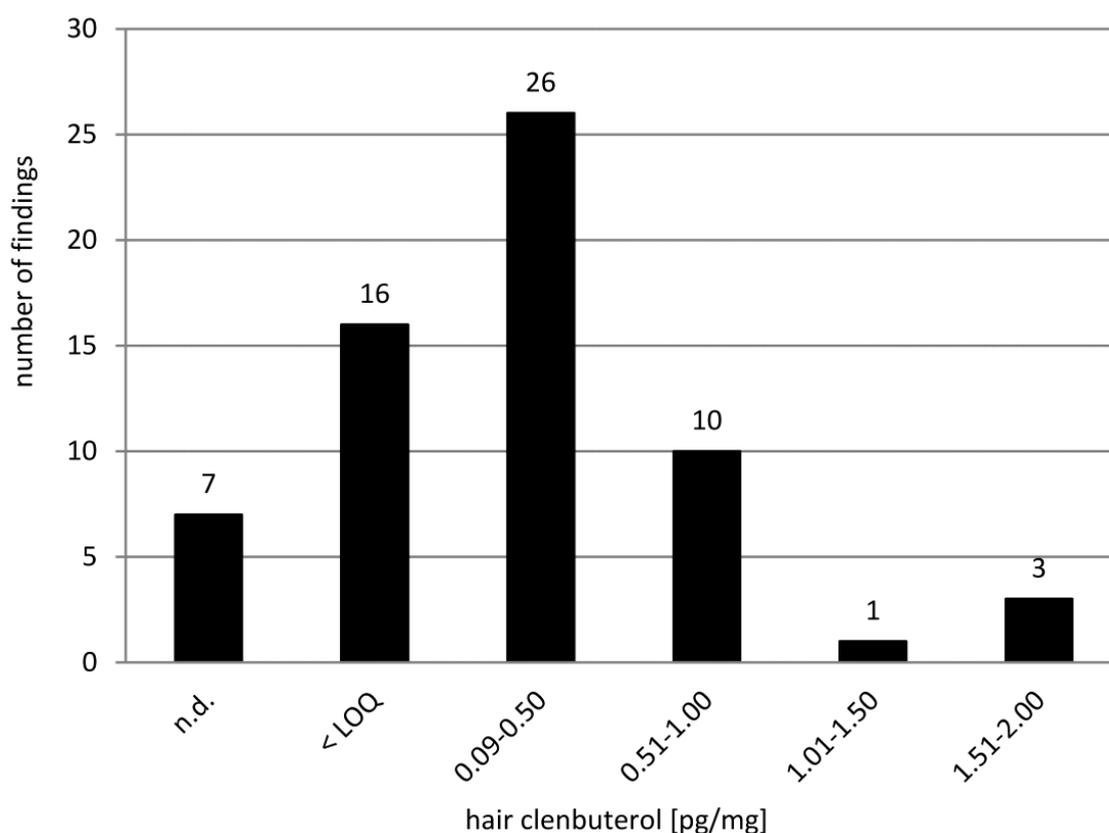


4.3 Hochrisikostudie

4.3.1 Haar-Clenbuterolkonzentrationen

Bei der Stichprobe der Sportler aus Mexiko waren nur sieben Haarproben vorhanden, bei welchen kein Clenbuterol nachgewiesen wurde. Bei 56 Proben (88.9%) wurde Clenbuterol in einer Konzentration zwischen 0.02 bis 1.90pg/mg gefunden. 16 Proben wiesen eine Konzentration zwischen dem LOD und dem LOQ auf (Abbildung 9: Quantitative Verteilung der Clenbuterolkonzentration im Haar, Hochrisiko-Gruppe).

Abbildung 9: Quantitative Verteilung der Clenbuterolkonzentration im Haar, Hochrisiko-Gruppe, n.d. - nicht gefunden, <LOD = 0,02pg/mg (Krumholz et al. 2014)



Bei der Höhe der Clenbuterolkonzentration spielte weder die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Fußballteams (Mann-Whitney-U-Test: $p > 0,05$) eine Rolle, noch konnte mittels Korrelationsanalysen ein Zusammenhang mit dem Wohnort, dem Alter oder der Teamzugehörigkeit festgestellt werden (Krumholz et al. 2014).

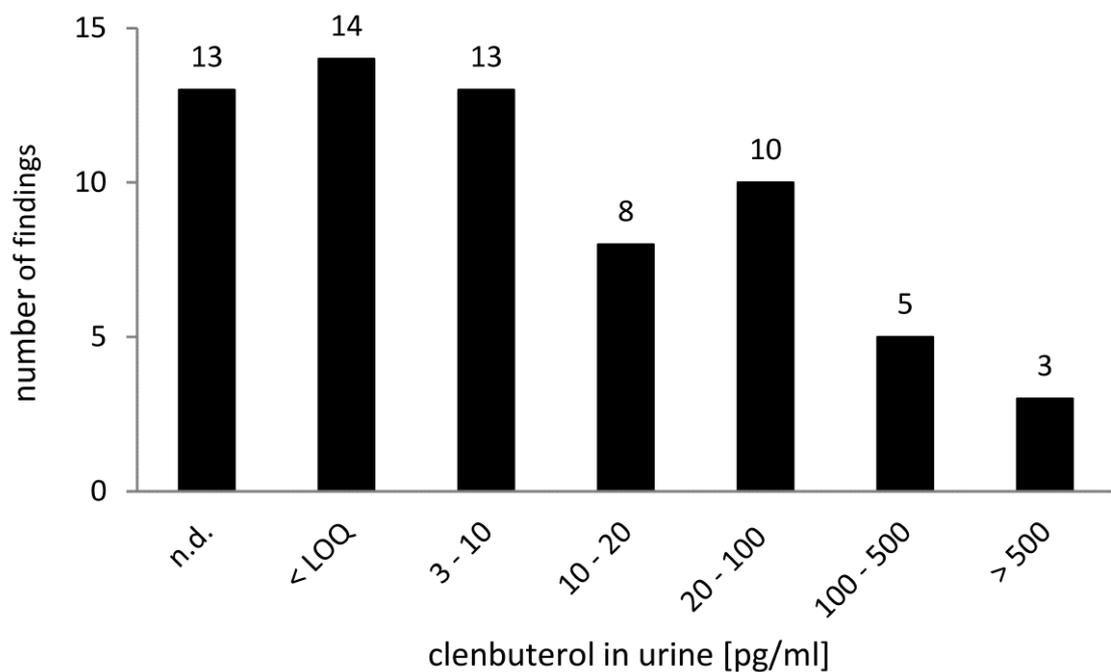
Aufgrund der hohen Clenbuterol-Konzentration wurden die Haarproben von drei Versuchspersonen einer erneuten Analyse unterzogen. Hierbei wurden Haarsträhnen in Segmente von jeweils 1 cm Länge unterteilt um die zeitliche Abfolge der Clenbuterol-Einlagerung zu überprüfen. Dies entspricht in etwa einer monatlichen Taktung vor dem Erhebungszeitraum. Für zwei der Proben wurde ein

relativ konstanter Clenbuterol-Wert über alle Segmente hinweg festgestellt. Bei diesen Probanden lag die Konzentration durchschnittlich bei 2.1pg/mg. In der dritten Probe jedoch war ein deutlicher Anstieg der Clenbuterol-Konzentration im zweiten Haarsegment zu vermerken (Krumbholz et al. 2014).

4.3.2 Urin-Clenbuterolkonzentrationen

Clenbuterol wurde bei 80,3% der Urinproben der 66 freiwilligen Probanden festgestellt. Die Clenbuterolkonzentration schwankte dabei zwischen 1,0pg/ml und 2541,3pg/ml. Acht der getesteten Probanden wiesen kritische Urinkonzentrationen (> 50% des MRPL = 0,2ng/ml) auf (MRPL =Minimum Required Performance Level – Konzentration, die von jedem Labor detektierbar ist) auf. Dabei gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Urinkonzentration von Clenbuterol je nach Ligazugehörigkeit (Mann-Whitney-U-Test; U20 vs. U17: P=0,798; U17 vs. Amateure: P= 0,248; U20 vs. Amateure: P= 0,283). Abbildung 10 (Quantitative Verteilung der Clenbuterolkonzentrationen im Urin, Hochrisiko-Gruppe) zeigt eine Zusammenfassung der gemessenen Clenbuterolkonzentrationen im Urin.

Abbildung 10: Quantitative Verteilung der Clenbuterolkonzentrationen im Urin, Hochrisiko-Gruppe, n.a - nicht gefunden, <LOD = 1pg/ml, LOQ = 3pg/ml (Krumbholz et al. 2014)



Die gemessenen Mittelwerte der einzelnen Teams zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Mittelwerten der Applikationsstudie 1 (Mann-Whitney-U-Test $P < 0,01$). Die Urin-Clenbuterolkonzentrationen von 20 der Probanden aus der Hochrisikogruppe befanden sich im selben Bereich wie die Ergebnisse nach der Applikation von Clenbuterol in der Applikationsgruppe 1.

5. Diskussion

5.1 Case report

Während der letzten Jahre (2010 bis 2014) wurden insgesamt 10 Haarproben von Athleten (Tischtennis, Fußball und Radsport) bei IDAS analysiert. Diese Fälle wurden untersucht, nachdem im Zuge von Dopingkontrollen bei den Athleten niedrige Dosen von Clenbuterol im Urin gefunden wurden. Bei einem der Athleten, einem männlichen Radfahrer (Haarfarbe: dunkelbraun) wurde ein AAF (adverse analytical finding) festgestellt, nachdem dieser aus Mexiko zurück kam (Clenbuterol 80pg/ml). Er war im November 2013 in Mexiko gewesen. Die Haarprobe wurde im Januar entnommen. Die Haarprobe wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und wie oben beschrieben analysiert. Um retrospektive Daten zu bekommen wurde die Haarsträhne in 2cm lange Segmente geteilt. Das proximale Ende (0-2cm, gemessen von der Schnittstelle) entspricht der Wachstumsphase zwischen November 2013 und Januar 2014, das distale Ende repräsentiert die Zeit vor dem Mexikoaufenthalt (September bis November 2013). Im proximalen Haarsegment wurde Clenbuterol in einer Konzentration von 0,08pg/mg gefunden. Das distale Haarsegment (2-4cm) war clenbuterolfrei. Weiterhin wurde auch kein Clenbuterol in der Waschlösung der Haarsträhnen nachgewiesen (Krumbholz et al 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Kontamination mit Clenbuterol durch Rückstände im verzehrten Fleisch möglich ist und diese das AAF nach dem Mexikobesuch erklären können. Prinzipiell ist Kontamination durch Fleischkonsum, vor allem in Hochrisikoländern durchaus möglich.

5.2 Clenbuterolrückstände in Haarproben

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sensitive Methode entwickelt um auch kleinste Rückstände von Clenbuterol in Haarproben mittels LC-MS/MS nachzuweisen. Dieser wissenschaftliche Fortschritt ermöglicht eine Differenzierung zwischen missbräuchlicher Clenbuterolanwendung zur Leistungssteigerung und einer unbewussten Aufnahme durch kontaminiertes Fleisch. Dies ermöglicht eine bessere Aufklärung von AAFs (Adverse Analytical Findings). In der Vergangenheit begründeten Sportler den Clenbuterolfund jeweils durch einen Aufenthalt im Ausland (vor allem Mexiko und China).

In der Kontrollgruppe mit niedrigem Kontaminationsrisiko wurde kein Clenbuterol im Haar gefunden, ebenso in den Blankproben der Applikationsgruppe 1, welche vor Studienbeginn entnommen wurden. Dies zeigt, dass in so genannten Niedrigrisikoländern (wie im vorliegenden Fall in Deutschland), in denen die Maststeigerung mit Clenbuterol verboten ist, keine Verunreinigung zu erwarten ist. In Europa ist die Maststeigerung mit Clenbuterol seit 1985 verboten (Richtlinie 96/22/EG des Europäischen Parlaments und Rates 2003). Da auch der Fleischkonsum der ProbandInnen erfasst wurde und alle ProbandInnen regelmäßig Fleisch essen, ist der negative Befund nicht durch den fehlenden Fleischkonsum zu erklären.

Clenbuterol wurde jedoch in den Haaren der Applikationsgruppen nach subtherapeutischer Dosis und in den Haarproben von Probanden aus Hochrisikoländern (Einwohner und Reisende) gefunden. Dies zeigt, dass bereits niedrige Dosen zu positiven Funden führen und auch der Beweis von Kontamination im Haar durch die hochsensitive Nachweismethode möglich ist.

In der vorliegenden Studie wurde als Hochrisikoland Mexiko ausgewählt, da hier laut einer Studie von Thevis et al. (2013) circa 30% des zum menschlichen Verzehr freigegebenen Fleisches verschiedener Tierarten mit Clenbuterol versetzt sind. In einer Studie von Pöttgen (2012) wird der Anteil der Clenbuterol behandelten Masttiere in Mexiko mit 18% angegeben. Deshalb ist von einer hohen Kontaminationswahrscheinlichkeit auszugehen, welche sich in der Hochrisikostudie auch bestätigte. So ließ sich bei 89% der Probanden Clenbuterol im Haar nachweisen. Im Fall der untersuchten Fußballspieler variierten die gemessenen Clenbuterolkonzentrationen zwischen 0,02 und 1,88pg/mg (Median: 0,16pg/mg). Im Hauptanteil der Haarproben (n=42) wurden Clenbuterolkonzentrationen zwischen 0,02 und 0,5pg/mg gemessen, in nur vier Proben Werte über 1pg/mg. Unter Einbeziehung der Tatsache, dass bei den Proben der mexikanischen Fußballspieler jeweils die gesamte Haarprobe (in ihrer gesamten Länge) analysiert wurde, ist eine Verdünnung mit Clenbuterol freien Haaranteilen möglich. Dies wäre jedoch nur relevant wenn keine kontinuierliche Aufnahme stattgefunden hätte.

Um den Zeitverlauf der Clenbuterolexposition zu prüfen, wurden drei der Proben segmentiert und nochmals einzeln analysiert. Jedes 1cm- lange Segment repräsentiert einen Monat Wachstum. Zwei der drei Haarsträhnen zeigten nahezu unveränderte Clenbuterolkonzentrationen über alle Segmente, was wiederum auf eine permanente und kontinuierliche Aufnahme durch Kontamination mit geringen Mengen Clenbuterol hinweist. In der dritten Haarsträhne jedoch wurde ein erheblicher Clenbuterolpeak gemessen. Im zweiten Haarsegment (1-2cm) wurde die vierfache Clenbuterolkonzentration wie in den angrenzenden Segmenten gemessen. Ursachen dafür könnten eine bestimmte Diät während des entsprechenden Monats, oder auch eine einmalige therapeutische Gabe von Clenbuterol sein. Dies sollte in folgenden Studien immer miterfasst werden um Konzentrationsschwankungen besser beurteilen zu können.

Kritisch zu sehen ist, dass in der Hochrisikogruppe lediglich Fußballspieler untersucht wurden, sie stellen unter Umständen keine repräsentative Gruppe für ein Hochrisikoland dar. Eine möglicherweise bewusste Leistungssteigerung durch Clenbuterol ist durchaus vorstellbar. Zu weiteren Forschungszwecken sollte eventuell nochmals eine weitere ProbandInnengruppe untersucht werden, die nicht sportlich aktiv ist. Weiterhin wäre eine Untersuchung von EinwohnerInnen aus Hochrisikoländern interessant, die auf Fleisch verzichten. Der Fleischkonsum der Probanden der Hochrisikogruppe wurde in der aktuellen Studie leider nicht erfasst. Interessant wäre, ob es sich bei den verbleibenden 11% der Probanden, bei denen kein Clenbuterol gefunden wurde, eventuell um Vegetarier handelt.

Falls einige der Clenbuterolfunde nicht ausschließlich durch Kontamination zu erklären sind, sondern durch Doping verursacht sind, wäre eine Aufspaltung der Werte zwischen den Probanden der drei verschiedenen untersuchten Fussballteams zu erwarten. Jedoch weist der fehlende Unterschied in der Höhe der Clenbuterolwerte im Haar zwischen den Probanden der verschiedenen Teams eher auf eine reine Kontamination durch Clenbuterol hin und nicht auf Doping.

Die Applikationsstudien zeigen, dass bereits subtherapeutische Dosen von Clenbuterol zu positiven Funden in Haarproben führen. Die applizierte Menge von insgesamt 30µg entspricht weniger als einer therapeutischen Tagesdosis (2 x 20µg) pro Monat (Karow und Lang-Roth 2012). Trotzdem wurden Clenbuterolkonzentrationen zwischen 0,43 und 4,76pg/mg in den proximalen Haarsegmenten der Applikationsgruppe 1, einen Monat nach Applikation gemessen. Dabei wurde von einem mittleren Haarwachstum von menschlichem Kopfhaar von einem Zentimeter pro Monat ausgegangen. In 11 der Proben wurde eine Ausweitung des positiven Segments auf das zweite Haarsegment (1-2cm) beobachtet. Die Clenbuterolkonzentration im zweiten Haarsegment (1-2cm) war niedriger als die der proximalen Haarsträhne. Dies lässt sich durch individuelle Schwankungen im Wachstumszyklus des Haares erklären, zeigt aber eine eventuelle

Ausweitung des Clenbuterols auf mehr als ein Haarsegment und die damit verbundene Schwierigkeit, einen bestimmten Fund einem genauen Aufnahmezeitpunkt zuzuordnen. Trotzdem lässt sich eine annähernde Zuordnung unter der Annahme von ca. 1 cm Haarwachstum pro Monat treffen.

Die Untersuchung einer zweiten Applikation von wiederum 30µg bei einem Teil der ProbandInnen aus Applikationsgruppe 1 simulierte eine häufigere Clenbuterolbelastung. Dabei wurde Clenbuterol in allen untersuchten Haarsegmenten gefunden. Die gemessenen Clenbuterolwerte in den proximalen Haarsträhnen befanden sich zwischen 0,877 und 2,843pg/mg (Mittelwert: 1,027pg/mg). Damit unterscheiden sich die proximalen Haarsegmente der beiden Applikationsgruppen nicht signifikant voneinander und sind vor allem nicht höher nach der zweiten Applikation. Dies wiederum legt nahe, dass es auch bei mehrmaliger Applikation nicht zur Verteilung des Clenbuterols auf alle Haaranteile kommt und sich die Werte bei mehrmaliger Applikation nicht summieren. Clenbuterol wird lediglich zum Zeitpunkt der Aufnahme in das zu diesem Zeitpunkt gerade neu wachsende Haar inkorporiert.

Zur Klärung der interindividuellen Schwankungen in den gemessenen Werten kann die durchgeführte Korrelationsanalyse beitragen. Es besteht eine positive Korrelation zwischen den gemessenen Werten der proximalen Haarsträhnen bei mehreren Applikationen (TeilnehmerInnen beider Applikationsstudien 1 und 2). Das bedeutet, ein/e ProbandIn mit hohen Werten nach der ersten Applikation hat auch (im Vergleich zu seinen/ihren MitProbandInnen) hohe Werte in der zweiten Applikation. Man könnte dadurch auf eine individuelle Neigung zu hohen, bzw. niedrigen Clenbuterolwerten schließen. Keines der erfassten Merkmale der ProbandInnen hing jedoch mit dieser Eigenschaft zusammen (Geschlecht, Größe, Gewicht). In der vorliegenden Studie ließ sich auch der Einfluss von Haarfarbe auf Clenbuterolinkorporation nicht nachweisen. Dies lässt sich jedoch mit der Auswahl der ProbandInnen erklären, welche alle dunkle Haare hatten und deren

Melaningehalt sich wohl nicht relevant voneinander unterschied. Es scheint also prinzipiell Menschen zu geben, die Clenbuterol in höheren Dosen einlagern als andere. Wovon dies, außer von der Haarfarbe, abhängt sollten weitere Studien klären, bzw. sollten weitere Follow-up-Messungen bei den ProbandInnen durchgeführt werden.

Zum momentanen Zeitpunkt ist es nicht möglich von der gemessenen Clenbuterolkonzentration im Haar auf die aufgenommene Menge rückzuschließen, da dies durch zu viele Variablen beeinflusst wird, deren genauer quantitativer Beitrag zum gemessenen Clenbuterolwert noch nicht genau bekannt ist. Die Entwicklung einer solchen Formel wäre zwar sehr sinnvoll, die Realisierbarkeit ist jedoch fraglich.

Bei der Applikationsgruppe 2 wurde das jeweils dritte Haarsegment untersucht, da dies dem Haarabschnitt zum Zeitpunkt der ersten Applikation entspricht. Es zeigten sich Clenbuterolwerte zwischen 0,11 und 2,50pg/mg (Mittelwert: 0,689pg/mg). Damit unterscheiden sich die Werte des proximalen Haarsegments der Applikationsgruppe 1 und dem dritten Segment der Applikationsgruppe 2 nicht signifikant voneinander. Dies zeigt, dass es zu keiner Auswaschung des Clenbuterols über die Zeit kommt. Jedoch wäre es sinnvoll nach einigen Monaten nochmals das entsprechende Segment zu messen um den Verlauf des Clenbuterolwerts in einem Haarsegment zu beobachten.

Aufgrund der lipophilen und basischen Eigenschaften ist Clenbuterol ein sehr geeigneter Stoff um die Inkorporation in Haar durch Melaninbindung zu untersuchen. Die vorliegende Untersuchung zeigt welche geringen Mengen von Clenbuterol bereits in Haaren nachweisbar sind. Diese Erkenntnis wiederum legt die Vermutung nahe, dass Clenbuteroldosen in der Größenordnung wie bei den beiden Applikationsstudien auch durch Kontamination zustande kommen können. Um einen Vergleich mit der mexikanischen Kohorte zu ermöglichen, wurden für die

Applikationsstudie lediglich ProbandInnen mit braunen, dunkelbraunen und schwarzen Haaren ausgewählt.

Ein Vergleich beider Studien zeigt, dass die Clenbuterolkonzentrationen in Haaren durch subtherapeutische Applikation durchaus mit denen durch vermeintliche Kontamination vergleichbar sind. Die Segmentanalyse der drei Haarsträhnen von mexikanischen Fußballspielern zeigt vergleichbare Werte in jedem Haarsegment (je 1cm) dieser Studie wie das proximale Haarsegment in der Applikationsstudie 1, einen Monat nach Studienbeginn. Nachdem 89% der getesteten mexikanischen Fußballspieler positiv auf Clenbuterol im Haar getestet wurden und die Aufnahme solcher subtherapeutischen Dosen nicht zu Leistungssteigerung führt, ist eine Kontamination durch Clenbuterol-versetztes Fleisch die wahrscheinlichste Erklärung für die vorliegenden Befunde. In der Literatur werden für Clenbuterolmissbrauch Konzentrationen zwischen 15 und 122pg/mg in den Haaren angegeben (Dumestre-Toulet et al. 2002). Dies stimmt mit den Werten überein, die bei Routinedopingkontrollen gefunden wurden (IDAS, nicht veröffentlichte Daten). In den Jahren 2013 und 2014 wurde von Polizei, Staatsanwaltschaft und Zoll 40 Proben zur Untersuchung beauftragt. Dabei wurde in fünf Fällen Clenbuterol in Konzentrationen zwischen 10 und 90pg/mg gefunden.

Diese Resultate zeigen die Notwendigkeit eines Grenzwertes für Clenbuterolfunde in Haaren. Dadurch wäre eine Unterscheidung zwischen Missbrauch und Kontamination mit Clenbuterol möglich. Eine sinnvolle Größe für diesen Schwellenwert wären 5pg/mg. Alle Funde unter diesem Wert sind durch eine mögliche Kontamination zu erklären. Eine Segmentanalyse der Haarsträhnen würde außerdem weitere Informationen zur Klärung eines Dopingverdachts liefern. Zum Beispiel über den zeitlichen Ablauf der Geschehnisse, Wettkämpfe und Aufenthalte in Hochrisikoländern.

Es besteht weiterhin Forschungsbedarf und der vorgeschlagene Grenzwert von 5pg/mg in Haarproben sollte anhand von echten Dopingproben überprüft werden.

5.3 Clenbuterolrückstände in Urin und Serum

In der vorliegenden Studie wurde Clenbuterol auch in Urin und Serum gemessen. Bei den TeilnehmerInnen der Kontrollgruppe und den Blankproben der Applikationsgruppen wurde kein Clenbuterol gemessen. Dies schließt eine kurz vorausgehende Aufnahme aus. Bei den ProbandInnen der Applikationsstudien wurden in beiden Proben erhöhte Clenbuterolkonzentrationen festgestellt. Dabei stieg der Clenbuterolgehalt sowohl im Urin als auch im Serum mit steigender Applikationsmenge an.

Durch große interindividuelle Schwankungen der Nierenfunktion und anderer physiologischer Vorgänge ist es nicht möglich von der gemessenen Clenbuterolkonzentration im Urin auf die applizierte Menge rückzuschließen. Die Clenbuterol-Urinkonzentrationen in der Hochrisiko-Gruppe zeigten Werte zwischen 1 und 2540pg/ml und befinden sich damit im selben Bereich wie vorherige Studienergebnisse (Thevis et al. 2013, Gaillard et al. 1997). Bei 20 der 66 Proben wurden sogar Werte im Bereich der subtherapeutischen Applikationsstudie gemessen (17-4530pg/ml). Dies zeigt, dass es nicht möglich ist, aufgrund der Urin-Clenbuterolkonzentration auf die applizierte Menge rückzuschließen und zwischen subtherapeutischer Anwendung und Kontamination zu differenzieren.

In den Blutserumproben der Applikationsgruppe 1 konnte eine Korrelation der Applikationsdosis und der gemessenen Clenbuterolkonzentration festgestellt werden. Allerdings zeigten die Werte eine große Streubreite. Deshalb ist das

Untersuchungsmaterial Blutserum nicht geeignet, um von der gemessenen Konzentration auf eine applizierte Dosis rückzuschließen.

Die im Serum gemessenen Clenbuterolkonzentrationen befinden sich zwischen 3,1 und 91,8pg/ml. Folglich sind die Konzentrationen im Serum nach subtherapeutischen Dosen (30µg über 5 aufeinanderfolgende Tage) im drei bis sechsfach niedrigeren Bereich, als sie bei einer therapeutischen Anwendung von Clenbuterol zu erwarten sind (300-600pg/ml)(Schulz et al. 2011).

Die Aussagekraft von Urin und Blutserum über die Aufnahme von Clenbuterol sind nur sehr kurze Zeit möglich. Eine Aussage über länger zurückliegende Aufnahme ist nicht möglich.

6. Literaturverzeichnis

Anabolika (2013): Clenbuterol Hydrochlorid, (online)
<http://www.anabolika.de/spiopent-clenbuterol-hydrochlorid.html> (23.09.2013).

AWMF (2011): Nationale Versorgungsleitlinie Asthma, (online)
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-002k_S3_Asthma_kurz_2011-07.pdf (12.08.2013).

Bährle-Rapp, M. (2012): *Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin*, S.246.

Baumgartner, W. und Hill, V. (1989): Hair analysis for drugs of abuse, in: *Journal of Forensic Sciences*, Nr.34, S.1433-1453.

Boehringer Ingelheim (2011): Fachinformation Spiropent®-Tropfen, PharmaWiki (2013): Clenbuterol, (online)
<http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=clenbuterol> (02.07.2013).

Dumestre-Toulet, V., Cirimele, V., Ludes, B., Gromb, S., Kintz, P.(2002): Hair analysis of seven bodybuilders for anabolic steroids, ephedrine, and clenbuterol., in: *Journal of Forensic Sciences*, Nr.47, S.211.

Forshufvud, S., Smith, H. und Wassen, A. (1961): Arsenic content of Napoleons I`s hair probably taken immediately after his death, in: *Nature*, Nr.192, S.103.

Frater, H., Podbregar, N. und Lohmann, D. (2008): Spitzensport als Spritzensport, in: *WISSEN HOCH 12, Erkenntnisse und Themen die uns bewegen 2007/2008*, Berlin: Springer, S.206-212.

Gaillard, Y., Balland, A., Doucet, F., Pepin, G. (1997): Detection of illegal clenbuterol use in calves using hair analysis. Application in meat quality control., in: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, Nr.703, S.85.

Gleixner, A., Sauerwein, H., Meyer, H. (2011): Detection of the anabolic beta 2-adrenoceptor agonist clenbuterol in human scalp hair by HPLC/EIA., in: *Clin Chem.*, Nr.42, S.1869.

Goldstein, D., Dobbs, T., Krull B. und Plumb V. (1998): Clenbuterol and anabolic steroids: a previously unreported cause of myocardial infarction with normal coronary arteriograms., in: *Southern Medical Journal*, Nr.91, S.780.

Guddat, S., Fusholler, G., Geyer, H., Thomas, A., Braun, H., Haenelt, N., Schwenke, A., Klose, C., Thevis, M. und Schanzer, W. (2012): Clenbuterol- regional food contamination as possible source for inadvertent doping in sports, in: *Drug Test Anal*, Nr.4, S.534.

Grupe, O., Haas, U., Kamber, M., Kindermann, W., Kley, H., Müller, D. Schänzer, W. und Löllgen, H. (2010): *Doping und seine Wirkstoffe, Verbotene Arzneimittel im Sport*, Dirk Clasing (Hrsg.), 2.Auflage, Balingen: Spitta-Verlag, S.22, 34ff, 73.

Guohua W. und Bharat B. (2006): Nanotribological and nanomechanical characterization of human hair using a nanoscratch technique, in: *Ultramicroscopy*, Nr.106, S.742-754.

Harkey, M. R. (1993): Anatomy and physiology of hair, in: *Forensic Science International*, Nr.63, S.9-18.

Hemmersbach, P., Tomten, S., Nilsson, S., Oftebo, H., Havrevoll, O., Oen, B., Birkeland, K. (1995): Illegal Use of Anabolic Agents in Animal Fattening- Consequences for Doping Analysis., in: Donike, M., Geyer, H., Gotzmann, A., und Mareck-Engelke, U. (Hrsg.), *Recent Advances in Doping Analysis*, Köln, Sport und Buch Strauß, S.185ff.

Herrmann, K. und Trinkkeller, U. (2007): *Dermatologie und medizinische Kosmetik: Leitfaden für die kosmetische Praxis, 2.Aufl.*, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S.17-21.

Hida, W., Sakurai, M., Ichinose, M., Shindoh, C., Chonan, T., Kikuchi, Y., Inoue, H., Takishima, T.(1985): Effect of clenbuterol on peripheral airway obstruction in bronchial asthma., in: *CurrMed Res Opin.* Nr.9, S.616.

Huckins, D., und Lemons, M. (2013): Myocardial Ischemia associated with Clenbuterol Abuse: Report of two cases, in: *The Journal of Emergency Medicine*, Nr.44, S.444–449.

Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln (2013): Definition der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) ab 1.1.2004, (online) <http://www.dopinginfo.de/> (11.07.2013).

Ito, S. und Wakamatsu, K. (2011): Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin, in: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Nr.12, S.1373.

Jia, J., Zhang, L., Lu, Y., Zhang, M., Liu, G., Liu, Y., Lu, C., Li, S., Lu, Y., Zhang, R., Yu, W. (2013): Hair analysis, a reliable and non-invasive method to evaluate the contamination by clenbuterol., in: *Ecotoxicol Environ Saf.*, Nr.93, S.186.

Karow, T. und Lang-Roth, R. (2012): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 20. Auflage, Köln: Thomas Karow, S.69ff.

Kidwell, D., Lee E. und DeLauder, S. (2000): Evidence for bias in hair testing and procedures to correct bias, in *Forensic Science International*, Nr.107, S.39-61.

Kim, K., Kim, Y. und Yang, J. (2011): The muscle-hypertrophic effect of clenbuterol is additive to the hypertrophic effect of myostatin suppression., in: *Muscle Nerve*, Nr. 43, S.700.

Kohler M, Thevis M, Schentzer W, Püschel K (2008): Gesundheitsschäden und Todesfälle durch Doping., in: *Rechtsmedizin*, Nr.18, S.177–182.

Krumbholz, A., Anielski, P., Gfrerer, L., Graw, M., Geyer, H., Schänzer, W., Dvorak, J., Thieme, D. (2014): Statistical significance of hair analysis of clenbuterol to discriminate therapeutic use from contamination, in: *Drug testing and analysis*, Jg.6, Nr.11-12, S. 1108-1116.

Machnik, M., Geyer, H., Horning, S., Breidbach, A., Delahaut, P., Schanzer, W. (1999): Long-term detection of clenbuterol in human scalp hair by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry., in: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, Nr.723, S.147.

Madea, B. (2004): Vorwort, in: B. Madea und F. Mußhoff (Hrsg.), *Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, S. VII.

Madea, B. (2003): *Praxis Rechtsmedizin, Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*, 2.Aufl., Heidelberg: Springer Medizin Verlag, S.411.

Maltin, C., Delday, M., Hay, S., Smith, F., Lobley, G. und Reeds, P. (1987): The Effect of the Anabolic Agent Clenbuterol, on Overloaded Rat Skeletal Muscle, in: *Bioscience Reports*, Nr. 7, S.143-149.

Micheli, F., Gatto, E., Gene, R., und Pardal, MF: (1991): Brief Report, Clenbuterol-Induced Tardive Dyskinesia, in: *Clinical Neuropharmacology*, Nr.14, S.27-431.

Moll, I. (2010): *Duale Reihe Dermatologie* , 7.Aufl., Georg Thieme Verlag, S.460.

Morton, R., Agbenyega, E., Hatton, P. und Wareham, A. (1995): Effects of clenbuterol and ICil18551, a selective p2-antagonist, on the growth of skeletal muscle of suckling rats, in: *European Journal of Physiology*, Nr. 431, S. 237-243.

NADA (2012): NADA Jahresbericht 2012, (online) <http://www.nada-bonn.de/de/service-infos/downloads/jahresberichte/#.Ufebeqhx9Ft> (30.07.2013).

Nakahara, Y. und Kikura, R. (1996): Hair analysis for drugs of abuse XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs, in: *Archives of Toxicology.*, Nr. 70, S.841.

Nakahara, Y., Tkahashi, K. und Kikura, R. (1995): Hair analysis for Drugs of Abuse. X. Effect of Physiochemical Properties of Drugs on the Incorporation Rates into Hair, in: *Biol. Pharm. Bull.*, Nr. 18, S.1225.

Neste, D. van und Desmond J.(2004): Hair cycle and hair pigmentation: dynamic interactions and changes associated with aging, in: *Micron*, Nr.35, S. 194.

- Paisey, R., Clamp, J., Kent, M., Light, N., Hopton, M. und Hartog, M. (1984): Glykosylation of hair: possible measure of chronic hyperglycaemia, in: *British Medical Journal*, Nr. 288, S. 669.
- Parzeller, M. und Centamore, R. (2008): Kampf gegen Doping im Sport, Gesetzliche Neuerungen, in: *Rechtsmedizin*, Nr. 18, S.189-194.
- Peterla, T. und Scanes, C. (1990): Effect of beta-adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue, in: *Journal of Animal Science*, Nr. 68, S.1024-1029.
- Pötsch, L. und Skopp, G. (2004): Inkorporation von Fremdsubstanzen in Haare., in: Madea, B. und F. Mußhoff (Hrsg.), *Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Köln, Deutscher Ärzte Verlag GmbH, S. 31-61.
- Pötsch, L., Skopp, G. und Möller, M. (1997): Biochemical approach on the conservation of drug molecules during hair fiber formation, in: *Forensic Sci.Int.* , Nr. 84, S.25-35.
- Pöttgen, K. (2012): Doping: Aktuelle Themen und Substanznachweise, (online) <http://www.klaus-poettgen.de/2012-MTW-Doping-neue-sustanznachweise-poettgen.pdf> (04.08.2015).
- Prather, I., Brown, D., North, P., Wilson, J. (1995): Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids?, in: *Med Sci Sports Exerc.*, Nr. 27, S.1118.
- Raab, W. (2012): *Haarerkrankungen in der dermatologischen Praxis*, Heidelberg: Springer- Verlag Berlin, S.8-9, 19.

Raschka, C (2008): Tödliche Dopingfälle im Sport. Ein historischer Überblick, in: *Rechtsmedizin*, Nr. 18, S. 173–176.

Richtlinie 96/22/EG des Europäischen Parlaments und Rates (2003): RICHTLINIE DES RATES vom 16. Juli 1985 zur Ergänzung der Richtlinie 81/602/EWG über ein Verbot von bestimmten Stoffen mit hormonaler Wirkung und von Stoffen mit thyreostatischer Wirkung (85/358/EWG), (online)
http://www.bfr.bund.de/cm/343/96_22_eg.pdf (04.08.2015).

Rook, A. und Dawber, R. (1995): *Haarkrankheiten, Diagnose und Therapie*, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, S.692.

Sachs, H. (1995): Theoretical limits of the evaluation of drug concentrations in hair due to irregular hair growth, in: *Forensic Science International*, Nr. 70, S.53-61.

Schlupp, A., Anielski, P., Thieme, D., Muller, R., Meyer, H., Ellendorff, F. (2004): The beta-agonist clenbuterol in mane and tail hair of horses., in: *Equine Vet J.*, Nr. 36, S. 118.

Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., Schmoldt, A. (2011): Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics., in: *Crit Care*, Nr. 16, S. 136.

Stern (2013): HINTERGRUND: Größte Doping-Skandale der Sportgeschichte, (online)
<http://www.stern.de/news2/aktuell/groesste-doping-skandale-der-sportgeschichte-1955019.html> (30.07.2013).

Thevis, M. Geyer, L., Geyer, H., Guddat, S., Dvorak, J., Butch, A., Sterk, S., Schanzer, W. (2013): Adverse analytical findings with clenbuterol among U-17 soccer players attributed to food contamination issues., in: *Drug Test Anal.*, Nr. 5, S. 372.

Thevis, M., Schebalkin, T., Thomas, A., S., W. (2005): Quantification of clenbuterol in human plasme and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry, in: *Chromatographia*, Nr.62, S. 435.

Thieme, D. (2004): Dopingsubstanzen, in: B. Madea und F. Mußhoff (Hrsg.), *Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht*, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, S.286.

Vulic, A., Pleadin, J., Persi, N., Stojkovic, R., Ivankovic, S. (2011): Accumulation of beta-agonists clenbuterol and salbutamol in black and white mouse hair., in: *J Anal Toxicol.*, Nr. 35, S. 566.

WADA (2015): Prohibited List, (online) <http://www.wada-ama.org/en/World-Anti-Doping-Program/Sports-and-Anti-Doping-Organizations/International-Standards/Prohibited-List/> (06.08.2015).

Wikipedia (2013): Dimitrij Ovtcharov, (online) http://de.wikipedia.org/wiki/Dimitrij_Ovtcharov (30.07.2013).

Wilkins, D., Valdez, A., Nagasawa, P., Gygi, S. und Rollins, D. (1997): Incorporation of Drugs for the Treatment of Substance Abuse into Pigmented and Nonpigmented Hair, in: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Nr: 87, S. 437.

Wischnik, A., Alberti, W., Hermer, (1986):Clenbuterol als neues Tokolytikum zur oralen Anwendung - Klinische Ergebnisse, in: M. Jung, H., Fendel, H., Karl, C. (Hrsg.), *Neueste Ergebnisse über Betamimetika*, Darmstadt: Steinkopff Verlag, S. 88-100.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Clenbuterolmolekül (Pharma Wiki 31.07.2013).....	5
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Haarfollikels mit Talgdrüse (Bährle-Rapp 2012)	17
Abbildung 3: Aufbau des Haars (Raab 2012)	18
Abbildung 4: Der Haarzyklus (Raab 2012)	19
Abbildung 5: Phasen des Haarwachstums (Raab 2012)	20
Abbildung 6: Clenbuterolkonzentration im proximalen Haarsegment, Applikationsgruppe 1 (Krumholz et al. 2014).....	39
Abbildung 7: Clenbuterolkonzentrationen im Serum (Krumholz et al. 2014).....	42
Abbildung 8: Clenbuterolkonzentration im Urin Applikationsstudie 1 (Krumholz et al 2014)	44
Abbildung 9: Quantitative Verteilung der Clenbuterolkonzentration im Haar, Hochrisiko-Gruppe, n.d. - nicht gefunden, <LOD = 0,02pg/mg (Krumholz et al. 2014) .	45
Abbildung 10: Quantitative Verteilung der Clenbuterolkonzentrationen im Urin, Hochrisiko-Gruppe, n.a - nicht gefunden, <LOD = 1pg7ml, LOQ = 3pg/ml (Krumholz et al. 2014)	47

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbotene Substanzen, Dopingliste der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA), Stand 1.1.2010	14
Tabelle 2: Applikationsstudien: Clenbuterolgehalt im Haar.....	36
Tabelle 3: Clenbuterolkonzentrationen im Serum	41
Tabelle 4: Clenbuterolkonzentrationen im Urin (Applikationsstudie 1) (Krumbholz et al. 2014)	43

8. Zusammenfassung

Clenbuterol ist ein gut bekannter β 2-Agonist der im Sport verboten ist und dessen Einsatz in der Lebensmittelproduktion streng reguliert ist. In den letzten Jahren wurde vermutet, dass positive Clenbuterol-Dopingkontrollen und Clenbuterolfunde bei EinwohnerInnen oder TouristInnen aus Hochrisikoländern mit dem illegalen Gebrauch von Clenbuterol zur Maststeigerung zusammen hängen könnten. Es wurde eine sensitive LC-MS/MS Methode entwickelt, mit der es möglich war Clenbuterolrückstände in Haaren bis zu einer unteren Nachweisgrenze von 0,02pg/mg nachzuweisen. Es wurden Applikationen mit subtherapeutischen Dosen von Clenbuterol (Applikationsgruppe 1+2), sowie eine Feldstudie mit Freiwilligen, die eine hohe Kontaminationswahrscheinlichkeit haben (Hochrisikogruppe) durchgeführt. Für die Applikationsstudie 1 wurde 20 gesunden Freiwilligen insgesamt 30 μ g Clenbuterol an fünf aufeinanderfolgenden Tagen appliziert. Einen Monat nach Applikationsbeginn wurden in den proximalen Haarsegmenten der ProbandInnen (0-1cm) Clenbuterolkonzentrationen zwischen 0,43 und 4,76pg/mg gemessen. Für die Applikationsstudie 2 wurde einem Teil der ProbandInnen aus Applikationsstudie 1 (11/20) nochmals 30 μ g Clenbuterol an 5 aufeinanderfolgenden Tagen appliziert. Bei dieser zweiten Studie wurde in allen untersuchten Haarsegmenten Clenbuterol detektiert. Weiterhin wurden Proben von 66 mexikanischen Fußballspielern analysiert. Bei 89% dieser Freiwilligen wurde Clenbuterol in Konzentrationen zwischen 0,02 und 1,90pg/mg gefunden.

Ein Vergleich von Applikationsgruppe 1 und Hochrisikogruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Applikation im subtherapeutischen Bereich und Kontamination. Im Gegensatz dazu ist eine Unterscheidung zum Missbrauch von Clenbuterol zu Dopingzwecken möglich.

Die Haaranalytik erscheint damit als eine sehr aussichtsreiche Möglichkeit um einen Clenbuterol-Missbrauch von einer ungewollten Kontamination mit Clenbuterol zu differenzieren. Ein sinnvoller Grenzwert dafür wäre 5pg/mg. Alle Werte die geringer sind lassen sich durch Kontamination erklären.

Die Analyse von Haaren birgt weiterhin einige Vorteile gegenüber der Analyse von Urin. So ist eine Aussage über einen längeren Zeitraum, also von Wochen bis Monaten möglich, wohingegen die Aussagekraft von Urin nur kurze Zeit nach dem fraglichen Ereignis möglich ist und außerdem auch starken interindividuellen Schwankungen durch Nierenfunktion und anderen physiologischen Einflüssen unterworfen ist. Die Aussagekraft der Haaranalyse lässt sich weiterhin noch durch Segmentanalytik steigern. So sind auch Aussagen über den Inkorporationszeitraum des Clenbuterols möglich. Dabei weist eine konstante Clenbuterolkonzentration über alle Haarsegmente auf eine permanente Aufnahme hin, wohingegen eine unterschiedliche Konzentration in den aufeinander folgenden Haarsegmenten auf eine Veränderung im Aufnahmeverhalten von Clenbuterol zeigt. Es gibt jedoch auch Faktoren, die die Aussagekraft der Haaranalyse beeinflussen. So besteht eine Abhängigkeit der Clenbuterolinkorporation in Haar von der Haarfarbe der untersuchten Person. Bei dunkelhaarigen Menschen wird mehr Clenbuterol eingelagert als bei Menschen mit hellem Haar (Schlupp et al. 2004)

Entsprechend der weltweit vorherrschenden Haarfarbe wurde diese Studie ausschließlich mit dunkelhaarigen Menschen durchgeführt.

9. Anhang

9.1 Studienprotokoll

INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Nußbaumstr. 26 · D-80336 München
Postfach 15 10 23 · D-80046 München
Tel.: +49 (0)89 2180-73 011 · Fax: -73 009
E-Mail: rechtsmedizin@med.uni-muenchen.de

Betreff: Studienprotokoll zur Studie:

Clenbuterolnachweis im Haar – Differenzierungsmöglichkeiten von Doping und akzidentieller Aufnahme

Die Versuche werden unter ärztlicher Aufsicht an freiwilligen, gesunden, erwachsenen, aufklärungs- und zustimmungsfähigen ProbandInnen durchgeführt. Die ProbandInnen werden mündlich aufgeklärt, jeder Proband erhält zusätzlich eine schriftliche ProbandInneninformation.

Die angestrebte Fallzahl beträgt 20 Patienten in der Interventionsgruppe, 20 Patienten in der Kontrollgruppe 1 ohne Medikamente und 5 Patienten in der Kontrollgruppe 2 mit Medikamenteneinnahme. Es folgt eine zweite Applikation bei 11 der ProbandInnen aus der Interventionsgruppe.

Die Patienten der Kontrollgruppe 1 sind gesunde ProbandInnen, die keine Medikamente einnehmen. Nach Gabe ihres Einverständnisses werden sie zu ihren Ernährungsgewohnheiten befragt und geben eine Haar-, sowie eine Urinprobe ab.

Die Patienten der Kontrollgruppe 2 sind ProbandInnen, die Clenbuterol in therapeutischen Dosen im Rahmen ihrer Asthmaerkrankung einnehmen.

Nach Gabe ihres Einverständnisses werden sie zu ihren Ernährungsgewohnheiten befragt und geben eine Haar-, sowie eine

Urinprobe (10ml) ab. Weiterhin werden sie zu ihrem Gebrauch von Clenbuterol befragt.

Die Patienten der Testgruppe sind gesunde ProbandInnen, die keine Medikamente einnehmen.

Vor Studienbeginn werden sie orientierend klinisch und laborchemisch (GOT, GPT, gGT, alkalische Phosphatase, Bilirubin, kleines Blutbild, Kreatinin) untersucht. Es erfolgt ein Ausschluss bei gesundheitlichen Einschränkungen, Allergien, dauerhafter Medikamenteneinnahme und insbesondere auch bei Schwangerschaft.

Zu Versuchsbeginn am ersten Tag werden den ProbandInnen jeweils eine Blut- (3ml), Urin (10ml) und Haarprobe (bleistiftdicker Strang, ab Kopfhaut) (Nullwerte) entnommen.

In 24stündlichen Abständen werden 2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg Clenbuterol (zum Vergleich therapeutisch bei Erwachsenen: 2x20 µg/Tag) p.o. verabreicht. An allen fünf Tagen werden jeweils 90min nach Applikation eine Urin (10ml) - und eine Blutprobe (3ml) entnommen.

Einen Monat nach Versuchsbeginn werden nochmal jeweils eine Haar-, Blut (3ml) - und Urinprobe (10ml) genommen.

Im Rahmen der zweiten Applikation wird einem Teil (11/20) derselben ProbandInnen erneut insgesamt 30 µg Clenbuterol appliziert. Es werden jedoch an jedem der fünf Tage Einzeldosen von 6 µg verabreicht. Jeweils 90min nach Einnahme wird eine Urinprobe (10ml) abgegeben. Wiederum vor, und einen Monat nach Versuchsbeginn werden Urin- (10ml) und Haarproben entnommen.

Die Haar-, Blut- und Urinproben werden im Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie (IDAS) in Kreischa auf Clenbuterol quantitativ analysiert. Ziel ist die Benennung einer Entscheidungsgrenze an Haarproben hinsichtlich

akzidenteller (nahrungsbedingter) Clenbuterolaufnahme zur Abgrenzung von Doping.

Eine Honorierung der ProbandInnen der Interventionsgruppe (1+2) in Höhe von 150,00€ ist nach Abschluss der Versuche vorgesehen.

Bei Rücktritt eine/r ProbandInnen werden die entsprechenden Daten, sowie die Proben vernichtet, außer der Proband gibt sein Einverständnis zur Weiterverwendung. In diesem Fall werden seine Daten irreversibel anonymisiert.

Ein Abschluss einer Versicherung ist nicht vorgesehen, da in den beiden Kontrollgruppen kein durch die Studie bedingtes Risiko entsteht und auch bei der Interventionsgruppe angesichts der weit untertherapeutischen Dosierung keine UAW zu erwarten sind.

Die erhobenen Informationen werden streng vertraulich behandelt, Proben und Ergebnisse werden anonymisiert verwendet.

9.2 Antrag an die Ethikkommission- Antragsformular für Nicht- AMG/Nicht-MPG- Studien

Antragsformular für Nicht- AMG/Nicht-MPG- Studien
Ergänzend ist ein eigenständiges Studienprotokoll vorzulegen

1. Formalia

Antragsteller

Prof. Dr. med. Matthias Graw
Institut für Rechtsmedizin der Universität
80336 München
Nussbaumstr. 26
Tel.: 2180-73001

Kooperationspartner:

Dr. Detlef Thieme
Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie (IDAS)
Dresdner Str. 12
01731 Kreischa

Titel des Forschungsvorhabens

Clenbuterolnachweis im Haar – Differenzierungsmöglichkeit von Doping und
akzidenteller Aufnahme

Ausbildungsdaten und Prüferfahrung:

Prof. Dr. med. Matthias Graw	
Facharztanerkennung	28.04.1993
Habilitation	17.11.1998

Berufung zum Professor (C3) 15.10.2001

Berufung zum W3-Professor 01.04.2011

2. Monozentrische oder multizentrische Studie

-monozentrische Studie-

3. Schriftliche Zustimmung des verantwortlichen Leiters der Wissenschaftlichen Institution

Mit dem beantragten Forschungsvorhaben bin ich einverstanden
München, den 05.08.2012 Prof. Dr. med. Matthias Graw

4. Erklärung, dass die Grundsätze der Deklaration von Helsinki in der derzeit gültigen Fassung berücksichtigt werden

Die Studie wird nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki mit Ihrer Novellierung von Somerset West 1996 durchgeführt.

5. Studienbedingte Strahlenbelastung

- keine Strahlenbelastung-
- diagnostische Untersuchungen
- mit Blut-, Urin-, Haarprobenentnahme

6. Bei Arzneimittelprüfung

-keine Arzneimittelprüfung-

7. Wissenschaftliche Angaben zum Forschungsvorhaben

7.1 Fragestellung/Studienziel

Die Zielstellung der Studie besteht in der Durchführung von Haaranalysen zur Differenzierung einer missbräuchlichen Anwendung von Clenbuterol, im Gegensatz zu akzidenteller subtherapeutischer Dosierung. Derartige Kontaminationen wären zum Beispiel nach Konsum von Kalbfleisch denkbar, bei dessen Produktion in einigen Regionen Asiens und Mittelamerikas immer noch β 2-Agonisten wie

Clenbuterol als illegale Masthilfsmittel eingesetzt werden. Dieser Kontaminationsmechanismus wird als Quelle einer Vielzahl von aktuellen Clenbuterol-Dopingfällen im Sport (alle im sehr niedrigen Konzentrationsbereich) unterstellt.

Wegen der ausgezeichneten Inkorporation in Haare erscheint es wahrscheinlich, dass therapeutische und dopingrelevante Dosierungen durch Haartests sicher identifizierbar sind, während Kontaminationsfälle zu signifikant verringerten oder negativen Haarbefunden führen.

Die Applikation einer definierten unter-therapeutischen Menge an Clenbuterol ist geboten, um eine quantitative Korrelation zwischen niedriger Dosierung und Wirkstoffkonzentrationen in Plasma-, Urin- und Haarproben zu prüfen.

7.2 Studiendesign

Die Versuche werden unter ärztlicher Aufsicht an freiwilligen, gesunden, erwachsenen, aufklärungs- und zustimmungsfähigen ProbandInnen durchgeführt.

- mit Kontrollgruppen
- Versuch mit gesunden ProbandInnen

7.3 Fallzahlschätzung und Auswertungskonzept

Die angestrebte Fallzahl der Testgruppe beträgt 20 dunkelhaarige Proband(inn)en in der Interventionsgruppe, wobei jeder Proband an einem fünftägigen Versuch mit Nachkontrolle nach einem Monat teilnehmen soll. Die ProbandInnen werden zunächst mündlich aufgeklärt. Jeder Proband erhält zusätzlich eine schriftliche ProbandInneninformation.

Jeder Proband wird vor Versuchsbeginn orientierend klinisch und laborchemisch (GOT, GPT, gGT, alk. Phosphatase, Bilirubin, kleines Blutbild, Kreatinin) untersucht. Es erfolgt ein Ausschluss bei gesundheitlichen Einschränkungen, Allergien, dauerhafter Medikamenteneinnahme und insbesondere auch bei Schwangerschaft. Zu Versuchsbeginn am ersten Tag werden den ProbandInnen jeweils eine Blut- (3ml), Urin (10ml) und Haarprobe (bleistiftdicker Strang, ab Kopfhaut) (Nullwerte) entnommen.

In 24stündlichen Abständen werden

- am 1. Tag 2µg
- am 2. Tag 4µg
- am 3. Tag 6µg
- am 4. Tag 8µg

am 5. Tag 10µg Clenbuterol p.o. verabreicht.

(zum Vergleich therapeutisch bei Erwachsenen: 2x20µg/Tag)

Am 2., 3., 4. und 5. Tag werden je 1 Blut (3ml)- und Urinprobe (10ml), einen Monat nach Versuchsbeginn jeweils eine Haar-, Blut (3ml)- und Urinprobe (10ml) entnommen.

Für die Kontrollgruppe 1 ist ebenfalls eine Fallzahl von 20 dunkelhaarigen Proband(inn)en vorgesehen, denen lediglich nach Anamneseerhebung und Fragen nach Ernährungsgewohnheiten eine Urin (10ml)- und Haarprobe entnommen wird.

Für die Kontrollgruppe 2 wird eine Fallzahl von 5 Patienten angestrebt, die Clenbuterol im

Rahmen Ihrer Asthmaerkrankung einnehmen (nicht zwingend als Monosubstanz).

Diese Gruppe wird aus Patienten bei Lungenfachärzten, Internisten und Allgemeinärzten rekrutiert. Sie werden ebenfalls nach Aufklärung bzgl. der Medikamenteneinnahme und Ernährungsgewohnheiten befragt und es werden eine Haar- und eine Urinprobe (10ml) entnommen.

Die ProbandInnen für die Testgruppe und Kontrollgruppe 1 werden über Aushang gesucht, für Testgruppe 2 über Arztpraxen, die das Medikament verordnen.

7.4 Studiendauer

Voraussichtlicher Beginn ist September 2012

Voraussichtliches Ende ist Mai 2013

8.1 Diskussion der Nachteile /Risiken /Belastungen /des möglichen Nutzens

Für die ProbandInnen entstehen bei der subtherapeutischen Dosierung keine erkennbaren Nachteile oder Risiken oder Belastungen.

Clenbuterol (Spiropent) ist ein selektives β_2 -Sympathomimetikum zur Behandlung von Asthma bronchiale und anderen Erkrankungen, die mit einer reversiblen Verengung der Atemwege einhergehen. Zusätzlich ist Spiropent ein partieller Agonist. Diese Eigenschaften tragen zur geringen Inzidenz der für β -Agonisten spezifischen Nebenwirkungen bei.

An unerwünschten Wirkungen werden unter therapeutischer Anwendung v.a. bei Überdosierung beschrieben: Herzklopfen, Tremor, Kopfschmerzen, übermäßiges Schwitzen, Schlaflosigkeit, Muskelkrämpfe, erhöhter Blutdruck, Übelkeit, Angst- und Beklemmungsgefühle.

Clenbuterol hat einen wachstumsfördernden Effekt (stärkerer Muskelaufbau bei geringerem Fettaufbau), so dass es missbräuchlich zur Maststeigerung (Kalbfleisch)

und zum Doping eingesetzt wird, jedoch in übertherapeutischer (5-10facher) Dosierung.

8.2 Zustimmungsfähigkeit

An der Studie sollen erwachsene ProbandInnen teilnehmen, die aufklärungs- und zustimmungsfähig sind.

9. Datenschutz

Die ProbandInnen werden zunächst mündlich aufgeklärt. Jeder Proband erhält zusätzlich eine schriftliche ProbandInneninformation (s. Anlage). Alle erhobenen Informationen werden sekundär irreversibel anonymisiert und streng vertraulich behandelt. Ein Rückschluss auf die Person der ProbandInnen von Seiten Dritter wird nicht möglich sein. Es werden keine Auskünfte an Dritte erteilt.

Angaben, wie der Verschlüsselungscode gebildet wird, wer Zugang zum Verschlüsselungscode hat, Gründe für die Entschlüsselung und wo wie lange die Daten /Proben aufbewahrt werden

– Untersuchungen vor Studie, Labor, Anamnese:	Namensbezogen
– Ergebnis/ Datenbogen/ Probenbeschriftung:	ohne Namensangaben mit fortlaufender Nummer ohne Bezug zum Geburtsdatum
– Entschlüsselung nicht vorgesehen	(Zulässig nur bei medizinischer Fragestellung des Patienten)
– Vernichtung der personenbezogenen Informationen:	nach zwei Jahren
– Vernichtung der Proben:	nach Analyse

10. Versicherung

Ein Abschluss einer Versicherung ist nicht geplant; keine erkennbaren relevanten Risiken für die ProbandInnen bei geringer subtherapeutischer Dosierung.

11. Finanzierung

- Finanzierung über Institutsmittel
- eine Honorierung der ProbandInnen der Testgruppe in Höhe von 150,00 Euro ist nach Abschluss der Versuche vorgesehen. Bei Rücktritt des ProbandInnen werden die entsprechenden Daten sowie die Blutproben vernichtet.

12. Aufwandsentschädigung für die EK

über den Haushalt des Instituts für Rechtsmedizin;
Antrag auf Reduktion der Aufwandsentschädigung, da Kosten aus Institutsmitteln getragen werden.

München, 05.08. 2012, Prof. Dr. med. Matthias Graw

9.3 ProbandInneninformationen

9.3.1 Kontrollgruppe

**INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Nußbaumstr. 26 · D-80336 München
Postfach 15 10 23 · D-80046 München
Tel.: +49 (0)89 2180-73 011 · Fax: -73 009
E-Mail: rechtsmedizin@med.uni-muenchen.de

An die ProbandInnen des
Clenbuterol-Versuches
- Kontrollgruppe 1 –

Prof. Dr. med. Matthias Graw
Institut für Rechtsmedizin der Universität
80336 München
Nussbaumstr. 26
Tel.: 2180-73001

Betreff: ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung

Clenbuterolnachweis im Haar –

Differenzierungsmöglichkeit von Doping und akzidentieller Aufnahme

Wir möchten anfragen, ob Sie bereit wären als Proband an einer wissenschaftlichen Studie teilzunehmen. Diese befasst sich mit den Nachweismöglichkeiten des Medikaments Clenbuterol (Spiropent®). Das untersuchte Medikament führt zur Erweiterung des Bronchialsystems (so genanntes β -2-Sympathomimentikum) und wird zur Behandlung von Asthma bronchiale und anderen Krankheiten, die mit einer Verengung der Atemwege einhergehen eingesetzt.

Weiterhin hat Clenbuterol einen wachstumsfördernden Effekt, bei dem der Muskelaufbau verstärkt und der Fetteinbau vermindert wird. Wegen dieser

Eigenschaften wird es missbräuchlich in der Kälbermast zur Maststeigerung und zum Doping eingesetzt.

Ziel der Untersuchung ist die Unterscheidung einer akzidentiellen, also ungewollten Aufnahme über Nahrung, von einem missbräuchlichen Gebrauch zum Doping. Besonders interessieren uns Haarproben, da sich das Medikament aufgrund seiner chemischen Eigenschaften besonders gut in Haare einlagert und so eine zurückliegende Aufnahme nachgewiesen werden kann. Bis jetzt wird der missbräuchliche Clenbuterolgebrauch zum Doping in Kontrollen nur anhand einer Urinprobe überprüft. Bei Kenntnis ab welcher Konzentration in Haaren ein Missbrauch als erwiesen gilt, wäre es vorstellbar die Testung auch auf Haarproben zu erweitern und damit auch einen länger zurückliegenden Gebrauch zur Wettkampfdisqualifikation heranzuziehen.

Wir möchten Sie nun bitten als Proband an unserer Studie teilzunehmen und uns eine Haar- und eine Urinprobe zur Verfügung zu stellen. Dadurch wollen wir überprüfen, ob es in der Bevölkerung zu ungewollter Aufnahme des untersuchten Medikaments kommt.

Versuchsablauf

Sie werden nach Abgabe Ihrer Einverständniserklärung und nach Klärung all Ihrer Fragen zu einem vereinbarten Termin in das Institut gebeten um dort zunächst einige Fragen zu Ihren Ernährungsgewohnheiten und zu Medikamenteneinnahmen zu beantworten. Dann bitten wir Sie, eine Urinprobe (ca. 10ml) abzugeben. Weiterhin werden wir Ihnen eine Haarprobe entnehmen. Diese ca. bleistiftdicke Strähne entnehmen wir in Absprache mit Ihnen vom Hinterkopf. Da die Haare nicht ausgerissen, sondern sehr kopfhautnah abgeschnitten werden ist das Procedere völlig schmerzlos. Der Zeitaufwand beträgt für Sie circa 10-15 Minuten.

Datenschutz

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Sollten Sie von der Teilnahme an der Studie zurücktreten, werden alle bis dahin gesammelten Untersuchungsmaterialien und Daten vernichtet, es sei denn, Sie stimmen einer Untersuchung und Auswertung ausdrücklich zu. In diesem Falle werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Prof. Graw.

Die gesondert aufbewahrten personenbezogenen Daten werden nach Ablauf von zwei Jahren vernichtet.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Abschließende Bemerkung

Falls Sie noch Fragen haben, werden wir Ihnen diese gerne beantworten. Wir möchten Sie nochmals darauf aufmerksam machen, dass Sie eine einmal gegebene Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie jederzeit, von sich aus, ohne Nennung von Gründen und Ohne negative Folgen für Sie zurückziehen können.

Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung

Hiermit gebe ich mein Einverständnis für die oben beschriebenen
datenschutzrechtlichen Vereinbarungen.

München

Ort, Datum _____ Name _____

Unterschrift

Einwilligung

Ich erkläre mich einverstanden als Proband am oben beschriebenen Versuch
teilzunehmen.

München

Ort, Datum _____ Name _____

Unterschrift

Aufklärende/r Ärztin/Arzt

Unterschrift

9.3.2 Applikationsgruppe 1

**INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Nußbaumstr. 26 · D-80336 München
Postfach 15 10 23 · D-80046 München
Tel.: +49 (0)89 2180-73 011 · Fax: -73 009
E-Mail: rechtsmedizin@med.uni-muenchen.de

An die ProbandInnen des
Clenbuterol-Versuches
– Testgruppe 1 –

Prof. Dr. med. Matthias Graw
Institut für Rechtsmedizin der Universität
80336 München
Nussbaumstraße 26
Tel.: 2180 - 73001

Betreff: ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung

**Clenbuterolnachweis im Haar – Differenzierungsmöglichkeit von Doping und
akzidentieller Aufnahme**

Wir möchten anfragen, ob Sie bereit wären als Proband an einer wissenschaftlichen Studie teilzunehmen. Diese befasst sich mit den Nachweismöglichkeiten des Medikaments Clenbuterol (Spiropent®). Das untersuchte Medikament führt zur Erweiterung des Bronchialsystems (so genanntes β -2-Sympathomimentikum) und wird zur Behandlung von Asthma bronchiale und anderen Krankheiten, die mit einer Verengung der Atemwege einhergehen eingesetzt.

Weiterhin hat Clenbuterol einen wachstumsfördernden Effekt, bei dem der Muskelaufbau verstärkt und der Fetteinbau vermindert wird. Wegen dieser

Eigenschaften wird es missbräuchlich in der Kälbermast zur Maststeigerung und zum Doping eingesetzt.

Ziel der Untersuchung ist die Unterscheidung einer akzidentiellen, also ungewollten Aufnahme über Nahrung, von einem missbräuchlichen Gebrauch zum Doping. Besonders interessieren uns Haarproben, da sich das Medikament aufgrund seiner chemischen Eigenschaften besonders gut in Haare einlagert und so eine zurückliegende Aufnahme nachgewiesen werden kann. Bis jetzt wird der missbräuchliche Clenbuterolgebrauch zum Doping in Kontrollen nur anhand einer Urinprobe überprüft. Bei Kenntnis ab welcher Konzentration in Haaren ein Missbrauch als erwiesen gilt, wäre es vorstellbar die Testung auch auf Haarproben zu erweitern und damit auch einen länger zurückliegenden Gebrauch zur Wettkampfdisqualifikation heranzuziehen.

Wir möchten Sie nun bitten als Proband an unserer Studie teilzunehmen.

Versuchsablauf

Sie werden nach Abgabe Ihrer Einverständniserklärung und nach Klärung all Ihrer Fragen zu einem vereinbarten Termin in das Institut gebeten. Es folgen eine Befragung zur Gesundheit, eine orientierende körperliche Untersuchung sowie die Entnahme einer Blutprobe (ca. 3ml) zur Erhebung von Standardwerten insb. auch der Nieren- und Leberfunktion. Dies ist notwendig, da nur Patienten ohne gesundheitliche Einschränkungen, Allergien, dauerhafte Medikamenteneinnahme und insbesondere auch Schwangerschaft teilnehmen können. Diese Voruntersuchungen werden circa 20 Minuten in Anspruch nehmen.

Wenn die Voruntersuchungen abgeschlossen sind wird eine Woche mit Ihnen vereinbart, in der Sie die Medikamente einnehmen und Proben genommen werden.

Am ersten Tag werden wir Ihnen eine Haarprobe entnehmen. Diese ca. bleistiftdicke Strähne entnehmen wir in Absprache mit Ihnen vom Hinterkopf. Da die Haare nicht ausgerissen, sondern kopfhautnah abgeschnitten werden ist das Procedere völlig schmerzlos.

Weiterhin werden wir Ihnen Blut (ca. 3ml) abnehmen und Sie bitten eine Urinprobe (ca. 10ml) abzugeben.

In 24stündlichen Abständen werden nun

am 1. Tag 2 μ g

am 2. Tag 4 μ g

am 3. Tag 6 μ g

am 4. Tag 8 μ g

am 5. Tag 10 μ g Clenbuterol p.o. verabreicht.

(zum Vergleich: therapeutische Dosierung bei Erwachsenen sind 2x20 μ g/Tag)

Am 2., 3., 4. und 5. Tag werden je 1 Blut (3ml)- und Urinprobe (10ml), einen Monat nach Versuchsbeginn jeweils eine Haar-, Blut (3ml)- und Urinprobe (10ml) entnommen. Für jeden dieser Termine beträgt der Zeitaufwand circa 10 Minuten.

Risiken und Nebenwirkungen

Für Sie als Proband entstehen durch die sehr geringe Dosierung keine erkennbaren Nachteile, Risiken oder Belastungen. Clenbuterol (Spiropent®) ist ein so genanntes selektives β -2-Sympathomimentikum das spezielle Nebenwirkungen hat, mit denen jedoch bei der Dosisaufnahme im Rahmen der Studie NICHT zu rechnen ist.

Unerwünschte Wirkungen treten unter therapeutischer Anwendung vor allem bei Überdosierung auf: Herzklopfen, Tremor(Muskelzittern), Kopfschmerzen, übermäßiges Schwitzen, Schlaflosigkeit, Muskelkrämpfe, erhöhter Blutdruck und Übelkeit.

Der wachstumsfördernde Effekt des Medikaments, der zur Maststeigerung und zum Doping missbraucht wird, tritt erst bei stark übertherapeutischen Dosen (5-10fach, also das ca. 200fache der Studiendosis) auf.

Sollten Sie wider Erwarten während der Medikamenteneinnahme eines der oben genannten Symptome verspüren möchten wir Sie bitten sich unverzüglich bei uns zu melden.

Vergütung

Durch die Teilnahme an unserer Studie entsteht für Sie eine nicht unerhebliche Zeitbelastung. Als Anerkennung für Ihr Engagement und Ihre Mitarbeit können wir Ihnen eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 150,00€ gewähren. Dieser finanzielle Ausgleich kann jedoch nur an ProbandInnen gezahlt werden, die den Versuch komplett absolvieren.

Datenschutz

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Sollten Sie von der Teilnahme an der Studie zurücktreten, werden alle bis dahin gesammelten Untersuchungsmaterialien und Daten vernichtet, es sei denn, Sie stimmen einer Untersuchung und Auswertung ausdrücklich zu. In diesem Falle werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Prof. Graw.

Die gesondert aufbewahrten personenbezogenen Daten werden nach Ablauf von zwei Jahren vernichtet.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).
Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Abschließende Bemerkung

Falls Sie noch Fragen haben, werden wir Ihnen diese gerne beantworten. Wir möchten Sie nochmals darauf aufmerksam machen, dass Sie eine einmal gegebene Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie jederzeit, von sich aus, ohne Nennung von Gründen und Ohne negative Folgen für Sie zurückziehen können.

Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung

Hiermit gebe ich mein Einverständnis für die oben beschriebenen datenschutzrechtlichen Vereinbarungen.

München

Ort, Datum _____ Name _____

_____ Unterschrift

Einwilligung

Ich erkläre mich einverstanden als Proband am oben beschriebenen Versuch teilzunehmen.

München

Ort, Datum

Name

Unterschrift

Aufklärende/r Ärztin/Arzt

Unterschrift

Mir wurde die Aufwandsentschädigung in Höhe von 150,00€ ausgehändigt.

München

Ort, Datum

Name

Unterschrift

9.3.3 Applikationsgruppe 2

**INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

Nußbaumstr. 26 · D-80336 München
Postfach 15 10 23 · D-80046 München
Tel.: +49 (0)89 2180-73 011 · Fax: -73 009
E-Mail: rechtsmedizin@med.uni-muenchen.de

An die ProbandInnen des
Clenbuterol-Versuches
- Testgruppe 2-

Prof. Dr. med. Matthias Graw
Institut für Rechtsmedizin der Universität
80336 München
Nussbaumstr. 26
Tel.: 2180-73001

Betreff: **ProbandInneninformation und Einwilligungserklärung**

**Clenbuterolnachweis im Haar – Differenzierungsmöglichkeit von Doping und
akzidentieller Aufnahme**

Wir möchten anfragen, ob Sie bereit wären erneut als Proband an einer
wissenschaftlichen Studie teilzunehmen. Diese befasst sich mit den
Nachweismöglichkeiten des Medikaments Clenbuterol (Spiropent®). Das
untersuchte Medikament führt zur Erweiterung des Bronchialsystems (so genanntes
β-2-Sympathomimentikum) und wird zur Behandlung von Asthma bronchiale und
anderen Krankheiten, die mit einer Verengung der Atemwege einhergehen
eingesetzt.

Weiterhin hat Clenbuterol einen wachstumsfördernden Effekt, bei dem der
Muskelaufbau verstärkt und der Fetteinbau vermindert wird. Wegen dieser

Eigenschaften wird es missbräuchlich in der Kälbermast zur Maststeigerung und zum Doping eingesetzt.

Ziel der Untersuchung ist die Unterscheidung einer akzidentiellen, also ungewollten Aufnahme über Nahrung, von einem missbräuchlichen Gebrauch zum Doping. Besonders interessieren uns Haarproben, da sich das Medikament aufgrund seiner chemischen Eigenschaften besonders gut in Haare einlagert und so eine zurückliegende Aufnahme nachgewiesen werden kann. Bis jetzt wird der missbräuchliche Clenbuterolgebrauch zum Doping in Kontrollen nur anhand einer Urinprobe überprüft. Bei Kenntnis ab welcher Konzentration in Haaren ein Missbrauch als erwiesen gilt, wäre es vorstellbar die Testung auch auf Haarproben zu erweitern und damit auch einen länger zurückliegenden Gebrauch zur Wettkampfdisqualifikation heranzuziehen.

Wir möchten Sie nun bitten als Proband an unserer Studie teilzunehmen.

Versuchsablauf

Nachdem Sie bereits einmal an einer Studie zum Thema teilgenommen haben sind keine weiteren Voruntersuchungen notwendig, wenn sich Ihr Gesundheitszustand seitdem nicht verändert hat. Wir bitten Sie außerdem uns Veränderungen Ihrer Ernährungsgewohnheiten mitzuteilen.

Wir werden mit Ihnen eine Woche vereinbaren, in der Sie das Medikament einnehmen und die Proben genommen werden.

Am ersten Tag werden wir Ihnen eine Haarprobe entnehmen. Diese ca. bleistiftdicke Strähne entnehmen wir in Absprache mit Ihnen vom Hinterkopf. Da die Haare nicht ausgerissen, sondern kopfhautnah abgeschnitten werden ist das Procedere völlig schmerzlos.

Weiterhin werden wir Sie bitten eine Urinprobe (ca. 10ml) abzugeben.

In 24stündlichen Abständen werden nun jeweils 6µg Clenbuterol p.o. verabreicht. Jeweils ca. 90 min nach Medikamenteneinnahme wird eine Urinprobe (ca. 10ml) abgegeben.

Einen Monat nach Versuchsbeginn werden erneut eine Urin- und eine Haarprobe abgegeben.

Für jeden dieser Termine beträgt der Zeitaufwand circa 10 Minuten.

Risiken und Nebenwirkungen

Für Sie als Proband entstehen durch die sehr geringe Dosierung keine erkennbaren Nachteile, Risiken oder Belastungen. Clenbuterol (Spiropent®) ist ein so genanntes selektives β -2-Sympathomimetikum das spezielle Nebenwirkungen hat, mit denen jedoch bei der Dosisaufnahme im Rahmen der Studie NICHT zu rechnen ist.

Unerwünschte Wirkungen treten unter therapeutischer Anwendung vor allem bei Überdosierung auf: Herzklopfen, Tremor(Muskelzittern), Kopfschmerzen, übermäßiges Schwitzen, Schlaflosigkeit, Muskelkrämpfe, erhöhter Blutdruck und Übelkeit.

Der wachstumsfördernde Effekt des Medikaments, der zur Maststeigerung und zum Doping missbraucht wird, tritt erst bei stark übertherapeutischen Dosen (5-10fach, also das ca. 200fache der Studiendosis) auf.

Sollten Sie wider Erwarten während der Medikamenteneinnahme eines der oben genannten Symptome verspüren möchten wir Sie bitten sich unverzüglich bei uns zu melden.

Vergütung

Durch die Teilnahme an unserer Studie entsteht für Sie eine nicht unerhebliche Zeitbelastung. Als Anerkennung für Ihr Engagement und Ihre Mitarbeit können wir Ihnen eine Aufwandsentschädigung in Höhe von 150,00€ gewähren. Dieser finanzielle Ausgleich kann jedoch nur an ProbandInnen gezahlt werden, die den Versuch komplett absolvieren.

Datenschutz

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.

Sollten Sie von der Teilnahme an der Studie zurücktreten, werden alle bis dahin gesammelten Untersuchungsmaterialien und Daten vernichtet, es sei denn, Sie stimmen einer Untersuchung und Auswertung ausdrücklich zu. In diesem Falle werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiter Prof. Graw.

Die gesondert aufbewahrten personenbezogenen Daten werden nach Ablauf von zwei Jahren vernichtet.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Abschließende Bemerkung

Falls Sie noch Fragen haben, werden wir Ihnen diese gerne beantworten. Wir möchten Sie nochmals darauf aufmerksam machen, dass Sie eine einmal gegebene Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie jederzeit, von sich aus, ohne Nennung von Gründen und Ohne negative Folgen für Sie zurückziehen können.

Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung

Hiermit gebe ich mein Einverständnis für die oben beschriebenen datenschutzrechtlichen Vereinbarungen.

München

Ort, Datum _____ Name _____

Unterschrift

Einwilligung

Ich erkläre mich einverstanden als Proband am oben beschriebenen Versuch teilzunehmen.

München

Ort, Datum _____ Name _____

Unterschrift

Aufklärende/r Ärztin/Arzt

Unterschrift

Mir wurde die Aufwandsentschädigung in Höhe von 150,00€ ausgehändigt.

München

Ort, Datum _____ Name _____

Unterschrift

9.4 Anamnese- und Untersuchungsbogen

Clenbuterol-Studie
LMU

Inst.f.RM

Anamnese/Untersuchung ProbandInnen Testgruppe

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Datum der Untersuchung:

Allgemeinbefund:

Größe:

Gewicht:

Alter:

AZ:

EZ:

Thorax:

un – symmetrisch, Seitengleich beatmet

Pulmo:

sehr – gute – mäßige – keine Atemverschieblichkeit

Sonorer Klopfeschall: ja / nein

Vesikuläres Atemgeräusch: ja / nein

Cor: rhythmisch / arrhythmisch / Extratöne

RR:

Abdomen: weich – gut eindrückbar – gespannt

Resistenzen:

Abwehrspannung:

Darmgeräusche:

Leber nicht/

Querfinger unterhalb des Rippenbogens tastbar

Risikoanamnese:

Arterielle Hypertonie

Diab. Mellitus: Typ 1 Typ 2

Hypercholesterinämie

Nikotin

Alkohol

Eigenanamnese:

Allergie:

HerzKreislauf:

Blutgerinnung:

Vorerkrankungen:

Medikamente:

Infektionen: Hep. A / B / C, HIV andere:

Gravidität:

ja

nein

Laborwerte (GOT, GPT, gGT, alkalische Phosphatase, Bilirubin, kleines Blutbild, Kreatinin) auffällig?

ja

nein

Sonstiges: Fleischkonsum /Woche, Welches Fleisch

Unterschrift Ärztin/Arzt

10. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Matthias Graw für die Überlassung des Themas und die gute, stets sehr schnell und nette Betreuung. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität München, im speziellen Frau Birgit Övgüer für die Unterstützung bei der Probenvorbereitung und -aufbewahrung. Besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Greil bedanken, die die Voruntersuchungen der ProbandInnen ärztlicherseits übernahm.

Ich möchte mich beim Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie (IDAS) für die gute Zusammenarbeit und Probenanalytik bedanken. Besonders bei Dr. Detlef Thieme und Aniko Krumbholz, die mir die Probenanalytik in Ihrem Institut vor Ort erklärten und auch für die gute Kommunikation und Hilfestellung danach. Ebenfalls beim Institut für Biochemie der Sporthochschule Köln, für die Analyse der Urinproben.

Danke für die Unterstützung bei der Handhabung des SPSS-Programms an Elisabeth Schneider. Für die Hilfe in allen statistischen, technischen und sonstigen wichtigen Fragen des Lebens bedanke ich mich sehr bei Kristin Yandirici.

Ich danke meiner Familie und Lars für die Unterstützungen während aller Hochs und Tiefs dieser Arbeit und des gesamten Studiums. Von der ProbandInnenaquise, über die Kommasetzung, (?) bis hin zum Druck wäre alles ohne Euch nie so möglich gewesen.

Ein großes Dankeschön auch an alle meine ProbandInnen.