

St. Marien-Krankenhaus Siegen gem. GmbH · Klinik für Hämatologie

Akademisches Lehrkrankenhaus

Hämatologie/Intern. Onkologie
Chefarzt: Prof. Dr. W. Gassmann

Kampenstraße 51, 57072 Siegen

Telefon 0271 231-1302
Telefax 0271 231-1309
Mobil 0170 9035227

Siegen, 17. Juni 2010

**Gutachten zu den medizinischen Ursachen der oft erhöhten
Retikulozytenzahl bei Frau Claudia Pechstein**

**Überarbeitete und deutlich ausführlichere Version des Gutachtens, das mit Datum vom
1. März 2010 dem Schweizer Bundesgericht vorgelegt wurde.**

Die Abbildungen von Dr. Weimann fehlen.

**Es wurde die Kommentierung der ärztlichen Gutachten umgestellt und viele
Literaturbelege eingebaut.**

1	Curriculum vitae	3
2	Einleitung	3
3	Erythrozytäre Membranopathien – Kugelzellen-Anomalie – Was ist eine hereditäre Sphärozytose	5
	3.1 Allgemeines	5
	3.2 Lyse-Tests, EMA-Test und SDS-PAGE	8
4	Neue Indizes zur Diagnosestellung einer Membranopathie vom Typ einer hereditären Sphärozytose oder Variante	10
	4.1 Der HS-Screening-Index	10
	4.2 Hyperchrome Zellen	13
	4.3 Mikrozyten versus hyperchrome Zellen	14
	4.4 Ret-IRF-Quotient	15
	4.5 Ergebnisse der Diagnostik in der Charité im Dezember 2009	15
	4.6 Eigene Bewertung der Weimann-Daten	17
5	Die Blutbilddaten der Dopingkontrollen von 2000 – 2009	19
	5.1 MCHC-Werte	19
	5.2 Verlauf von Retikulozyten und Hämoglobin über 10 Jahre hinweg	21
	5.3 Nach hohen Retikulozyten über 2.4% steigt der Hämoglobinwert nicht	22
	5.4 Vor hohen Hämoglobinwerten sind die Retikulozytenwerte nicht erhöht	23
	5.5 Weitere Laborparameter der Sphärozytose	24
	5.6 Abgleich der Daten der Doping-Kontrollen mit Dr. Weimanns Befunden	24
6	Zum CAS-Verfahren erstellte Gutachten	25
	6.1 Prof. Dr. D’Onofrio	25
	6.2 Prof. Dr. Schrezenmeier	27
	6.3 Prof. Dr. Heimpel	27
	6.4 Prof. Dr. Dame	28
	6.5 Prof. Dr. Schmidt	29
	6.6 Prof. Dr. Röcker	29
	6.7 Bewertung/Abgleich der Gutachten mit Dr. Weimanns Befunden	34
7	Bewertung der ärztlichen Gutachten zu Claudia Pechstein	35
	7.1 Fakten, über die Gutachter-Konsens besteht	35
	7.2 Fakten, über die Gutachter-Dissens besteht	35
8	Wissenschaftlich Belege	38
	8.1 Lehrbuch: Wintrobe’s Clinical Hematology	38
	8.2 Lehrbuch: Handin Blood – Principles and Practice of Hematology	40
	8.3 Lehrbuch: Lilleyman Pediatric Hematology	41
	8.4 Lehrbuch: Gadner Pädiatrische Hämatologie und Onkologie	42
	8.5 Leitlinie U.K.	43
	8.6 Leitlinie Deutschland Pädiatrie	45
	8.7 Wissenschaftliche Publikation: Kutter, Luxemburg	47
	8.8 Wissenschaftliche Publikation: Cynober U.S.A.	48
	8.9 Wissenschaftliche Publikation: Conway, U.K.	49
	8.10 Wissenschaftliche Publikation: Mariani	50
	8.11 Wissenschaftliche Publikation: Michaels	52
	8.12 Wissenschaftliche Publikation: Perotta	53
	8.13 Wissenschaftliche Publikation: Bruce	55
9	Wie hoch sind die Retikulozytenwerte bei ganz milder Sphärozytose	56
10	Zusammenfassung – Diagnosestellung	58
11	Anhänge: Literaturverzeichnis und Verzeichnis medizinischer Begriffe	63

1 Curriculum Vitae

Alter/Facharzt	60 Jahre	Arzt für Hämatologie und internistische Onkologie/Palliativmedizin
Staatsexamen	1977	
Klinischer Werdegang	1978-1980 1980-1997	Medizinische Universitätsklinik Giessen II. Medizinische Klinik der Christian-Albrechts-Universität Kiel
Habilitation	1989	
APL-Professur	seit 1993	
Krankenhaus	seit 1997	Chefarzt der Klinik für Hämatologie und internistische Onkologie am St. Marienkrankenhaus, Siegen und ärztlicher Leiter des Labors
Fachgesellschaften	2004 - 2008 DGHO	Ärztlicher Direktor des Krankenhauses Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)
Weitere Tätigkeiten	Labor ASCO AIO Instand Netzwerke Soziales	Mitglied im Arbeitskreis Labormedizin der DGHO American Society of Clinical Oncology Arbeitsgemeinschaft für internistische Onkologie Mehrjährig Ringversuchsleiter für Knochenmarkdiagnostik Kompetenznetz akute und chronische Leukämien: Mehrjährig Leiter/Koordinator der morphologischen Leukämie-Diagnostik European Leukemia Net: Mehrjährig Leiter/Koordinator der Diagnostik-Plattform Engagement für die Tour der Hoffnung (Unterstützung für krebskranke Kinder)

2 Einleitung

Mir liegt Dr. Andreas Weimanns Untersuchungsbericht von der Charité Berlin vom 10. Februar 2010 vor. Mit bislang unbekanntem Auswertungsmethodiken diagnostizierte er bei Frau Claudia Pechstein eine hereditäre Membranopathie im Sinne einer hereditären Sphärozytose. Die folgende Stellungnahme dient der Bewertung dieses Befundes und der Prüfung, ob er mit den bekannten Blutwerten der Athletin und den Ergebnissen früherer medizinischer Untersuchungen vereinbar ist.

Zur Vorgeschichte: Bis Mitte Dezember 2009 bin ich aufgrund der Berichterstattung in Presse und Funk davon ausgegangen, dass die Dopingvorwürfe gegen Frau Pechstein stimmen. Ein Kollege hat mich nach einer scherzhaften Bemerkung über die Pechstein-Retikulozyten aufgefordert, ihre Original-Blutwerte anzusehen. Per E-Mail habe ich die Athletin um die Werte gebeten und sie unverzüglich erhalten. Aus der ISU-PDF-Liste habe ich mir eine Excel-Tabelle erstellt. Ich hatte damit unmittelbar den Eindruck, dass hier kein Fall von Doping mit Erythropoetin oder ähnlich effektiven Substanzen (ESA) vorliegt.

Als Mitglied der Arbeitsgemeinschaft Labor in der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie fühlte ich mich nun verpflichtet, der Pechstein'schen Retikulozyten-Problematik auf den Grund zu gehen. Einen Auftrag zu dieser Arbeit habe ich nicht erhalten. Eine Bezahlung meiner Bemühungen ist nicht erfolgt und wird auch für die Zukunft von mir abgelehnt. Die erarbeiteten Tabellen, Abbildungen und Stellungnahmen wurden Frau Pechstein zur Verfügung gestellt, ausdrücklich zur freien Verwendung. Zusätzlich stehen die Dateien jedermann zur beliebigen Nutzung zur Verfügung; Urheberrechte werden nicht geltend gemacht.

Zwei Fragen ergaben sich:

1. Wo könnten sich eventuell hinter den Blutwerten Indizien für Doping mit Erythropoetin oder ähnlich wirkenden Substanzen verbergen.
2. Gibt es Hinweise für eine Erkrankung oder Anomalie, mit der die auf jeden Fall nicht-normalen Retikulozytenzahlen erklärt werden könnten.

Zu Frage 1: Im Weiteren habe ich alles nur erdenkliche versucht, Doping-Spuren in den Blutwerten von 2000 bis 2009 zu finden. Insbesondere habe ich mir natürlich die Werte vor, während und nach Top-Ereignissen wie Olympischen Spielen und Weltmeisterschaften angesehen. Ich habe mich auch gefragt, wie war der Hämoglobinverlauf nach hohen Retikulozytenwerten und wie hoch waren die Retikulozyten vor hohen Hämoglobinwerten. Zusätzlich habe ich nach Blutwertverläufen gesucht, die auf die Entnahme von Eigenblut-Konserven hindeuten könnten sowie auch nach auffällig tiefen Retikulozytenwerten etc. Dies ist schriftlich niedergelegt in folgenden Stellungnahmen:

1. Pechstein 1 – CAS-Urteil Fakten
2. Pechstein 2 – CAS-Urteil Problematisches Verhalten des Gerichts
3. Pechstein 3 – Die Arbeit der Doping-Kontrolleure
4. Pechstein 5 – Doping-Aspekte

Alle drei Papiere können auf der Internet-Site des Marienkrankenhauses Siegen eingesehen werden: www.marienkrankenhaus.com. Als Resümee aller dieser Versuche, Doping-Spuren zu finden, musste/durfte ich feststellen, dass die hohen Retikulozytenwerte von Hamar 2009 mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit **nicht** die Folge eines Epo-ESA-Dopings sein können und dass sich auch in den Jahren vorher keine Belege für Blutdoping welcher Art auch immer finden.

Zu Frage 2: Zur Frage nach Hinweisen auf eine Anomalie zur Erklärung der erhöhten Retikulozytenwerte habe ich mir die ISU-Originaldaten diesbezüglich noch einmal genauer angesehen und mich an Herrn Dr. Lutz, den Verbandsarzt des Deutschen Eisschnelllauf-Verbandes, gewandt. Von dort habe ich die zur Problematik bereits erstellten medizinischen Gutachten und Zusatz-Informationen erhalten. Er stellte auch den Kontakt zu Dr. Weimann von der Charité in Berlin her, der in Zusammenarbeit mit anderen Labormedizinern gerade eine neue Methodik zur Untersuchung von Patienten mit hohen MCHC-Werten, sogenannten Mikro-Erythrozyten (mit normalem Hämoglobingehalt) und wechselnd hohen Retikulozytenzahlen entwickelt hatte, also zur Untersuchung von Menschen, die einzelne Laborphänomene der hereditären Sphärozytose haben, ohne überhaupt irgendwelche Symptome der Erkrankung zu haben. Zu den Begriffen siehe Anhang „Medizinische Begriffe“.

Diese neuen Auswertungs-Algorithmen waren auch mir als ärztlichem Leiter des Labors des St. Marienkrankenhauses Siegen und Mitglied des Arbeitskreises Labormedizin der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie zuvor nicht bekannt gewesen. Dr. Lutz hat mich auf sie aufmerksam gemacht. Sie sind Anlass dieser Stellungnahme und werden im Kontext der ISU-Dopingkontroll-Daten und im Kontext der mir bekannten vorherigen Gutachten bewertet.

3 Erythrozytäre Membranopathien – Kugelzellen-Krankheit – Kugelzellen-Anomalie – hereditäre Sphärozytose – welche Labor-Auffälligkeiten finden sich?

3.1 Allgemeines

„HS“

Hereditäre Sphärozytose = Kugelzellen-Anämie besser Kugelzellen-Krankheit, denn die wenigsten auch der schwer Betroffenen haben eine Anämie. Bei ganz schwachen Erkrankungsformen ist die Bezeichnung Kugelzellen-Anomalie angebracht, denn solche Patienten sind nicht „krank“.

Die Bezeichnung der Krankheit/Anomalie klingt eindeutig: Es handelt sich um die Anämie (= Blutarmut), bei der ein Teil der roten Blutkörperchen kugelförmig aussieht. Die Bezeichnung ist missverständlich, denn die meisten kranken Erythrozyten haben über lange Zeit hinweg die optimale Scheibenform und nur ein kleiner Teil zirkuliert in Kugelform.

In Wirklichkeit gibt es sehr viele verschiedene Krankheiten, bei denen die Erythrozyten Kugelform annehmen. Die Kugelform ist nicht das zu Grunde liegende Krankheitsprinzip sondern Ausdruck verschiedenster Schädigungstypen des Erythrozyten; er ist danach nicht mehr dazu in der Lage, die für die Sauerstoff-Versorgung des Gewebes bessere Scheibenform zu halten und wird passiv zur Kugel.

Der Vererbungsmodus ist unterschiedlich: teils rezessiv, teils dominant. Dominante Vererbung bedeutet, man ist auch krank, wenn von einem Elternteil das gesunde Gen und vom anderen das kranke Gen geerbt hat. Rezessiv heißt, dass die Erkrankung von Vater und Mutter vererbt sein muss. Der Ausprägungsgrad der verschiedenen Formen von Kugelzellenanämie kann extrem unterschiedlich sein.

Auch die Vorstellung, bei Kugelzellen-Anomalie müsse man sich die Erythrozyten nur mit dem Mikroskop ansehen und könnte dann die Diagnose stellen, ist falsch. Selbst bei schweren Fällen findet man oft nur mit Mühe einzelne Kugelzellen; die aber kann man auch bei Gesunden finden. Ein Kind mit Sphärozytose, das sich im April 2010 erstmals mit folgender Laborkonstellation bei mir vorgestellt hat, zeigte eine schwere hämolytische Konstellation: Hämoglobin 10 g/dl, große Milz, sichtbare Gelbfärbung mit Bilirubin 3.5 mg/dl und eine

LDH von 800 U/l bei 9.5% Retikulozyten. Sichere deutlich vermehrte Kugelzellen habe ich nicht gefunden.

Einteilung der erythrozytären Membranopathien

Die Gruppe der erythrozytären Membranopathien umfasst neben den sehr vielen verschiedenen Formen der klassischen Sphärozytosen auch noch folgende Membranopathie-Varianten. Die Abgrenzung untereinander ist nicht genetisch/molekularbiologisch definiert und orientiert sich mehr am schwer interpretierbaren Ausfall von Labortests wie den osmotischen Resistenztests:

- Hereditäre Sphärozytose
- Hereditary spherocytosis with a low temperature leak
- Hereditäre Stomatozytose
- Dehydrierte hereditäre Stomatozytose – Hereditäre Xerozytose
- Hereditäre Stomatozytose mit Überwässerung der Erythrozyten
- Hereditäre Stomatozytose „Blackburn“
- Familäre Pseudohyperkaliämie
- Mediterrane Stomatozytose
- Hereditäre Kryohydrozytose
- Stomatin-Mangel-Kryohydrozytose
- Hereditäre Elliptozytose
- Hereditäre sphärozytäre Elliptozytose
- Hereditäre Poikilozytose (Pyropoikilozytose)
- Südostasiatische Ovalozytose
- High phosphatidyl choline hemolytic anemia (HPCHA)

Krankheitsbild

Wenn ein Patient – in der Regel schon in der Kindheit – wegen einer Kugelzellen-Krankheit einen Arzt aufsucht, besteht keinerlei Zweifel daran, dass er krank ist. Er leidet mehr oder weniger sichtbar am vorzeitigen Zerfall ihrer roten Blutkörperchen. Dies führt zu Ikterus (Gelbfärbung der Haut durch Abbauprodukte des Hämoglobins), zur Vergrößerung der Milz und im Extremfall zur Anämie. In der Regel gleicht das Knochenmark den vorzeitigen Verlust jedoch aus; es kann seine Aktivität durchaus um den Faktor 10 steigern.

Milde Formen

Neben klinisch auffälligen Patienten gibt es auch solche, die nur ganz diskrete Veränderungen im Sinne einer Sphärozytose aufweisen. Bei diesen in der Regel nur Labormedizinern auffallenden Veränderungen handelt es sich zum einen um den MCHC-Wert, der bei Gesunden ohne Eisenmangel sehr stabil ist und normalerweise als Indikator für die Fehlbestimmung eines der Erythrozyten-

Parameter herangezogen werden kann, wenn man frühere Vergleichswerte des Patienten hat. Es gibt praktisch keine Blut-Erkrankung, die mit erhöhten MCHC-Werten verbunden ist außer den hämolytischen Erkrankungen insbesondere vom Typ der Sphärozytose und der Hämoglobin-CC-Krankheit bzw. -Anomalie und Stomatozytosen.

Weitere in der Regel nicht auffallende Parameter können die Zahl der hyperchromen/hyperdensen Erythrozyten sein, die in Folge Wasserverlustes durch die defekte Membran austrocknenden Erys entsprechen. Daneben kann die Retikulozytenzahl erhöht sein, wie auch die LDH und der Bilirubinwert.

Stille Träger

Was sind stille Träger?

Stille Träger sind Menschen, die eine rezessive Form (siehe oben) der Erkrankung in ihrem Erbgut tragen. Diese Defekte werden nur dann voll wirksam, wenn sie von Vater und Mutter ererbt werden. Der Betroffene trägt also nur die Anlage in sich, er ist in der Regel nicht oder nur minimal betroffen. Laut Lehrbüchern hat ein Mensch von 20.000 eine rezessiv vererbte Kugelzellenanämie. Allerdings gibt es auch Zweifel an der Häufigkeitsangabe von 1:20.000. Im täglichen ärztlichen Leben von Pädiatern, die sich intensivst um Menschen mit Erkrankungen der Erythropoese bemühen, tauchen sicher rezessiv vererbte Fälle nur sehr selten auf (persönliche Mitteilung Frau Dr. Roswitha Dickerhoff, Bonn, Düsseldorf). 75% der Patienten haben eine sicher dominant vererbte Form der Erkrankung. In der Gruppe der scheinbar rezessiven können sich auch noch Neu-Mutationen verbergen, die sich dann in der nächsten Generation als dominant demaskieren.

Aus einer publizierten Häufigkeit von 1:20.000 wie oben mit allen Einschränkungen angegeben errechnet sich, dass 1.4% der Bevölkerung stille in der Regel asymptotische Träger einer rezessiven Form einer Kugelzellenanämie sein müssten (Lehrbuch: Handin, Lux, Stossel: Blood - Principles and Practice of Hematology, Kapitel 54, Seiten 1701-1818).

Stille Träger der Sphärozytose-Anomalie haben meist verminderte Haptoglobinspiegel, erhöhte Retikulozytenzahlen bei 2.1 +/- 0.8%, verminderte osmotische Resistenz. „Carriers can be detected reliably only considering the results of a battery of tests.“ (Lehrbuch: Handin, Lux, Stossel: Blood - Principles and Practice of Hematology, Kapitel 54, Seite 1756).

3.2 Lysetests, EMA-Test und SDS-PAGE

Prinzipielles Alle Lyse-Tests basieren im Wesentlichen auf Kugelzell-Eigenschaft und können nicht optimal zwischen hereditärer Sphärozytose und Kugelzellen bei Auto-Immuhämolyse unterscheiden.

Osmotischer Resistenztest

Erythrozyten werden in unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen inkubiert, beginnend mit der physiologischen Konzentration von 0.9%. Gesunde Zellen vertragen niedrige Salzkonzentrationen besser als solche von Kugelzell-Anomalie-Patienten. Dementsprechend platzen gesunde rote Blutkörperchen erst z.B. bei 0.4%iger NaCl-Lösung, während dies bei Kugelzell-Erys schon bei 0.45% passiert. Die Lyse wird gemessen über den Hämoglobingehalt des Überstandes.

Inkubierter osmotischer Resistenztest

Gleiches Testprinzip wie oben beschrieben. Das Blut wird aber über 24 Stunden hinweg bei 37° vorinkubiert. Dadurch werden sie Zellen empfindlicher für den anschließenden Test. Der Test wird als „almost always positive“ (Lux und Palek) beschrieben, also nicht in jedem einzelnen Fall. Dies wird auch durch die Vielzahl von publizierten Modifikationen deutlich, die eine verbesserte aber umstrittene Sensitivität haben sollen.

AGLT

Acidified glycerol lysis test

Eine deutsche Bezeichnung dieses Testverfahrens wird üblicherweise nicht verwendet. Nach meinem Verständnis müsste er mit „angesäuerter Glycerin-Lyse-Test“ übersetzt werden. Glycerin vermindert die Schwellung der Erythrozyten unter den osmotischen Verhältnissen eines osmotischen Resistenztests. Dadurch überstehen sie niedrigen osmotischen Umgebungsdruck besser. Der Test wird von einigen auch mit 24-stündiger Vorinkubation beim Raumtemperatur durchgeführt. Mittels eines turbidometrisches Verfahrens wird der Abfall der Lichtabsorption gemessen. Die T1/2 für Gesunde liegt bei über 30 Minuten, für Sphärozytose-Patienten z.B. bei weniger als 5 Minuten.

Pink test

Modifizierter AGLT

Hypertoner Cryohämolyse-Test

Dieser Test basiert darauf, dass Sphärozytose-Erythrozyten bei Null Grad in hypertonen Lösungen deutlich stärker hämolysieren als gesunde Zellen.

Autohämolyse-Test Blut wird über 48 Stunden inkubiert, die resultierende Hämolyse gemessen.

Osmotische Gradienten-Ektazytometrie

Dieses Verfahren steht insbesondere in Frankreich und in den U.S.A. zur Verfügung. Mir ist keine Klinik in Deutschland bekannt, die damit ausreichende Erfahrung hat.

„Hierbei wird die zu testende Erythrozyten-Probe bei kontinuierlich ändernder Osmolarität ektazytometriert. Dabei entsteht eine Kurve, das *Ektazytogramm*, mit der Osmolarität als Abszisse und dem Deformabilitäts-Index als Ordinate. Mittels dieser Kurve können einige Parameter des untersuchten Blutes abgelesen werden:

- Die Osmolarität, bei welcher 50 % der Erythrozyten hämolysieren. Die Aussagekraft dieses Wertes ist vergleichbar mit dem einer osmotischen Resistenzprüfung.
- Die maximale Deformabilität der Erythrozyten
- Das Verhalten der Deformabilität im hyperosmolaren Milieu

Hereditäre hämolytischen Anämien lassen sich mittels Osmotengradienten-Ektazytometrie genauer charakterisieren, insbesondere lassen sich Störungen der erythrozytären Membran gut erkennen. Die Ektazytometrie ist auch in der Lage, eine Aussage zum momentanen Zustand der Erkrankung zu geben. Beispiele solcher Erkrankungen sind die Hereditäre Sphärozytose und die Ellipsozytose. Es gibt aber Hinweise, dass es auch bei anderen Erkrankungen zu einer Störung der Deformabilität der Erythrozyten kommt, welche mittels Ektazytometrie genauer beschrieben werden könnte. Dennoch ist die Ektazytometrie als experimentell zu betrachten, die Auswertung bedarf einer gewissen Erfahrung mit dieser Methode und genaue Kenntnis der vielen möglichen Störfaktoren.

Die Ektazytometrie ist eine sehr selten angewandte Methode und wird nur an sehr wenigen universitären Zentren angeboten, im deutschsprachigen Raum nur in der Klinik für Hämatologie am Universitätsspital Zürich“ (aus Wikipedia wörtlich kopiert). In Medline finden sich für die letzten 5 Jahre weltweit insgesamt nur 18 Publikationen, in denen das Wort „ektacytometry“ vorkommt.

EMA-Test

Beim durchflusszytometrischen EMA-Test wird dabei die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes Eosin-5-Maleimid (EMA) an das Protein-3 bzw. Bande-3-Protein der Erythrozytenmembran untersucht.

SDS-PAGE

Steht für: „sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis“, auf deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese. SDS-PAGE ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, einer analytischen Methode der Biochemie zur Trennung von Stoffgemischen im elektrischen Feld. Damit wird der Protein-Defekt analysiert, der zum Bild der Kugelzell-Krankheit geführt hat.

4 Neue Indizes zur Diagnosestellung einer hereditären Sphärozytose oder Variante

Ausgangslage: Bericht von Dr. Andreas Weimann, Labormedizin, Charité, Berlin, vom 10. Februar 2010 zu neuen Untersuchungsmethoden und neue Indizes zur Diagnosestellung einer hereditären Sphärozytose bei Frau Claudia Pechstein

Neue Messmethodik Seit langem ist das labormedizinische Problem der ganz diskreten „hämolytischen“ Konstellation bekannt mit hohen MCHC-Werten und anderen inkonstanten Hämolyse-Indikatoren. Es sind nicht viele Menschen, die solch eine Konstellation aufweisen, aber es gibt sie doch immer wieder. Mit der Verbesserung der Mess-Technik bei den Hämatologie-Automaten haben sich in letzter Zeit neue Wege eröffnet. Im Jahr 2009 wurden zwei neue Index-Werte für die Differentialdiagnose von Patienten mit asymptomatischer fraglicher hämolytischer Konstellation etabliert. Der eine wird errechnet aus den Parametern Mikro-Erythrozyten dividiert durch hypochrome Erys (mit zu wenig Hämoglobin). Der zweite errechnet sich bei Zählautomaten der Firma Sysmex aus der Zahl der Retikulozyten dividiert durch die Zahl unreifen Retikulozyten. Erstmals berichtet wurde über beide Scores auf einer Fachtagung im Mai 2009 (siehe Gutachten Dr. Weimann).

Bei den neuen Indizes handelt es sich um den HS-Screening-Index und um den Retikulozyten-IRF-Quotienten.

4.1 Der HS-Screening-Index

Der HS-Screening-Index ist der Quotient aus besonders kleinen Erythrozyten (%MicroR) dividiert durch den Prozentsatz von Erythrozyten mit auffällig wenig Hämoglobin (%HYPO-He). Der Indexwert selbst ist seit langem bekannt und wird von einigen Zählgeräten angezeigt – nicht bekannt war er jedoch bislang in seiner Eigenschaft als Diagnostikum für die hereditäre Membranopathien vom Typ der Sphärozytose. Allerdings fristete er bislang eher ein Schattendasein und wurde kaum beachtet. Wie wenig er beachtet wurde, zeigt sich auch daran, dass der Index selbst in der unten erwähnten Publikation von Urrechaga als neu bezeichnet wird. Wörtlich heißt es in der Summary: “The aim of the study was to assess the predictive value of the new index % microcytic/% hypochromic ratio in the differential diagnosis of beta-thalassaemia compared with Mentzer index, currently used in our Laboratory“ (Hervorhebung durch mich). Offenbar wusste selbst eine auf diesem Gebiet forschende Ärztin nichts von der schon langen Existenz des Index-Wertes.

Er findet sich auch schon auf Frau Pechsteins Laborausdruck vom 4. Februar 2000. Dort sind 0.7% Mikrozyten angegeben und 0.0% hypochrome Zellen. Durch Division der beiden Werte errechnete der Computer eine %Mikro/%Hypo-Ratio von 73.25 sehr verdächtig für eine Sphärozytose. Da die Division durch Null zu einer unendlich großen Zahl führen würde und nicht erlaubt ist, wird deutlich, dass sich weiter hinten nach dem Komma noch Zahlen befunden haben müssen. Rechnet man zurück, ergeben sich 0.0096% hypochrome Zellen. An dieser Stelle wird auch deutlich, dass der Score problematisch sein kann, wenn der Divisor wie hier sehr klein ist.

Auch, wenn der Score problematisch sein kann, interessieren die zugrunde liegenden biologischen Gegebenheiten. Im täglichen ärztlichen Leben in Mitteleuropa beruhen mit Abstand die meisten mikrozytären Anämien (also Anämien mit auffällig kleinen Erythrozyten) auf einem Eisenmangel. Das Prinzip besteht darin, dass bei Eisenmangel viele Erythrozyten einerseits zu wenig Hämoglobin haben, weil der entscheidende Werkstoff für die Produktion, das Eisen, fehlt. Andererseits sind diese Zellen dann auch klein, weil zu wenig vom entscheidenden „Inhaltsstoff“ des Erythrozyten, dem Hämoglobin vorhanden ist. Jeder Erythrozyt hat zu wenig Hämoglobin. Hinzu kommt als weiteres Phänomen, dass nicht nur die Menge des Hämoglobins zu gering ist; zusätzlich ist auch die Konzentration des Hämoglobins in der Zelle (also Hämoglobin pro Volumeneinheit) reduziert. Letzterer Parameter wird dadurch dargestellt, dass man angibt, wie viel Hämoglobin 100 ml Erythrozyten hätten, wenn alle genau so wären wie der gerade analysierte. Im Zählgerät wird diese Rechnung für jede einzelne Zelle durchgeführt.

Dementsprechend wird der Quotient aus beiden bei Eisenmangel bei knapp über „1“ liegen: Die zu kleinen Zellen haben auch zu wenig Hämoglobin pro Volumeneinheit.

Nachdem dieser Index viele Jahre kaum beachtet wurde, sah Frau Urrechaga, dass er insbesondere für die oft schwierige Abgrenzung des Eisenmangels von den vielen Formen heterozygoter Thalassämie genutzt werden kann. Wichtigstes Erkennungsmerkmal der heterozygoten Thalassämie ist auf jeden Fall die einfach labortechnisch verfügbare Erythrozyten-Verteilungs-Breite (EVB, im anglo-amerikanischen RDW = Red cell Distribution Width). Sie spiegelt das Ausmaß der Anisozytose (Ungleichheit der Zellgröße) wider. EVB bzw. RDW werden verwendet, um bei mikrozytärer Anämie die beiden Hauptvertreter, Eisenmangelanämie bzw. heterozygote Thalassämien, zu unterscheiden. Unter normalen Bedingungen verteilt sich das MCV so um den Mittelwert (80 – 95 fl ab dem 7. Lebensjahr), dass eine schmale Gauss'sche Kurve entsteht. Die normale EVB ist 11 – 15 %. Bei Eisenmangel werden die neugebildeten Erythrozyten immer kleiner, d. h. die Kurve der

Volumenverteilung verbreitert sich nach links in den Bereich des niedrigen MCV: die EVB (RDW) wird größer als 15%. Die EVB ist der erste Laborwert, der sich bei beginnendem Eisenmangel verändert, vor MCV und Hämoglobin. Fazit: bei niedrigem MCV spricht eine erhöhte EVB für einen Eisenmangel, eine normale EVB für eine heterozygote Thalassämie.

Beide Erkrankungen/Anomalien (Eisenmangel und heterozygote Thalassämie) haben in der Regel zu kleine Erythrozyten, sie sind also mikrozytär. Der Hämoglobingehalt jedes einzelnen Erythrozyten ist bei beiden reduziert. Entscheidender zusätzlicher Unterschied ist jedoch, dass die Erythrozyten bei den Trägern der Thalassämie-Anlage (=heterozygote Merkmalsträger) eine normale Hämoglobinmasse pro Volumeneinheit haben im Gegensatz zum Eisenmangel. Diese Tatsache drückt sich auch aus in verminderten MCHC-Werten beim Eisenmangel und normalen bei der Thalassämie (MCHC = Hämoglobin pro 100 ml Erythrozyten, nicht pro 100 ml Blut).

Aus dem Gesagten ergibt sich, dass bei Eisenmangelanämien viele hypochrome Erythrozyten vorhanden sind und bei der Thalassämie nicht. Deshalb ist der Quotient aus sehr kleinen Erythrozyten dividiert durch hypochrome Zellen deutlich größer als bei Eisenmangel.

Zu dieser Thematik gab es in den letzten Jahren einzelne Publikationen (E. Urrechaga: Int. J. Lab Hematol 31: 528, Oktober 2009). Hohe Quotienten wurden bei Thalassämie gefunden, niedrige bei Eisenmangel.

Gesunde	0.57% +/- 0.56%	mikrozytäre Erys
	0.15% +/- 0.56%	hypochrome Erys
Eisenmangel	28.8% +/- 20.9%	mikrozytäre Erys
	20.4% +/- 19.6%	hypochrome Erys
Thalassämie	36.5% +/- 13.6%	mikrozytäre Erys
	3.4% +/- 2.87%	hypochrome Erys

Ausgangspunkt für die Nutzung dieses lange bekannten Quotienten für die Differentialdiagnose der Sphärozytose war die Tatsache, dass der Quotient wegen der bekannten Pathophysiologie auch bei dieser Erkrankung hoch sein müsste. Zentrales Prinzip ist der Flüssigkeitsverlust der Erythrozyten wegen der nicht optimalen oder schwer defekten Membran, während das Hämoglobin in der Zelle verbleibt und sich somit seine Konzentration in ihr erhöht. Man spricht hier deshalb von hyperchromen Zellen (= Zellen mit besonders konzentriertem Farbstoff).

Der Index liefert somit als Screening-Instrument einen Parameter, der vom Zählgerät automatisch angezeigt wird und somit ohne Mühe jederzeit verfügbar ist. Er stellt keine Diagnose, sondern gibt Anlass zu weitergehender Diagnostik, wobei in einem ersten Schritt eine Thalassämie ausgeschlossen werden muss und sehr leicht

differentialdiagnostisch abgetrennt werden kann. An dieser Stelle soll jedoch nicht Werbung für die Nutzung des Indexes bei heterozygoter Thalassämie gemacht werden, da der RDW-Wert (siehe oben) wahrscheinlich bei dieser Erkrankung gleiches kann und schon heute überall verfügbar ist. Leider wird er bei vielen Krankenhaus- und Praxis-EDV-Systemen nicht von der Labor-EDV übernommen und den Ärzten nicht zur Verfügung gestellt. Letztere kennen die Bedeutung dieses wichtigen Laborparameters oft auch nicht.

Fazit

Der Quotient aus Mikrozyten und hypochromen Erys soll zwar die Diagnose sichern, hat aber auch eine wichtige Screening-Funktion. Der hohe Mikro-Hypo-Quotient gehört zur Diagnosestellung dazu. Er ist jedoch kein Alleinstellungsmerkmal der Sphärozytose.

4.2 Hyperchrome Zellen sind kleine Erys – aber sind sie auch Mikrozyten?

Hyperchrome/hyperdense Erythrozyten sind bei jedem Menschen zu finden. Es sind dies durch Wasserverlust geschrumpfte Zellen. Siehe auch MCHC-Wert. Diese Zellen sind zugleich die Indikatorzellen für die verschiedenen Formen der Sphärozytose und der Xerozytose. Davon betroffene Patienten haben einen Anteil von 5-55% hyperchromer Erys (Cynober et al J. Lab. Clin 1996).

Vor 10 Jahren am 4. Februar 2000 (siehe Anhang), wurden bei Claudia Pechstein 16.2% gezählt; es ist dies eine der wenigen Untersuchungen, von der mir eine Kopie des Laborwertausdrucks vorliegt. Am 6. Februar 2009, bei der zur Sperre führenden Blut-Untersuchungen in Hamar, wurden 5% gezählt. Dies ist mehr als in der Allgemeinbevölkerung; der Normbereich geht für einige Autoren bis 2.5%, einzelne geben Werte bis 4% als normal an.

Technische Ergänzung: Viele moderne Zählautomaten für Blutzellen bestimmen die Größe jedes einzelnen Erythrozyten sowie seine Hämoglobinmasse. Ein Erythrozyt wird als hyperchrome Zelle gewertet, wenn sein Hämoglobingehalt und seine Größe so ist, dass, wenn alle Erys ihm gleich wären, der MCHC-Wert (Hämoglobin pro 100 ml Erys) über 41 g/dl läge. Als untere Grenze für hypochrome Zellen (besonders häufig bei stimulierendem Blutdoping, insbesondere wenn ohne Eisen-Gabe gedopt wird) gilt 28g/100ml Erys. Die Mitte dieses Bereiches liegt bei 34.5 g/dl und entspricht in etwa einem Standard-MCHC-Wert.

Hyperchrome Zellen sind folglich mehr oder weniger geschrumpfte Erythrozyten, deren Hämoglobinkonzentration (Gramm pro 100 ml Erys) mehr als 19% über der Mitte des definierenden Bereiches liegt.

Kleine Erythrozyten, so genannte Mikrozyten, sind definiert als Zellen mit einem Volumen unter 60 fl (Femtoliter), Makrozyten sind größer

als 120 fl. Folglich sind Mikrozyten solche Zellen, die 33% kleiner sind als die Mitte des Definitionsbereiches von 60-120 fl.

4.3 Mikrozyten versus hyperchrome Zellen

Grundsätzlich bei vergleichbarer Definition müsste der Prozentsatz von Mikrozyten und hyperchromen Zellen bei einer Sphärozytose gleich sein. Denn beiden Phänomenen zugrunde liegt bei den Membranopathien der Erythrozyten wie der Kugelfellen-Anämie die Austrocknung der Zellen durch Wasserverlust durch die defekte Membran.

Da aber für die Definition des Mikrozyten eine 33%ige Abweichung von der Mitte des definierenden Bereiches gefordert wird, bei den hyperchromen Zellen jedoch nur eine solche von 19%, besteht bei blanden Erkrankungsformen eine Diskrepanz mit niedrigeren meist auch normalen Zahlen für die Kategorie „Mikrozyten“, während der Prozentsatz hyperchromer Zellen deutlich erhöht ist. Bei den Pechstein-Werten im Anhang im Jahr 2000 kann man dies nachvollziehen. 16.2% der Zellen sind hyperchrom, während der Prozentsatz mikroytärer Zellen nur bei 0.7% liegt.

Der absolute Wert der Mikrozyten ist „normal“. Er ist aber viel niedriger als die hyperchromen Zellen signalisieren und erhöht in Relation zur Zahl der hypochromen Erys, mit denen er ohne Sphärozytose ja parallel laufen müsste.

Dies wird auch deutlich in der nachfolgend zitierten Studie von Cynober et al (J Lab Clin Med 1996; 128:259-69). Der Prozentsatz mikrozytärer Zellen spiegelt dementsprechend den Schweregrad der Erkrankung wider; diese Zellen sind im Mittel um mehr als 33% geschrumpft und stehen unmittelbar vor der Lyse.

Cynober:

“Using new approaches to quantitate various physiologically relevant red cell parameters, we evaluated the pathobiology of red cells in a large series of 55 non-splenectomized and 31 splenectomized patients with HS. Red cell membrane surface area, surface area-to-volume ratio, cell volume, and state of cell hydration were quantitated. We found that decreased membrane surface area is a distinguishing feature of red cells in all patients studied, whereas decreased surface area-to-volume ratio as reflected by increased osmotic fragility is noted in only 66% of the 55 non-splenectomized patients. The percentage of microcytes was a good indicator of the severity of the disease, but it was not a good discriminator of HS phenotype. In contrast, the percentage of hyperdense cells was a good discriminator of HS phenotype but a poor indicator of disease severity. These findings have enabled us to define the dominant cellular changes that account for the clinical expression of this common red cell membrane disorder. Furthermore, the data we have

obtained allow us to propose improved approaches for diagnosis and phenotypic classification of HS.”

4.4 Ret-IRF-Quotient

Retikulozyten sind dadurch definiert, dass in ihnen noch Erbinformation zur Protein-Produktion (RNA) vorhanden ist. Diese RNA kann mit Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt werden. Ist noch viel RNA vorhanden, sind die Retis jung oder unreif, haben sie nur noch wenig RNA sind sie reif. Haben sie nur noch minimal wenig, sind sie keine Retikulozyten mehr sondern normale Erythrozyten. Dieser Entwicklungsprozess läuft im Blut in der Regel innerhalb von 24 Stunden ab. Zuvor haben die Zellen drei Tage als Retikulozyten im Knochenmark gelebt.

Bei den Membran-Anomalien der Erythrozyten wie bei der hereditären Sphärozytose ist die Zellmembran geschädigt. Damit ist der Metabolismus des Fluoreszenz-Farbstoffes, der die Retikulozyten als solche marliert, verändert. Dieser Farbstoff muss einerseits schnell in die Zellen hinein kommen und, falls er nicht von „RNA“ gebunden wird, schnell wieder hinaus. Bei defekter Zellwand ist dieser Prozess zumindest beim System der Firma Sysmex gestört. Dadurch besteht eine Tendenz, einerseits die Gesamtzahl der Retikulozyten zu überschätzen und andererseits den Anteil der unreifen Retikulozyten zu unterschätzen. Daraus resultiert, dass der Anteil von „unreifen Retikulozyten“, die sich durch viel Fluoreszenzfarbstoff auszeichnen, erniedrigt zu sein scheint.

Diese Kombination von mehr oder weniger hoher Retikulozytenzahl mit einer scheinbar erniedrigten Fraktion unreifer Retikulozyten (IRF) ist bei einer Membranopathie vom Typ Kugelzellenanämie oder Variante als differentialdiagnostischer Parameter zur Abgrenzung anderer hämolytischer Anämien hilfreich. Patienten mit Kugelzellen-Anämie fallen dementsprechend durch einen hohen Quotienten aus Retikulozyten und dem Prozentsatz unreifer Retis auf.

Das Phänomen der Unterschätzung der Zahl unreifer Retikulozyten bei Membranopathien war bislang unbekannt. Nach Prof. Dr. D'Onofrio ist Dr. F. Mullier der Erstbeschreiber dieses Phänomens.

Dieses Phänomen ist am Sysmex-System etabliert. Ob es auch bei anderen Hämatologie-Automaten zutrifft, muss noch untersucht werden. Beim gänzlich anderen Testsystem des Advia-Gerätes ist es nicht der Fall.

4.5 Ergebnisse der Diagnostik in der Charité im Dezember 2009

Vorgehen Vom 01.12.2009 bis zum 16.12.2009 wurde an 5 Tagen 6 Blutproben mit jeweils 3-fachen Messungen von Frau Pechstein analysiert. Zusätzlich wurde die Familie untersucht.

Retikulozyten Bei Messung im Dezember 2009 lag die Retikulozytenzahl bei allen Messungen im Normbereich und deutlich unter den Werten von Patienten mit Kugelform-Anämie (HS = hereditäre Sphärozytose).

Die Werte von Claudia Pechstein „CP“ lagen im Dezember 2009 bei 40.000/ μ l bei Messung mit einem Sysmex-Gerät. Bei den 10-jährigen ISU-Kontrollen hatte der Mittelwert bei 91.000/ μ l gelegen meist mit einem Advia-Gerät gemessen.

MCHC Der **durchschnittliche MCHC lag bei 36,2 g/dl** (Min 35,7 g/dl und Max = 36,5 g/dl). Alle Werte wurden auf einem Sysmex-Gerät ermittelt. Der Referenzbereich liegt bei 31,8-34,7 g/dl)

Damit liegen die MCHC-Werte der Athletin oberhalb der 3 fachen Standard-Abweichung einer Referenzpopulation.

Erythrozyten-Indizes vor und nach morgendlicher Belastung

Blut wurde vor und nach schwerer sportlicher Belastung untersucht. Die Erys verlieren unter Belastung offenbar Flüssigkeit. Dementsprechend fällt der MCV, der MCHC steigt.

	MCHC g/dl	MCV fl	MCH pg/E
1. Dez. morgens	35.3	86.2	30.7
1. Dez. mittags	36.7	84.7	31.1
2. Dez. morgens	35.5	86.6	30.9
2. Dez. mittags	36.9	84.5	31.2

Haptoglobin Auch im Dezember in Berlin lagen die Haptoglobinwerte wieder im unteren Grenzbereich zwischen 38 und 53 mg/dl.

HS-Screening-Index Im Dezember 2009 wurde im Rahmen der Blut-Diagnostik in der Charité wiederholt der Prozentsatz mikrozytärer und hypochromer Erythrozyten bestimmt. Insgesamt wurden der HS-Screening-Index an 6 Tagen in 7 Blutproben mit jeweils 3-fachen Messungen bestimmt.

Der Prozentsatz mikrozytärer Erythrozyten lag mit 1.1 - 1.4% im Normbereich, 0.2 - 0.3% der Zellen waren hypochrom. Aus diesen jeweils normalen Werten errechnen sich HS-Screening-Indizes von 6 bis 7. Werte über 4 sind pathologisch und Ausdruck der Tatsache, dass die sehr kleinen Zellen keine Verminderung der Hämoglobin-Konzentration aufweisen.

Der Index war bei Frau Pechstein erhöht wie bei hereditärer Membranopathie vom Typ Sphärozytose.

Retikulozyten-IRF-Quotient

Die Retikulozytenzahl war im Dezember 2009 bei Messung in der Charité immer normal. Im Gegensatz dazu wurde der Anteil unreifer Retikulozyten mit Werten zwischen 0.5 und 3% bestimmt. Der Normbereich liegt zwischen 1 und 17%. Diese Normbereichsgrenzen machen auch deutlich, dass man diese fundamentale diagnostisch wichtige Eigenschaft der Sphärozytose-Erythrozyten nicht nutzen kann, wenn man sich auf eine monoparametrische Betrachtung beschränkt. Wenn der Normbereich so breit und die Untergrenze fast bei Null liegt, gibt es keine sicher erniedrigten Werte.

Der zweite neu entwickelte Quotient aus Retikulozytenzahl und IRF (immature reticulocyte fraction) zeigte ebenfalls das klare Bild einer abortiven Sphärozytose (Quelle: Francois Mullier, SYSMEX Europa Symposium 2009, Istanbul, Vortrag).

Familie

Der Hämoglobinwert der Mutter wurde bei mehreren Messungen zwischen 14.7 und 15.8 g/dl gemessen, der des Vaters zwischen 15.4 und 15.7 g/dl. Claudia Pechstein liegt somit mit ihrem eigenen Hämoglobinwert (Mittelwert 14.5 g/dl) über die gesamte 10-jährige Beobachtungszeit im „familiären“ genetisch determinierten Bereich, sofern man der Familie nicht Doping für diese Untersuchung unterstellt..

Vater

Der Vater hat wie Claudia Pechstein ebenfalls einen erhöhten MCHC-Wert (siehe Abbildung) und einen erhöhten Anteil hyperchromer Zellen (9.5%) – die primäre Verdachtskonstellation einer sphärozytischen Konstellation. Bei ihm sind Haptoglobin und die anderen Hämolysparameter normal.

Bei der Mutter ist der Anteil hyperchromer Zellen auch erhöht, aber geringer und der MCHC-Wert ist nur grenzwertig. Zwei untersuchte Geschwister waren bezüglich der hämolytischen Parameter unauffällig (siehe obige Abbildung).

Resümee-Familie

Die komplette Familie wurde untersucht. Bei Claudia Pechstein haben sich bekannten Befunde einer hämolytischen Konstellation bestätigt. Der Vater hat die gleiche Konstellation in milderer Ausprägung.

Bei der Mutter ist der Anteil hyperchromer Zellen auch erhöht, aber geringer und der MCHC-Wert ist nur grenzwertig. Zwei untersuchte Geschwister waren bezüglich der hämolytischen Parameter unauffällig (siehe obige Abbildung).

4.6 Eigene Bewertung der Weimann-Daten

Bewertung

Die nach meiner Kenntnis erstmals durch Dr. Weimann in der klinischen Praxis angewandte, zusätzliche Spezialdiagnostik mit den neuen im Jahr 2009 etablierten Indizes und der

Familienuntersuchung hat die vermutete, aber im CAS-Verfahren noch nicht als erwiesen betrachtete Diagnose einer abortiven Membranopathie der Erythrozyten im Sinne einer Sphärozytose gesichert. Bei Gesamtbetrachtung aller oben diskutierter Befunde und nach den Leitlinien der Task Force of the British Committee for Standards in Haematology sowie auf der Basis international genutzter Fach-Lehrbücher und auf der Basis von wissenschaftlichen Publikationen besteht nun **kein Zweifel** mehr daran, dass die Blutbildkonstellation bei der WM in Hamar auf die hämolytische Konstellation einer **erythrozytären Membranopathie vom Typ der Sphärozytose oder Variante** zurückgeht.

Es ist zusätzlich davon auszugehen, dass die neuen Indizes die Zahl der erkannten Träger/Patienten mit Sphärozytose-Konstellation deutlich erhöhen wird, weil sicherlich auch ein Teil der Träger rezessiver Sphärozytose-Mutationen (je nach Schätzung bis zu 1% in der Allgemeinbevölkerung siehe unten) aber ebenfalls sicher nicht alle bei diesen neuen Techniken auffällig sein werden.

Resümee-Proteintyp Bei Voruntersuchungen mit dem Säure-Hämolyse-Test und zur Suche einer speziellen Protein-Anomalität war keiner der bekannten Defekte identifiziert worden. Nach Perrotta (Lancet 372: 1411-1426, 2008) werden folgende proteinchemische Sphärozytose-Typen wörtlich unterschieden; bei Frau Pechstein liegt Typ Nr. 6 vor:

1. Isolated deficiency of spectrin
2. Combined deficiency of spectrin and ancyrin
3. Deficiency of band-3-protein
4. Deficiency of protein 4.2
5. Deficiency of Rh complex
6. **Yet to be defined protein abnormalities**

5 Die Blutbilddaten der Dopingkontrollen von 2000-2009

Eigene Analyse: Gegenüberstellung/Abgleich der Befunde Dr. Weimanns mit den Blutbilddaten der Dopingkontrollen

Mir liegt die Tabelle der ISU ohne Datum mit letztem Eintrag vom 18.02.2009 mit den bei Frau Pechstein gemessenen Blutdaten vor. Anhand dieser Daten habe ich die Stichhaltigkeit der Diagnose der abortiven Membranopathie in Form einer Sphärozytose (Kugelzellenanämie) überprüft:

5.1 MCHC-Werte

Der MCHC-Wert gibt die mittlere celluläre Hämoglobin-concentration in Hämoglobin pro 100 ml Erythrozyten (nicht pro 100 ml Blut) an. Er ist Ausdruck eines Fehlers bei der Messung oder alternativ Ausdruck eines Fehlers der Erythrozyten selbst und kann somit Ausdruck einer Blut-Anomalie sein. Bei so vielen Werten über 36 g/dl ist die Fehlbestimmung als Ursache jedoch ausgeschlossen.

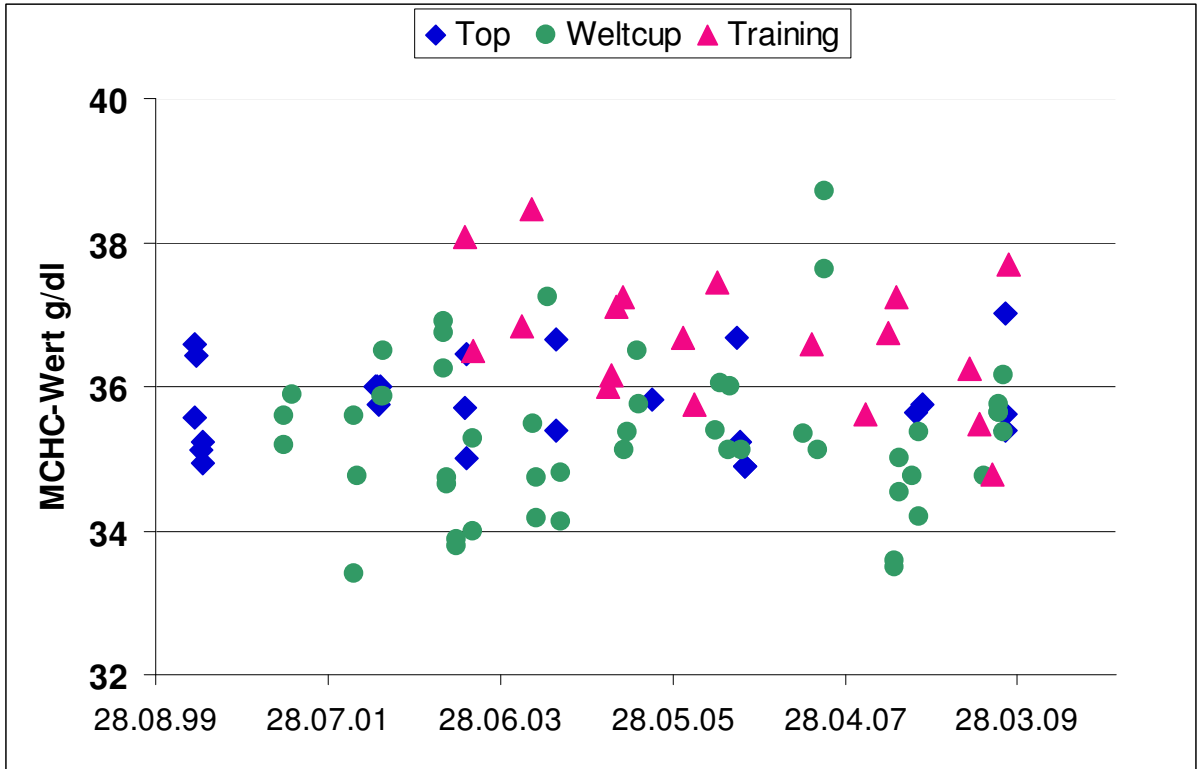
Hohe MCHC-Werte gibt es nur als Artefakt bei Fehlbestimmung durch das Labor oder durch „Fehlverhalten“ der Erythrozyten. Im Lehrbuch von Prof. Dr. Lothar Thomas heißt es wörtlich auf Seite 680: „Erhöhte MCHC: Wird gefunden bei hochtitrigen Kälteagglutininen und bei hereditärer Sphärozytose.“ Ergänzen muss man hier, dass mit der Sphärozytose hier die erythrozytären Membranopathien als Gruppe gemeint sind, und dass noch die Hämoglobin-CC-Anomalie ergänzt werden muss (Frau Dr. Dickerhoff, Bonn, Düsseldorf).

Bei der Sphärozytose entsteht der erhöhte MCHC-Wert (also die erhöhte Hämoglobinmenge pro 100 ml Erythrozyten) dadurch, dass Wasser durch die etwas defekte Membran der Erythrozyten austritt. Dies passiert nur, wenn die Zellmembran der Erythrozyten geschädigt wird und Flüssigkeit aus den Zellen ausströmen kann und sich durch die intrazelluläre Austrocknung der Hämoglobinmenge im Erythrozyt scheinbar erhöht. Wegen dieser Gegebenheit ist der MCHC-Wert ein so wichtiger Indikator einer leichten Hämolyse auf der Basis einer Schädigung der Zellwand.

Bei Frau Pechstein verbleibt keine andere Differentialdiagnose als eine hämolytische Konstellation. Der MCHC-Wert ist bei Frau Pechstein in allen Labors hoch. Er liegt meist im oberen Grenzbereich, oft im pathologisch hohen Bereich.

Die Abbildung macht schon deutlich, dass der MCHC-Wert bei Trainingskontrollen mit einem Mittelwert von 36.7 g/dl besonders hoch ist gegenüber 35.7 g/dl bei Top-Ereignissen und 35.5 g/dl bei Weltcup-Veranstaltungen.

Abbildung: Verlauf des MCHC-Wertes von 2000 bis 2009 je nach Abnahmesituation

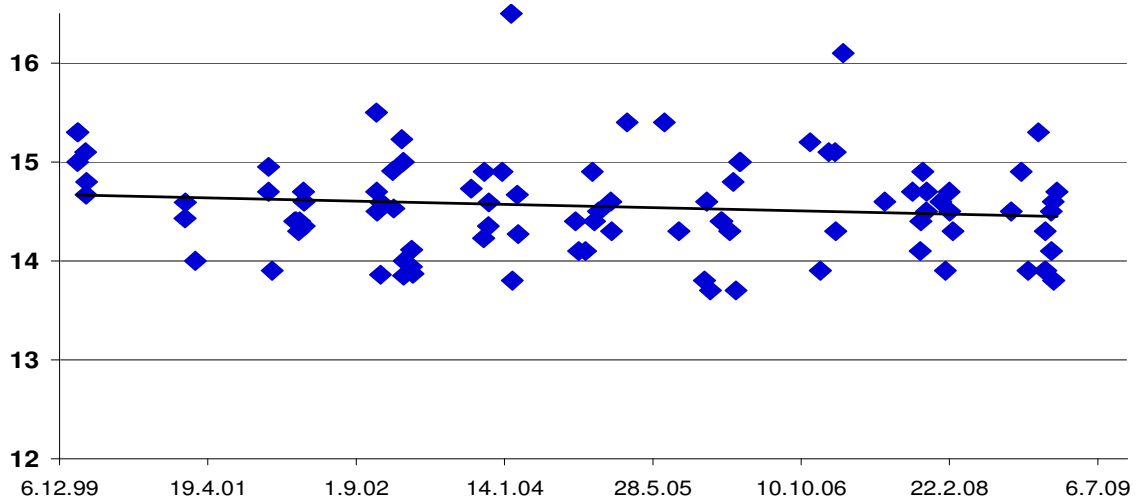


5.2 Die Retikulozytenzahlen steigen tendenziell über 10 Jahre hinweg - die Hämoglobinwerte fallen tendenziell in der gleichen Zeit

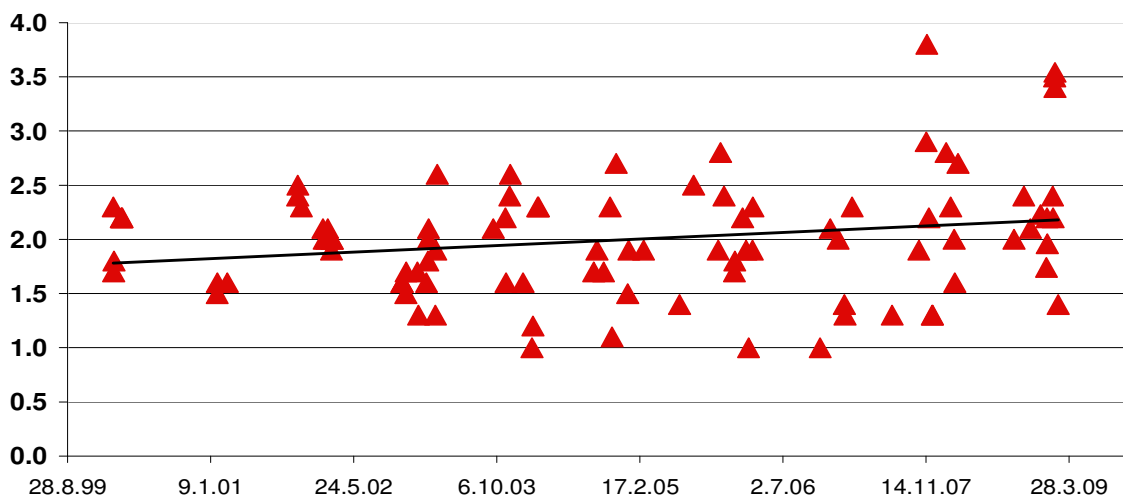
Verlauf Blutwerte Die Hämoglobinwerte über 10 Jahre hinweg von der ISU gemessen tendieren im Lauf der zehn Jahre nach unten, die Retikulozytenzahlen nach oben.

In der Funktion „Trendlinie hinzufügen“ im Excel-Programm zeigt sich ein steigender Reti-Wert von 1.8 auf 2.2% über 10 Jahre, beim Hämoglobinwert stellt sich ein Abwärtstrend von 14.7 auf 14.4 g/dl dar. Dieser abfallende Hämoglobin-Trend bei steigenden Retikulozyten spricht für ein medizinisches Phänomen und gegen Epo-Doping.

Hämoglobinwerte von 2000 - 2009
Normbereich Lehrbuch plus ISU-Grenzwert 12-16.5 g/dl



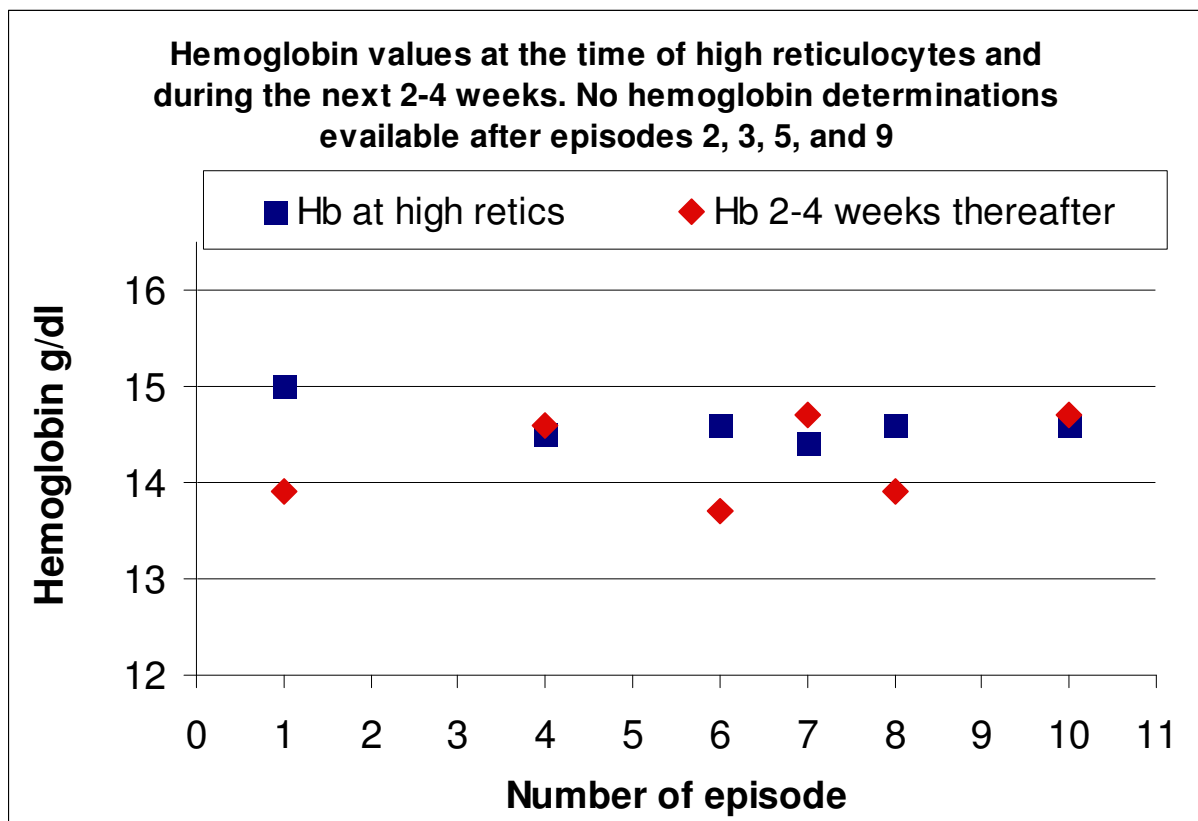
Retikulozyten von 2000-2009
Normbereich Doping-Richtlinien 0.5-2.4%



5.3 Nach hohen Retikulozytenwerten über 2.4% steigt der Hämoglobinwert nicht – er ist tendenziell niedriger

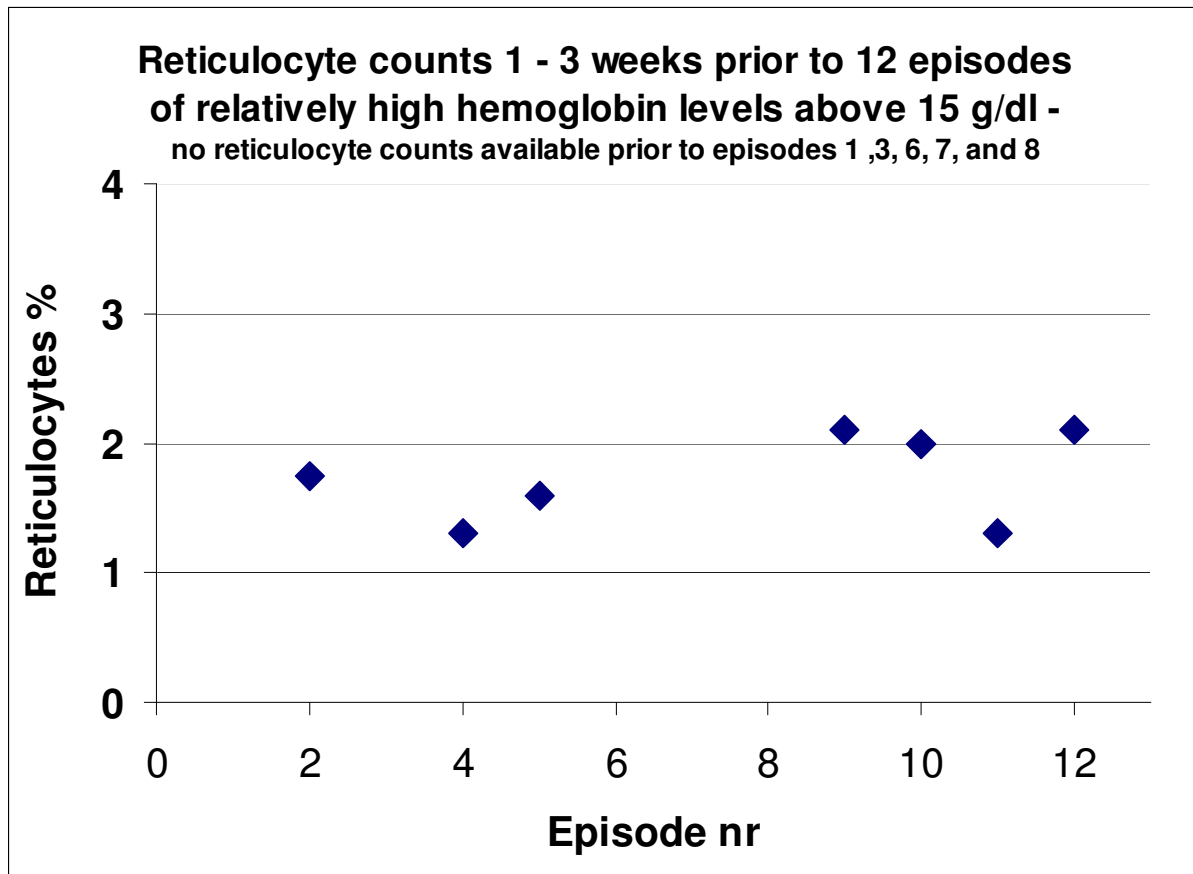
Wenn Doping mit blut-stimulierenden Substanzen wie Epo die Erhöhung der Retikulozytenzahl über die ISU-Grenzen verursacht, muss der Hämoglobinwert um z.B. 1 g/dl und mehr steigen. Dies war nie der Fall. Tatsächlich lag der mittlere Hämoglobinwert innerhalb der nächsten vier Wochen nach auffälligen Reti-Werten mit 14.3 g/dl niedriger als in allen anderen Situationen (14.6 g/dl). Entsprechendes gilt für den Hämatokrit.

Wenn der Hämoglobinwert innerhalb eines Monats nach hohen Retikulozytenzahlen tendenziell etwas niedriger ist, passt dies keinesfalls zur Doping-Hypothese. Vielmehr ist diese Situation verdächtig für eine subklinische normalerweise nicht auffallende hämolytische Konstellation.



5.4 Vor hohen Hämoglobinwerten über 15 g/dl finden sich keine auffällig hohen Retikulozytenwerte – sie sind tendenziell niedriger.

Es stellt sich die Frage: Wie hoch waren die Retikulozytenwerte jeweils eine bis drei Wochen vor den höchsten Hämoglobinwerten der Patientin.



Wenn die höchsten Hämoglobinwerte der Sportlerin Ausdruck von Epo-Doping wären, könnte sich dies durch hohe Retikulozytenzahlen in der Zeit davor verraten. Dies ist allerdings nicht zwangsläufig der Fall. Bei sehr niedrig dosierter Dauertherapie mit Epo muss die Retikulozytenzahl nicht zwangsläufig hoch sein (siehe auch Prof. Dr. Jelkmann).

Die Zahl der Retikulozyten lag vor hohen Hämoglobinwerten immer im Bereich zwischen 1.3 und 2.3%, der Mittelwert beträgt 1.8% und ist damit niedriger als in anderen Situationen (2.0%).

Insgesamt spricht die Konstellation mit fehlendem bzw. sogar tendenziell niedrigerem Hämoglobinwert nach hohen Retikulozytenzahlen deutlich für eine medizinische Ursache der hohen Zahlen.

5.5 Weitere Parameter zur Differenzierung zwischen epo-induzierten und physiologischen bzw. Sphärozytose-Veränderungen

Hyperchrome Zellen Hyperchrome/hyperdense Erythrozyten sind bei jedem Menschen zu finden. Es sind dies durch Wasserverlust geschrumpfte Zellen. Diese Zellen sind zugleich die Indikatorzellen für die verschiedenen Formen der Sphärozytose. Davon betroffene Patienten haben einen Anteil von 5-55% hyperchromer Erys (Cynober et al J. Lab. Clin 1996).

Bei der Messung in Hamar lag der Anteil hyperchromer Erys bei 5.6%. Bei der Messung im Labor 28 lag er 2009 bei 6.5%. Vor 10 Jahren am 4. Februar 2000, wurden nach Unterlagen der Doping-Kontrollreure 16.2% gezählt; es ist dies eine der wenigen Untersuchungen, von der mir eine Kopie des Laborwertausdrucks vorliegt. Dies ist mehr als in der Allgemeinbevölkerung; der Normbereich geht für einige Autoren bis 2.5%, einzelne geben Werte bis 4% als normal an.

Reti-Hämoglobin Die Reti-Hämoglobinmessung ist zusätzlich von Bedeutung, weil beim Epo-Doping tendenziell wenig Hämoglobin in den überstürzt gebildeten Zellen vorhanden ist. Die Zellen sind dann tendenziell wasserreich und hämoglobinarm. In Hamar lag der Hämoglobingehalt der Retikulozyten mit 34.2 pg im oberen Grenzbereich.

CHCMr CHCMr gibt den mittleren zellulären Hämoglobingehalt pro 100 ml Retis an. Er ist bei Epo-Doping besonders niedrig. In Hamar war dieser Wert mit 33.4 g/dl erhöht gemessen worden.

5.6 Bewertung/Abgleich der Daten der Doping-Kontrollen mit Dr. Weimanns Befunden

Bewertung Alle medizinischen Daten der Doping-Kontrollen passen exakt in das Bild der neuen Weimann-Befunde einer hereditären Membranopathie vom Typ einer Sphärozytose:

- Über 10 Jahre hinweg tendenziell fallende Hämoglobin- und Hämatokritwerte bei gleichzeitig tendenziell steigenden Retikulozytenwerten als Ausdruck einer leichten Verschlechterung der Hämolyse-Situation.
- Wechselnd hohe MCHC-Werte als Standard-Labor-Auffälligkeit bei Membranopathien
- Hämoglobin nach hohen Retikulozyten niedriger als nach normalen, weil die hohen Retikulozytenwerte Ausdruck einer verstärkten Nachproduktion zerfallener Erythrozyten sind.
- Vor hohen Hämoglobinwerten niedrigere Retikulozytenzahlen, weil die hohen Hämoglobinwerte Ausdruck der Tatsache sind, dass in den letzten Wochen weniger Zellzerfall stattgefunden hat.
- Vermehrt hyperchrome Zellen.

6 Zum CAS-Verfahren erstellte ärztliche Gutachten

Gegenüberstellung/Abgleich der Befunde Dr. Weimanns mit den vorher erstellten ärztlichen Gutachten

Mir liegen folgende Gutachten vor, anhand derer ich die Diagnose einer hereditären Membranopathie überprüft habe:

- Gutachten Professor Dr. D'Onofrios vom 22. August 2009
- Vorläufiger Bericht Professor Dr. Schrezenmeiers vom 30. Juli 2009 sowie seine Stellungnahme vom 6. Dezember 2009
- Gutachten Professor Dr. H. Heimpel vom 11. Februar 2010
- Gutachten Professor Dr. Christof Dame
- Gutachten Professor Dr. Walter Schmidt vom 20. Oktober 2009
- Bericht Professor Dr. Lothar Röcker Juli bis September 2009

6.1 Prof. Dr. D'Onofrio, Katholische Universität zu Rom

Prof. Dr. D'Onofrio kommt in seiner zusammenfassenden Wertung auf der Basis der damals vorliegenden Befunde zu der Einschätzung, die Retikulozytenzahlen in Hamar 2009 seien auf Doping zurückzuführen. Er listet aber auch detailliert alle medizinischen Befunde auf, die für eine hämolytische Konstellation im Sinne einer hereditären Sphärozytose sprechen können. Diese Aspekte seiner Stellungnahme vom 22. August 2009 sollen hier dargestellt werden.

Er schreibt an mehreren Stellen, dass neben Doping als Ursache der erhöhten Retikulozytenzahlen aus der Gruppe der vielen hämolytischen Anämien nur eine hereditäre Sphärozytose (Kugelmellenanämie) in Betracht kommt. Die Kugelmellenanämie sei die häufigste angeborene hämolytische Anämie in Nordeuropa mit einer Prävalenz (Häufigkeit) von 1:2000. Er bemüht sich sehr darum, bei den Richtern des CAS Verständnis für diese schwierige Erkrankung zu vermitteln. Er macht mehrfach deutlich, dass diese Erkrankung die zentrale Alternativ-Erklärung für die erhöhten Retikulozytenzahlen ist – nicht für Doping-Verdächtige im allgemeinen, sondern speziell bei Frau Pechstein.

Er beschreibt klinisches Bild, pathophysiologisches Prinzip, genetische Grundlagen, Proteindefekte, Laborkonstellationen und spezielle Testverfahren zum Nachweis.

Er kritisiert, dass Frau Pechstein sich nicht adäquat schnell um die Durchführung der entsprechenden Untersuchungen bemüht habe.

Besonders wichtige, kritische Passagen zitiere ich in Englisch, der Originalsprache der mir vorliegenden Gutachtenversion.

Folgende Untersuchungsdaten zitiert er:

Zitat der Daten des Schweizer Labors für Doping-Analysen am 16. April 2009

- hoch-normaler MCHC-Wert: 35.7 g/dl,
- „rare echino-spherocytes on the peripheral blood film”,
- “serum Epo in the high normal range ...”
- normales Bilirubin

Über die Daten von Prof. Dr. Schrezenmeier schreibt Prof. Dr. D’Onofrio

- Retikulozyten 2.45% (oberhalb des internen Normbereiches)
- „MCHC is increased (37.3 g/dl), as it inconstantly was in former test results; this is in favour of spherocytosis (and it is not a proof of analytical error)”
- “Several spherocytes are present on the peripheral blood film, another element which is in favour of spherocytosis; spherocytes are absent in normal blood.”

Zitat zu hyperchromen Zellen

Er schreibt, in einer limitierten Zahl von durchgeführten Untersuchungen gebe es Informationen über den Prozentsatz hyperchrome Zellen (typisch für Kugelzellenanämie HS); dabei seien erhöhte Werte festgestellt worden. Speziell zu Hamar 2009 schreibt er: „ .. in the Hamar ADVIA reports of 6 and 7 February 2009, they are above 5%.“

Conclusions

Seine “Conclusions” beginnen folgendermaßen: „From a medical and hematological standpoint, as stated since my first Expert Opinion of May 25, two possible explanations remain valid for the exceedingly variable and occasionally high reticulocyte counts observed in the Appellant (Kommentar: “the Appellant”; das ist Frau Pechstein): one is blood doping, the other one is a compensated congenital hemolytic blood disorder (in particular spherocytosis). Some findings including slightly increased Advia MCHC and hyperchromic cells, the findings of even a few spherocytes on the blood film (although I could not personally verify it), can be observed in a patient with compensated spherocytosis.”

Original sieht sein anschließender Text folgendermaßen aus:

In conclusion, the increase in reticulocytes associated to the above mentioned findings can indicate:

- 1) blood doping
- 2) hereditary spherocytosis (or one of its variants).

Im Anschluss beklagt er sich durchaus verständlich, dass ihm die Untersuchungsergebnisse zum Zeitpunkt seiner Gutachten-Erstellung noch nicht vorliegen. Er hält eine kongenitale hämolytische

Erkrankung für „quite unlikely“. Er fährt fort mit den Worten: „**The study of red cell membrane, anyway, available in several laboratories in Europe, could be carried out to definitely rule it out (or confirm it).**“ (Hervorhebung durch mich).

6.2 Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier Transfusionsmedizin Ulm Vorläufiger Bericht vom 30.07.2009

Pathol. Befunde Pulmonale Spastik (Asthma) mit Medikation von Symbicort und Salbuhexal. Dies ist eine Kombination zur Inhalation bestehend aus „Cortison“ und „Betamimetikum“, beides Medikamente zur Erweiterung der Bronchien. Häufige Infekte im Winter. Auffällige Zyanose (Blauverfärbung) von Lippen, Zunge und Wangen bei Atem-Maneuvern.

Nachgewiesene Hämolysparameter: hoher MCHC-Wert und erneute Retikulozytenvermehrung. Dazu Kugelzellen.

Erhöhte Retikulozytenzahl und erneut erhöhter MCHC-Wert (Werte nicht angegeben). Umfassende aber zum Berichtszeitpunkt noch nicht komplette Diagnostik mit dem Ziel der Identifizierung einer genau definierten hämolytischen Erkrankung ohne eindeutigen pathologischen Befund.

Ergänzungen Mit Datum vom 6. Dezember 2009 weist Prof. Dr. Schrezenmeier darauf hin, dass er im Urteil des CAS falsch zitiert wurde. Er hatte wiederholt erhöhte Retikulozyten und erhöhte MCHC-Werte gemessen sowie mikroskopisch Kugelzellen (Sphärozyten) festgestellt.

In seiner Ergänzung mit Datum vom 12.02.2010 bezieht er die Befunde von Dr. Weimann ein und stellt fest, dass „in der Gesamtschau sämtlicher Befunde, insbesondere auch bei Berücksichtigung des neu verfügbaren Auswertungs-Algorithmus“ diese vereinbar sind mit einer milden Form einer hereditären Sphärozytose.

6.3 Prof. Dr. H. Heimpel

MCHC-Wert Prof. Heimpel weist darauf hin, dass viele der bei Frau Pechstein gemessenen MCHC-Werte oberhalb der Normgrenze liegen. Der MCHC-Wert ist nur bei sehr seltenen Konstellationen erhöht. Hierzu zählen so genannte Kälte-Agglutinine, die das Blut an kalten Körperteilen (Lippen, Ohren) verklumpen und zerstören sowie Veränderungen der Erythrozytenstruktur wie z.B. bei der Kugelzellenanämie.

Epo-Doping kann diese Veränderungen nicht auslösen. Es führt beim MCHC-Wert wenn dann zu gegenteiligen Effekten.

Prof. Heimpel wertet dies als ein Beleg dafür, dass die Erythrozyten von Frau Pechstein nicht normal sind und zweitens eine sicher nicht durch Epo verursachte Veränderung aufweisen.

Zusammenfassung Die niedrig-normalen und zum Teil pathologisch niedrigen Haptoglobinwerte ergänzen die auf eine leichte Hämolyse hindeutende Konstellation. Es wird zusätzlich noch darauf hingewiesen, dass eine Verdopplung des Hämoglobinabbaus im Vergleich zum Gesunden erforderlich ist, um den Haptoglobinwert sinken zu lassen. Dies entspricht einer milden bei anderen Menschen nicht auffallenden Hämolyse.

Prof. Heimpel zitiert Daten, nach denen 1% der Nordeuropäer eine Konstellation zwischen normal und Kugelzell-Anämie haben bei Beschwerdefreiheit und Screening-Blutuntersuchung.

Zusätzlich weist er die Behauptung von Prof. Dr. d'Onofrio zurück, negative erythrozytäre Membran-Untersuchungen könnten eine Erythrozytenerkrankung ausschließen.

In seiner ergänzenden Stellungnahme vom Februar 2010 nach Vorliegen der Daten von Dr. Weimann sieht er seine ursprüngliche Einschätzung voll-umfänglich bekräftigt, dass eine Membranopathie vom Typ hereditäre Sphärozytose vorliegt.

6.4 Prof. Dr. Christof Dame, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Vorgehen Sechs Untersuchungen von Blutbild und Epo-Spiegel sowie molekularbiologische Untersuchungen

Ergebnisse Kein SNP (single nucleotid polymorphism) im Exon 8 des Epo-Rezeptor-Gens somit kein Anhalt für Hypersensitivität gegenüber Epo.

Kein SNP im Promotor-Gen des Epo-Rezeptors.

Kein SNP im regulatorisch wirkenden Intron1 des Epo-Rezeptors-Gens.

Im Epo-Gen-Locus wurden ein Polymorphismus auf beiden Allelen des Epo-Enhancers nahe dem HRE nachgewiesen. Nach Angaben von Prof. Dr. Dame ist nicht auszuschließen, dass dieser Polymorphismus bei sportlicher Belastung oder Hypoxie die endogene Epo-Synthese modifiziert.

Ein weiterer Polymorphismus, der mit erhöhten Epo-Spiegeln assoziiert ist, wurden auf beiden Allelen des Epo-Promotors nachgewiesen.

Fazit: Prof. Dr. Dame stellte bei Frau Pechstein zwei homozygote, von Vater und Mutter vererbte, Veränderungen im Erythropoetin-Gen fest, von denen eine das Gen sicher aktiviert und es für die andere unbekannt ist, welchen Einfluss sie hat.

Fazit ist, dass bei Frau Pechstein eine Konstellation vorliegen kann, bei der bei vermindertem Blut-Sauerstoff überschießend Erythropoetin gebildet wird und damit die Retikulozyten in pathologische Bereiche gehoben werden können. Da der Sauerstoffmangel bei der Sportlerin (siehe Prof. Dr. Schrezenmeier: Zyanose, Asthma) jeweils nur kurzzeitig auftritt, wäre verständlich, dass der Effekt nicht auf den Hämoglobinwert durchschlägt.

6.5 Prof. Dr. Walter Schmidt, Institut für Sportwissenschaft, Universität Bayreuth

Vorgehen Prof. Dr. Schmidt hat die ISU-Blutwerte von Claudia Pechstein insbesondere die von Hamar analysiert.

Sein Resümee lautet Bei statistischer Betrachtung (z-score) sind die Hamar-Daten sicher verschieden von der Parasotti-Doping-Gruppe mit Epo-Doping über 24 Tage; die Irrtumswahrscheinlichkeit dieser Aussage wurde von Prof. Dr. Schmidt mit zwischen 1% und unter 0.0001% berechnet.

Bei einem zweiten Vergleich mit einer anderen 10-Tage-Epo-Doping-Gruppe von Parisotto (2000b) ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Die Irrtumswahrscheinlichkeit dieser Festlegung „Parisotto-10-Tage-Epo-Doping ist ausgeschlossen“ wurde von ihm mit 5% berechnet.

Bei einem dritten Vergleich mit Epo-Daten von Breymann 1996 mit Kurz-Doping (2 Applikationen) ergab sich ein gleichartiges Ergebnis.

Fazit: Die Retikulozytenzahlen in Hamar sind abnorm. Die zusätzlichen weiteren Veränderungen der Erythrozyten und Retikulozyten sind nicht typisch für Epo-Doping. Die erhöhten Retikulozytenzahlen sind nicht notwendigerweise Folge von Epo-Doping.

6.6 Prof. Dr. Lothar Röcker – Labor 28 – Berlin: Juli – September 2009

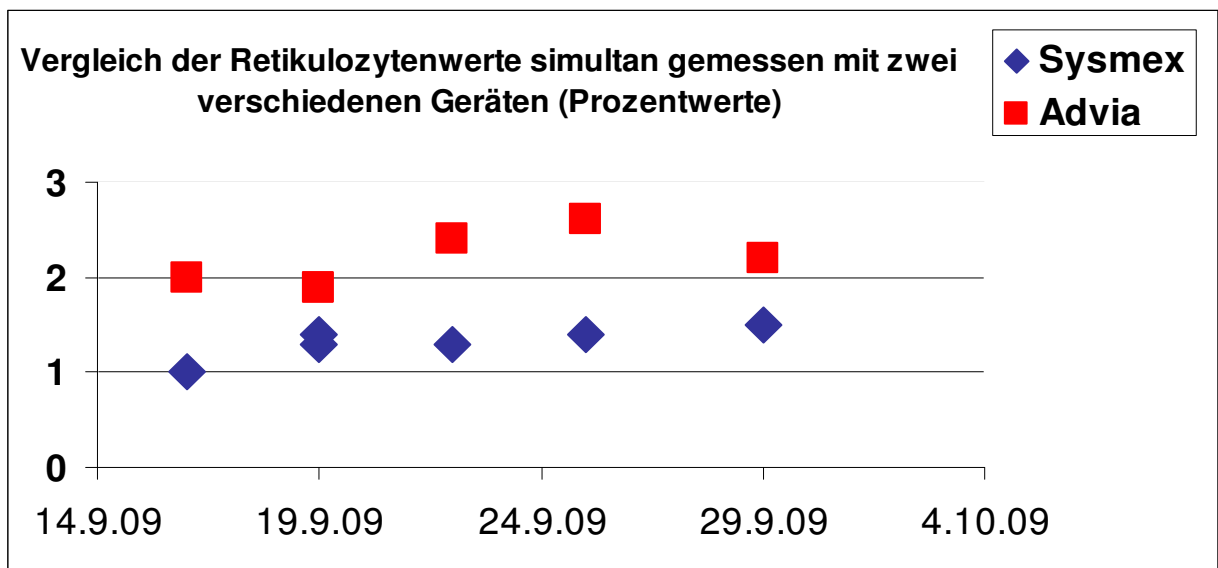
Retis In der Zeit vom 21. Juli bis 25. September wurden regelmäßig Blutbild-Untersuchungen durchgeführt. Bei Untersuchung mit dem Advia-Gerät lag der Hämoglobin-Mittelwert bei 13.8 g/dl, die Retikulozyten wurden im Mittel bei 2.09% gezählt. Vier von 11 Retikulozytenmessungen zeigten Werte oberhalb der ISU-Grenze von 2.4%. Dabei wurde vom 11.08.2009 an regelmäßig der Erythropoetinspiegel kontrolliert.

Nach submaximaler Belastung am 21.7.2009 sowie am 19.9.2009 dokumentiert sich ein Retikulozyten-Anstieg in den nächsten Tagen von 1.4% auf 2.6% im Juli und von 1.9 auf 2.6% im September.

Hohe Werte finden sich aber nicht nur nach besonders starker Belastung sondern unabhängig davon z.B. 11. August und am 16. September. Es gibt somit auch belastungsunabhängig hohe Retikulozytenwerte.

Haptoglobin ist ein äußerst empfindlicher Hämolyse-Indikator, weil dieses Protein freies Hämoglobin abfängt und abtransportiert. Das Messprinzip funktioniert so, dass nur das freie Haptoglobin gemessen wird, welches kein aus Erythrozyten freigesetztes Hämoglobin transportiert. Bei leichten Hämolysen ist der Haptoglobinwert erniedrigt, bei mittelgradigen ist freies Haptoglobin gar nicht mehr nachweisbar. Frau Pechstein liegt bei den Messungen im Labor 28 immer im untersten Normbereich bzw. darunter.

Geräte-Vergleich Im Labor wurden Blutbilduntersuchungen simultan an zwei verschiedenen Geräten durchgeführt, einerseits am Advia-Gerät, das meist bei Doping-Kontrollen verwendet wird sowie an einem Sysmex-Gerät.



Dabei zeigten sich die Retikulozyten bei Frau Pechstein am Sysmex-XE2100-Gerät deutlich niedriger. Der Mittelwert betrug 1.3% gegenüber 2.2% bei paralleler Messung am Advia. Dieser Unterschied ist wesentlich größer als bei Normwertkollektiven gemessen mit beiden Systemen. Dabei ist der Unterschied marginal wenn überhaupt vorhanden und liegt in der Größenordnung von bis 0.4%.

Ein zusätzliches Phänomen fällt auf. Der oben dargestellte Anstieg der Retikulozyten nach Belastung zeigt sich nur beim Advia-Gerät. Auch bei diesen Werten zeigt sich, dass die Erythrozyten von Frau Pechstein abnormal sind und zwar ganz besonders unter oder nach Belastung, weniger in Standard-Situationen.

Dabei zeigten sich die Retikulozyten bei Frau Pechstein am Sysmex-XE2100-Gerät deutlich niedriger. Der Mittelwert betrug 1.3% gegenüber 2.2% bei paralleler Messung am Advia. Dieser Unterschied ist wesentlich größer als bei Normwertkollektiven gemessen mit beiden Systemen. Dabei ist der Unterschied marginal wenn überhaupt vorhanden und liegt in der Größenordnung von bis 0.4%, wie Normwertstudien bei Gesunden gezeigt haben.

Kommentar

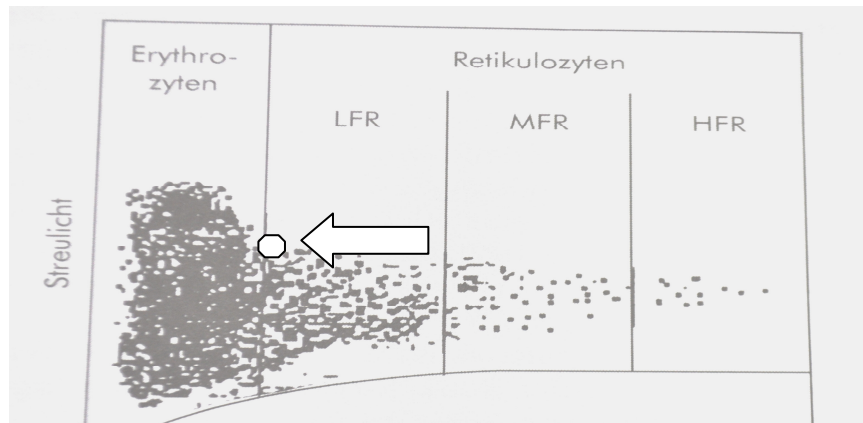
Ein zusätzliches Phänomen fällt auf. Der oben dargestellte Anstieg der Retikulozyten nach Belastung zeigt sich nur beim Advia-Gerät.

Die Abgrenzung der Retikulozyten erfolgt beim Advia-Gerät und bei dem der Firma Sysmex unterschiedlich. Um den Unterschied zu verstehen müssen einige Fakten erläutert werden. Wie an anderer Stelle erläutert besteht der definierende Unterschied zwischen Erythrozyt und Retikulozyt darin, dass letzterer noch RNA enthält, die im Zähl-Automaten mit Fluoreszenz-Farbstoffen angefärbt wird. Ein Retikulozyt baut die RNA in vier Tagen ab und ist dann ein reifer Erythrozyt – davon drei Tage im Knochenmark und ein Tag im Blut. Ein Retikulozyt unterscheidet sich vom reifen Erythrozyt nicht nur durch die RNA sondern auch dadurch, dass er größer ist. Im Laufe seiner Reifung gibt er Flüssigkeit ab.

Advia-Prinzip

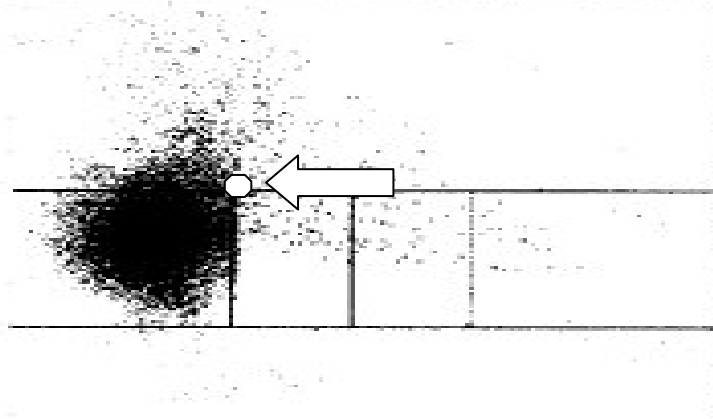
Beim Advia-Gerät basiert die Trennung zwischen Erys und Retis nur auf der Farbstoff-Aufnahme charakterisiert durch die senkrechte trennende Linie zwischen Erythrozyten und LFR (low fluorescence reticulocytes). MFR und HFR stehen für medium und high FR (Bild etwas schlecht fotografiert aus dem Lehrbuch von Lothar Thomas).

Jeder Punkt der nachfolgenden Abbildung steht für einen Erythrozyt oder Retikulozyt. An der Y-Achse findet sich der Hinweis „Streulicht“ beim Advia bzw. „FSC“ beim Sysmex; das soll bedeuten, je weiter oben eine Zelle abgebildet wurde, desto größer ist sie. Je weiter rechts sie liegt, desto mehr Farbstoff hat die RNA gebunden, desto unreifer ist sie also. Siehe nachstehende Abbildung.



Ein zusätzliches Problem kommt hinzu. Wie die nachfolgende Abbildung der Retikulozytenzählung vom 6. Februar 2009, die zur Dopingsperre führte, zeigt, werden beim Advia-System die großen Erythrozyten und Retikulozyten von der Auswertung ausgeschlossen – symbolisiert durch die die Zellwolke schneidende Gerade.

Retic Scatter Absorption



Sysmex-Prinzip

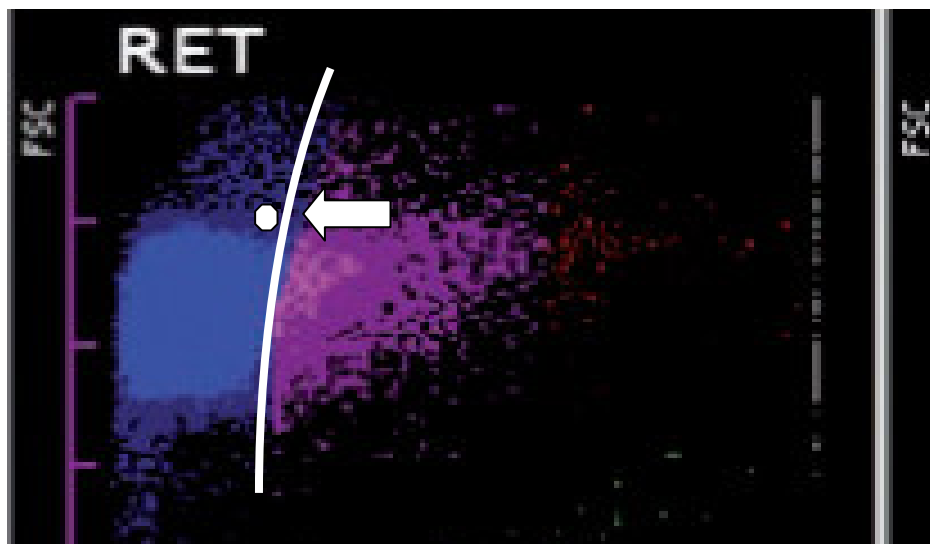
Beim Sysmex-Gerät (siehe Abbildung unten) wird bei der Ery-Reti-Unterscheidung die Zellgröße in einer dynamischen Weise berücksichtigt, wie die gebogen verlaufende Trennlinie zwischen blau dargestellten Erys und pink-farbenen oder und roten Retis zeigt (bei Schwarz-weiß-Druck sicher schlecht zu sehen). Das heißt ganz konkret, große Zellen mit nur noch ganz wenig RNA-Anfärbung

werden vom Sysmex-Gerät als Erythrozyt und vom Advia-System als Retikulozyt gezählt.

Nun kommt hinzu, dass bei einige hereditären Membranopathien z.B. vom Typ der Sphärozytose der Metabolismus des Farbstoffes gestört ist. Der Membrandefekt hat Einfluss sowohl auf den schnellen Eintritt des Fluoreszenzfarbstoffes in die Zelle als auch auf den Austritt des Farbstoffes, der nicht an RNA gebunden wurde. Deshalb können solche Patienten eine zu niedrige Fraktion „unreifer Retikulozyten“ haben. Darauf beruht auch der Reti%/IRF-Quotient von Dr. Weimann. Patienten mit Kugelzellenanämie haben natürlich unreife Retikulozyten; nur die Messverfahren unterschätzen sie.

Als nächstes muss daran erinnert werden, dass Retikulozyten auch größer sind als reife Erythrozyten. Das heißt innerhalb eines Tage geben sie viel Flüssigkeit ab und werden dadurch kleiner. Sphärozytose-Retikulozyten, die den Fluoreszenz-Farbstoff schlecht aufnehmen oder halten können, sind groß und haben wenig Fluoreszenz. In obiger Abbildung habe ich eine Stelle mit Kreis und Pfeil markiert, an der solche Zellen liegen. Das Advia zählt sie als Retis, das Sysmex-Gerät als reife Erythrozyten (siehe Muster-Zelle mit Punkt und Pfeil).

Während bei Normalpersonen bei der Reti-Zählung kaum Unterschiede zwischen den Geräte-Typen Advia und Symex bestehen (siehe Normwertstudien), sind diese bei hereditärer Sphärozytose aus mess-technischen Gründen groß.



Zusammenfassung Retikulozytenzählung mit Advia und Sysmex-Systemen

Die beiden Gerätetypen färben und zählen die Retikulozyten auf unterschiedliche Weise. Die beobachteten Unterschiede sind in Normwertstudien dennoch minimal und ohne Relevanz. Dies findet

seinen Ausdruck auch in den Normbereichen, die in Lehrbüchern angegeben sind.

Eine Ausnahme davon scheinen jedoch Menschen mit Sphärozytose zu sein. Einschränkend muss aber festgestellt werden, dass diese Aussage nach Kenntnis des Autors nur auf limitierten bei Frau Pechstein gewonnenen Daten beruht und eine Generalisierung erst erlaubt ist, wenn der Befund auf breiterer Basis bestätigt ist.

Bei Frau Pechstein ist der Unterschied zwischen beiden Systemen bei paralleler Messung groß.

Hyperchrome Zellen Bei acht Messungen wurde der Anteil hyperchromer Erythrozyten bestimmt. Der Prozentsatz lag zwischen 3.3 und 11.1% bei einem Mittelwert von 6.5%. Dies ist deutlich mehr als in der Allgemeinbevölkerung; der Normbereich geht für einige Autoren bis 2.5%, für andere bis 4%. Damit wurde der Hamar-Befund in Richtung hämolytische Konstellation auch mit diesem Parameter bestätigt.

Reti-Hämoglobin Die Retikulozyten-Hämoglobinmessung ergab wie in Hamar immer Werte im oberen Grenzbereich bei 34.2 pg.

6.7 Bewertung/Abgleich der vorherigen ärztlichen Gutachten mit Dr. Weimanns Befunden

Bewertung Alle ärztlichen Gutachten passen exakt in das Bild der neuen Weimann-Befunde einer hereditären Sphärozytose. Die Retikulozytenzahlen sind wechselnd hoch normal oder erhöht wie auch bei den Doping-Kontrollen. Kugelzellen, aber wenige, wurden im Blutaussstrich gesehen in zwei verschiedenen Institutionen, eine davon einem speziellen Doping-Labor. Der wichtige Haptoglobinwert ist immer wieder niedrig. Die erythrozytären Spezialparameter passen auch.

7 Bewertung der ärztlichen Gutachten zu Claudia Pechstein

7.1 Fakten, über die Gutachter-Konsens besteht

Die Gutachten von Prof. Dr. Dame und Prof. Dr. Schmidt haben eine andere Zielrichtung und werden daher hier nicht in der Gegenüberstellung aufgeführt.

Die ärztlichen Gutachten von Prof. Dr. D'Onofrio, Prof. Dr. Heimpel, Prof. Dr. Schrezenmeier, Prof. Dr. Röcker, Dr. Weimann sowie meines und das hier nicht wiedergegebene von Prof. Dr. Tichelli, Basel, stimmen weitgehend darin überein, dass bei Frau Pechstein Veränderungen des Blutbildes bestehen, die zumindest verdächtig sind für das Vorliegen einer hereditären Sphärozytose oder einer Variante dieser Anomalie.

Einigkeit besteht darin, dass folgende Befunde den Verdacht auf das Vorliegen der Anomalie nahe legen:

- immer wieder erhöhter MCHC-Wert,
- oft vermehrte Zahl so genannter hyperchrome Zellen,
- teils erniedrigter Haptoglobinspiegel (allerdings Durchführung der Messung ohne Überwachung durch ISU-Gutachter, wie im CAS-Urteil moniert)
- oft erhöhte Retikulozytenzahl (allerdings auch alternativ verursachbar durch aktivierendes Blutdoping)

Während die anderen Gutachter vom Vorliegen einer erythrozytären Membranopathie vom Typ Sphärozytose ausgehen, konnte Prof. Dr. D'Onofrio zumindest auf der zum CAS-Verfahren vorliegenden Datenbasis eine solche Diagnose nicht stellen.

7.2 Fakten, über die Gutachter-Dissens besteht

Ja oder nein

Das klassische Bild einer leichten bis mittelschweren Sphärozytose liegt selbstverständlich nicht vor. Die zentralen die Anomalie nachweisenden Tests haben ein unauffälliges Ergebnis erbracht. Von daher ist zunächst verständlich, wenn ein Kollege sich der Membranopathie-Diagnose nicht voll anschließen kann. Die Studien der letzten 15 Jahre haben hier jedoch zu einem kompletten Wandel des Sphärozytose-Bildes im Bereich der ganz milden Erkrankungsformen geführt.

Sieht man sich die veröffentlichten Studien und wissenschaftlichen Reviews zur Thematik an, wird klar, sie wurden überwiegend unter dem Aspekt geschrieben, hier sind offensichtlich erkrankte Menschen – welche Befunde liegen vor? Dann heißt es zum Beispiel: bei 90% der Patienten war die Membrandiagnostik mittels SDS-PAGE pathologisch. Konkret heißt das, bei 90% aller Patienten aller

Schweregrade war die Untersuchung pathologisch. Das heißt nicht, dass sie bei 90% aller asymptomatischen Patienten auffällig war.

Bei Frau Pechstein wird nach meiner Kenntnis erstmals in einem Individualfall die umgekehrte Frage gestellt: Hat diese äußerst erfolgreiche Ausdauer-Sportlerin mit offensichtlich äußerst leistungsfähigem Herz-Kreislauf-Blut-Muskel-System eine Anomalie der Erythrozyten. Liegt hier eine ganz milde asymptomatische Erkrankung vor.

Höhe der Retizahl

Und zweitens: Wenn die Erkrankung ganz mild ist, erklärt sie dann die „ganz leicht“ oder „ganz stark“ erhöhten Retikulozytenwerte. Bei der Frage der Retikulozytenwerte gibt es zwei diametral unterschiedliche Perspektiven. Die Perspektive der Doping-Fahnder und die der Hämatologen: Für Doping-Fahnder sind 3.5% Retikulozyten ein stark erhöhter Wert, der zunächst einmal einen starken Dopingverdacht begründet. Für Hämatologen dagegen ist der gleiche Prozentsatz nur geringgradig erhöht, weil wir es ansonsten bei Krankheiten mit vorzeitiger Zerstörung der Erythrozyten mit Retikulozytenzahlen um 4 bis 10% oder mehr zu tun haben. Wenn dementsprechend in einem Lehrbuch oder Übersichtsartikel von einer nur leicht erhöhten Retikulozytenzahl die Rede ist, liegt dieser Beurteilung naturgemäß die hämatologische Perspektive zu Grunde.

Zentrale Frage:

Der ISU-Gutachter im CAS-Verfahren, Prof. Dr. D'Onofrio, war die wesentliche Stütze des Urteils, das die ISU-Doping-Sperre für Frau Pechstein im CAS-Verfahren bestätigte. Der zentrale Satz seines oben dargestellten Gutachtens vom 22. August 2009 lautet **„The study of red cell membrane, anyway, available in several laboratories in Europe, could be carried out to definitely rule it out (or confirm it).”**

Dieser Satz ist deshalb entscheidend, weil SDS-PAGE und Lyse-Tests bei Frau Pechstein unauffällig waren. Ist damit jedoch eine Sphärozytose ausgeschlossen?

Es stellt sich also die Frage, ist es richtig, dass man durch Untersuchung der “red cell membrane” eine Sphärozytose ausschließen kann. Zweite Frage ist, was ist mit „study of red cell membrane“ gemeint. Meint er SDS-PAGE, meint er die Lyse-Tests? Die Untersuchungstechnik sei „available in **several** laboratories in Europe“. Aus der Formulierung, die Untersuchung sei in „several“ Labs in Europa möglich, lässt sich schließen, dass er die SDS-PAGE meint. Denn alle anderen Untersuchungen sind in „many laboratories“ möglich. Nur SDS-PAGE-Untersuchung ist auf „several laboratories in Europe“ beschränkt.

Die Antwort auf die zentrale Frage lautet: Nach Meinung von Lehrbuchautoren und von Autoren von Übersichtsarbeiten kann durch

die geforderten Untersuchungen zwar eine Sphärozytose bewiesen aber nicht durch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Kann man keinen der bekannten Protein-Defekte nachweisen, ist ein noch nicht beschriebener nicht ausgeschlossen.

Zur Verdeutlichung der Problematik sei auf das jedermann bekannte Beispiel der Hepatitis-Formen verwiesen. Früher kannte man nur die Hepatitis-Viren A und B. Es wäre vermessen gewesen, hätte man damals bei fehlendem Virusnachweis dem Patienten gesagt, Sie haben keine Virus-Hepatitis. Die Gastroenterologen waren so klug, in solchen Fällen die Diagnose einer NonA-NonB-Hepatitis zu stellen. Heute geht das etwas genauer. Nun ja, das sollten wir Hämatologen auch können.

Zentrale Antwort

Es gibt keine Untersuchung, durch die eine Sphärozytose ausgeschlossen werden kann. Jede Untersuchung hat insbesondere bei ganz milden Formen Lücken. Nachfolgend sind die Belege dafür aufgeführt. Die Belege hohe MCHC-Werte, oft erniedrigtes bzw. grenzwertig niedriges Haptoglobin, viele hyperchrome Zellen, passender HS-Screening-Index, erhöhter Ret-IRF-Quotient, Familienanamnese (und Retikulozytenzahl)(letztere in Klammern wegen der alternativem Möglichkeit der Verursachung durch Blutdopings) belegen die erythrozytäre Membranopathie im Sinne einer Sphärozytose.

8 Wissenschaftliche Belege

Wissenschaftliche Belege dafür, dass das bei Frau Pechstein vorliegende klinische und labor-technische Bild einer ganz milden Sphärozytose entspricht bzw. dem Bild eines Merkmalsträger bei rezessiv vererbter Variante

8.1 Lehrbuch U.S.A.: Wintrobe's Clinical Hematology, 12. Auflage, 2009 Kapitel 31. Autor: Gallagher PG

Fazit Dem Lehrbuch-Kapitel entsprechend hat Frau Pechstein eine Sphärozytose-Konstellation, die zu „Carrier“ und mit Einschränkung zu „mild HS“ passt. Für „mild HS“ ist die Retikulozytenzahl nicht hoch genug. Auch sind dabei die Lyse-Tests oft positiv, was bei der Sportlerin nicht der Fall ist.

Zitate Hyperdense/hyperchrome Erythrozyten sind in Verbindung mit dem MCHC-Wert das wichtigste diagnostische Instrument für milde Fälle von Kugelzellen-Anomalie.

Blutzell-Diagnostik: “Histograms of hyperdense erythrocytes (MCHC >40 g/dl)” (Kommentar: Damit ist der MCHC der individuellen Zellen gemeint, der CHCM, sonst wird eine höhere strengere Grenze von 41 g/dl angegeben) obtained from laser based cell counters have been used as a screening test for HS and, when combined with an elevated MCHC, has been claimed to identify nearly all cases of HS” (Seite 918). Es gibt Fälle ohne Auffälligkeit bei der SDS-PAGE.

Zur Biochemie: “The primary lesion in HS erythrocytes is caused by membrane protein defects that result in membrane instability. The first biochemical defect recognized in patients with HS was spectrin deficiency, and the degree of spectrin deficiency was found to correlate with the extent of spherocytosis, the degree of abnormality of the osmotic fragility test, and severity of hemolysis (Fig. 31.4) (27,28, 31, 32, 33). In some cases, spectrin deficiency is the result of impaired synthesis, whereas in other instances, it is caused by quantitative or qualitative deficiencies of other proteins that integrate spectrin into the cell membrane, especially ankyrin. In the latter case, free spectrin is degraded, thereby leading to spectrin deficiency. Analysis of red cell membrane proteins in patients with HS has identified several major abnormal patterns: spectrin deficiency alone, combined spectrin and ankyrin deficiency, band 3 deficiency, protein 4.2 deficiency,

or no obvious biochemical abnormality.

(Hervorhebung durch mich). Each of the variant subsets is associated with mutations that result in different protein abnormalities and varied clinical expression (Table 31.2) (34). A tabulation of these mutations, searchable by gene or phenotype, is available at the Human Gene

Table 31.2 Classification of Hereditary Spherocytosis (HS) (wörtlich zitiert)

	Carrier	Mild HS	Moderate HS	Mod. Severe	Severe HS
Hemoglobin (g/dl)	Normal	11–15	8–12	6–8	<6
Reticulocytes (%)	1–3	3–8	8	10	10
Bilirubin (mg/dl)	0–1	1–2	2	2–3	3
Spectrin content (% of normal)	100	80–100	50–80	40–80	20–50
Peripheral smear	Normal	Mild spherocytosis	Spherocytosis	Spherocytosis	Spherocytosis poikilocytosis
Osmotic fragility Fresh blood	Normal slightly increased	Normal or slightly increased	Distinctly increased	Distinctly increased	Distinctly increased
Incubated blood	Slightly increased	Distinctly increased	Distinctly increased	Distinctly increased	Markedly increased

8.2 **Lehrbuch U.S.A.:** Handin, Lux, Stossel: Blood - Principles and Practice of Hematology, Kapitel 54, Autoren: Lux SE, Palek J. Seiten 1701-1818. 1. Auflage 1995

Fazit Menschen mit Trägerstatus einer rezessiven Variante einer Sphärozytose haben nach Text dieses Lehrbuchs recht genau die Konstellation von Frau Pechstein. Die mittlere Retikulozytenzahl solcher Träger wird mit 2.1% +/- 0.8% angegeben.

Zitate Stille Träger der Sphärozytose-Anomalie haben meist verminderte Haptoglobinspiegel, erhöhte Retikulozytenzahlen bei 2.1 +/- 0.8% und leicht verminderte osmotische Resistenz. Sport kann die Symptomatik verschlimmern. 30% von Patienten mit milder HS haben keine Mikrosphärozyten im peripheren Blut. Einige haben gar keine Sphärozyten (auch keine normal großen). Auf die MCHC-Erhöhung wird hingewiesen. Der Prozentsatz von hyperchromen Zellen wird als zentrales und bestes Diagnoseverfahren für die Sphärozytose beschrieben.

Table 54.9 Clinical Classification of Hereditary Spherocytosis (HS): Wörtlich identisch zur Tabelle in Wintrob's Lehrbuch

“Silent carrier state: The parents of patients with nondominant HS are clinically asymptomatic and do not have anemia, splenomegaly, hyperbilirubinemia, or spherocytosis in peripheral blood smears. Most do have subtle laboratory signs of HS, including slight reticulocytosis (average 2.1% +/- 0.8%), diminished haptoglobin levels, osmotic fragility, shortened acidified glycerol lysis time, and elevated autohemolysis..... No single test is sufficient. Carriers can be detected reliably only considering the results of a battery of tests” (Seite 1756).

“Hemolysis may also be exacerbated by pregnancy or exercise, such that it may impair athletic performance in endurance sports, even in patients with mild disease” (Seite 1756).

“About 25 to 35% of patients with mild HS patients lack the characteristic microspherocytes, in some no spherocytes are detectable” (Seite 1758).

“..... but all patients have some dehydrated cells. These are best revealed by instruments which measure mean corpuscular volume (MCV) by light scattering and provides a histogram of MCHC that is sufficient, in our experience and others, to identify all or nearly all HS patients. We find that this simple method is one of the easiest and most accurate ways of diagnosing HS” (Seite 1758).

8.3 Lehrbuch U.S.A.: Lilleymann J, Hann I, Blanchette V: *Pediatric Hematology*, Kapitel 13, Autoren: Mentzer WC, Libin BH. Seiten 257-283. 2. Auflage 1999

Fazit

In Bezug auf Frau Pechstein sind folgende Feststellungen von Bedeutung: Der MCHC ist wichtig. Osmotische Resistenztests sind nicht bei allen Patienten pathologisch, insbesondere nicht bei jenen Patienten, bei denen die Erythrozyten insbesondere viel Wasser verlieren, aber wenig Oberflächenmembran.

Im Kapitel findet sich auch eine Beschreibung einer varianten Form einer hereditären Membranopathie, die bei Frau Pechstein in Betracht kommt: die Xerozytose mit folgenden Merkmalen: Anämie selten, autosomal dominant, MCHC-Erhöhung, meist vergrößerte osmotische Resistenz im Gegensatz zur Sphärozytose, Ausströmen von Kalium und Wasser aus der Zelle, Einströmen von Natrium in die Zelle, Na-K-ATPase-Problem, Retikulozytose. Es wird auch deutlich, dass die Xerozytose ein Syndrom ist, für das es keinen eindeutig entscheidenden Test gibt sondern ein Batterie von Tests mit synoptischer Stellung der Diagnose.

Zitate Sphärozytose

„The most helpful red cell index is the MCHC which is routinely higher higher, reflecting the red cell dehydration.”

“The reduced surface area:volume ratio that is characteristic of spherocytes increases their susceptibility to osmotic lysis in hypotonic solutions. This is the basis of the well-known osmotic fragility test, in which red cells are suspended in buffered salt solutions of differing tonicity and the degree of hemolysis is determined. However, according to one previous report, the osmotic fragility test is normal in as many as one-third of hereditary spherocytosis samples. The normal samples are those in which cell dehydration has reduced volume to a degree equivalent to the reduction in surface area characteristic of spherocytes. Incubation of blood specimens for 24 hours in the absence of metabolic substrate accentuates the osmotic fragility of spherocytes and makes easier the distinction of this disease from others. Surprisingly, even after incubation, 15% of the samples in the report cited above (Cynober) had normal osmotic fragility.”

Zitate Xerozytose

“Little or no anemia is usually found in this disorder, although the red life-span may be considerably shortened. Exercise-associated episodes of hemolysis were reported ...”

“The reticulocyte count is often increased to a level higher than expected for the degree of anemia.”

“Ultimately, the diagnosis of xerocytosis depends on recognizing the abnormalities listed above and eliminating from consideration other diseases

8.4 Lehrbuch: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Kapitel 9, Autor: Eber S. Seiten 123-138, 2006: "Angeborene Erythrozytenmembrandefekte"

Fazit Der Autor gibt keine minimalen Erfordernisse für die Diagnose einer Sphärozytose an. Er geht auch auf die hereditäre Xerozytose ein (siehe auch Punkt 8.3). Seine Tabelle 9.5 gibt einen Überblick über die Abgrenzung der verschiedenen Formen der Membranopathie.

Einteilung der angeborenen Erythrozyten-Membrandefekte

- Hereditäre Sphärozytose
- Hereditäre Elliptozytose
- Hereditäre Poikilozytose (Pyropoikilozytose)
- Hereditäre sphärozytäre Elliptozytose
- Südostasiatische Ovalozytose
- Hereditäre Stomatozytose
- Hereditäre Xerozytose

Tabelle 9.5. Merkmale von hereditärer Stomatozytose, Xerozytose und verwandter Erkrankungen (nach Walensky et al. 2003)

	Stomatozytose ¹ mit zellulärer Überwässerung	Kryohydrozytose	Familläre Pseudo- hyperkaliämie	Xerozytose
Hämolyse	Mittel bis schwer	Mild bis mittel	Mild bis normal	Mild bis mittel
Erythrozytenmorphologie	Stomatozyten ↑-↑↑↑	Stomatozyten (↑), tassenförmig; zentraler Balken	Targetzellen, Stomatozyten (↑)	Targetzellen ↑ Echinozyten ↑ Stomatozyten (↑)
MCV (80–100 fl) ²	110–150	90–105	82–104	84–122
MCHC (32–36 g/dl)	24–30	34–38	33–39	34–38
Osmotische Fragilität	↑↑↑	Normal bis (↑)	(↓)	↓
Erythrozytäres Na ⁺ (5–12 mmol/l)	60–100	15–50	10–25	10–30
Erythrozytäres K ⁺ (90–103 mmol/l)	20–55	55–65	75–100	60–90
Erythrozytäres K ⁺ und Na ⁺ (95–110 mmol/l)	110–140	75–105	87–109	75–99
Passives Membranleak ³	20–40	1–6	1–2	2–4
Stomatinverlust	Ja	Nein? ⁴	Nein	Nein
Kälteautohämolyse	Nein	Ja	Nein	Nein
Pseudohyperkaliämie	K ⁺ (↑) nach Lagerung	Ja	Ja, ↑↑↑	Teilweise
Intrauterin Aszites	Nein	Nein	Nein	Gering bis stark
Rückgang der Hämolyse nach Splenektomie	Gut	Gering bis gar nicht	Nicht erforderlich	Schlecht
Postsplenektomie- Thromboserisiko	↑↑↑	Normal?	Nicht bekannt	↑↑↑

¹ Neben der schweren Form gibt es leichtere Verlaufsformen der hereditären Stomatozytose, bei denen Stomatozyten vermehrt sind, die zelluläre Überwässerung (MCV 95–130; Na⁺ 30–60) jedoch nur leicht ausgeprägt ist (Jarvis et al. 2001; Oski et al. 1969)

² Die Normalbereiche sind in Klammern angegeben

³ Definiert als der Ouabain- und Bumetanid-resistente 86RubidiumEinstrom bei 37°C; es wird der Quotient des Patientenwerts zum normalen Einstrom angegeben (Norm: 0,06–0,1 mmol/l Erythrozyten/h; Coles et al. 1999)

⁴ Bei einem Patient mit angeblicher Kryohydrozytose wurde ein Fehlen des Stomatins beschrieben (Lande et al. 1982); dieser Patient hat aber eher Zeichen der Stomatozytose mit zellulärer Überwässerung.

↑ vermehrt; (↓) vermindert; ↑↑↑ deutlich vermehrt oder erhöht; (↑) leicht vermehrt oder erhöht; (↓) leicht erniedrigt.

8.5 Leitlinie UK: Leitlinie der General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology: Bolton-Maggs, Stevens, Dodd et al: Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. Brit. J. Haemat 126: 455-474, 2004.

Fazit In Bezug auf Frau Pechstein ist wichtig: Die Protein-Analyse mit SDS-PAGE und die Lyse-Tests sind nicht bei allen Patienten pathologisch; dies gilt insbesondere für ganz milde Formen. Die bei Frau Pechstein pathologischen Parameter MCHC und der Prozentsatz hyperdenser Zellen sind ein „discriminating feature of the HS phenotype“. Selbst asymptomatische Merkmalsträger rezessiver Varianten haben mittlere Retikulozytenzahlen von 1-3%.

Zitate Wörtlich heißt es: “Hereditary spherocytosis is a heterogenous group of disorders with regard to clinical severity, protein defects and mode of inheritance. The clinical severity of HS varies from symptom free carrier to severe haemolysis. Mild HS can be difficult to identify because individuals may have a normal haemoglobin and bilirubin. The presence of spherocytes and reticulocytosis will support the diagnosis. If there are no spherocytes seen on the film, no abnormalities in the red cell indices and the reticulocyte count is normal, a carrier state cannot be excluded, but the individual is unlikely to have any clinical sequelae. Occasionally, mild HS can be exacerbated by illnesses that cause splenomegaly, such as infectious mononucleosis.”

Ausdrücklich wird in der Leitlinie darauf hingewiesen, dass Spektrin-Analysen etc normal sein können. „Gel electrophoresis is the method of choice.... The main drawback is a lack of sensitivity to very mild or asymptomatic carrier HS” (Seite 463 und Tabelle 3).

Dies gilt auch für die osmotische Resistenz-Tests (negativ bei 10-20% der Patienten). „All the laboratory tests currently in use can detect typical HS (Table VI). The acid glycerol lysis test has a higher detection rate in asymptomatic relatives of known affected individuals than the osmotic fragility test. The drawback of both tests is an apparent lack of specificity under certain circumstances.....” “A normal osmotic fragility result does not exclude the diagnosis of HS and may occur in 10–20% of cases of HS” (Seite 460).

“The cryohaemolysis test, the osmotic gradient ektacytometry and the EMA binding test have a higher predictive value in the diagnosis of HS In mild or atypical cases, difficulty in interpretation is likely to occur with results that fall between normal and typical HS reference ranges (Seite 461).”

Table III. Classification of spherocytosis and indications for splenectomy (modified from Eber, S.W., Armbrust, R. & Schroter, W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility and autohemolysis. Journal of Pediatrics, 177, 409–411 (1990) (Seite 458).

Classification	Trait	Mild	Moderate	Severe
Haemoglobin (g/dl)	Normal	11–15	8–12	6–8
Reticulocyte count %	Normal (<3%)	3–6	>6	>10
Bilirubin (µmol/l)	<17	17–34	>34	>51
Spectrin* per erythrocyte (% of normal)	100	80–100	50–80	40–60

*Data on spectrin content are provided for interest; it is not necessary to measure this.

Table V. Elevated automated red cell parameters in the prediction of hereditary spherocytosis and its severity (aus der hier zitierten Leitlinie, GBR, Seite 460)

Parameters	Remarks	Reference
Combined MCHC and RDW or HDW	Significantly higher in HS	Pati et al (1989) Michaels et al (1997)
Combined % hyperdense* cells and RDW	Excellent diagnostic efficacy and indication of HS severity	Pilar Ricard & Gilanz (1996)
% Microcytes	The best indicator of HS severity	Cynober et al (1996)
Combined MCHC and % hyperdense cells	A discriminating feature of the HS phenotype	Cynober et al (1996)

8.6 Leitlinie Deutschland Pädiatrie – S.W. Eber Leitlinie Hereditäre Sphärozytose - Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). H. Cario (Ulm), R. Dickerhoff (Bonn/St.-Augustin), S. Eber (München, H. Heimpel (Ulm), G. Janssen (Düsseldorf), G. Janka-Schaub (Hamburg), E. Kohne (Ulm), A. E. Kulozik (Heidelberg), M. Lakomek (Göttingen), C. Niemeyer (Freiburg), G. Stöhr (Göttingen) Leitlinienkoordination: Ursula Creutzig, Hannover. AWMF online.

Fazit

Die pädiatrische Sphärozytose-Leitlinie der GPOH ist nur begrenzt auf Situationen wie bei Frau Pechstein anwendbar. Das Ziel der Leitlinie ist Hilfestellung für Diagnostik und Therapie bei Patienten, die in aller Regel mit einer hämolytischen Konstellation, einer Milzvergrößerung oder einer Anämie zum Arzt kommen. Bei solchen Patienten wäre es völlig verfehlt, auf der Basis von Retikulozytose, hohem MCHC-Wert und vermehrt nachgewiesenen hyperchromen/hyperdensen Erythrozyten eine Sphärozytose für gesichert zu halten und z.B. eine Milzentfernung anzuraten. Ohne Nachweis der osmotischen Fragilität und ohne die anderen Sphärozytose-Tests dürfte hier keine therapeutische Entscheidung getroffen werden. Die diagnostischen Kriterien sind bei der Leitlinie der GPOH unter dem Aspekt der Abgrenzung von anderen Erkrankungen zu sehen.

Dementsprechend könnte man bei Anwendung der Leitlinie der GPOH bei Frau Pechstein keine Kugelzell-Anomalie diagnostizieren, weil die als obligat bezeichnete erhöhte osmotische Fragilität der Erythrozyten nicht durch die entsprechenden Tests nachgewiesen ist. Bei dem Kriterium „Zeichen der gesteigerten Hämolyse“ sind wie gefordert zwei weitgehend erfüllt (siehe auch Gutachten Prof. Dr. Röcker): Retikulozytose und Ahaptoglobinämie. Die beiden übrigen „indirektes Bilirubin erhöht“, „erhöhte LDH“ sind nicht erfüllt „(mindestens 2 Zeichen obligatorisch)“. Wenn die Retikulozytose jedoch als Doping-Indikator gewertet würde, lägen hier keine zwei erfüllten Kriterien vor.

Von den Kriterien der „leichten HS“ sind die Parameter (1) Bilirubin und (2) osmotische Fragilität im inkubierten Blut nicht erfüllt. (3) Der Hämoglobinwert war auch öfters über 15 g/dl gemessen worden.

Zitate

„Neben der gesteigerten Hämolyse, der positiven Familienanamnese und der Milzvergrößerung sind der Nachweis von Kugelzellen und einer erhöhten osmotischen Fragilität der Erythrozyten die wichtigsten diagnostischen Kriterien. Weitere Spezialuntersuchungen sind nur bei fehlenden fakultativen Hauptbefunden erforderlich.“

Tabelle: Klinische Schweregrade der hereditären Sphärozytose (weitestgehend wörtlich)

	Leichte HS	Mittelschwere HS	Schwere HS	Sehr schwere HS
Anteil an Patienten (%)	25-33	60-70	≈ 10	3-4
Hämoglobin (G/L)	110 - 150	80 - 110	60-80	< 60
Retikulozyten (%)	1,5 - 6	≥ 6	≥10 meist >15	≥ 10
Bilirubin (mg/dl)	1 - 2	≥ 2	> 2-3	≥ 3
Osmotische Fragilität				
Frisches Blut	Normal/gering erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht
Inkubiertes Blut	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht;
Sphärozyten u.a. im Blutaussstrich	Oft nur vereinzelt	Deutlich vermehrt	Deutlich vermehrt	Mikrosphärozyten und Poikilozyten
Transfusionen	0-1	0-2	≥ 3	regelmäßig

„Nachweisdiagnostik: Die Erkrankung wird durch folgende Untersuchungsergebnisse nachgewiesen (obligatorische Befunde müssen immer vorhanden sein)“:

Tabelle zur Nachweisdiagnostik (weitestgehend wörtlich)

Hauptbefunde:

- Positive Familienanamnese (fakultativ)
- Milzvergrößerung (fakultativ)
- Anämie (fakultativ, ca. 1/3 der Patienten sind nicht anämisch!)
- Zeichen der gesteigerten Hämolyse: Retikulozytose, indirektes Bilirubin erhöht, erhöhte LDH, Ahaptoglobulinämie (mindestens 2 Zeichen obligatorisch)
- Nachweis von vermehrten Kugelzellen im Ausstrich (können bei leichten Fällen fehlen)
- Erhöhte osmotische Fragilität der Erythrozyten (obligatorisch)
- Erhöhte Anisozytose (RDW ?) (fakultativ)

Nebenbefunde:

- Erhöhte MCHC (> 35 %) oder Rechtsverschiebung des MCHC Histogramms (fakultativ)
- Verminderte Spektrinkonzentration u. a. Defekte der Erythrozytenmembran (fakultativ)
- Verminderte Eosin-Maleimid-Bindung (erniedrigte Bande 3-Konzentration)

8.7 Kutter, Luxemburg: Strategies for screening for hereditary spherocytosis. J. Chin. Clin. Med. 2: 266, 2007

Fazit Der Prozentsatz hyperchromer Erythrozyten wurde bei 94.000 Luxemburger Patienten untersucht. Bei 547 wurde die definitive Diagnose einer hereditären Sphärozytose gestellt auf der Basis von hyperchromen Zellen. Dazu musste der Prozentsatz solcher Zellen dauerhaft bzw. oft über 3.4% und mindestens einmal über 9% liegen. Dies ist bei Frau Pechstein der Fall.

Zitate "We provisionally conclude HS from permanently increased %Hyper over one year with at least one value >9.0%. Before issuing a final diagnosis of HS, the eventuality of the secondary origin must be considered. While the increase of %Hyper is generally not permanent in diseases such as infectious mononucleosis, HELLP syndrome, ethanol abuse, in pregnancy and during chemotherapy, it is permanent in G6PHD deficiency, homozygous drepanocytosis (HbSS, HbSC), long lasting autoimmune, haemolytic anaemia (AIHA). In other words increased %Hyper can be seen as indicator of haemolysis of origin" (Seite 267). 94.000 Luxemburger Patienten waren bezüglich des Prozentsatzes hyperchromer Zellen untersucht worden. Bei 992 ergab sich aufgrund dieser Werte der Verdacht auf das Vorliegen einer hereditären Sphärozytose, bei 547 wurde die Diagnose definitiv gestellt überwiegend auf der Basis des Verlaufs der hyperchromen Erys. (J. Chin. Clin. Med. 2: 266, 2007). Fünf der Patienten hatten eine "marked anaemia", fünf eine Milzvergrößerung. Eine "marked reticulocytosis" war vorhanden bei 21 von 105 entsprechend untersuchten Patienten; welcher Wert als "marked reticulocytosis" angesehen wurde, ist nicht angegeben. Signifikante Haptoglobinverminderung bei 26 von 64 Untersuchten, freies Plasma-Hämoglobin erhöht bei 139 von 350.

8.8 Cynober U.S.A.: Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: Relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. J Lab Clin Med 128: 259-269, 1996)

Fazit: Die Autoren betonen die überragende Bedeutung des Prozentsatzes hyperchromer Zellen in Verbindung mit erhöhten MCHC-Werten für die Diagnose einer Sphärozytose. Dies ist exakt die Laborwerte-Kombination von Claudia Pechstein. Auch die normale Zahl von Mikrozyten und der immer normale MCV-Wert passt nach diesen Autoren perfekt dazu.

Zitate “If, on the other hand, there is evidence for an increased mean cell hemoglobin concentration or an increased percentage of hyperdense red cells (or both), a diagnosis of HS should be seriously considered in spite of normal osmotic fragility. The availability of routine, automated hematology analyzers that can generate hemoglobin concentration histograms makes the proposed approach feasible.” (J Lab Clin Med 128: 259-269, 1996)

So untersuchten Cynober et al insgesamt 55 nicht-splenektomierte Patienten mit HS. Davon fiel der Test auf osmotische Fragilität in 18 von 55 Fällen (33 %) negativ aus. Bei Durchführung des gleichen Tests mit inkubiertem Blut waren immer noch 8 Patienten negativ (14,5 %).

„To increase the sensitivity of the osmotic fragility test for the diagnosis of HS, the test is generally repeated after incubation of the whole blood sample at 37°C for 24 hours (incubated osmotic fragility test). During this incubation period the HS red cells lose surface area at a faster rate than do normal cells, and they also increase their volume as a result of cell hydration. This combination of changes exaggerates the susceptibility of HS red cells to osmotic lysis as compared with their normal counterparts. In the group of non-splenectomized patients with HS that we studied, the incubated osmotic fragility of red cells was normal in 8 of the patients.”

“Neither the MCV nor the percentage of microcytic red cells had any diagnostic value. There was substantial overlap in the values of these two parameters between the patient group and the control group..... On the other hand, the percentage of hyperdense cells could clearly distinguish the group of patients with HS from their normal counterparts. Because hyperdense cells are also seen in other red cell disorders such as Hb SC disease, Hb CC disease, and xerocytosis, the finding of increased numbers of dense cells is not specific for HS. However, it can be of great value in screening for HS in members from affected families, because similar increases in the numbers of hyperdense cells are found in all affected members.“

8.9 Conway GBR: The clinical relevance of an isolated increase in the number of circulating hyperchromic red blood cells. Conway AM, Vora AJ, Hinchliffe RT: J Clin Pathol 55: 841-844, 2002

Fazit

Nach diesen Daten von „apparently healthy children“ mit vermehrten hyperchromen Erythrozyten (Zellen die Wasser verloren haben) hat Frau Pechstein eine Konstellation von hyperchromen Erythrozyten verbunden mit der zusätzlichen dort beschriebenen Konstellation: plus Retikulozyten erhöht plus MCHC erhöht aber Lyse-Tests negativ bzw. nicht signifikant verschieden von den Normal-Kindern (modified Pink test). Die Autoren grenzen diese Patientengruppe von der mit typischer hereditärer Sphärozytose ab, die alle diese labortechnischen Merkmale auch hat aber in wesentlich stärkerem Ausmaß. Die mittlere Retikulozytenzahl liegt dieser neu definierten Patientengruppe bei 102.800/µl +/- 44.800/µl (Standardabweichung).

Zitate

„Subjects with an isolated increase in hyperchromic red blood cells have a profile of red blood cell changes similar to that of patients with HS, but to a lesser degree. They may carry a recessive form of the disease but lack the laboratory features of clinically manifest HS“ (Summary).

“We estimate the incidence of an increase in hyperchromic red blood cells in our population also to be around 1%, giving an incidence of an abnormal Pink test of about 0.1%, based on the finding of an abnormal Pink test in three of the 34 children studied“ (Seite 843).

“Take home messages: Subjects with an isolated increase in hyperchromic red blood cells have a profile of red blood cell changes similar to that of patients with HS, including significantly higher numbers of hyperchromic red blood cells and reticulocytes, and significantly higher values for mean cell haemoglobin concentration and haemoglobin distribution width, and lower mean cell volume values, although these were seen to a lesser degree than is present in HS.

About 1% of North European subjects have laboratory findings indicative of a continuum between normal subjects and those with clinically manifest disease.

These individuals may carry a recessive form of the disease but lack the laboratory features of clinically manifest HS“ (Seite 843).

8.10 Mariani, Italien (Arbeitsgruppe von Professor Dr. Zanelli, Mailand): Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, Marcello AP, Fermo E, Pedotti P, Boschetti C, Zanella A: Haematologica 93:1310-1317, 2008

Fazit

Größte mir bekannte Fall-Sammlung zur hereditären Sphärozytose. Es handelt sich hierbei allerdings um eine Sammlung von Fällen mit klinisch auffälliger Erkrankung. Asymptomatische Patienten finden sich offenbar nur wenige. Man erkennt dies zum Beispiel daran, dass 70% aller untersuchter Patienten eine Milzvergrößerung hatten. 60% hatten eine Anämie.

11% aller Sphärozytose-Patienten waren in der SDS-PAGE unauffällig und zeigten dementsprechend keinen nachweisbaren Eiweißdefekt der Zellwand (dem Typ 6 nach Perotta entsprechend). Ausdrücklich heisst es in dem Artikel, eine molekularbiologische Suche ist erfolglos, wenn vorher kein Proteindefekt nachgewiesen ist. Zitat: „efforts to identify the protein defect by genetic analysis in unclassified cases have been unsuccessful.“ Dies sei ergänzt, weil in Deutschland bei Frau Pechstein das Fehlen dieser an sich wünschenswerten molekularbiologischen Diagnostik vielfach kritisiert worden ist.

In den klinischen Parametern unterschieden sich die proteinchemisch nicht-splektomierten nicht-klassifizierbaren Typ-6-Patienten (nach Perotta) nach meiner Einschätzung der Abbildung 2 nicht relevant von denen mit nachgewiesenem Proteindefekt. Lediglich der Hämoglobinwert ist bei diesen im Mittel mit 12.5 g/dl höher als bei den anderen Subgruppen (dort zwischen 10.7 und 11.5 g/dl, Werte nach der Abbildung geschätzt).

Auszug aus “Table 1: “Hematologic and biochemical data of non-splenectomized and splenectomized HS patients”

Ergebnisse der osmotischen Resistenztests bei 259 nicht-splenektomierten Patienten

Standard glycerol lysis	pathologisch bei 124 Patienten	48%
Acidified glycerol lysis	pathologisch bei 246 Patienten	95%
Pink	pathologisch bei 197 Patienten	76%
NaCl on fresh blood	pathologisch bei 174 Patienten	67%
NaCl on incubated blood	pathologisch bei 223 Patienten	86%
All tests	pathologisch bei 259 Patienten	100%

Nach den Mailänder Erfahrungen liegt die Sensitivität der einzelnen Lyse-Test-Untersuchungen sowie des EMA-Tests teils deutlich unter 100%. Für die Kombination der verschiedenen Tests haben die Mailänder Kollegen hingegen eine Sensitivität von 100% für die Erkennung der Sphärozytose angegeben. Dieses Ergebnis wörtlich

genommen bedeutet, dass eine Sphärozytose bei Frau Pechstein ausgeschlossen ist.

Was aber bedeutet es, wenn die Sensitivität mit 100% angegeben ist? Wörtlich heisst das, jeder einzelne Fall wird durch die Test-Kombination erkannt. Dies ist auch die Einschätzung des Kinderarztes und Wissenschaftler mit dem Schwerpunkt Erythrozyten, Prof. Dr. Eber, München (persönliche Mitteilung), ein ebenfalls auf diesem Sektor international sehr renommierter Wissenschaftler.

Ich habe diesbezüglich trotz der herausragenden Kompetenz der Professoren Zanella und Eber auf dem hier diskutierten Gebiet etwas Bedenken. Ist die Sensitivität einer Laborwert-Kombination 100%, bedeutet dies nicht mehr und nicht weniger als, dass man dieses Merkmal zur Krankheitsdefinition verwendet hat. Nach dieser Definition findet man dann natürlich eine 100%ige „Sensitivität“.

Andere Autoren sehen dies offenbar anders, wie aus den zusätzlich hier zitierten Publikationen (siehe Abschnitte 8.8, 8.9, 8.11, 8.12 dieses Gutachtens) hervorgeht. Diese Autoren ziehen ganz überwiegend bei einer Labor-Konstellation wie der von Frau Pechstein eine Xerozytose nicht einmal in Erwähnung. In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass die xerozytische Eigenschaft, das „Austrocknen“ der Zellen, sich bei sehr vielen Patienten mit Sphärozytose findet; speziell bei den vielen mit erhöhtem MCHC-Wert.

Die Wörter “xerocytosis” und “stomatocytosis” kommen zum Beispiel in den Publikationen von Kutter (Abschnitt 8.7) und Conway (Abschnitt 8.9), die sich beide mit hohen MCHC-Werten und hyperchromen Zellen befassen, einfach nicht vor.

In der aktuellen Review-Arbeit von Perotta, Gallagher und Mohandas im Lancet 2008 heisst es dementsprechend: “Thus, the clinical presentation ranging from band-3-related hereditary spherocytosis to dehydrated hereditary stomatocytosis and cryohydrocytosis is a continuum.” (Seite 1414 des Artikels) (Siehe auch Abschnitt 8.12).

8.11 **Michaels U.S.A.:** Screening for hereditary spherocytosis by use of automated erythrocyte indexes. Michaels LA, Cohen AR, Thao H, Raphael RI, Manno CS: J Pediatr 130: 957-960, 1997

Fazit

Laut Michaels et al begründet allein der wiederholt/oft erhöhte MCHC-Wert den Verdacht auf das Vorliegen einer Sphärozytose mit einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von 86%. Das heißt: dieser erhöhte Laborwert erkennt 70% aller Kugelzell-Anomalie-Fälle. Und wenn der Wert erhöht ist, liegt mit 86%iger Sicherheit eine solche Erkrankung vor. Für höhere Werte über 35.4 g/dl liegt die Spezifität sogar bei 96%. Allerdings beruht diese Auswertung auf Kindern. Die Übertragbarkeit auf Erwachsene ist unsicher; die Zahlen scheinen mir für sie zu hoch zu sein.

Zitate

Bei 112 HS-Kindern und einer Vergleichsgruppe fanden die Autoren, dass schon allein der MCHC-Wert ein hohes Maß an diagnostischer Aussagekraft hat bei der Diagnostik der Sphärozytose: „An MCHC >35gm/dl has a sensitivity of 70% and a specificity of 86%“ für die HS. Wenn zusätzlich der RDW (Schwankung der Größe der Erythrozyten) erhöht ist, ist nach den Autoren eine Spezifität von 100% gegeben. Letzteres liegt bei Frau Pechstein nicht vor. J. Pediatr 130: 957, 1997.

8.12 Perrotta Lancet 2008: Hereditary spherocytosis. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N: Lancet 372: 1411-1426, 2008

Fazit

Da bei Frau Pechstein die SDS-PAGE-Untersuchung unauffällig war, liegt der von Perrotta et al als sechstes angegebene Typ der Sphärozytose vor mit der Bezeichnung „yet to be defined protein abnormalities“. Es wird auf die Unsicherheit der Lyse-Tests hingewiesen insbesondere bei asymptomatischer Erkrankung. Es wird darauf hingewiesen, dass die hyperchromen Zellen und der MCHC-Wert eine große Bedeutung für die Kugelzell-Anomalie-Diagnostik haben.

Somit ist die HS-Diagnose im Einklang mit diesem Review des Jahres 2008 in der besonders angesehenen britischen Zeitschrift Lancet.

Zitate

„Some automated haematology analysers measure cell haemoglobin concentration of individual red blood cells, and increased numbers of dense dehydrated cells might identify all patients with hereditary spherocytosis without the need for additional laboratory tests, especially when one member of a family is already known to have the illness“ (Seite 1420). Exakt dies ist bei Frau Pechstein immer wieder nachweisbar, auch schon im am 4. Februar 2000, um 11:59 Uhr, in Milwaukee. Es wurden damals 16.2% hyperdense/hyperchrome Erythrozyten gezählt.

“The parents or other relatives of patients with recessive hereditary disease are carriers of an asymptomatic trait. They are clinically healthy and do not have anaemia, splenomegaly, hyperbilirubinaemia, or spherocytosis on peripheral blood smears. Most relatives have subtle laboratory signs of hereditary disease, including slight reticulocytosis (1.5–3.0%) or slightly reduced haptoglobin values. The incubated osmotic fragility test is probably the most sensitive method for detection of carriers, especially by the 100% lysis point, which is greatly increased in carriers (mean sodium chloride 4.3 g/L [SD 0.5]) compared with controls (2.3 g/L [0.7]). The acidified glycerol lysis test might also be useful for the diagnosis of spherocytosis. About 1% of the population are estimated to be silent carriers“ (Seite 1417)

“Membrane loss in hereditary spherocytosis is associated with defects in several membrane proteins. On the basis of densitometric quantification of membrane proteins separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis, this disease can be divided into subsets: (1) isolated deficiency of spectrin; (2) combined deficiency of spectrin and ankyrin; (3) deficiency of band-3 protein; (4) deficiency of protein 4.2; (5) deficiency of Rh complex; and

(6) yet to be defined protein abnormalities.”

Tabelle 3 zu entnehmen, dass bei milder Sphärozytose die Gel-Elektrophorese SDS-PAGE unauffällig ist (Seite 1416).

“The simplest method is SDS-PAGE of red blood cell membranes, but this technique reveals abnormalities in only 70–80% of patients” (Seite 1421).

“Osmotic fragility tests have a poor sensitivity because about 20% of mild cases of hereditary spherocytosis are missed. It is unreliable in patients with small numbers of spherocytes.. “ (Seite 1421).

Bei der Klassifikation gehen die Autoren etwas anders vor als in der oben zitierten Leitlinien-Arbeit aus Groß-Britannien. Prinzipiell besteht jedoch kein Unterschied; die ganz milde Kategorie „Trait“ ist nicht aufgeführt.

Table 3: Classification of hereditary spherocytosis (Tabelle wörtlich bis auf letzte Zeile)

	Mild	Moderate	Moder severe	Severe
Haemoglobin (g/L)	Normal	>80	60–80	<60
Reticulocytes	<6%	>6%	>10%	>10%
Bilirubin (µmol/L)	17.1–34.2	>34.2	>34.2–51.3	>51.3
Peripheral smear	Some	Spherocytes	Spherocytes	Microspheroc. poikilocytosis
OF (fresh blood)	Normal/slightly	increased	Increased	Increased
OF (incubated blood)	Increased	Increased	Increased	Increased
Splenectomy	Rarely	In some cases	Necessary	Necessary early
Transfusions	0–1	0–2	>2	Regular
SDS-PAGE	Normal	Pathol	Pathol	Pathol

8.13 Bruce GBR 2009 Hereditary stomatocytosis and cation leaky red cells — Recent developments. Bruce LJ: Blood Cells, Molecules, and Diseases 42 (2009) 216–222

In dieser Übersichtsarbeit (siehe auch Flatt JF and Bruce LJ: „The hereditary stomatocytoses“ Zeitschrift Haematologica 94: 1039, 2009) zu hereditären Stomatozytosen kann man einen sehr guten Überblick über die verschiedenen Formen der Stomatozytose-Syndrome gewinnen. Die unterstrichene „dehydrated hereditary stomatocytosis“ ist diejenige Form, die bei Frau Pechstein als Alternative zur Sphärozytose diskutiert wird.

Warum heißen die Erkrankungen Stomatozytosen? Stomatozyten sind rote Blutkörperchen, die wie ein küssender Mund aussehen. Sie heißen so, weil Hämatologen solche archaischen Bezeichnungen lieben. Mit ihnen tun sie so, als würden sie die Krankheiten am Mikroskop diagnostizieren. Das tun jedoch nur die wenigsten. In Wirklichkeit sind Stomatozyten bei Stomatozytosen eher selten zu finden. Bei Kugelzellenanomalie muss man die Kugelzellen auch sehr oft lange suchen.

Per definitionem geht man davon aus, dass die verschiedenen Sphärozytosen auf strukturellen Defekten der Membraneiweise beruhen, während die Stomatozytosen auf Defekten bei Funktionseiwissen beruhen sollen – also zum Beispiel auf Defekten des Systems, das für die richtige Elektrolytkonzentration in den roten Blutkörperchen sorgen soll.

Dieser entscheidende Unterschied zu Sphärozytosen ist jedoch oft schwer nachweisbar. Es gibt keinen Einzeltest, der zweifelsfrei das Vorliegen einer Stomatozytose zum Beispiel vom Typ der Xerozytose beweist.

Einteilung

Folgendes ist die Original-Einteilung der unterschiedenen Syndrome

- Cryohydrocytosis
- HSt “Blackburn”
- Hereditary spherocytosis with a low temperature leak
- Overhydrated hereditary stomatocytosis (OHSt)
- Stomatin deficient CHC
- Dehydrated hereditary stomatocytosis
- Familial pseudohyperkalemia
- Distal renal tubular acidosis
- SouthEast Asian ovalocytosis (SAO)
- Mediterranean stomatocytosis
- Rhesus null
- Stomatocytosis

Zitat

Als Definition ist angegeben: “Hereditary stomatocytosis (HSt) describes a group of haemolytic anemias where the red cells leak monovalent cations.” Gegenwärtig kann die Erkrankung noch durch

keine Untersuchung mit definitiv bewiesen werden. Die sogenannte Gradienten-Ektazytometrie (siehe vorn) ist allerdings sehr hilfreich.

Zitat Perotta 2008: „Hereditary stomatocytoses are very rare autosomal dominant haemolytic anaemias, often diagnosed as atypical hereditary spherocytosis.“ (siehe Abschnitt 8.12)

Zitiert aus Guideline: “Cell dehydration occurring in the spherocytes of a patient with HS can be one of the causes of normal osmotic fragility results for non-splenectomized HS patients (Cynober et al, 1996)(siehe Abschnitt 8.5)

9 Wie hoch sind die Retikulozyten bei ganz milder asymptomatischer Sphärozytose?

Fazit Die bei Frau Pechstein beobachteten Retikulozytenzahlen passen exakt zu einer ganz milden Sphärozytose und sogar zum alleinigen Träger-Status bei rezessiver Form. Für klinisch gesunde Eltern von Kindern, die an einer rezessiv vererbten Sphärozytose leiden, werden mittlere Retikulozytenzahlen von 2.1% +/- 0.8% angegeben.

Lehrbücher In beiden amerikanischen Lehrbüchern (Wintrob's, Handin) wird einheitlich angegeben, dass selbst bei asymptomatischen Trägern die Reti-Zahl zwischen 1 und 3% liegt. Siehe Tabelle 31.2 im Lehrbuch Wintrob's und Tabelle 54.9 im Lehrbuch Handin.

“**Silent carrier state:** The parents of patients with nondominant HS are clinically asymptomatic and do not have anemia, splenomegaly, hyperbilirubinemia, or spherocytosis in peripheral blood smears. Most do have subtle laboratory signs of HS, including slight reticulocytosis (average 2.1% +/- 0.8%)” (Handin Seite 1756)

Leitlinie UK Leitlinie der General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology: Bolton, Maggs, Stevens, Dodd et al: Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. Brit. J. Haemat 126: 455-474, 2004.

Tabelle 3: Retikulozytenzahl bei milder Form 3-6%, bei Trägerstatus bis 3%.

Conway GBR Conway AM, Vora AJ, Hinchliffe RT: The clinical relevance of an isolated increase in the number of circulating hyperchromic red blood cells. J Clin Pathol 55: 841-844, 2002

Bei gesund erscheinenden Kindern mit der Konstellation viele hyperchrome Zellen plus erhöhter MCHC-Wert lag die mittlere Retikulozytenzahl bei dieser Patientengruppe bei 102.800/µl +/-

44.800/μl (Standardabweichung). Dies entspricht in etwa 2.3% +/- 1%.

Perrotta Lancet 2008 Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N: Hereditary spherocytosis. Lancet 372: 1411-1426, 2008.

Selbst die Träger rezessiv vererbter HS-Formen haben im Mittel 1.5 – 3% Retikulozyten.

“The parents or other relatives of patients with recessive hereditary disease are carriers of an asymptomatic trait. They are clinically healthy and do not have anaemia, splenomegaly, hyperbilirubinaemia, or spherocytosis on peripheral blood smears. Most relatives have subtle laboratory signs of hereditary disease, including slight reticulocytosis (1.5–3.0%) or slightly reduced haptoglobin values” (Seite 1417).

Cyober U.S.A

Red cell abnormalities in hereditary spherocytosis: Relevance to diagnosis and understanding of the variable expression of clinical severity. J Lab Clin Med 128: 259-269, 1996)

Der Schweregrad Null der Sphärozytose nach Cyober (Schweregrad-Bereich: null - 15) gilt bis zu Retikulozytenwerte von 150.000/μl. Dies entspricht in etwa 3.3% Retikulozyten.

10 Zusammenfassung - Diagnosestellung

Resümee: Die zusätzliche Spezialdiagnostik mit den neuen im Jahr 2009 etablierten Indizes und der Familienuntersuchung ergab die bereits zuvor vermutete Diagnose einer **abortiven Membranopathie** der Erythrozyten im Sinne einer **Sphärozytose**. Bei Gesamtbetrachtung aller oben diskutierter Befunde und nach den Leitlinien der Task Force of the British Committee for Standards in Haematology besteht **kein Zweifel** daran, dass die Blutbildkonstellation bei der WM in Hamar und in vielen Jahren zuvor auf die **hämolytische Konstellation** zurückgeht.

Prinzipiell hätten allerdings die zur CAS-Verhandlung bereits vorliegenden Befunde für die Annahme der Sphärozytose-Diagnose reichen müssen

1. Oft hohe MCHC-Werte
2. Oft erhöhter Prozentsatz hyperchromer Erythrozyten
3. Immer Haptoglobinwerte im unteren Grenzbereich oder darunter im Labor 28

10.1 Als Diagnose ergibt sich:

Diagnose	Hereditäre Membranopathie passend zu Sphärozytose oder „Variante“ wie Xerozytose
Erbmuster	Unklar; dominant (Vater) möglich; heterozygoter Träger einer rezessiven Variante möglich vererbt vom Vater
Häufigkeiten	Dominant 1:2.000 Rezessiv 1:20.000, daraus errechnet sich eine Trägerstatus-Häufigkeit von 1% Trägerstatus: 1:100
Schweregrad	Grad Null nach Cynober (Schweregrad-Bereich: null - 15) (Retis bis 150.000/µl bei Schweregrad 0)
Protein-Typ	Typ 6 nach Perrotta: “Yet to be defined protein abnormalities” (Perrotta Lancet 2008)

Zum Schweregrad: Cynober wörtlich: “... a severity score was derived based on the mean hemoglobin value, the reticulocyte count, the presence or absence of splenomegaly, and the transfusion requirement. The relative weight given to the range of values for each of these different parameters is as follows: haemoglobin levels (gm/dl) (0 for >12, 1 for 11.9 to 10, 3 for 9.9 to 8, 5 for 7.9 to 6, and 7 for 5.9 to 4); blood

transfusion requirements (0 for no transfusions, 1 for 1 to 3 transfusions, 2 for 4 to 6 transfusions, and 4 for >6 transfusions before the age of 2 years); **reticulocyte counts ($\times 10^9/L$) (0 for <150, 1 for 151 to 300, 2 for 301 to 500, and 3 for >500)**; splenomegaly (0 for absence and 1 for presence). Based on these criteria, the severity score ranged from a value of zero for individuals with no clinical manifestations to a maximum of 15 for the most severely affected.”

Konstellation Jeder einzelne Befund bei Frau Pechstein mag diskutierbar sein. Die Gesamt-Konstellation aller Befunde indes **beweist eindeutig** das Vorliegen einer **hereditären Membranopathie im Sinne einer Sphärozytose**. Diese Konstellation mit auch durch äußere Einflüsse veränderbarer Hämolyse erklärt die sehr auffällige gelegentliche Retikulozytenvermehrung bei der WM in Hamar sowie bei Weltcups und bei Trainingskontrollen und die niedrigen Werte zu anderen Zeiten.

10.2 Kurzdarstellung der Einzel-Befunde

**Neue Methoden 1
HS-Screening-Index** Die Abkürzung HS steht für hereditäre Sphärozytose. Bei hereditären Sphärozytosen ist der Anteil besonders kleiner Erythrozyten (%MicroR) wesentlich höher als der Anteil von Zellen mit verminderter Hämoglobinkonzentration (%HYPO-He). Aus grundsätzlichen Gründen sollten beide Werte parallel gehen. Diese typische Kombination von vergleichsweise vielen %MicroR und wenigen %HYPO-He kann mit einem Index deutlich gemacht werden.

Insgesamt wurden die HS-Screening-Indizes an 6 Tagen in 7 Blutproben mit jeweils 3-fach Messungen bestimmt. Die HS-Screening-Indizes lagen bei Werten von 6-7. Werte > 4 sind ein starker Hinweis auf eine HS, sofern eine Thalassämie ausgeschlossen ist.

**Neue Methoden 2
Quotient Retis/IRF** Patienten mit Membranopathie vom Typ der Kugelzellen-Anämie fallen durch einen hohen Quotienten aus Retikulozyten und dem Prozentsatz unreifer Retis auf. Frau Pechsteins Blutkonstellation entspricht in diesem neu definierten Parameter des Sysmex-Systems einer Sphärozytose-Membranopathie-Konstellation.

Der Retikulozyten/IRF-Quotient entspricht bei Claudia Pechstein den Werten von Patienten mit einer milden hereditären Sphärozytose.

Familie Die zwischenzeitlich – auch mit Hilfe der neuen Messmethoden – durchgeführte Familiendiagnostik bestätigt den Befund einer abortiven Membranopathie der Erythrozyten im Sinne einer Sphärozytose. Der Hämoglobinwert der Mutter wurde bei mehreren

Messungen zwischen 14.7 und 15.8 g/dl gemessen, der des Vaters zwischen 15.4 und 15.7 g/dl. Claudia Pechstein liegt somit mit ihrem eigenen Hämoglobinwert über die gesamte 10-jährige Beobachtungszeit im „familiären“ genetisch determinierten Bereich.

Auch der Vater der zeigt eine Konstellation wie bei Sphärozytose mit erhöhtem MCHC-Wert und einem erhöhten Anteil hyperchromer Zellen (9.9%).

Asthma

In dem bei Frau Pechstein diagnostizierten Asthma könnte unter Umständen ein zusätzlicher retikulozyten-steigernder Effekt insbesondere in Zusammenschau mit den Daten von Prof. Dr. Dame liegen.

Epo-Profil

Nach Prof. Dr. Schmidt passen die Original-Blutbilddaten von Hamar nicht zu Epo-Doping (siehe 5).

Retikulozyten

Bei Claudia Pechstein ist die Retikulozytenzahl oft erhöht; dies wurde in allen beteiligten Labors bestätigt. Nach Belastung ließen sich bei der Sportlerin 100%ige Anstiege dokumentieren. Es gibt aber auch belastungsunabhängig gleich hohe Retikulozytenwerte.

Beim Advia-Gerät werden die Retikulozyten von Menschen mit Membranopathie vom Typ der hereditären Sphärozytose prinzipbedingt höher gemessen als mit dem Sysmex-Gerät (siehe Prof. Dr. Röcker), weil letzteres große Retikulozyten mit wenig Farbbindung, wie bei HS typisch, als Erythrozyten zählt. Bei Nicht-HS-Patienten werden die Reti-Werte dagegen mit beiden Geräten annähernd gleich hoch gezählt.

Retis und Advia

Das Advia-Gerät erkennt ganz speziell Menschen mit milder Sphärozytose.

Reti-Verlauf Hb-Verlauf

ISU-Daten: Die Retikulozytenzahl steigt deutlich von 2000 bis 2009, während die Hämoglobinwerte tendenziell über 10 Jahre hinweg fallen. Dies passt nicht zu Epo-Doping sondern eher zu einer medizinischen Ursache.

ISU-Daten: Nach hohen Retikulozytenwerten über 2.4% steigt der Hämoglobinwert nicht – er ist tendenziell niedriger: 14.3 vs. 14.6 g/dl. Vor hohen Hämoglobinwerten finden sich nie hohe Retikulozytenwerte – sie sind tendenziell niedriger: 1.8% vs. 2.0%.

Ery-Indizes

Der MCHC-Wert ist bei Frau Pechstein in allen Labors hoch. Er liegt meist im oberen Grenzbereich, oft im pathologisch hohen Bereich.

Von Hamar 2009 liegen zu den Erythrozyten von Frau Pechstein Zusatz-Informationen vor. Auch hier ergibt sich ein Bild wie eine Minimalform einer Kugelzellen-Anämie: Viele hyperchrome Erys, hoher Retikulozyten-Hämoglobinspiegel, hoher CHCMr-Wert. Epo-Doping würde die umgekehrte Konstellation zeigen (siehe 3.3).

Haptoglobin

Haptoglobin ist ein äußerst empfindlicher Hämolyse-Indikator, weil dieses Protein freies Hämoglobin abfängt und abtransportiert. Frau

Pechstein liegt bei den Messungen im Labor 28 und bei der Charité-Untersuchung immer im untersten Normbereich bzw. darunter.

Protein-Chemie

Die osmotischen Testverfahren in Richtung Sphärozytose etc. waren negativ. Dies schließt eine Sphärozytose nicht aus; diese Konstellation liegt bei 20% der Patienten vor. Die protein-chemische Diagnostik z.B. SDS-PAGE hat gezeigt, dass keine der bekannten Protein-Anomalien vorliegt. Dies ist der charakteristische Befund der Sphärozytose Typ 6 nach Perrotta: "Yet to be defined protein abnormalities".

Laborwerte

Pathologisch können bei Sphärozytose - dominant oder rezessiv vererbt oder Träger-Status - folgende Labor-Parameter sein:

Parameter bei schwerer und mittelschwerer Sphärozytose (bei Frau Pechstein nicht vorhanden)

- Hämoglobin, Erythrozyten-Zahl, Hämatokrit zu niedrig
- Bilirubin zu hoch
- LDH zu hoch
- Viele kleine Erys = %Micro

Membranopathie-Sphärozytose-Indizien: Oft pathologisch unabhängig vom Schweregrad (bei Frau Pechstein vorhanden); der einzelne Befund beweist die Diagnose nicht – mehrere Parameter müssen zusammenkommen

- Retikulozytenzahl wechselnd hoch, je höher desto kränker. Werte um 4 % gelten in diesem Zusammenhang als niedrig
- MCHC hoch
- Viele hyperchrome/hyperdense Zellen
- Wenige unreife Retikulozyten (Sysmex-System)
- Haptoglobin niedrig
- Wenige Erys mit wenig Hb = %Hypo
- Kugelzellen im Blut (einzelne)
- RDW hoch (liegt bei Frau Pechstein nicht vor)

Direkter Sphärozytose-Nachweis: Prinzipielle Untersuchungen zum definitiven Nachweis der Sphärozytose (bei Frau Pechstein negativ bzw. normal)

- Inkubierter osmotischer Resistenztest
- Acidified Glycerol Lysis Test AGLT
- EMA-Test
- SDS-PAGE zum Nachweis einer Protein-Anomalie

Neue Untersuchungstechniken/Methoden der Auswertung – Indizien (bei Frau Pechstein pathologisch im Sinne einer Membranopathie vom Typ der Sphärozytose oder Variante)

- HS-Screening-Index: Micro Erys/Hypo- Erys
- Quotient Retikulozytenzahl/Fraktion „unreifer“ Retikulozyten

Resümee

Die Kombination von (1) immer wieder erhöhten Retikulozyten, (2) immer auffällig niedrigem Haptoglobin und (3) immer auffällig hohem MCHC-Wert teils innerhalb teils außerhalb des Normbereiches, sowie den erythrozytären Spezialparametern wie (4) hyperchrome Erys, (5) hoher Retikulozyten-Hämoglobinspiegel und (6) hohe CHCMr-Werte sind eindeutiger Beleg für eine hämolytische Konstellation bzw. sprechen gegen jede Form von Blutdoping. Durch die Weimann-Methodik der Charité in Berlin wurde die Diagnose einer hereditären Membranopathie vom Typ der Sphärozytose abgesichert.

Anhang 1: Literaturverzeichnis

Eine Auswahl repräsentativer Volltext-Veröffentlichungen (Bis 1997 erschienen 140 Arbeiten plus über 200 Abstracts):

Habilitationsschrift: Experimentelle Knochenmarktransplantation - Untersuchungen zum Problem der Transplantatabstoßung bei der allogenen Knochenmarktransplantation. Kiel 1988. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart - New York, 1989

Gassmann, W., Pralle, H.: Sind Bestrahlungen iliakaler Lymphknoten und regelmäßige Staging-Laparotomie bei den klinischen Stadien IA und IIA des Morbus Hodgkin notwendig? Inn. Med. 7, 300-301 (1979)

Gassmann, W., Pralle, H., Löffler, H.: Prognostisch ungünstige Faktoren beim Morbus Hodgkin. Dtsch. med. Wschr. 106, 814-818 (1981)

Gassmann, W., Pralle, H., Löffler, H., Gluth-Stender, M.: Therapieergebnisse des Morbus Hodgkin in den Stadien I und II. Klin. Wochenschr. 59, 469-475 (1981)

Gassmann, W., Perenyi, L., Pralle, H., Graubner, M., Schmitz, N., Löffler, H.: Behandlungsergebnisse mit dem ABVD-Schema bei C-MOPP-resistentem Morbus Hodgkin. Klin. Wochenschr. 59, 267-273 (1981)

Gassmann, W., Schmitz, N., Löffler, H.: Zur Frage der Virusätiologie des Morbus Hodgkin. Dtsch. med. Wschr. 107, 1171-1172 (1982)

Gassmann, W., Schmitz, N., Löffler, H.: 15 Jahre DeVita-Protokoll. Dtsch. med. Wschr. 107, 1043-1044 (1982)

Gassmann, W., Schmitz, N., Haas, R., Barth, G., Pralle, H., Löffler, H.: Ergebnisse der Strahlentherapie des Morbus Hodgkin bei Patienten mit primärem Chemotherapieversagen und Rezidiven nach Chemotherapie. Strahlenther. 158, 336-341 (1982)

Gassmann, W., Schmitz, N., Löffler, H.: Praxis der Chemotherapie mit dem DeVita-Protokoll. Dtsch. med. Wschr. 107, 1063-1069 (1982)

Gassmann, W., Haferlach, T., Schmitz, N., Kayser, W., Löffler, H.: Zur Problematik der intravenösen Urographie bei Patienten mit Plasmozytom. Schweiz. med. Wschr. 113, 301-304 (1983)

Gassmann, W., Schmitz, N., Kayser, W., Löffler, H.: Hodgkin's disease. Cancer Treatm. Rev. 11, 311-314 (1984)

Gassmann, W., Haferlach, T., Engelhardt, K.H., Rabenhorst, G., Junge, W., Schmitz, N., Kayser, W., Euler, H.H., Löffler, H.: IgD-Plasmozytom. Dtsch. med. Wschr. 109, 1775-1779 (1984)

Gassmann, W., Pralle, H., Haferlach, T., Pandurevic, S., Graubner, M., Schmitz, N., Löffler, H.: Staging systems for multiple myeloma: a comparison. Br. J. Haematol. 59, 703-711 (1985)

- Gassmann, W., Wottge, H.U., von Kolzynski, M., Müller-Ruchholtz, W.: Immune reactivity after high-dose irradiation. *Transplantation* 41, 380-384 (1986)
- Gassmann, W., Schmitz, N., Kayser, W., Löffler, H.: Ultrahochdosierte Zytostatika - Einsatzmöglichkeiten bei akuten Leukämien. *Dtsch. med. Wschr.* 112, 65-72 (1987)
- Gassmann, W., v. Kolszynski, M., Wottge, H.U., Müller-Ruchholtz, W.: Demonstration of strong classic immune reactivity after total-body irradiation for bone marrow transplantation. Implications for human T-depleted bone marrow transplantation. *Transplant. Proc.* 19, 2687-2688 (1987)
- Gassmann, W., Uharek, L., Wottge, H.U., Schmitz, N., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Comparison of cyclophosphamide, cytarabine, and etoposide as immunosuppressive agents before allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 72, 1574-1579 (1988)
- Schmitz, N., Gassmann, W., Rister, M., Johannson, W., Suttorp, M., Brix, F., Holthuis, J.J.M., Heit, W., Hertenstein, B., Schaub, J., Löffler, H.: Fractionated total body irradiation and high-dose VP 16-213 followed by allogeneic bone marrow transplantation in advanced leukemias. *Blood* 72, 1567-1773 (1988)
- Gassmann, W., Schmitz, N., Wottge, H.U., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Historischer Überblick zur Entwicklung der Knochenmarktransplantation. *Dtsch. med. Wschr.* 114, 1124-1129 (1989)
- Gassmann, W., Erbersdobler, A., Uharek, L., Glass, B., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Ifosfamide and ACNU in experimental allogeneic bone marrow transplantation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 117, 224-227 (1991)
- Gassmann, W., Uharek, L., Erbersdobler, A., Glass, B., Wottge, H.-U., Schmitz, N., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: High-dose cytostatic agents in allogeneic bone marrow transplantation - comparison of the engraftment promoting potential. *Br. J. Haematol.* 78, 310-318 (1991)
- Uharek, L., Gassmann, W., Fleischhauer, D., Wottge, H.U., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Effect of post-transplant methotrexate, cyclosporin A and prednisolone on graft rejection after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 7, 17-22 (1991)
- Glass, B., Uharek, L., Gassmann, W., Focks, B., Bolouri, H., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Graft-versus-leukemia activity after bone marrow transplantation does not require graft-versus-host disease. *Ann. Hematol.* 64, 255-259 (1992)
- Uharek, L., Gassmann, W., Glass, B., Steinmann, J., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Influence of cell dose and graft-versus-host reactivity on rejection rates after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 79, 1612-1621 (1992)
- Gassmann, W., Slanina, J.: Langzeittoxizität kurativer Lymphomtherapie. *Internist* 34, 161-169 (1993)
- Haferlach, T., Gassmann, W., Löffler, H., Jürgensen, Ch., Noak, J., Ludwig, W.-D., Thiel, E., Haase, D., Fonatsch, Ch., Becher, R., Schlegelberger, B., Nowrousian, M.R., Lengfelder, E., Eimermacher, H., Weh, H.J., Braumann, D., Maschmeyer, G., Koch, P., Heinecke, A., Sauerland, M.C., Büchner, Th., for the AML Cooperative Group: Clinical aspects of acute myeloid leukemias of the FAB types M3 and M4Eo. *Ann. Hematol.* 66, 165-170 (1993)

- Löffler, H., Gassmann, W.: Morphology and cytochemistry of ALL. In: Hoelzer, D. (Hrsg.) Baillière's Clinical Haematology. International Practice and Research. Acute Lymphoblastic Leukaemia. Vol. 7, Baillière Tindall, London 1994, 263-272
- Löffler, H., Gassmann, W.: Hämatologische Veränderungen und Erkrankungen in der Schwangerschaft. In: Künzel, W., Wulf, K.-H. (Hrsgs) Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, 3rd edn. Urban & Schwarzenberg, München 1994, 86-96
- Uharek, L., Glass, B., Gaska, T., Gassmann, W., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Influence of donor lymphocytes on the incidence of primary graft failure after allogeneic bone marrow transplantation in a murine model. *Br. J. Haematol.* 88, 79-87 (1994)
- Salomo, M., Steinmann, J., Glass, B., Herwartz, C., Uharek, L., Gassmann, W., Müller-Ruchholtz, W.: Leukemia specific allogeneic donor T cells quantitated by a limiting dilution assay. *Bone Marrow Transplant.* 15, 179-186 (1995)
- Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Gaska, T., Gassmann, W., Mueller-Ruchholtz, W.: Induction of graft-versus-leukemia activity in murine leukemia models after IL-2 pretreatment of syngeneic and allogeneic bone marrow grafts. *Bone Marrow Transplant.* 14: 711-715 (1995)
- Zeis, M., Uharek, L., Glass, B., Gaska, T., Steinmann, J., Gassmann, W., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W.: Allogeneic NK cells as potent antileukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Transplantation* 59, 1734-1736 (1995)
- Gassmann, W., Löffler, H.: Acute megakaryoblastic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 18 (Suppl. 1): 69-73 (1995)
- Schoch, R., Jenisch, S., Haferlach, T., Müller-Ruchholtz, W., Gassmann, W., Löffler, H., Glass slide smears are a suitable source for RT-PCR based analysis of chromosomal aberrations in leukemias. *Br. J. Haematol.* 92, 140-142 (1996)
- Haferlach, T., Winkemann, M., Löffler, H., Schoch, R., Gassmann, W., Fonatsch, Ch., Schoch, C., Poetsch, M., Weber-Matthiesen, K., Schlegelberger, B.: The abnormal eosinophils are part of the leukemic cell population in AML M4Eo and carry the pericentric inversion 16: A combination of May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization. *Blood* (1996) 87: 2459-2463
- Glass, B., Uharek, L., Zeis, M., Löffler, H., Müller-Ruchholtz, W., Gassmann, W.: Graft-versus-leukemia activity can be predicted by natural cytotoxic against leukemia cells. *Br. J. Haematol.* (1996) 93: 412-420
- Hoelzer, D., Ludwig, W.-D., Thiel, E., Gassmann, W., Löffler, H., Fonatsch, C., Rieder, H., Heil, G., Heinze, B., Arnold, R., Hossfeld, D., Büchner, Th., Koch, P., Freund, M., Hiddemann, W., Maschmeyer, G., Heyll, A., Aul, C., Faak, Th., Kuse, R., Ittel, Th.H., Gramatzki, M., Diedrich, H., Kolbe, K., Fuhr, H.G., Fischer, K., Schadeck-Gressel, C., Weiss, A., Strohscheer, I., Metzner, B., Fabry, U., Gökbüget, N., Völkers, B., Messerer, D., Überla, K.: Improved outcome in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87, 495-508 (1996)
- Zhang, Y., Poetsch, M., Weber-Matthiesen, K., Rohde, K., Winkemann, M., Haferlach, T., Gassmann, W., Ludwig, W.-D., Grote, W., Löffler, H., Schlegelberger, B.: Secondary acute leukaemias with 11q23 rearrangement: clinical, cytogenetic, FISH and FICTION studies. *Br. J. Haematol.* 92, 673-680 (1996)

Gassmann, W., Löffler, H., Ludwig, W.-D., Schwartz, S., Haferlach, T., Maurer, J., Bartram, C.R., Rieder, H., Fonatsch, C., Thiel, E., Gökbuget, N., Hoelzer, D., for the German ALL Study Group (GMALL): Morphological and cytochemical findings in 150 cases of T-lineage acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in adults. Brit. J Haemat (1996)

Gassmann, W., Schmitz, N., Löffler, H., De Witte, Th.: Intensive chemotherapy and bone marrow transplantation for myelodysplastic syndromes. In: Koeffler, H.Ph (Hrsg.) Hematology/Oncology Clinics of North America, 7th edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1996

Haferlach T, Winkemann M, Löffler H, Schoch R, Gassmann W, Fonatsch C, Schoch C, Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Schlegelberger B: The abnormal eosinophils are part of the leukemic cell population AML M4Eo and carry the inversion 16: A combination of May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization Blood: 87: 2459, 1996

Löffler, H, Gassmann, W: Morphology and cytochemistry of ALL. In: Hoelzer, D (Hrsg) Baillière's Clinical Haematology. International Practice and Research. Acute Lymphoblastic Leukaemia Vol 7, Baillière Tindall, London 1994, 263-272

Gassmann, W, Löffler, H, Ludwig, Haferlach, T, W-D, Schwartz, S, Maurer, J, Rieder, H, Fonatsch, C, Thiel, E, Gökbuget, N, Hoelzer, D for the German ALL Study Group (GMALL) Morphological and Cytochemical Findings in 150 Cases of T-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Adults. Br J Haematol 97: 372, 1997

Anhang 2 Liste medizinischer Begriffe

HS	Hereditäre Sphärozytose = Kugelzellenanämie. Die Bezeichnung der Krankheit klingt eindeutig: Es handelt sich um die Anämie (=Blutarmut), bei der ein Teil der roten Blutkörperchen kugelförmig aussieht. Die Bezeichnung ist missverständlich, nur ein kleiner Teil der kranken Erys zirkuliert in Kugelform und nicht als Scheibchen. In Wirklichkeit gibt es sehr viele verschiedene Krankheiten, bei denen die Erythrozyten Kugelform annehmen. Die Kugelform ist nicht das zu Grunde liegende Krankheitsprinzip sondern Ausdruck verschiedenster Schädigungstypen des Erythrozyten; er ist danach nicht mehr dazu in der Lage, die für die Sauerstoff-Versorgung des Gewebes bessere Scheibenform zu halten und wird passiv zur Kugel. Der Vererbungsmodus ist unterschiedlich: teils rezessiv, teils dominant. Dominante Vererbung bedeutet, man ist auch krank, wenn von einem Elternteil das gesunde Gen und vom anderen das kranke Gen geerbt hat. Rezessiv heißt, dass die Erkrankung von Vater und Mutter vererbt sein muss. Der Ausprägungsgrad der verschiedenen Formen von Kugelzellenanämie kann extrem unterschiedlich sein.
Hb-Wert	Abkürzung für Hämoglobinwert. Angegeben in g/dl, das heißt Gramm Hämoglobin pro 100 ml Blut
Hämatokrit	Der Wert gibt an, wie hoch der Anteil der Erythrozyten am Blut in Prozent ist. Ein Wert von 45% bedeutet, das Blut besteht zu 45% aus Erythrozyten und zu 55% aus Flüssigkeit

MCHC	Abkürzung für Hämoglobinmenge in den Erythrozyten, angegeben in g/dl wie bei Hb-Wert, aber hier bedeutet es Gramm Hämoglobin pro 100 ml Erythrozyten (nicht Blut).
CHCM	Wie MCHC; hier beruht der Wert aber auf der Messung des Hämoglobingehaltes der Einzelzellen. Der Wert ist dann der Mittelwert gebildet aus den Werten aller Zellen.
MCH	Mittelwert der Menge des Hämoglobins im einzelnen Erythrozyten
MCV	Mittlere Zellgröße
%Hypo	Prozentsatz von Erythrozyten mit wenig Hämoglobin 19% unter der Mitte des Definitionsbereiches
%Hyper	Prozentsatz von Erythrozyten mit viel Hämoglobin pro Volumen 19% über der Mitte des Definitionsbereiches
%Micro-R	Prozentsatz kleiner Retikulozyten 33% unter der Mitte des Definitionsbereiches
%Makro	Prozentsatz besonders großer Erythrozyten 33% über der Mitte des Definitionsbereiches
Reti	Retikulozyten; junge Erythrozyten; drei bis vier Tage im Knochenmark, ein Tag im Blut
Haptoglobin	Empfindlichster Labor-Parameter zur Erfassung einer Hämolyse. Es bindet Hämoglobin; ist deshalb „verbraucht“ wenn viel Hämoglobin im Blut transportiert werden muss – also bei Hämolyse.
Hämolyse	Bezeichnet einen schnelleren Zerfall der roten Blutkörperchen (normalerweise leben sie 100-120 Tage). Meistens wie eine Art Allergie – der Körper zerstört durch Antikörper seine eigenen Erythrozyten. Selten beruht die Hämolyse auf vererbten Eigenschaften. Bekannteste Beispiele sind die viele Formen der Thalassämie, die Sichelzellen-Krankheit und die verschiedenen noch nicht einzeln charakterisierten Formen der Kugelzellenanämien wie bei Claudia Pechstein.
MCVr	Volumen des einzelnen Retikulozyten
CHCMr	auch MCHCr; mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt pro 100 ml Retis
CHr	Hämoglobingehalt der Retikulozyten
RNA	Ribonukleinsäure. Kopie der Erbinformation, die in der Zelle für die Eiweißproduktion genutzt wird.
IRF	immature reticulocyte fraction; Anteil unreifer Retikulozyten mit noch viel RNA. Dieser Anteil ist bei Kugelzellenanämie beim Sysmex-System scheinbar niedrig.