

Bestimmungsmethoden für Erythropoietin

Armin Kurtz, Kai-Uwe Eckardt

Physiologisches Institut der Universität Zürich, Schweiz

Die jüngsten Erfahrungen zeigen, dass gentechnisch hergestelltes Erythropoietin (EPO) ein wichtiges Therapeutikum in der Behandlung von Anämien sein wird, denen kausal eine unzureichende endogene EPO-Bildung zu Grunde liegt. Die Diagnose eines absoluten oder relativen EPO-Mangels lässt sich am zielstrebigsten durch eine Bestimmung der EPO-Konzentration im Serum oder Plasma herbeiführen. Die Bestimmung von EPO-Konzentrationen ist bislang noch nicht Routine eines klinisch-chemischen Labors, sondern derzeit noch beschränkt auf Speziallaboratorien (meist Forschungslaboratorien). Ziel dieses Beitrages ist es, die wichtigsten Bestimmungsmethoden für EPO vorzustellen und ihre Anwendbarkeit und Störanfälligkeit zu erörtern.

EPO wird aus historischen Gründen als Aktivität quantifiziert. Referenzgrösse ist die Internationale Einheit (IU). Um EPO-Aktivitäten miteinander vergleichen zu können, müssen alle EPO-Standardpräparationen an die «Second International Reference Preparation B» angeglichen werden. Seitdem EPO in reiner Form verfügbar ist, kennt man auch die spezifische Aktivität des Hormones, welche bei rund 100000 IU/mg EPO liegt. Der Normalwert der EPO-Konzentration im menschlichen Plasma und Serum liegt zwischen 15 und 25 mU/ml. Es ist keine Geschlechtsabhängigkeit und kein Tagesrhythmus der Serum-EPO-Konzentration erkennbar. Die Altersabhängigkeit des Normalwertes ist noch nicht ausreichend untersucht.

Die zur Bestimmung der EPO-Konzentration verwendeten Assays lassen sich prinzipiell in Bioassays und Immunoassays einteilen.

Bioassays

Als Nachweisprinzip verwenden alle Bioassays die biologische Wirkung von EPO, welches ein spezifischer essentieller Proliferationsfaktor (Auslösung von Zellteilungen) und Differenzierungsfaktor (Induktion der Hämoglobinsynthese) für bestimmte erythroide Vorläuferzellen ist. Bioassays können *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden.

In-vivo-Bioassay

Für diese Form der EPO-Bestimmung werden Labortiere (Mäuse und Ratten) verwendet, deren endogene EPO-Bildung und in der Folge Erythropoiese supprimiert ist. Eine solche Hemmung der Erythropoiese kann durch Hungern, Hypophysektomie oder Polyzythämie erzeugt werden. Der gebräuchlichste Assay darunter ist der polyzythämische Mausassay (PCM-Assay). Dabei wird in Mäusen entweder durch Hypertransfusion oder durch intermittierenden Sauerstoffmangel eine Polyzythämie (Hämatokrit 60–70%) erzeugt. In einem genau einzuhaltenden Protokoll erhalten die Tiere im Abstand von 24 h die Probe zweimal (je 0,5 ml) subkutan verabreicht. Weitere 24 h später erhalten die Tiere ⁵⁹Eisen intravenös oder intraperitoneal. Nach weiteren 48 h werden die Tiere entblutet, und die in den Erythrozyten enthaltene Radioaktivität gemessen. Aus der injizierten Radioaktivität und in der für den Ganzkörper hochgerechneten Radioaktivität in allen Erythrozyten wird dann die Eiseneinbaurrate berechnet (% Eiseneinbau). Diese Rate ist ein Mass für die Hämoglobinsyntheserate

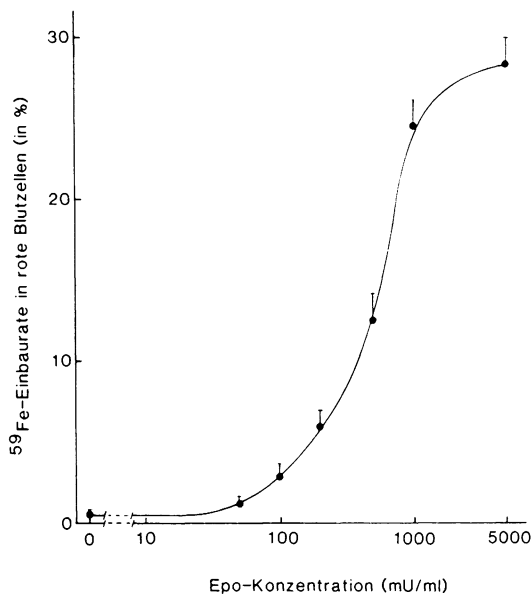


Abb. 1. Dosiswirkungskurve für Human-EPO auf die Eiseneinbaurate in rote Blutzellen in polyzythämischen Mäusen im PCM-Assay. Weibliche ICR-Mäuse wurden für 14 Tage intermittierender (22 h/Tag) normobarer Hypoxie (8% O₂) ausgesetzt. Am 5. und 6. Tag nach Beendigung der Hypoxie erhielten die Tiere subkutan je 0,5 ml der Probe und am 7. Tag intraperitoneal 0,1 µCi ⁵⁹Fe-Chlorid. Zwei Tage später wurden die Tiere entblutet und der Hämatokrit und die ⁵⁹Fe-Radioaktivität in den Erythrozyten gemessen. Der Eiseneinbau in rote Blutzellen (% ⁵⁹Fe-Einbau) wurde nach folgender Formel berechnet: $^{59}\text{Fe-Einbau (\%)} = ^{59}\text{Fe-Radioaktivität (pro ml Blut)} \times \text{Körpergewicht (in g)} \times 0,075 / \text{injizierte } ^{59}\text{Fe-Radioaktivität}$. Für die Auswertung wurden nur Tiere berücksichtigt, deren Hämatokrit höher als 55% war.

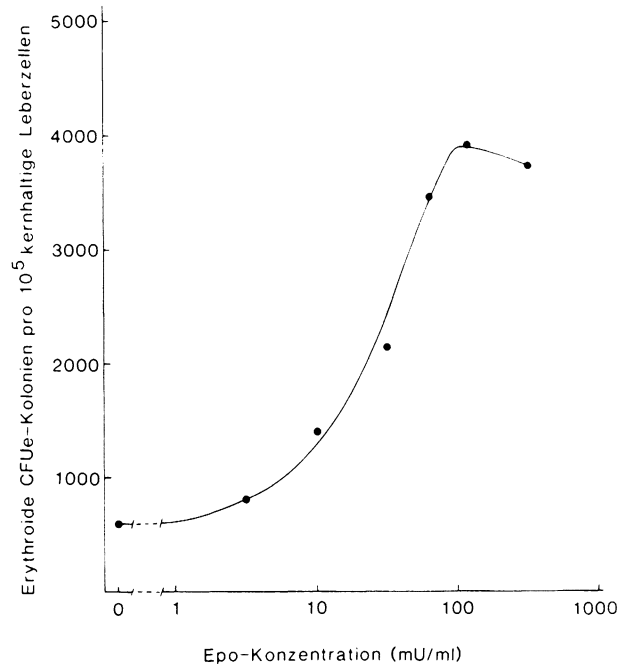


Abb. 2. Dosiswirkungskurve von EPO auf die erythroide Kolonienbildung in fetalen Mausleberzellen im CFU-E-Assay. Ein Ansatz enthält 10⁵ kernhaltige fetale (13 Tage alte) Leberzellen in 1 ml Kulturmedium (Iscove-Medium plus 0,8 g/100 ml α-Methylzellulose plus 10% fetales Rinderserum + 10% Probe bzw. EPO-Standard). Die Kulturen wurden für 48 h bei 37°C in humidifizierter Atmosphäre (O₂/N₂/CO₂, 20/75/5) inkubiert. Anschliessend wurden die typischen erythroiden (CFU-E)-Kolonien unter dem Mikroskop ausgezählt.

und reflektiert damit die Aktivität der Erythropoese. In jedem Assay wird eine Eichkurve mit menschlichem Standard-EPO mitgeführt. Abbildung 1 zeigt eine solche typische Eichkurve für den PCM-Assay.

Der PCM-Assay ist die wichtigste Nachweismethode für biologische EPO-Aktivität, und er muss deshalb immer zur Kalibrierung von EPO-Standardpräparationen verwendet werden. Der PCM-Assay ist nur wenig stör anfällig. Aus diesem Grund kann damit prinzipiell EPO in jeder wässrigen Lösung (Serum, Plasma, Urin, Zellkulturmedien, Applikationslösungen etc.) ohne spezielle Probenaufbereitung bestimmt werden.

Nachteil des PCM-Assays ist seine relativ grosse Aufwandigkeit. Die Durchführung eines Assays erfordert einschliesslich der Induktion der Polyzythämie zwischen 3 und 4 Wochen Zeit. Pro Probe oder Eichkurve müssen wegen der interindividuellen biologischen Streubreite 5

bis 10 Tiere verwendet werden. Ebenso ist der nicht unbeträchtliche Verbrauch an ⁵⁹Fe zu beachten. Aus der Eichkurve (Abb. 1) geht weiterhin hervor, dass der PCM-Assay eine hohe Nachweisschwelle (zirka 50 mU/ml) besitzt. Dies macht den PCM-Assay für Routinemessungen im menschlichen Blut ungeeignet, da die Normalkonzentrationen dort unter der Nachweisgrenze liegen.

In-vitro-Bioassay

Bei den In-vitro-Bioassays für EPO werden Kurzzeitgewebekulturen hämopoietischen Gewebes aus Milz, Knochenmark oder fetaler Leber (in der Regel von der Maus) verwendet. In diesen Gewebekulturen wird dann entweder der proliferationsfördernde Effekt von EPO oder die Stimulation der Hämoglobinsynthese bestimmt. Die Wirkung auf die Proliferation kann durch mikroskopische Auszählung bestimmter Teilungsstadien ery-

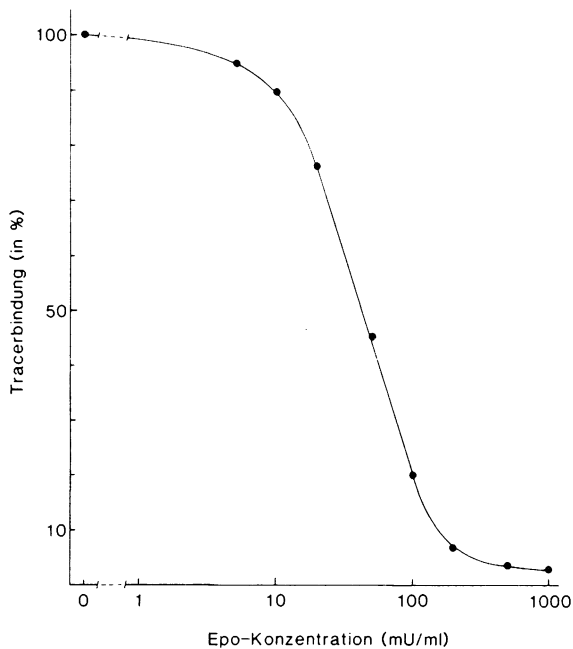


Abb. 3. Tracerverdrängungskurve für Human-EPO im RIA. Im Ansatz wurden 0,1-ml-Proben oder Standardlösungen zunächst für 24 h bei 4°C mit verdünntem Kaninchenantiserum gegen EPO vorinkubiert. Danach wurde ^{125}I -markiertes EPO hinzugegeben und nach weiterer Inkubation für 24 h wurde antikörpergebundenes ^{125}I -EPO mit Hilfe eines zweiten, gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörpers, von ungebundenem ^{125}I -EPO abgetrennt. In Abwesenheit von nichtmarkiertem EPO war 45% der hinzugegebenen Radioaktivität an Antikörper gebunden, und Standardwerte der Eichkurve sind in Relation zur Bindung bei diesem Wert (B_0) dargestellt. Der Intraassay-Variationskoeffizient liegt im idealen Teil der Eichkurve bei 2%, der Interassay-Variationskoeffizient bei 7%.

throider Vorläufer (erythroid colony-forming cells; CFU-E-Assay) oder durch die Messung der Einbaurrate von ^3H -Thymidin in die Zellen bestimmt werden. Die Wirkung von EPO auf die Hämoglobinsynthese wird durch Bestimmung des ^{59}Fe -Einbaus in die Gewebekulturen ermittelt. In jedem Assay wird eine Eichkurve mit menschlichem Standard-EPO mitgeführt. Abbildung 2 zeigt eine solche typische Eichkurve für einen CFU-Assay unter Verwendung fetaler Mausleberzellen.

Aus der Eichkurve wird deutlich, dass der Assay EPO-Aktivitäten ab 5 mU/ml nachweisen kann, die Anwendung der Methode zur Bestimmung der EPO-Konzentration im menschlichen Blut somit möglich ist.

Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil aller In-vitro-Bioassays ist jedoch, dass diese unspezifisch auch auf allgemein wachstumsinduzierende Hormone (wie

z.B. Wachstumshormon oder insulinähnlicher Wachstumsfaktor) und wachstumsverstärkende Hormone (wie Schilddrüsenhormon oder Katecholamine) reagieren. Auch Toxine oder Medikamente in den Proben können die Bestimmung verfälschen.

Immunoassays

Der wichtigste Immunoassay zur Bestimmung von EPO-Konzentrationen ist der Radioimmunoassay (RIA). Dabei kommen polyklonale Antikörper zum Einsatz, die gegen aufgereinigtes natives Human-EPO oder reines rekombinantes Human-EPO (r-HuEPO) im Kaninchen erzeugt wurden. Als Tracer wird iodiniertes (^{125}I) hochaufgereinigtes natives Human-EPO oder reines r-HuEPO verwendet. Die bisherigen Erfahrungen zeigen, dass natives und r-HuEPO die gleiche Immunoreaktivität besitzen. Im RIA wird die Verdrängung des jodmarkierten EPOs aus der Antikörperbindung durch exogenes EPO (in der Probe) bestimmt. Abbildung 3 zeigt eine typische Tracerverdrängungskurve für menschliches Standard-EPO. RIAs sind sehr sensitiv, d.h. EPO-Konzentrationen von 5 mU/ml sind zweifelsfrei nachzuweisen. In Anbetracht der Tatsache, dass in einem RIA zahlreiche Proben umgesetzt werden können, bietet sich diese Bestimmungsmethode zur Routinemessung an. Prinzipiell kann mit dem RIA EPO in allen wässrigen Lösungen bestimmt werden. Zu achten ist auf einen eventuellen Proteasegehalt der Proben, welche im Ansatz den EPO-Antikörper zerstören könnten. Es muss weiterhin darauf hingewiesen werden, dass der RIA nur Immunoreaktivität und keine biologische Aktivität bestimmt. Theoretisch könnten biologisch inaktive EPO-Bruchstücke falsch-hohe RIA-Messergebnisse bewirken.

Zusammenfassung

Nach dem derzeitigen Erfahrungsstand ist die radioimmunologische Bestimmung der EPO-Konzentration im Blut die Methode der Wahl. Es hat sich herausgestellt, dass die Messung im Serum und im Plasma die gleichen Werte liefert. Unsere eigenen Erfahrungen zeigen weiterhin, dass EPO in sterilen Plasma- oder Serumproben bei Raumtemperatur bis zu 2 Wochen stabil ist. Sollte in diesem Zeitraum keine Messung möglich sein, so sollten die Proben bei -20°C gelagert werden. Werden im RIA abnorm hohe EPO-Konzentrationen gemessen, so ist eine Bestätigung des Befundes im polyzythämischen Mousassay (PCM-Assay) zu empfehlen.

In-vitro-Bioassays sollten auf die Fälle beschränkt werden, in denen keine radioimmunologische Bestimmung zur Verfügung steht. Abnorm hohe Werte sollten auch hier im PCM-Assay nachgeprüft werden.

Assays for Erythropoietin

The aim of this contribution is to briefly characterize the assays available for the quantitation of erythropoietin (EPO). The radioimmunological determination of EPO has gained priority for routine and screening measurements. The *in vivo* bioassay is the most reliable assay for biologic EPO activity. *In vitro* bioassays should be limited to situations in which radioimmunoassays are not available and for which *in vivo* bioassays are too insensitive.

Ausgewählte Spezialliteratur

Standard-EPO

Annable, L.; Cotes, P.M.; Mussett, M.V.: The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull. Wld Hlth Org.* 47: 99-112 (1972).

PCM-Bioassay

Cotes, P.M.; Bangham, D.R.: Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduced pressure. *Nature* 4793:1065-1067 (1961).

Erslev, A.J.: Erythropoietin assay; in Williams, Beutler, Erslev, Lichtman, *Hematology*; 3. Aufl., p. 1634 (McGraw-Hill, New York 1983).

Eckardt, K.-U.; Kurtz, A.; Hirth, P.; Scigalla, P.; Wiczorek, L.; Bauer, C.: Evaluation of the stability of human erythropoietin in samples for radioimmunoassay. *Klin. Wschr.* 66:241-245 (1988).

In-vitro-Bioassay

Rich, I.N.; Kubanek, B.: The ontogeny of erythropoiesis in the mouse detected by the erythroid colony-forming technique. *J. Embryol exp. Morph.* 50: 57-74 (1979).

Krystal, G.; Eaves, A.C.; Eaves, C.J.: A quantitative bioassay for erythropoietin, using mouse bone marrow. *J. Lab. clin. Med.* 97: 144-157 (1981).

Radtke, H.W.; Erbes, P.M.; Fassbinder, W.; Koch, K.M.: Serum erythropoietin measurements using the fetal mouse liver cell cultures: the importance of reduction of variation in the specific activity of radioiron-transferrin. *Exp. Hematol., Copenh.* 6: 468-472 (1978).

Kurtz, A.; Jelkmann, W.; Bauer, C.: Insulin stimulates erythroid colony formation independently of erythropoietin. *Br. J. Haemat.* 53: 311-316 (1983).

RIA

Cotes, P.M.: Immunoreactive erythropoietin in serum. *Br. J. Haemat.* 50: 427-438 (1982).

Egrie, J.C.; Cotes, P.M.; Lane, J.; Gaines Das, R.E.; Tam, R.C.: Development of radioimmunoassays for human erythropoietin using recombinant erythropoietin as tracer and immunogen. *J. immunol. Methods* 99: 235-241 (1987).

Eckardt, K.-U.; Kurtz, A.; Hirth, P.; Scigalla, P.; Wiczorek, L.; Bauer, C.: Evaluation of the stability of human erythropoietin in samples for radioimmunoassay. *Klin. Wschr.* 66:241-245 (1988).

PD Dr. med. Armin Kurtz

Physiologisches Institut der Universität Zürich-Irchel
Winterthurerstrasse 190
CH-8057 Zürich (Schweiz)