

KALA- JA RIISTARAPORTTEJA nro 189

*Reeta Pösö
Antti Leinonen
Mauri Nieminen
Timo Soveri*

**Anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden analysointi
poron verestä**

Kaamanen 2000



RIISTAN- JA KALANTUTKIMUS

ANABOLISESTI VAIKUTTAVIEN YHDISTEIDEN ANALYSOINTI PORON VERESTÄ.

¹Reeta Pösö, ²Antti Leinonen, ³Mauri Nieminen, ¹Timo Soveri

¹Peruseläinlääketieteen laitos, Helsingin yliopisto, PL 57, 00014 Helsingin yliopisto
puh. 09 191 49522 faksi 09 191 49799

²Yhtyneet Laboratoriot Oy, Höyläämötie 14, 00380 Helsinki
puh. 09 506 051 faksi 09 5060 5410

³Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos,
Porotutkimusasema, 99910 Kaamanen
puh 020 575 1820 faksi 020 575 1829

Julkaisija

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

Julkaisu-aika

Kesäkuu 2000

Tekijä(t)

Reeta Pösö, Antti Leinonen, Mauri Nieminen ja Timo Soveri

Julkaisun nimi

Anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden analysointi poron verestä

Julkaisun laji

Toimeksiantaja

Toimeksiantopäivämäärä

Tutkimusraportti

Maa- ja metsätalousministeriö

8.5.1996

Projektin nimi ja numero

3959/508/95

Tiivistelmä

Hankkeessa selvitettiin neljän doping-sääntöjen perusteella kielletyn, lihasten kasvua lisäävän hormonin ja hormonin kaltaisen yhdisteen analytiikkaa porovaatimen seerumista. Testatut yhdisteet, testosteroni, nandroloni, metandienoni ja klenbuteroli, ovat ihmisurheilijoiden keskuudessa eniten käytettyjä kasvua lisääviä yhdisteitä. Kaikki tutkittavat yhdisteet annettiin kertainjektiona lihakseen ja yhdisteiden pitoisuuksia veressä seurattiin 3-30 vuorokauden ajan. Tulokset osoittavat, että testosteronin ja nandrolonin osalta yleisesti käytössä olevat immunologiset menetelmät ovat riittävän herkkiä, kun taas metandienonin ja klenbuterolin osalta joudutaan turvautumaan herkempiin menetelmiin. Tämän tutkimuksen yhteydessä klenbuterolille kokeiltiin uutta kaasukromatografiaan ja massaspektrometriaan perustuvaa ns. MS/MS-menetelmää, jolla analyysiherkkyys saatiin alennettua 50 pg/ml pitoisuuteen. Uudella menetelmällä, joka on noin 20 kertaa immunologisia menetelmiä herkempi, voidaan klenbuteroli todeta seerumista ainakin 3 vuorokautta injektion jälkeen. Samankaltaista menetelmää voitaneen soveltaa myös metandienoniin, jolle tässä tutkimuksessa käytetty immunologinen menetelmä osoittautui liian epäspesifiseksi. Suuret yksilöiden väliset erot anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden häviämisessä vaikeuttavat häviämisajan arviointia ja siten hankaloittavat yhdisteiden mahdollista doping-käyttöä. Tutkimuksen yhteydessä testattiin epävirallisesti 6 vuoden 1997 Porokuninkuusajoihin osallistunutta poroa, joihin sovellettiin urheiluhevosiille käytössä olevia seulontamenetelmiä. Näillä menetelmillä seulottuna yhdessäkään tutkituista näytteistä ei ollut viitteitä kiellettyjen aineiden käytöstä. Tutkimuksessa tehtiin myös perustyötä ja mitattiin testosteronin ja kortisolin vuosivaihtelu vaatimissa.

Asiasanat

Poron kilpailu, porokilpailu, doping, anabolinen steroidi, testosteroni, nandroloni, metandienoni, β -agonisti, klenbuteroli, kortisoli

Sarjan nimi ja numero

ISBN

ISSN

Kala- ja riistaraportteja 189

951-776-279-9

1238-3325

Sivumäärä

Kieli

Hinta

Luottamuksellisuus

18 s.

suomi

Jakelu

Kustantaja

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos

Porotutkimusasema

PL 6

99910 Kaamanen

00721 Helsinki

Puh. 0205 751 820 faksi 0205 751 829

Puh. 0205 7511 faksi 0205 751 201

Published by

Finnish Game and Fisheries Research Institute

Date of Publication

June 2000

Author(s)

Reeta Pösö, Antti Leinonen, Mauri Nieminen and Timo Soveri

Title of Publication

Analysis of Anabolic compounds in serum of reindeer

Type of Publication

Research report

Commissioned by

Ministry of Agriculture and Forestry

Date of Research Contract

8.5.1996

Title and Number of Project

3959/508/95

Abstract

The aim of the project was to test in serum of female reindeer analytical methods of four hormones and hormone like substances that increase the growth of muscles and the use of which is illegal according to doping regulations. Among human athletes the compounds tested, testosterone, nandrolone, methandienone, and clenbuterol, are the most frequently used compounds to increase muscle growth. All compounds were given as a single intramuscular injection and their concentrations in serum were followed for 3 to 30 days. The results show that for testosterone and nandrolone the sensitivity of the commonly used immunological methods is sufficient, while for methandienone and clenbuterol more sensitive methods are required. In this study for the analysis of clenbuterol a new MS/MS-method that is based on gas chromatography and mass spectrometry, was tested. With this method the detection limit was 50 pg/ml which is about 20 times lower than the available immunological methods. With this new method it is possible to detect clenbuterol in reindeer serum for 3 days after a single injection of 250 mg. It is conceivable that a similar method could be applied for the analysis of methandienone, for which the immunological method used in this study was too unspecific. It is concluded that large inter-individual variation in the disappearance of anabolic compounds makes their doping-use more difficult. In this study we also tested (unofficially) 6 reindeer that participated in the main racing event, Kuninkuusajot 1997. The samples were tested with screening methods used for equine blood samples. Based on the used screening methods there were no signs of illegal use of drugs. The study includes also data on annual variation of testosterone and cortisol in female reindeer.

Key words

reindeer, racing reindeer, reindeer races, doping, anabolic steroid, testosterone, nandrolone, methandienone, β -agonist, clenbuterol, cortisol

Series (key title and no.)

Kala- ja riistaraportteja 189

ISBN

951-776-277-1

ISSN

1238-3325

Pages

18 p.

Language

Finnish

Price

Confidentiality

Public

Distributed by

Finnish Game and Fisheries Research Institute
Reindeer Research Station
99910 Kaamanen
Phone +358 205 751 820 Fax +358 205 751 829

Publisher

Finnish Game and Fisheries Research Institute
P.O.Box 6
FIN-00721 Helsinki, Finland

Phone +358 205 7511 Fax +358 205 75 201

Sisällys

1. TIIVISTELMÄ.....	1
2. JOHDANTO.....	2
2.1 Anaboliset steroidit	2
2.2 Anabolis-androgeenisten steroidien fysiologiset vaikutukset.....	3
2.3 Anabolis-androgeeniset steroidit ja suorituskyky.....	4
2.4 Klenbuteroli	5
2.5 Analyysimenetelmät.....	5
3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	6
4. AINEISTO JA MENETELMÄT	7
4.1 Koejärjestelyt.....	7
4.2 Anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden analysointi.....	7
4.3 Tilastolliset menetelmät	8
5. TULOKSET	9
5.1 Testosteroni.....	9
5.2 Nandroloni	10
5.3 Metandienoni	11
5.4 Klenbuteroli	12
5.5 Kilpaporonäytteiden seulontatutkimus.....	12
5.6 Testosteronin ja kortisolin vuosivaihtelu vaatimissa.....	13
6. TULOSTEN TARKASTELU	15
KIITOKSET	17
KIRJALLISUUS	18

1. Tiivistelmä

Kilpaporojen mahdollista doping-kontrollia varten selvitettiin neljän kasvua lisäävän hormonin ja hormonin tapaan vaikuttavan yhdisteen, testosteronin, nandrolonin, metandienonin ja klenbuterolin, analytiikkaa vaatimen seerumista. Testatut yhdisteet ovat doping-sääntöjen perusteella kielletyistä, lihasten kasvua lisäävistä yhdisteistä, eniten käytettyjä ihmisurheilijoiden keskuudessa. Tutkimuksessa käytettiin vaatimia, koska haluttiin välttää eläimen omien androgeenisten hormonien häiritsevä vaikutus. Tutkittavat yhdisteet annettiin injektiona lihakseen ja vaatimista otettiin verinäytteitä, yhdisteestä riippuen, kolmesta 30 vuorokauteen. Tulokset osoittivat, että testosteronille ja nandrolonille käytössä olevat immunologiset menetelmät ovat riittävän herkkiä, kun taas klenbuterolin ja metandienonin osalta immunologisten menetelmien herkkyys ei riitä. Tämän tutkimuksen yhteydessä klenbuterolille kokeiltiin uutta kaasukromatografiaan ja massaspektrometriaan perustuvaa ns. MS/MS-menetelmää, jolla analyysierkkyys saatiin alennettua 50 pg/ml pitoisuuteen, mikä on huomattavasti matalampi kuin perinteinen kaasukromatografia/massaspektrometria tai immunologiset menetelmät. Samankaltaista menetelmää voitaneen soveltaa myös metandienoniin, jolle käytetty immunologinen menetelmä osoittautui liian epäspesifiseksi. Suuret yksilöiden väliset erot anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden häviämisessä on testajan näkökulmasta hyvä asia, koska se tekee mahdollisen doping-käytön ajankohdan valitsemisen vaikeammaksi. Tutkimuksen yhteydessä testattiin epävirallisesti 6 vuoden 1997 Porokuninkuusajoihin osallistunutta poroa, joihin sovellettiin urheiluhevosille käytössä olevia seulontamenetelmiä. Näillä menetelmillä seulottuna yhdessäkään tutkituista näytteistä ei ollut viitteitä kiellettyjen aineiden käytöstä. Tutkimuksessa tehtiin myös perustyyötä mittaamalla testosteronin ja kortisolin vuosittainen vaihtelu vaatimissa.

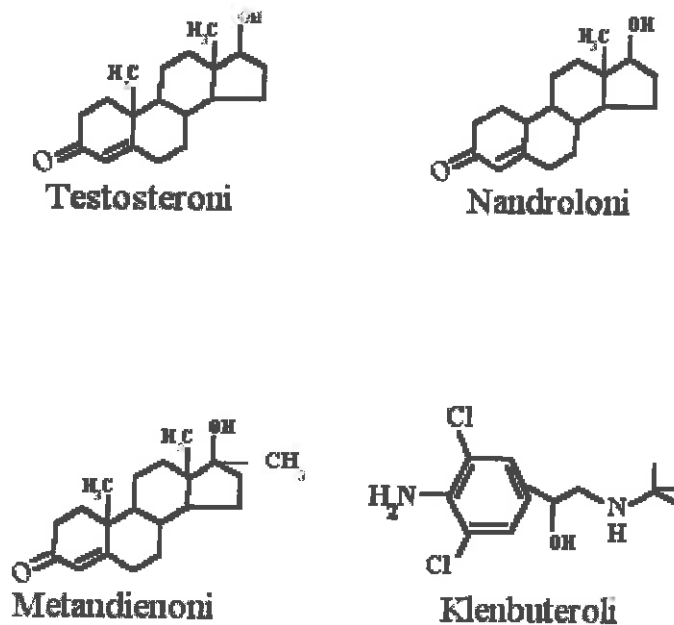
2. Johdanto

Huippu-urheilussa kilpailu on kovaa ja huipulle pääsyä on monesti etsitty fyysisen ja psyykkisen harjoittelun lisäksi lääkkeistä, joiden joko tiedetään tai uskotaan parantavan urheilusuoritusta. Urheilusuorituksen farmakologiset parannuskeinot ovat kiellettyjä ja niiden käyttöä kontrolloidaan urheilujärjestöjen ja antidoping-organisaatioiden toimesta. Testauskäytäntö ja kielletyt aineet on määritelty dopingsäännöstössä. Urheiluhevosille on olemassa vastaava käytäntö. Porokilpailuissa ei ole olemassa vastaavaa säännöstöä, joka kieltäisi dopingin eikä käytössä myöskään ole systemaattista näytteenotto- ja analyysikäytäntöä. Tästä huolimatta anabolisten hormonien käyttö on EU-direktiivien mukaisesti kiellettyä myös poroissa, samoin kuin kaikissa lihaeläimissä (Anon. 1988, Kuiper ym. 1998).

Kansainvälisen Olympiakomitean Lääketieteellinen komissio on luokitellut urheilussa kielletyt lääkeaineet seuraavasti: keskushermostoa stimuloivat yhdisteet, huumaavat särkylääkkeet, anabolisesti vaikuttavat yhdisteet, nesteenpoistolääkkeet, peptidihormonit ja niiden analogit, erityisrajoitetut aineet sekä manipulointiin liittyvät aineet ja menetelmät (Leinonen & Seppälä 1994). Tässä tutkimuksessa keskityttiin neljään ihmisurheilijoiden keskuudessa yleisimmin käytettyyn anabolisesti eli lihasvoimaa ja lihasmassaa lisäävän yhdisteen analysointiin. Testatut aineet olivat testosteroni ja sen kaksi synteettistä johdannaista, 19-nortestosteroni eli nandroloni ja 17-metyylitestosteroni eli metandienoni. Lisäksi tutkittiin yhden adrenaliinin tavoin vaikuttavan β -agonistin eli klenbuterolin analyysimahdollisuuksia. Minkään edellä mainitun yhdisteen analysoinnista poron verestä ei ole aikaisempaa kokemusta. Ihmisurheilijoille luotu analytiikka ei sellaisenaan ollut sovellettavissa, koska analyysimenetelmät perustuvat näiden aineiden aineenvaihduntatuotteiden analysointiin virtsanäytteistä, joiden ottaminen poroilta kilpailujen yhteydessä olisi käytännössä mahdotonta. Pääosa analyyseistä tehtiin Yhtyneet Laboratoriot Oy:n dopingtestauslaboratoriossa, joka on yksi Kansainvälisen Olympiakomitean valtuuttamista laboratorioista.

2.1 Anaboliset steroidit

Anabolisiksi steroideiksi kutsutaan synteettisiä yhdisteitä, joiden vaikutukset sukurauhasia lukuun ottamatta ovat samankaltaiset kuin miessukupuolihormonilla, testosteronilla. Synteettisesti ei kuitenkaan ole onnistuttu valmistamaan anabolista steroidia, jolla ei olisi vaikutusta myös sukurauhasiin. Tästä syystä synteettisistä yhdisteistä käytetään usein nimitystä anabolis-androgeeniset steroidit. Kuvassa 1 on esitetty tässä tutkimuksessa käytettyjen steroidien ja klenbuterolin rakennekaavat.



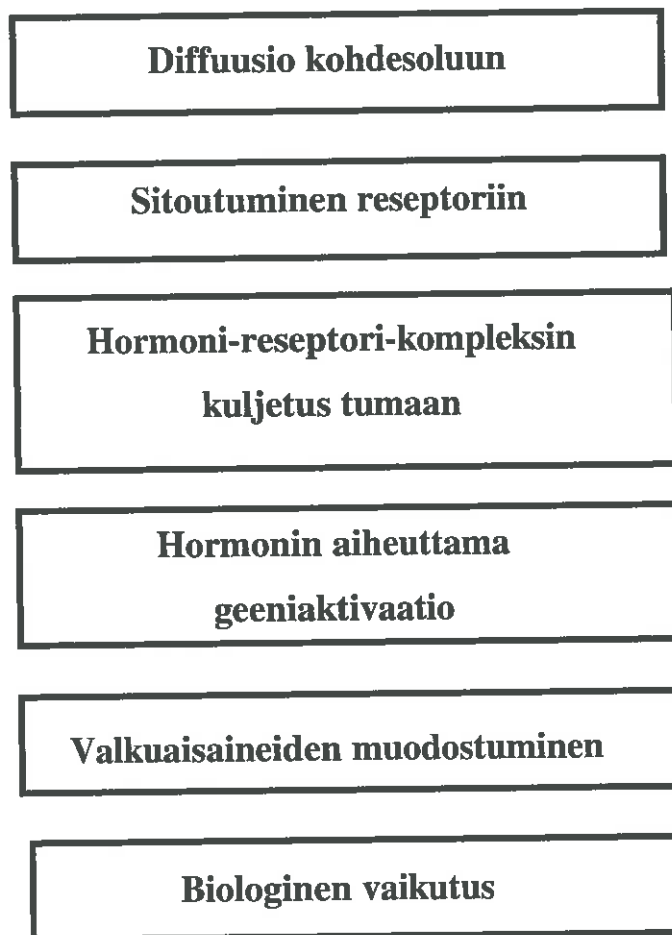
Kuva 1. Tutkimuksessa käytetyt yhdisteet

2.2 Anabolis-androgeenisten steroidien fysiologiset vaikutukset

Anabolis-androgeeniset steroidit, kuten kaikki muutkin steroidihormonit ovat rasvaliukoisia ja ne pystyvät läpäisemään soluja ympäröivän solukalvon (Kuva 2). Solun sisällä hormoni sitoutuu reseptoriproteiiniin ja muodostunut hormoni-reseptorikompleksi puolestaan vaikuttaa solujen proteiinisynteesiin geeniaktivaation kautta (Murray ym. 1990). Geeniaktivaatio kohdistuu useisiin entsyymiproteiineihin, joiden määrä lisääntyy ja samalla myös solun kokonaisproteiinimäärä kasvaa. Anabolis-androgeenisten steroidien, samoin kuin testosteroninkin, vaikutukset kohdistuvat moniin kudoksiin. Näistä vaikutuksista on seuraavassa esitetty lyhyt yhteenveto.

Urheilusuorituksen kannalta merkittävää on anabolis-androgeenisten steroidien aiheuttama punasolusynteesin lisääntyminen, jota on havaittu sekä ihmisurheilijoilla että ravihevosilla (Kuipers 1995, Hyyppä ym. 1995, Snow 1993). Punasolujen määrä saattaa tosin lisätä verisuonitukosten muodostumista, minkä arvellaan olevan syynä osaan kuolemantapauksista, joihin liittyy anabolis-androgeenisten steroidien käyttö (Kuipers 1995). Toinen anabolis-androgeenisten steroidien käyttöön liittyvä kuolinsyy on näiden yhdisteiden aiheuttamat muutokset sydänlihaksessa, jotka saattavat johtaa infarktiin (Huie 1994, Dickerman et al. 1995, Melcher & Welder 1995). Lihaskudoksessa anabolis-androgeeniset steroidit lisäävät proteiinisynteesiä ja siten kasvattavat lihasmassaa. Suuri osa kasvusta johtuu lihassolujen koon lisääntymisestä, mutta lihassyiden määrän lisääntymismahdollisuuttakaan ei ole suljettu pois (Kuipers 1995). Muutokset, jotka kohdistuvat pääasiassa nopeasti supistuviin, tyypin II lihassoluihin, ovat huomattavasti selvempiä naaraspuolisissa yksilöissä kuin uroksissa (Kuipers 1995). Tosin tutkittaessa nandrolonin vaikutusta hevostammojen ja kastroi-

tujen orien, eli ruunien, lihaksiin havaittiin, että lihassolukokoa lisäävät vaikutukset kohdistuvat ainoastaan hitaasti supistuviin, tyypin I lihassyihin (Hyypä ym. 1995). Lisäksi anabolis-androgeenisten steroidien tiedetään hidastavan kilpirauhasen toimintaa ja vähentävän immunoglobuliinien määrää veressä, mutta näiden vaikutusten fysiologista merkitystä ei tunneta. Fysiologisten vaikutusten ohella anabolis-androgeeniset steroidit vaikuttavat merkittävästi myös käyttäytymiseen. Selvimpiä muutoksia ovat urosmainen käytös ja lisääntynyt aggressiivisuus. Tämä näkyy myös ruunilla ja tammoilla tehdyissä hevostutkimuksissa (Hyypä ym. 1995, Snow 1993).



Kuva 2. Anabolis-androgeenisten steroidien vaikutusmekanismi

2.3 Anabolis-androgeeniset steroidit ja suorituskyky

Kysymys siitä, vaikuttavatko anabolis-androgeeniset steroidit urheilusuoritusta parantavasti, on edelleen avoin, ja sen tutkiminen on vaikeaa kontrolloiduissa olosuhteissa. Ainakin urospuolisissa yksilöissä veren normaali testosteronipitoisuus on niin korkea, että se riittää kylläyttämään solujen androgeenireseptorit, ja ehkä juuri tästä syystä uroksissa anabolis-androgeenisten steroidien aiheuttamia fyysisistä suorituskykyä parantavia vaikutuksia ei kovinkaan usein ole pystytty osoittamaan (Celotti & Negri Cesi 1992). Myöskään kahdessa hevostutkimuksessa, joissa tutkittiin nandrolonin vaikutuksia täysverihevossissa ja suomen-

hevosissa, ei steroidikäsitteilyllä ollut mitään merkittäviä muutoksia suorituskykyyn (Snow 1993, Hyyppä ym. 1995). Toisaalta on huomattava, että doping-tarkoituksessa käytettynä annokset ovat arvattavasti jopa 100 kertaa suurempia kuin kontrolloiduissa kokeissa. Yhteenvedossa, joka on tehty 30 aikaisemmasta tutkimuksesta, päädyttiin toteamaan, että harjoitteleissa yksilöissä anabolis-androgeeniset steroidit saattavat hieman lisätä lihasvoimaa (Kuipers 1995). Jotkut tutkimukset viittaavat siihen, että anabolis-androgeenisten steroidien aiheuttama aggressiivisuus mahdollistaisi kovempitehoisen harjoittelun ja sitä kautta lisääisi suorituskykyä. Viitteitä löytyy myös siitä, että anabolis-androgeeniset steroidit nopeuttaisivat palautumista (Kuipers 1995).

2.4 Klenbuteroli

Klenbuteroli on astmalääkkeistäkin löytyvä lääkeaine, joka pieninä pitoisuuksina laajentaa keuhkoputkia, mutta suurempina pitoisuuksina on tehokas kasvunedistäjä. Rakenteeltaan klenbuteroli on adrenaliinin johdannainen (Kuva 1) ja se myös vaikuttaa sitoutumalla samoihin kohdesolujen pinnalla sijaitseviin β -reseptoreihin kuin adrenaliinikin. Klenbuterolin vaikutuksesta lihassolujen poikkileikkauspinta-ala kasvaa, nopeasti supistuvien lihassyiden prosentuaalinen osuus nousee ja lihasten kyky tuottaa energiaa hiilihydraateista lisääntyy (Mersmann 1998, Wadler 1994). Tämän lisäksi klenbuterolin tiedetään vähentävän rasvan määrää. Kasvua edistävän vaikutuksensa vuoksi klenbuterolia käytetään karjankasvatuksessa monissa maissa, joskin EU-direktiivit kieltävät sen käytön EU:n alueella (Kuipers ym. 1996). Kasvunedistämisvaikutuksensa tähden klenbuterolia on tutkittu jonkin verran myös märehitijöissä (Smith 1998).

2.5 Analyysimenetelmät

Anabolis-androgeenisten steroidien, kuten muidenkin steroidihormonien, aineenvaihdunta tapahtuu pääasiassa maksassa ja ne poistuvat elimistöstä munuaisten kautta. Doping-analytiikka perustuu pitkälti anabolis-androgeenisten steroidien, niiden hajoamistuotteiden tai konjugaattien määrittämiseen virtsanäytteestä. Erityisereitistä johtuen virtsa on, ainakin ihmisille, ruumiin nesteistä paras doping-analyysijä ajatellen. Virtsasta voidaan määrittää esimerkiksi testosteronin ja sen isomeerin, epitestosteronin, pitoisuuksien suhde, joka on virtsan erityisnopeudesta riippumaton suure. Tällöin ulkopuolisen testosteronin käytön hevosissa havaitsemisaika pitenee 3 - 4 viikkoon, kun seeruminäytteissä vastaava havaitsemisaika on noin 2 viikkoa (Bonnaire et al. 1995.). Tällä hetkellä kaikki ihmisurheilijoiden doping-analyysit tehdään virtsasta, mikä tosin ei mahdollista veridopingin ja peptidihormonien käytön analysointia.

Dopinganalytiikka perustuu seulontatutkimuksiin, joiden ensimmäisessä vaiheessa käytetään yleensä immunologisia, kromatografisia ja massaspektrometrisia menetelmiä selvittämään onko näytteissä merkkejä stimulanteista, puudutusaineista tai anabolisesti vaikuttavista yhdisteistä. Positiivisen näytteen löydyttyä tulos varmistetaan tarkemmilla menetelmillä, joissa selviää myös käytetyn yhdisteen nimi. Tarkemmat analyysimenetelmät ovat yleensä kaasukromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmiä.

3. Tutkimuksen tarkoitus

On mahdollista, että kilpaurheilun negatiiviset piirteet löytävät tiensä myös kilpaporojen valmennukseen. Tilanteen ennakoimiseksi haluttiin selvittää miten hyvin ihmisurheilijoiden kolme eniten käyttämää anabolis-androgeenista steroidia ja klenbuterolia voidaan analysoida poron verestä.

4. Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa käytettiin Paliskuntain yhdistyksen Kaamasen koetarhan vaatimia, yhteensä 19 kappaletta. Kokeessa tutkittiin seuraavat yhdisteet: testosteroni, nandroloni, metandienoni ja klenbuteroli. Tutkimukselle on Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan ja Elintarvike ja eläinlääkintälaitoksen (EELA) eläinkoetoimikunnan myöntämä lupa.

4.1 Koejärjestelyt

Testosteronia (Sustanon A250⁷, Organon, 250 mg/ml) annettiin 250 mg/poro kertainjektiona lihakseen 9 vaatimelle, joista otettiin verinäytteet kaulalaskimosta ennen injektiota, sekä 2, 4, 7, 14 ja 30 vuorokauden kuluttua injektioista. Verinäytteistä erotettiin seerumi, jota säilytettiin pakastettuna analysointiin saakka.

Nandroloni-annos oli 100 mg/poro (Laurabolin⁷, Intervet, 25 mg/ml). Tutkimuksessa oli mukana 10 vaadinta, joista otettiin verinäytteet ennen injektiota, sekä 1, 2, 3, 4 ja 5 vuorokautta injektion jälkeen. Vaatimien keskipaino oli 80.7 kg. Verinäytteet käsiteltiin samoin kuin edellä.

17-Metyylitestosteronia eli metandienonia (metandienoni, BP-80) annettiin 9 vaatimelle 250 mg/poro. Verinäytteet otettiin ennen injektiota, 2, 3, 7, 14 ja 21 vuorokauden kuluttua injektioista. Verinäytteet käsiteltiin samoin kuin edellä. Tässä kokeessa käytettiin samoja eläimiä kuin nandroloni-kokeessa. Kokeiden väli oli 3 viikkoa.

Klenbuterolikoe toistettiin 3 kertaa. Ensimmäisellä kerralla käytetty annos oli 40 µg/poro (Planipart⁷, Boehringer Ingelheim, 30µg/ml) toisella 100 µg/poro ja viimeisellä kerralla 250 µg/poro. Kahdessa jälkimmäisessä testissä mukana olivat samat 9 vaadinta kuin nandroloni- ja metandienonitesteissäkin. Näytteet otettiin ennen injektiota, 12, 24, 36, 48, 60 ja 72 tunnin kuluttua injektioista. Näytteet käsiteltiin kuten edellä. Kolmannen klenbuterolikokeen lopussa vaatimien keskipaino oli 88.7 kg.

Tutkimukseen liittyen näytteitä otettiin koeluontoisesti myös 1997 Porokuninkuusajojen kuudesta härästä. Verinäytteet otettiin kilpailujen jälkeen kaulalaskimosta ja seerumi erotettiin sentrifugoimalla näytteenottoa seuraavana päivänä.

Tutkimuksessa selvitettiin myös testosteronin ja kortisolin vuosivaihtelua vaatimissa. Tässä osiossa hyödynnettiin aikaisemman tutkimuksen yhteydessä kerättyä materiaalia, jossa oli kerätty viikoittaiset verinäytteet 12 vaatimesta 49 viikon ajan.

4.2 Anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden analysointi

Seerumin testosteroni määritettiin käyttäen kaupallista testipakkausta (ACS:180 TSTO, Chiron Diagnostics Comp., Norwood, U.S.A.). Menetelmän määrittäjäraja on 0.3 mmol/l. Määritykset tehtiin Yhtyneet laboratoriot Oy:n dopingtestauslaboratoriossa.

Nandroloni määritettiin immunologisesti (ELISA) käyttäen kaupallista testipakkausta (Enzyme Immunoassay for the Quantitative Analysis of 19-Nortestosterone, C.E.R., Marloie, Belgia). Analyysiä varten steroidit uutettiin seeruminäytteistä seuraavasti: 200 µl seerumia, 200 µl 0.5 M KOH ja 4 ml dietyylieetteriä sekoitettiin ravistelijassa 10 minuutin ajan. Faa- sit erotettiin toisistaan sentrifugoimalla ja eetterifaasi haihdutettiin kuiviin tyypivirrassa (40-50 °C) ja steroidit liuotettiin testipakkaukseen kuuluvaan puskuriliuokseen. Laadun- tarkkailuseerumi valmistettiin yhdistämällä kokeeseen osallistuneiden vaatimien ennen in- jektiota otetut kontrollinäytteet, negatiivinen kontrolli, ja positiivisena kontrollina käytet-

tiin laaduntarkkailuseerumia, johon oli lisätty 0.5 µg/l nandrolonia. Käytetyn menetelmän toteamisraja on noin 0.1 µg/l seerumia. Määritykset tehtiin Yhtyneet Laboratoriot Oy:n dopingtestauslaboratoriossa.

Metandienoni määritettiin myös immunologisesti (ELISA) käyttäen kaupallista testipakkausta (Enzyme Immunoassay of the Quantitative Analysis of Methyltestosterone, C.E.R., Marloie, Belgia). Näytteiden esikäsittely oli sama kuin edellä nandrolonin kohdalla on kuvattu. Laaduntarkkailunäytteet valmistettiin samoin kuin nandrolonikokeessakin, paitsi, että positiiviseen kontrolliseerumiin lisättiin 0.5 µg/l metandienonia. Menetelmän toteamisraja on noin 0.1 µg/l seerumia. Määritykset tehtiin Yhtyneet Laboratoriot Oy:n dopingtestauslaboratoriossa.

Klenbuterolin määrittämiseksi käytettiin kahta eri menetelmää. Kahdessa ensimmäisessä kokeessa käytettiin entsyymi-immunologista menetelmää (EIA), jossa menetelmän herkkyysraja on 0.4 ng/ml. Määrityksissä käytettiin kaupallista testipakkausta (β-Agonist EIA, Euro-Diagnostica B.V., Apeldoorn, The Netherlands). Myös klenbuterolin uutto seeruminäytteistä suoritettiin testipakkauksen ohjeiden mukaisesti. Immunologiset määritykset tehtiin Eläinlääkintä- ja Elintarvikelaitoksen (EELA) laboratoriossa.

Viimeisessä koesarjassa klenbuteroli määritettiin kaasukromatografis/massaspektrometrisesti MS/MS-tekniikalla näytteistä, joista klenbuteroli oli uutettu emäksisessä pH:ssa. Menetelmän tarkempi kuvaus on liitteessä 1. Tämän menetelmän herkkyysraja on 50 pg/ml.

Kortisoli määritettiin RIA-menetelmällä käyttäen kaupallista testipakkausta (Coat-A-Count Cortisol, Diagnostics Products Co, Los Angeles, Kalifornia, USA). Menetelmän herkkyysraja on 20 ng/ml.

Porokilpailussa otetut näytteet kävivät läpi saman seulonta-analyysipaketin, jota käytetään myös hevoskilpailuissa otetuille näytteille. Nämä määritykset tehtiin Yhtyneet Laboratoriot Oy:n dopingtestauslaboratoriossa.

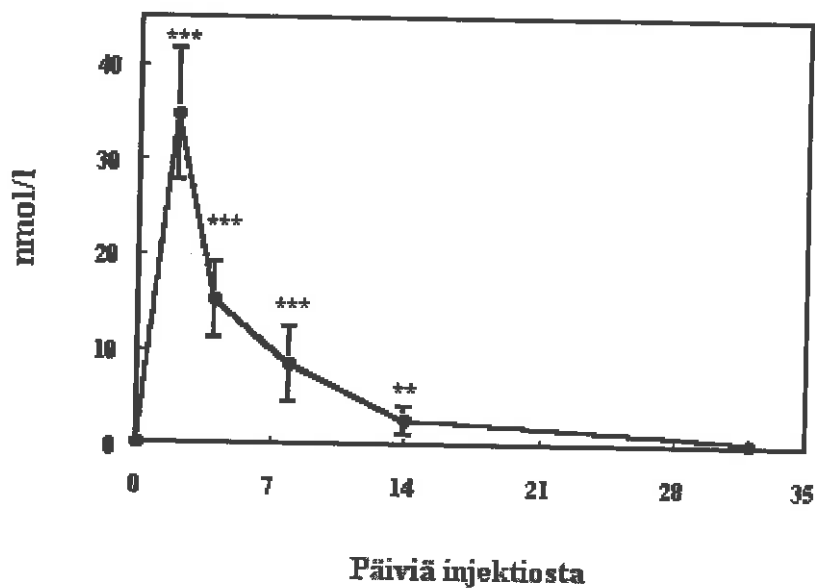
4.3 Tilastolliset menetelmät

Klenbuterolia lukuun ottamatta tulokset on ilmoitettu keskiarvoina ± keskiarvon keskivirhe (SEM). Klenbuterolianalyseissä on ilmoitettu ainoastaan positiivisten näytteiden lukumäärä. Tilastolliset vertailut ennen injektioita mitattuun pitoisuuteen on tehty parillisella t-testillä.

5. Tulokset

5.1 Testosteroni

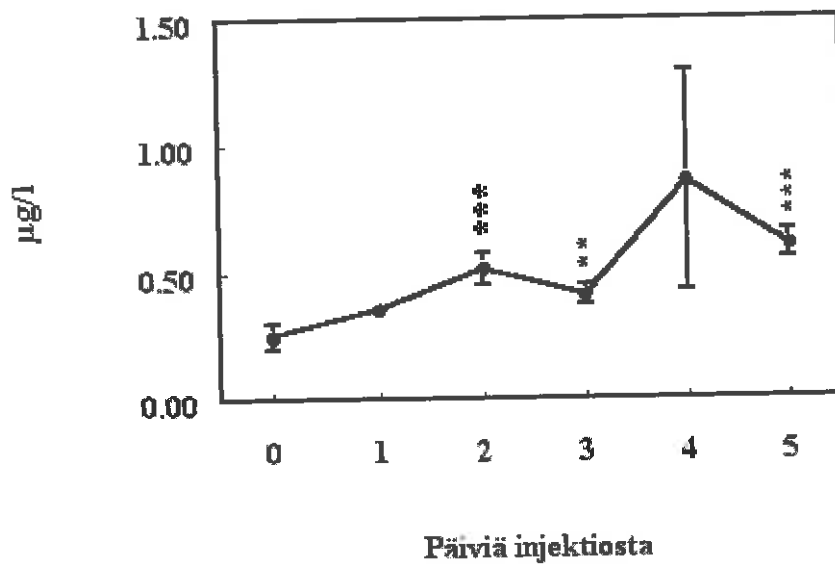
Testosteronitestin keskiarvotulokset (\pm SEM) on esitetty kuvassa 3. Kaikissa vaatimissa injektio nosti testosteronipitoisuuksia merkittävästi. Kuvan tuloksista voitiin laskea testosteronin puoliintumisaika, joka oli 4.9 vuorokautta. Yhtä vaadinta lukuun ottamatta kaikissa eläimissä oli mitattavia määriä testosteronia näytteissä, jotka otettiin 14 vuorokautta injektion jälkeen ja 6 vaatimessa pitoisuudet olivat lievästi koholla vielä 30 vuorokautta injektion jälkeen.



Kuva 3. Testosteronipitoisuudet (keskiarvo \pm SEM) poron seerumissa lihakseen annetun testosteroni injektion jälkeen. Tilastolliset erot ennen injektiota mitattuihin arvoihin on ilmoitettu seuraavasti: *** = $P < 0.001$ ja ** = $P < 0.01$.

5.2 Nandroloni

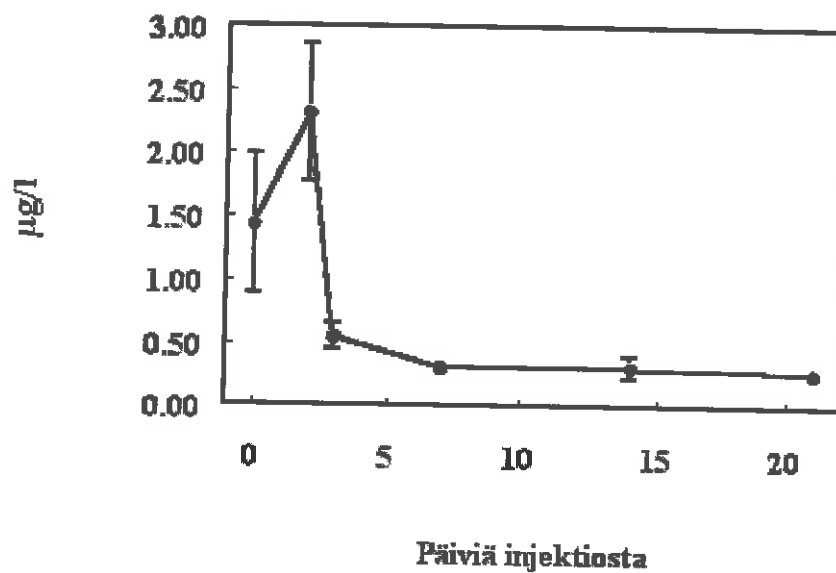
Lihakseen annettu nandroloni-injektio nosti pitoisuuksia plasmassa merkittävästi 2 vuorokauden kuluttua (Kuva 4). Näytteitä otettiin vain 5 vuorokauden ajan, joten puoliintumisaian laskeminen ei ole mahdollista näistä tuloksista. Myös tässä tapauksessa yksilöiden välisiä eroja oli havaittavissa.



Kuva 4. Seerumin nandrolonipitoisuudet (keskiarvo \pm SEM) lihakseen annetun injektion jälkeen. *** = $P < 0.001$ ja ** = $P < 0.01$ ennen injektiota otettuun näytteen verrattuna.

5.3 Metandienoni

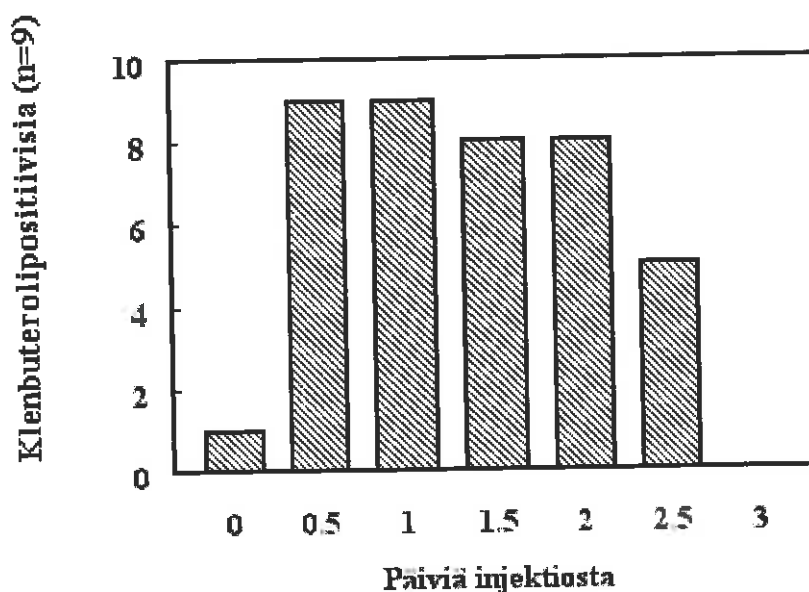
Metandienonipitoisuudet olivat korkeimmillaan 2 vuorokautta injektion jälkeen otetuissa näytteissä (Kuva 5).



Kuva 5. Seerumin metandienonipitoisuudet (keskiarvo \pm SEM) lihakseen annettun injektion jälkeen.

5.4 Klenbuteroli

Klenbuterolin osalta immunologiset menetelmät osoittautuivat liian karkeiksi, joten kahdessa ensimmäisessä testissä klenbuterolin vaikutusta ei pystytty osoittamaan. Viimeisessä koesarjassa analyysit tehtiin kaasukromatografiaa ja massaspektrometriaa hyväksikäyttäen, ns. MS/MS-tekniikalla, jolloin klenbuteroli-positiiviset näytteet erottuivat selvästi ja klenbuteroli oli joissakin vaatimissa todettavissa vielä 60 tunnin kuluttua injektioista (Kuva 6). Yhden vaatimen seerumista löytyi ennen injektiota otetusta näytteestä yhdistettä, joka identifioitiin klenbuteroliksi. Riittämättömän näytemäärän vuoksi analyysiä ei pystytty uusimaan, eikä myöskään pystytty selvittämään sitä, onko näytteiden numeroinnissa kentien tapahtunut virhe.



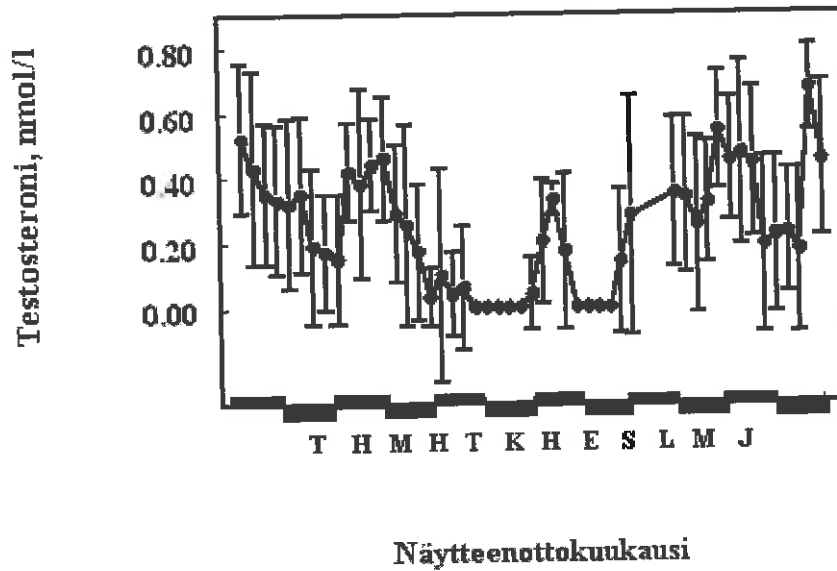
Kuva 6. Klenbuteroliposiivisten näytteiden osuus klenbuteroli-injektion jälkeen.

5.5 Kilpaporonäytteiden seulontatutkimus

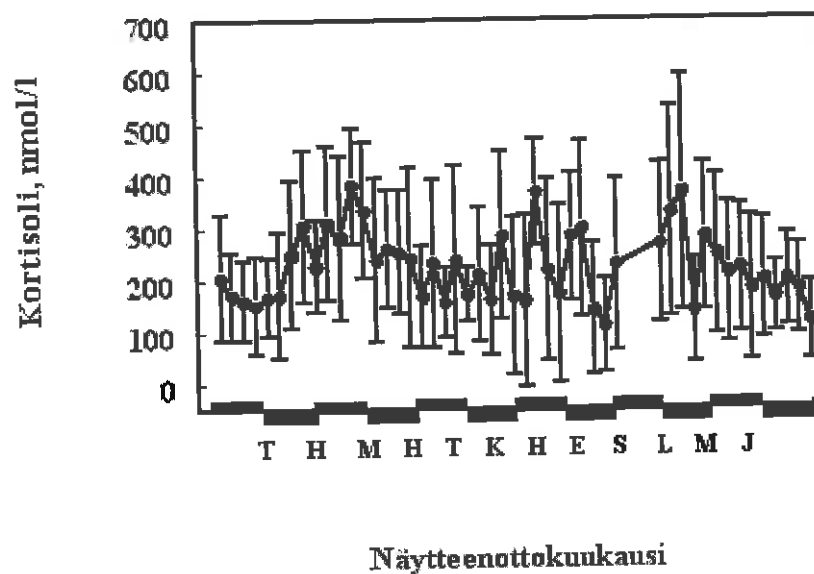
Tutkimuksen yhteydessä otettiin kuudesta porokuninkuusajoihin 1997 osallistuneesta porosta näytteet, joiden seulonta-analyysi tehtiin hevospnäytteille käytettävillä menetelmillä. Näytteenoton ja näytteiden laboratorioon lähettämisen osalta ei noudatettu hevospnäytteille määriteltyä käytäntöä, joten näytteitä ei voida pitää virallisina doping-näytteinä. Näytteistä seulottiin seuraavat yhdisteryhmät: kipu- ja kuumeläkkeet, hengityselinsairauksien lääkkeet, sydän- ja verisuonisairauksien lääkkeet, keskushermostoa stimuloivat yhdisteet, paikallispuudutteet, anaboliset aineet ja psyykenlääkkeet. Yksikään testatuista näytteistä ei sisältänyt tutkittuja yhdisteitä.

5.6 Testosteronin ja kortisolin vuosivaihtelu vaatimissa

Hirvailla pääosa testosteronista tulee kiveksistä, mutta testosteronia muodostuu ja erittyy verenkiertoon myös lisämunuaisesta, joten vaatimien ja härkien veressä on mitattavia määriä testosteronia. Tästä syystä tässä tutkimuksessa määritettiin testosteronin vuosivaihtelu. Asiasta ei ollut aikaisempaa tietoa ja mahdollisen doping-kontrollin kannalta on tärkeää tietää, millaisia testosteronipitoisuuksia poron veressä on kevättalvella. Testosteronipitoisuudessa oli selkeä vuosivaihtelu, jossa matalimmat pitoisuudet mitattiin kesällä (Kuva 7). Vertailun vuoksi kokeessa mitattiin myös toisen lisämunuaisesta peräisin olevan steroidihormonin, kortisolin, vuosivaihtelu. Kortisolipitoisuuksissa oli erittäin suuri yksilövaihtelu, mutta keskiarvoissa on havaittavissa, että pitoisuudet ovat korkeimmillaan talvella (helmi-maaliskuu) ja toisaalta lokakuussa (Kuva 8).



Kuva 7. Seerumin testosteronipitoisuuden vuosivaihtelu (keskiarvo \pm SEM) vaatimissa. Kuvassa näytteenotto-kuukaudet on merkitty kuukauden alkukirjaimella, esim. T = tammikuu.



Kuva 8. Seerumin kortisolipitoisuuden (keskiarvo \pm SEM) vuosivaihtelu vaatimissa.

6. Tulosten tarkastelu

Porojen doping-analytiikka poikkeaa urheilijoiden ja myös urheiluhevosten analytiikasta siinä, että määritykset on aina tehtävä verestä, koska virtsanäytteiden ottaminen on käytännössä mahdotonta. Tämä tutkimus osoittaa kuitenkin, että ainakin joidenkin anabolisesti vaikuttavien yhdisteiden analysointi onnistuu myös verinäytteistä. Ennen kaikkea klenbuterolin kohdalla tehty kehitystyö osoittaa, että metodologisesti on mahdollista parantaa herkkyyttä ja yhä pienempien jäämien havainnointi on mahdollista. Tutkimukset tehtiin vaatimilla, koska niiden oma testosteronitaso on matala. Tämä vastaa hyvin käytännön tilannetta, sillä suurin osa kilpaporosta on härkiä. Vuosivaihtelutuloksista käy ilmi, että vaativien normaali testosteronitaso kevättalvella on niin matala, ettei se tule aiheuttamaan ongelmia mahdollisissa doping-testeissä.

Merkillepantavaa on kaikkien testattujen yhdisteiden osalta suuri yksilövariaatio. Kun esimerkiksi testosteronin puoliintumisaika veressä oli 9 poron ryhmässä keskimäärin 4.9 vuorokautta, oli joukossa yksilöitä, joissa testosteronia oli mitattavissa vielä 4 viikon kuluttua injektiosta. Tässä on vielä huomioitava se, että tässä tutkimuksessa porot saivat vain yhden injektion, kun taas dopingkäyttö on yleensä pitempiaikaista, joten on mahdollista, että myös yksilöiden väliset erot korostuvat entistä enemmän. Tämä näkyy esimerkiksi kontrolloidusta hevostutkimuksesta, jossa suomenhevostammoille ja ruunille annettiin nandrolonia injektiona viikottain 13 viikon ajan ja seurattiin nandrolonin häviämistä verestä. Keskimääräinen nandrolonin puoliintumisaika oli 26 vuorokautta, mutta kahdella hevosella kuudesta oli veressä mitattavia määriä nandrolonia vielä 3 kuukautta viimeisen injektion jälkeen (Hyypä ym. 1997). Lisäksi on huomattava, että hevostutkimuksessa käytetty annos oli terapeuttinen eli noin 10-100 kertaa pienempi kuin mitä urheilijoiden tiedetään käyttävän doping-tarkoituksessa. Käytännössä tämä suuri yksilövaihtelu helpottaa mahdollista dopingkontrollia, koska käyttäjä ei voi olla varma siitä, kuinka pitkä aika kuluu ennen kuin poro on ”puhdas”.

Tutkituista yhdisteistä metandienoni osoittautui hankalimmaksi. Pitoisuudet olivat korkeimmillaan ennen injektiota, mikä viittaa siihen, että 17-metyylitestosteronia saattaa muodostua luonnostaan poron elimistössä samoin kuin hevosissa (Snow 1993). Toinen vaihtoehto on, että joku muu poron elimistössä muodostuva steroidi ristireagoi immunologisessa testissä ja siten tulee näkyviin analyseissä. Asia on tarvittaessa varmistettava lisätutkimuksilla.

Klenbuterolin biologinen puoliintumisaika on erittäin lyhyt, naudoilla noin 18 tuntia (Smith 1998), mutta tässä tutkimuksessa herkällä MS/MS-tekniikalla pystyttiin havaitsemaan klenbuterolin käyttö vielä 60 tuntia injektion jälkeen. Uudella tekniikalla määritysherkkyys parani 50 pg/ml aikaisemmasta GS/MS-tekniikalla saavutetusta 1 ng/ml (Laakkonen ym. 1995). Klenbuteroli kertyy naudoilla myös karvoihin. Mikäli myös poroilla käynnäin, tulee olemaan mahdollista todeta klenbuterolin käyttö kuukausien kuluttua varsinaisista injektioista. Mahdollista doping-kontrollia varten myös tämä näytteenottovaihtoehto on tarvittaessa testattava.

Kysymyksiä, joihin tämä tutkimus ei tuo vastausta, on mm. doping-yhdisteen antotapa. Tässä tutkimuksessa käytettiin injektiota lihakseen. Toinen yleinen tapa on nauttia lääkeaineet suun kautta tabletteina. Koska poro on märehijä, tulisi myös selvittää pötsin mikrobin vaikutus käytettävien yhdisteiden aineenvaihduntaan. Teoriassa mikrobin vaikutus saattaa olla merkityksetön, mutta toisaalta mikrobit voivat hajottaa lääkeaineen tai mikrobit voivat muuttaa lääkeaineen yhdisteeksi, jota elimistössä ei muodostuisi. Tällaisen yhdisteen läsnäolo verenkierrossa olisi sitten varma merkki lääkeaineen käytöstä.

Urheiluhevosille on käytössä seulonta-analyysi, mikä tehdään verinäytteistä, jos hevosesta ei saada virtsanäytettä. Samaa menetelmää soveltaen testattiin 6 vuoden 1997 Porokuninkuusajoon osallistuneen poron seerumit, joista yhdessäkään ei ollut viitteitä kiellettyjen aineiden käytöstä. Kyseisen epävirallisen ”doping-testauksen” arvoa lisää se, että näytteen-

otosta ilmoitettiin vasta kilpailupaikalla ja myös se, että kaikki porojen omistajat suhtautuivat erittäin positiivisesti testaukseen. Ravihevosilla analyysit tehdään verinäytteistä, mikäli virtsanäytettä ei saada. Tämä sama testipaketti on mitä ilmeisemmin sovellettavissa myös poroihin, joten pelkästään tämän seulontatestauksen olemassaolo antaa myös porokilpailujen järjestäjille selvän mahdollisuuden dopingkontrolliin.

Eläinkilpailujen- ja näyttelyjen doping-valvontaa varten on nyt perustettu puolueeton toimikunta, joka ryhtyy valvomaan kilpailuja järjestelmällisesti. Myös Paliskuntain yhdistys on hyväksynyt sopimuksen helmikuussa 2000. Toimikunta voi määrätä pistokokeita tehtäväksi myös porokilpailuissa ja mahdollisen positiivisen näytteen jälkeen Paliskuntain yhdistys tulee päättämään seuraamuksista.

Kiitokset

Tämän tutkimuksen on toteutettu Maa- ja metsätalousministeriön myöntämän MAKERA-apurahan turvin. Tässä yhteydessä haluamme myös kiittää Paliskuntain yhdistystä, jonka omistamalla Kaamasen koetarhan vaatimilla tämä tutkimus on tehty, sekä porotalousneuvoja Veijo Tervosta ja muuta koetarhan henkilökuntaa porojen hoidosta.

Kirjallisuus

- Anon. 1988: Council Directive of 7 March prohibiting the use in livestock farming of certain substances having a hormonal action (88/146/EEC). Official J. Eur. Commun. L118, 4 May 1993: 64-74.
- Bonnaire, Y., Dehennin, L., Plou, P., Popot, M. A. & Toutain, P. L. 1995: Study of testosterone and metabolites in urine and plasma after administration of a single dose of testosterone hexahydrobenzoate to mares: a new approach. Teoksessa: Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Stockholm, Sweden 1994 (toim. P. Kallings, U. Bondesson & E. Houghton), R. & W Publications Ltd., Newmarket, UK, pp. 187-194.
- Celotti, F. & Negri Cesi, P. 1992: Anabolic steroids: A review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. -J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 43: 469-477.
- Dickerman, R. D., Schaller, F., Prather, I. & McConathy, W. J. 1995: Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids. -Cardiology 86: 172-173.
- Huie, M. J. 1994: An acute myocardial infarction occurring in an anabolic steroid user. - Med. Sci. Sports Exerc. 26: 408-413.
- Hyyppä, S., Karvonen, U., Räsänen, L. A., Persson, S. G. B. & Pösö, A. R. 1997: Androgen receptors and skeletal muscle composition in trotters treated with nandrolone laurate. -J. Vet. Med. A 44: 481-491.
- Hyyppä, S., Räsänen, L. A., Persson, S. G. B. & Pösö, A. R. 1995: Exercise performance indices in normal and anabolic steroid treated trotters. -Equine Vet. J. Suppl. 18: 443-447.
- Kuiper, H. A., Noordam, M. Y., van Dooren-Flipsen, M. M. H., Schilt, R. & Roos, A. H. 1998: Illegal use of β -adrenergic agonists: European community. -J. Anim. Sci. 76: 195-207.
- Kuipers, H. 1995: Anabolic steroids and sport performance. Teoksessa: Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Stockholm, Sweden 1994 (toim. P. Kallings, U. Bondesson & E. Houghton), R. & W Publications Ltd., Newmarket, UK, pp. 177-179.
- Laakkonen, U.-M., Leinonen, A. & Savonen, L. 1995: Screening and identification of clenbuterol in equine urine. Teoksessa: Proceedings of the 10th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Stockholm, Sweden 1994 (toim. P. Kallings, U. Bondesson & E. Houghton), R. & W Publications Ltd., Newmarket, UK, pp. 369-371.
- Leinonen, A. & Seppänen, T. 1994: Dopingaineiden valvonta ja analytiikka. -Kemia-Kemi 21:403-409.
- Melchert, R. B. & Welder, A. A. 1995: Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. -Med. Sci. Sports Exerc. 27: 1252-1262.
- Mersmann, H. J. Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. - J. Anim. Sci. 76: 160-172.
- Smith, D. J. 1998: The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of β -agonists in livestock. - J. Anim. Sci. 76: 173-194.
- Snow, D. H. 1993: Anabolic steroids. -Vet. Clin. N. A. Equine Pract. 9: 563-576.
- Wadler, G. I. 1994: Drug use update. - Med. Clin. N. A. 78: 439-455.