

Doping im Pferdesport

dopingrelevante Mittel und Futterzusätze

M. Kietzmann, Hannover



Definition Doping

Verboten ist die Verabreichung eines jeden Mittels, das geeignet ist, die aktuelle und natürliche Leistungsfähigkeit eines Pferdes zum Zeitpunkt des Rennens zu verändern.

Die Verabreichung von Mitteln, welche den Nachweis solcher Substanzen beeinträchtigen können, ist ebenfalls verboten.

Insbesondere verboten sind solche Substanzen, welche eine der in den Dopinglisten aufgeführten pharmakologischen Wirkungen direkt oder indirekt, als Haupt- oder Nebenwirkung entfalten.

Wenn bei den Dopingkontrollen eine beliebige Menge einer verbotenen Substanz oder einer ihrer Metaboliten im Gewebe oder in den Körperflüssigkeiten nachgewiesen wird, ist das Pferd als gedopt zu bezeichnen.

Doping und Arzneimitteleinsatz

- Dopingsubstanzen (im eigentlichen Sinn)
- „Verbotene“ Arzneimittel
- Ausnahmen

Die Behandlung eines erkrankten Pferdes muss möglich sein, ohne gegen Dopingbestimmungen zu verstoßen.

Diesbezüglich werden diskutiert:

- **Nulllösung** \Leftrightarrow **Grenzwerte**
- **Karenzzeiten**

Dopingrelevante Substanzen

Leistungsbeeinflussende Substanzen

- Stimulantia
- Sedativa und Narkotika
- Anabolika
- Diuretika
- Peptidhormone und Analoga

Verbotene Arzneimittel (Substanzen, die als Arzneimittel eingesetzt werden, jedoch im Wettkampf verboten sind)

- Substanzen mit Wirkung auf Nervensystem, Herz-Kreislauf-System, Atmungssystem, Verdauungssystem, Harn-System, Geschlechtsorgane, Muskel- und Skelettsystem, Haut, Infektionserreger

Dopingrelevante Substanzen

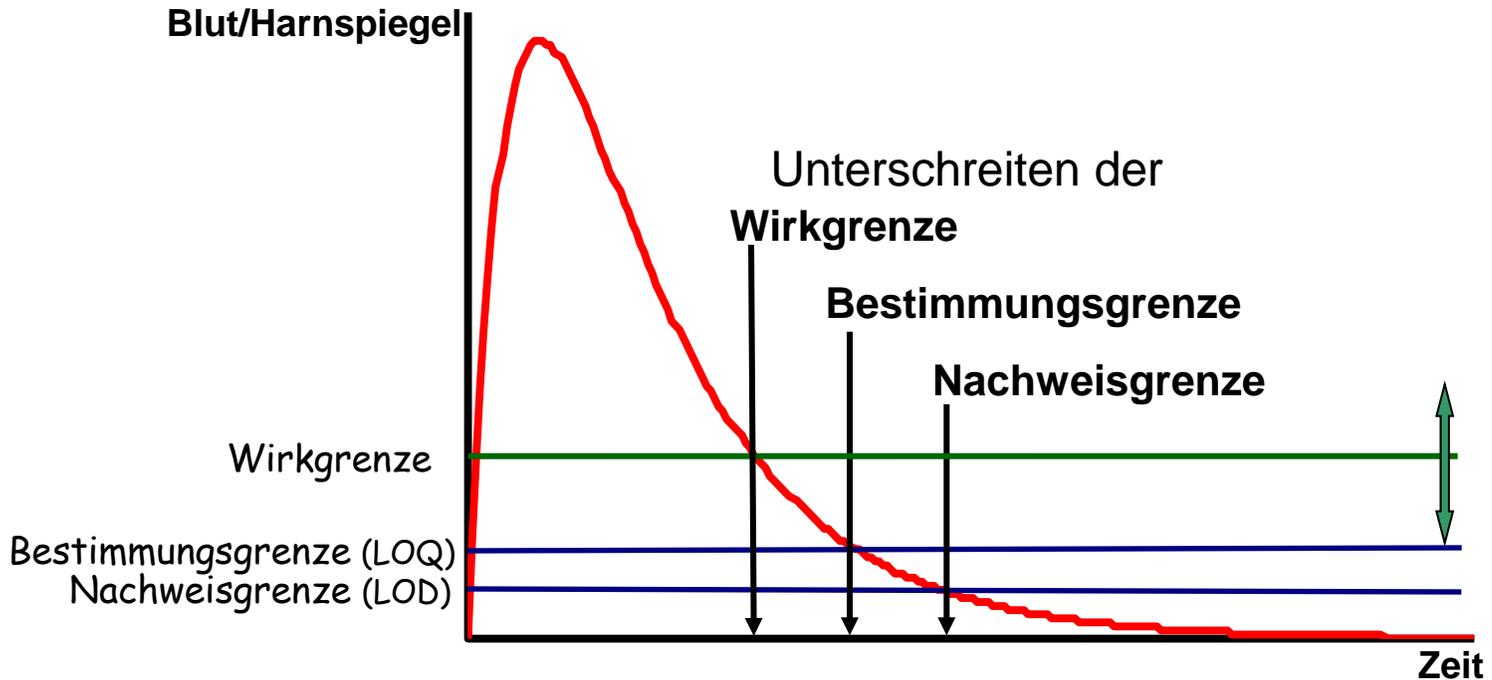
Ausnahmen (Anwendung/Verabreichung in zeitlichem Zusammenhang mit der Wettkampfteilnahme erlaubt)

- Impfstoffe
- Endoparasitika
- Paramunitäts-Inducer
- externe Desinfektionsmittel und Insektenschutzmittel

„Nulllösung“

Zum Zeitpunkt des Wettkampfes
darf sich keine körperfremde
Substanz im Pferd befinden.

Grenzwertkonzept

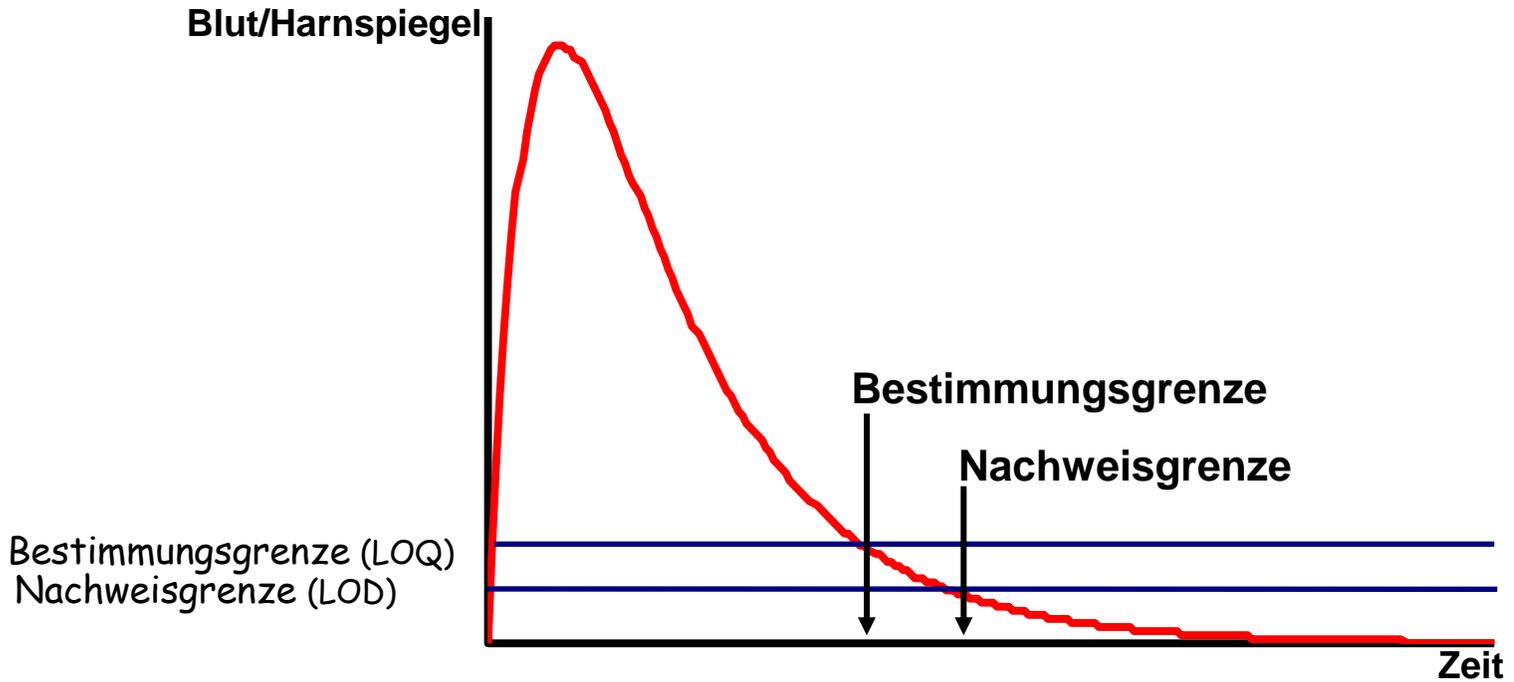


→ RLOQ = empfohlene Bestimmungsgrenze

Grenzwertkonzept

- **qualitative Bestimmung → quantitative Bestimmung**
- Grenzkonzentrationen ohne pharmakologischen Effekt
- nur für therapeutisch eingesetzte Substanzen
- geeigneter Analyt (Rückschluß auf Wirkung)
- Blutkonzentrationen korrelieren besser mit pharmakologischem Effekt als Urinkonzentrationen
- Grenzkonzentrationen im Blut teilweise kleiner als aktuelle Nachweisgrenzen
- Berechnung von Absetzfristen?

Grenzwertkonzept



Grenzwertkonzept

- qualitative Bestimmung → quantitative Bestimmung
- Grenzkonzentrationen ohne pharmakologischen Effekt
- nur für therapeutisch eingesetzte Substanzen
- geeigneter Analyt (Rückschluß auf Wirkung)
- Blutkonzentrationen korrelieren besser mit pharmakologischem Effekt als Urinkonzentrationen
- Grenzkonzentrationen im Blut teilweise kleiner als aktuelle Nachweisgrenzen
- Berechnung von Absetzfristen?

Grenzwertkonzept

- qualitative Bestimmung → quantitative Bestimmung
- Grenzkonzentrationen ohne pharmakologischen Effekt
- nur für therapeutisch eingesetzte Substanzen
- geeigneter Analyt (Rückschluß auf Wirkung)
- **Blutkonzentrationen korrelieren besser mit pharmakologischem Effekt als Urinkonzentrationen**
- **Grenzkonzentrationen im Blut teilweise kleiner als aktuelle Nachweisgrenzen**
- Berechnung von Absetzfristen?

Berechnung irrelevanter Plasma- und Urinkonzentrationen PK/PD-Modell nach TOUTAIN und LASSOURD (2002)

$$\text{EPC} = \frac{\text{Dosierung}}{\text{Clearance}} \quad [\text{ng/ml}]$$

**Effektive Plasma-
konzentration**

**Ineffektive Plasma-
konzentration**

$$\text{IPC} = \frac{\text{EPC}}{\text{SF}} \quad [\text{ng/ml}]$$

$$\text{SF} = 500$$

$$\text{IUC} = \text{IPC} \times R_{ss} \quad [\text{ng/ml}]$$

**Ineffektive Urin-
konzentration**

$$R_{ss} = \frac{\text{durchschnittliche Urinkonzentration}}{\text{durchschnittliche Plasmakonzentration}}$$

Wirkungsdauer und „Ausscheidungszeit“ beim Pferd

Wirkstoff	pharmakologische Wirkung [h]	Ausscheidungszeit* [h]	
		Blut	Harn
Fentanyl	0,5-1	2-3	96
Pentazocin	1	60	100
Apomorphin	1	1,5	48
Coffein	72	144	226
Acepromazin	3	8	
Reserpin	240	120	
Flunixin	> 12	3-5	48
Phenylbutazon	12-36	216	336
Procain	4	>12	300
Furosemid	4	5-12	72

* in Abhängigkeit von der Analytik

Beispiel: Detomidin

[Tobias, 2004]

Analytik

Nachweis von Detomidin im Plasma und Urin mittels HPLC/MS/MS

Validierung der Methode bezüglich Selektivität und Spezifität, Linearität, Richtigkeit, Präzision, Stabilität und Wiederfindung.

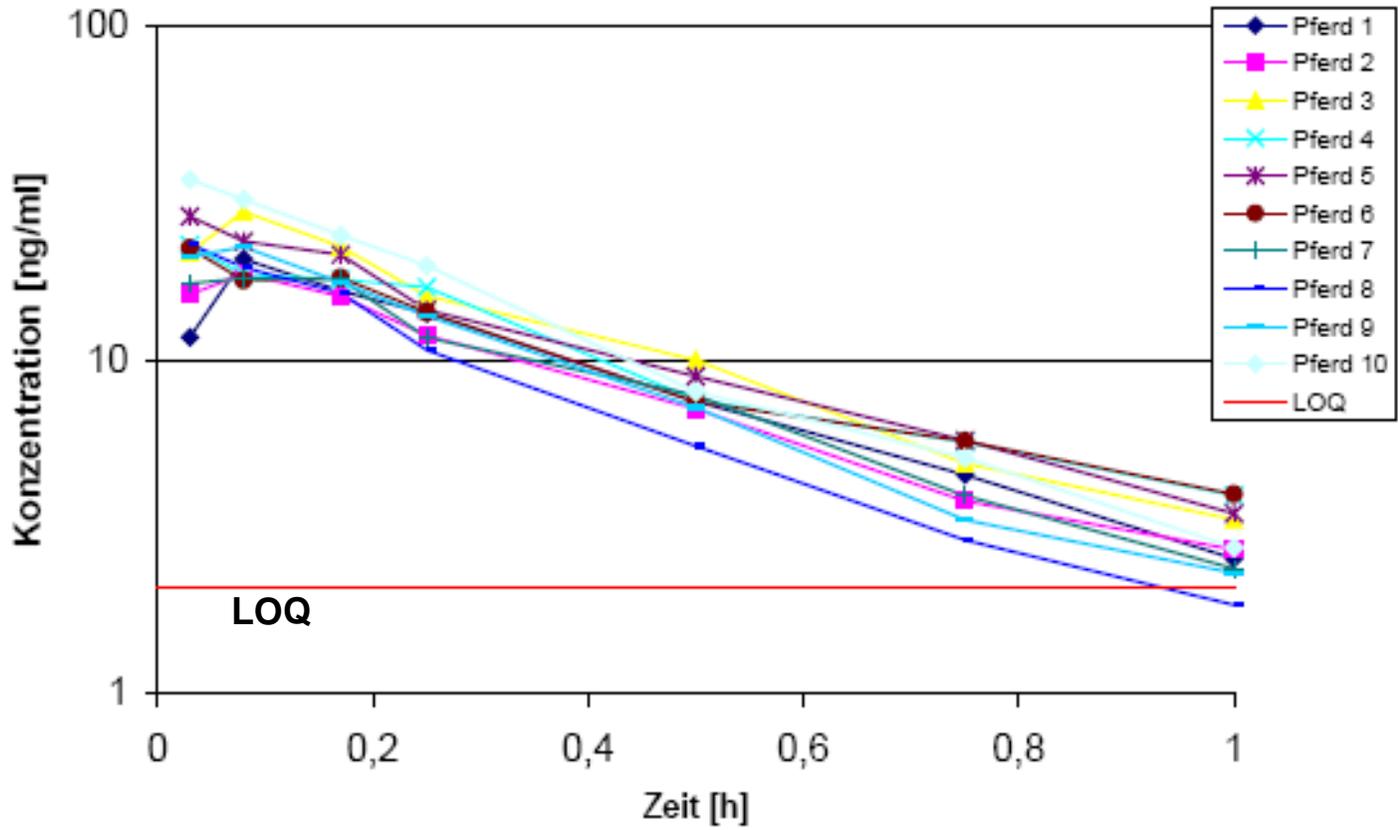
Bestimmungsgrenze im Plasma: 2,09 ng/ml

im Urin: 10 ng/ml (3-Hydroxydetomidin)
50 ng/ml (Carboxydetomidin)

Nachweisgrenze im Plasma: 1,67 ng/ml

im Urin: 10 ng/ml (3-Hydroxydetomidin)
50 ng/ml (Carboxydetomidin)

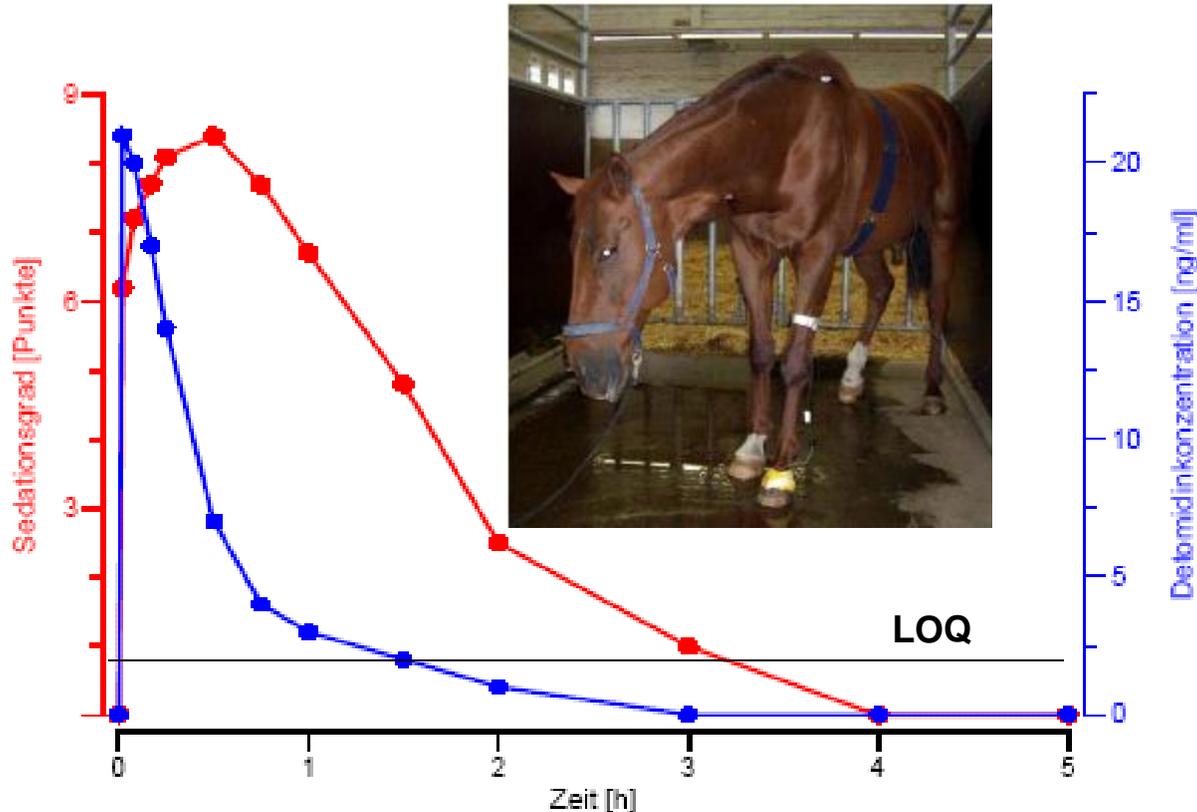
Plasmakonzentrationsverlauf von Detomidin nach einmaliger intravenöser Applikation von 20 µg Detomidin-Hydrochlorid/kg KM bei 10 Pferden (halblogarithmische Darstellung)



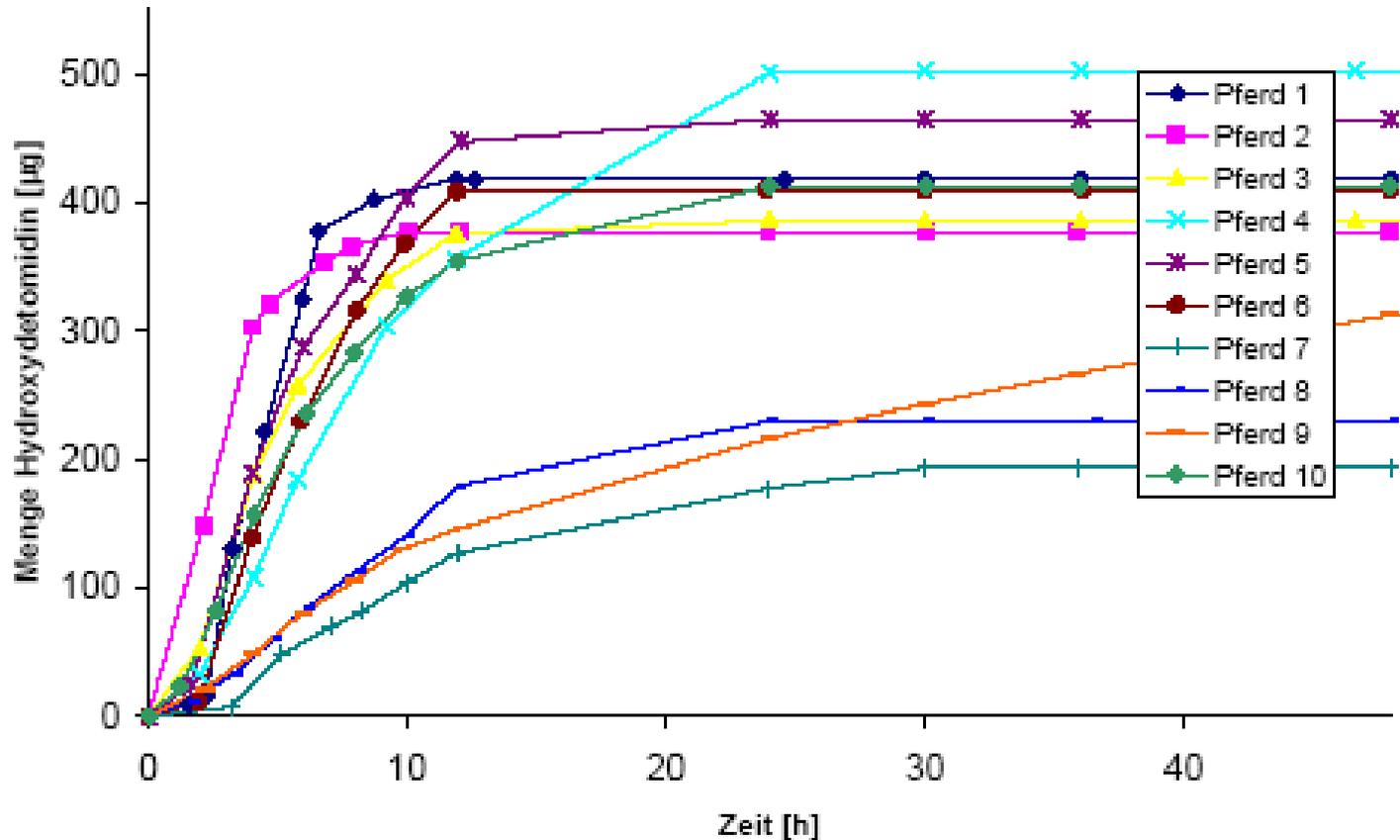
Pharmakokinetische Daten nach einmaliger Applikation von 20 µg/kg
 Detomidin-Hydrochlorid bei 10 Pferden
 (Mittelwert, Standardabweichung, Variationskoeffizient)

Parameter	Einheit	Mittelwert [n=10]	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
b₁	[1/h]	2,33	0,39	16,56
t₅₀ (b₁)	[h]	0,30	0,05	16,71
MRT_(tot)	[h]	0,47	0,08	16,39
V_c	[l/kg]	0,70	0,12	17,77
Clearance	[ml/min]	26,78	4,03	15,05
AUC	[ng/ml*h]	10,65	1,57	14,70
Cmax_{gem}	[ng/ml]	23,40	5,23	22,36
Tmax_{gem}	[min]	3,50	1,58	45,18

Sedationsgrad (Score-System für Ptosis sowie Reaktion auf akustischen Reiz und visuellen Reiz) *versus* Plasmakonzentration nach einmaliger i.v. Gabe von 20 µg Detomidin-Hydrochlorid/kg KM



Kumulative Darstellung der im Urin ausgeschiedenen Menge 3-Hydroxydetomidin nach einmaliger intravenöser Applikation von 20 µg Detomidin-Hydrochlorid/kg KM bis 48 Stunden p. a.



Ergebnisse der Berechnungen von EPC, IPC und IUC nach TOUTAIN und LASSOURD (2002)

(Dosierung 16,76 µg Detomidin-Hydrochlorid/kg KM, Dosierungsintervall 4 Stunden)

Parameter	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4	Pferd 5	Pferd 6	Pferd 7	Pferd 8	Pferd 9	Pferd 10	Mittelwert	S
EPC (4h) [ng/ml]	2,96	2,21	3,19	3,01	3,05	2,83	2,64	2,08	2,47	3,20	2,76	0,40
IPC (4h) [ng/ml]	0,0059	0,0044	0,0064	0,0060	0,0061	0,0057	0,0053	0,0042	0,0049	0,0064	0,0055	0,0008
IUC (4h) [ng/ml]	0,25	0,67	0,47	0,29	0,70	0,33	0,22	0,67	0,12	0,59	0,43	0,22

Ergebnis der *Detomidin-Studie*

- Nachweisgrenzen werden im Plasma nach 3 Stunden und im Urin nach 30 Stunden unterschritten.
- irrelevante Plasma- und Urinkonzentrationen für Detomidin liegen unterhalb der Nachweisgrenze
(im PK/PD-Modell nach TOUTAIN und LASSOURD bei angenommenen Dosierungsintervallen von 4 Stunden)



jeglicher Nachweis von Detomidin ist ein positiver Dopingbefund

- *relativ geringe Anzahl von Versuchstieren (n = 10) und beachtenswerte interindividuelle Unterschiede*
⇒ *keine auf die Gesamtpopulation übertragbare Aussage zu Ausscheidungs- oder Karenzzeiten möglich*

Beispiel: Dembrexin

[Massmann, 2004]

Analytik

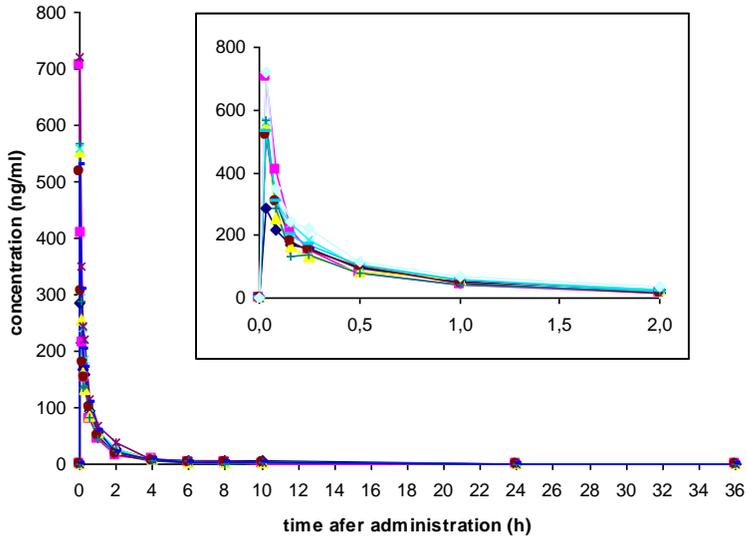
Nachweis von Dembrexin im Plasma und Urin mittels HPLC/MS/MS

Validierung der Methode bezüglich Selektivität und Spezifität, Linearität, Richtigkeit, Präzision, Stabilität und Wiederfindung.

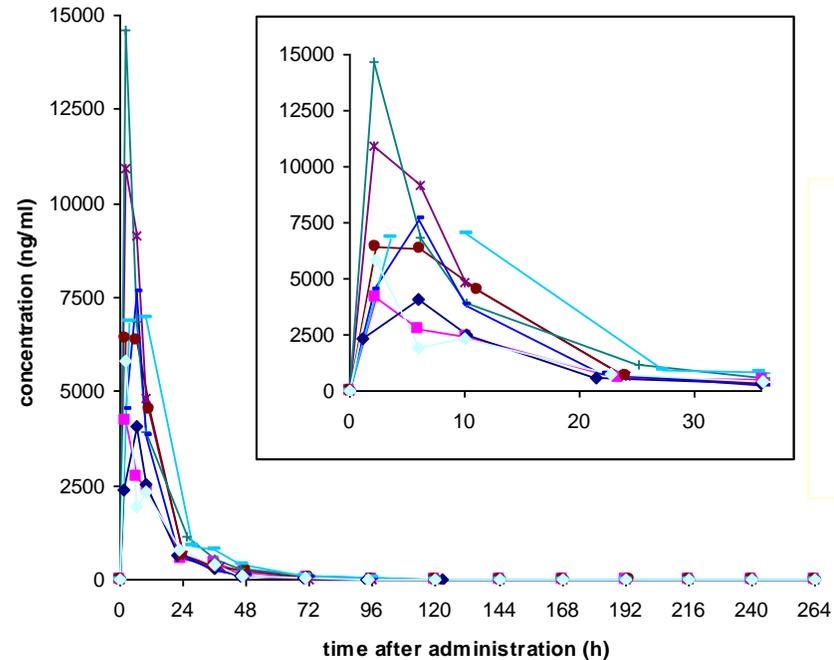
Bestimmungsgrenze im Plasma: 5 ng/ml
im Urin: 5 ng/ml

Nachweisgrenze im Plasma: 50 ng/ml
im Urin: 50 ng/ml

Plasma- und Urinkonzentration von Dembrexin beim Pferd nach einmaliger Gabe



Plasma



Urin

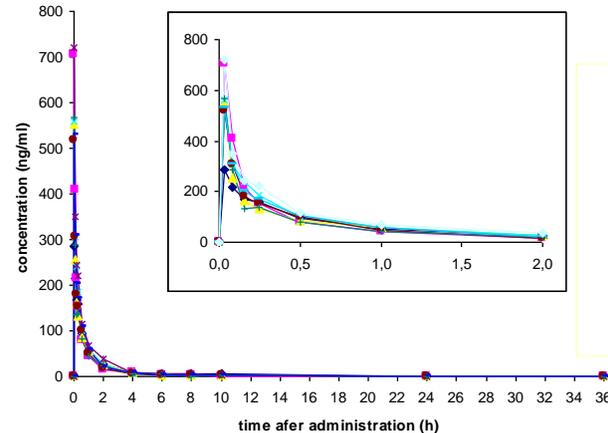
Ergebnis der Dembrexin-Studie

[Massmann, 2004]

IPC 0,1 ng/ml

IUC 4,1 ng/ml

RLOQ 50,0 ng/ml



Ausscheidungszeit

nach wiederholter oraler Gabe: **4 Tage**

Grenzwertkonzept

- qualitative Bestimmung → quantitative Bestimmung
- Grenzkonzentrationen ohne pharmakologischen Effekt
- nur für therapeutisch eingesetzte Substanzen
- geeigneter Analyt (Rückschluß auf Wirkung)
- Blutkonzentrationen korrelieren besser mit pharmakologischem Effekt als Urinkonzentrationen
- Grenzkonzentrationen im Blut teilweise kleiner als aktuelle Nachweisgrenzen
- **Ermittlung von Nachweiszeiten**
- **Berechnung von Absetzfristen?**

Nachweiszeiten (EHSLC)

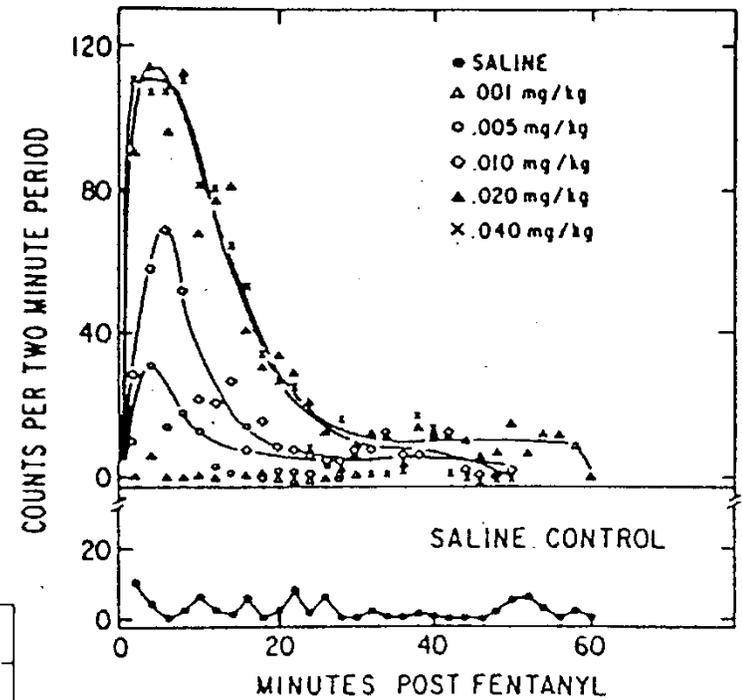
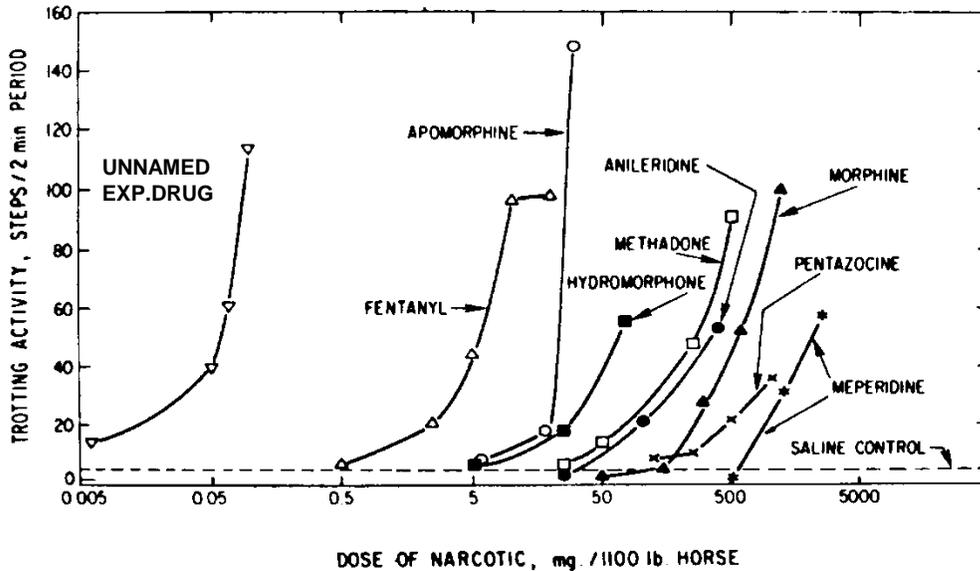
<i>Substanz</i>	<i>Dosierung (mg/kg)</i>	<i>Appl.-Art</i>	<i>Nachweiszeit (Std., Tage)</i>
Phenylbutazon	4,4-8,8	oral, i.v.	168 (7)
Flunixin	1	i.v.	144 (6)
Carprofen	0,7	i.v.	264 (11)
Ketoprofen	2,2	i.v.	96 (4)
Meloxicam	0,6	oral, i.v.	72 (3)
Eltenac	0,5	i.v.	192 (8)
Metamizol	30	i.v.	72 (3)
Vedaprofen	2	i.v.	96 (4)
Furosemid	1	i.v.	48 (2)

„Das EHSLC übernimmt keinerlei Haftung oder Verantwortung für mittelbare oder unmittelbare Folgen für die Anwendung der veröffentlichten Daten.“

Wichtige Aspekte bezüglich der Festsetzung von Absetzfristen

- Dosierung
- Pharmakokinetik:
 - Elimination (Clearance, Halbwertszeit)
 - Verteilung (tiefe Kompartimente)
- Nachweisgrenze der Analytik

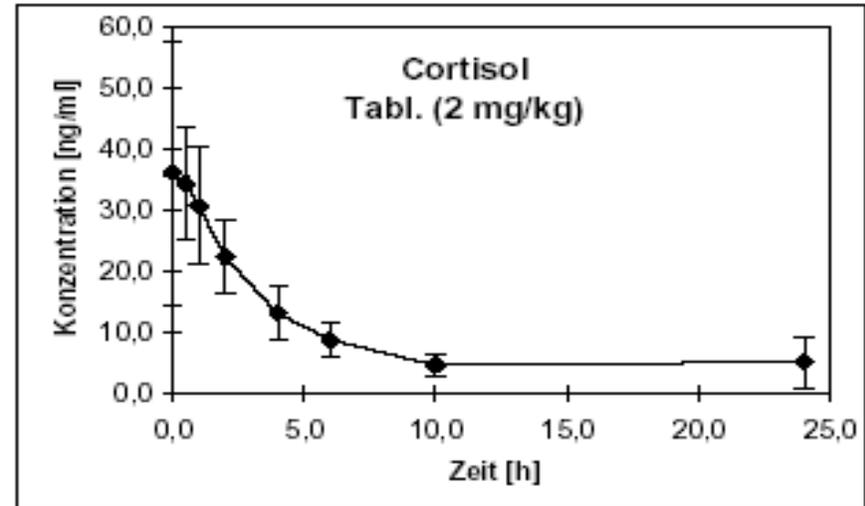
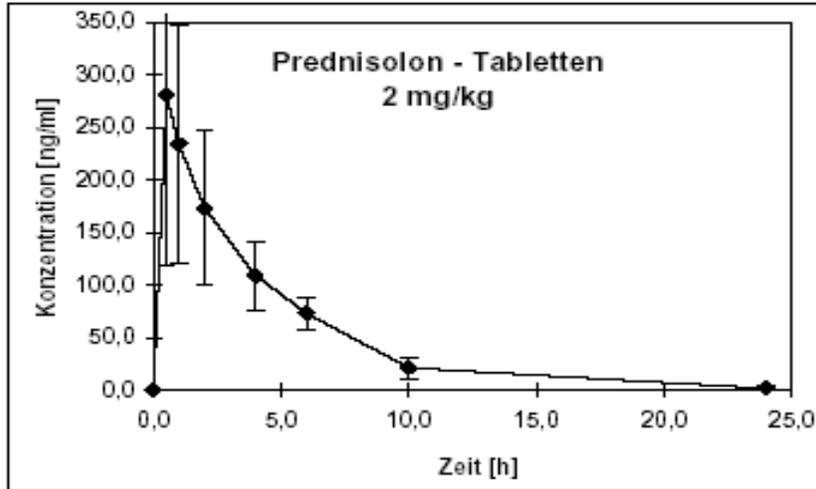
Dosisabhängiger Effekt von starken Analgetika auf die spontane Lokomotion beim Pferd



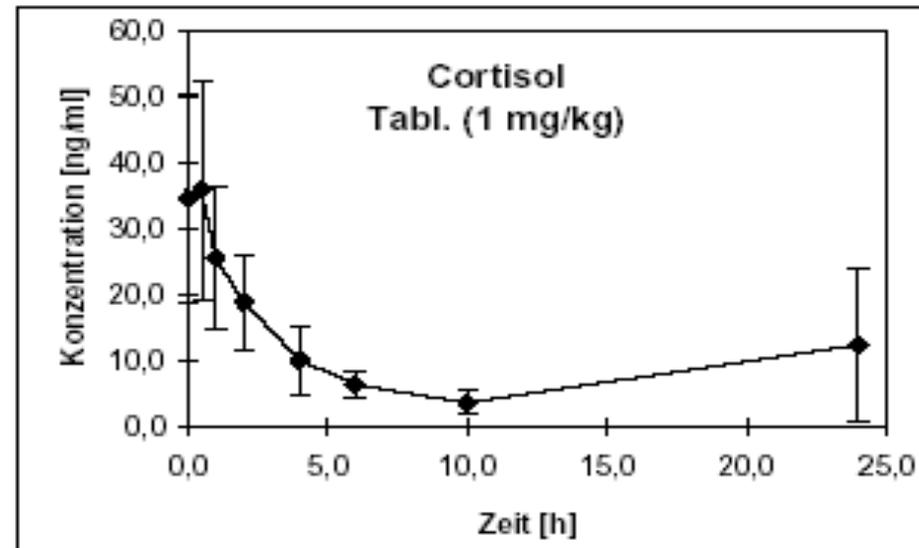
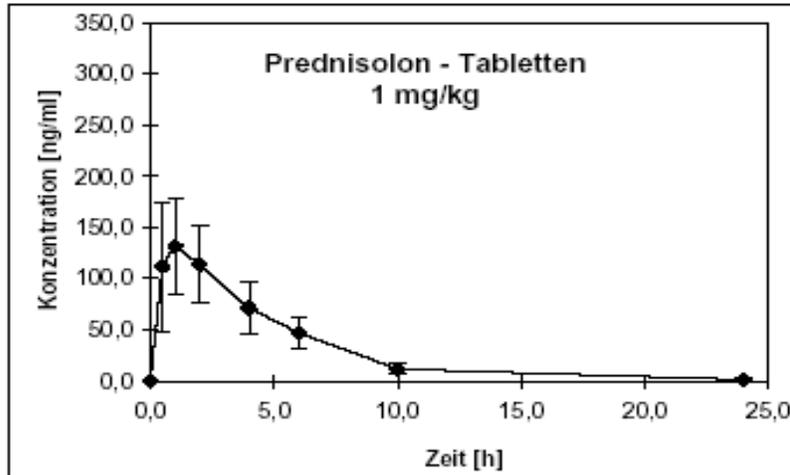
Wichtige Aspekte bezüglich der Festsetzung von Absetzfristen

- Dosierung
- Pharmakokinetik:
 - Elimination (Clearance, Halbwertszeit)
 - Verteilung (tiefe Kompartimente)
- Nachweisgrenze der Analytik

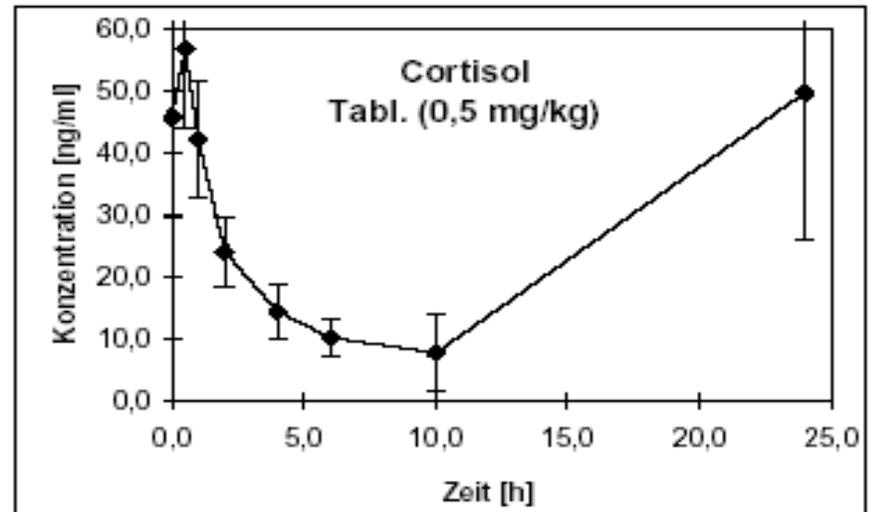
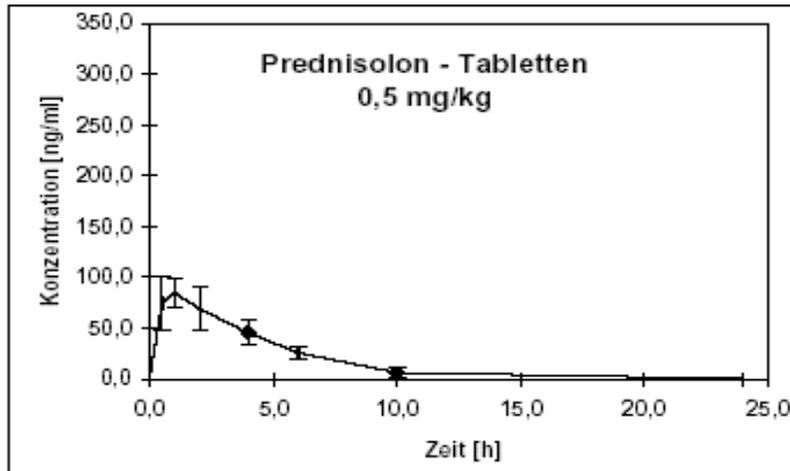
Prednisolonkonzentration und Cortisolsuppression nach oralen Behandlung beim Pferd



Prednisolonkonzentration und Cortisolsuppression nach oralen Behandlung beim Pferd



Prednisolonkonzentration und Cortisolsuppression nach oralen Behandlung beim Pferd



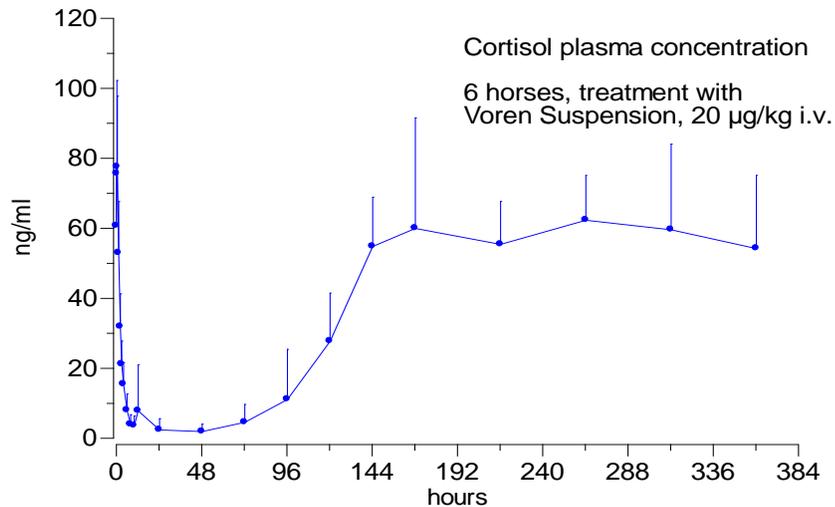
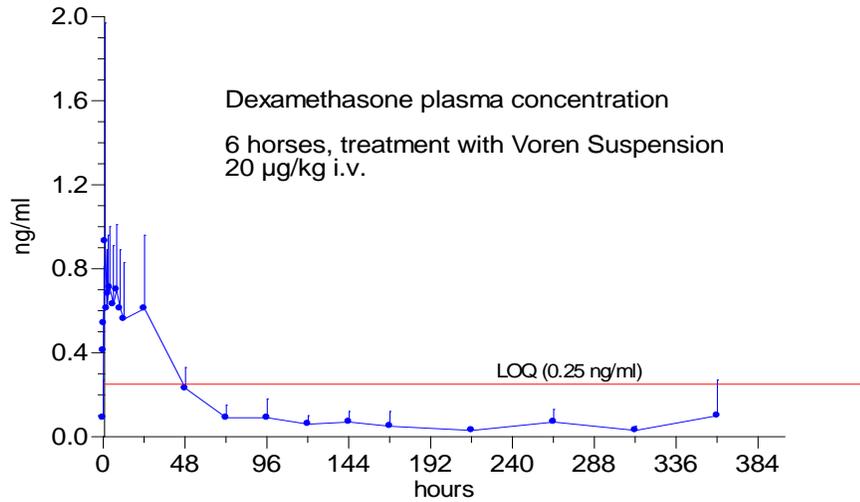
Wichtige Aspekte bezüglich der Festsetzung von Absetzfristen

- Dosierung
- Pharmakokinetik:
 - Elimination (Clearance, Halbwertszeit)
 - Verteilung (tiefe Kompartimente)
- Nachweisgrenze der Analytik

Dexamethasone plasma concentration and cortisol suppression

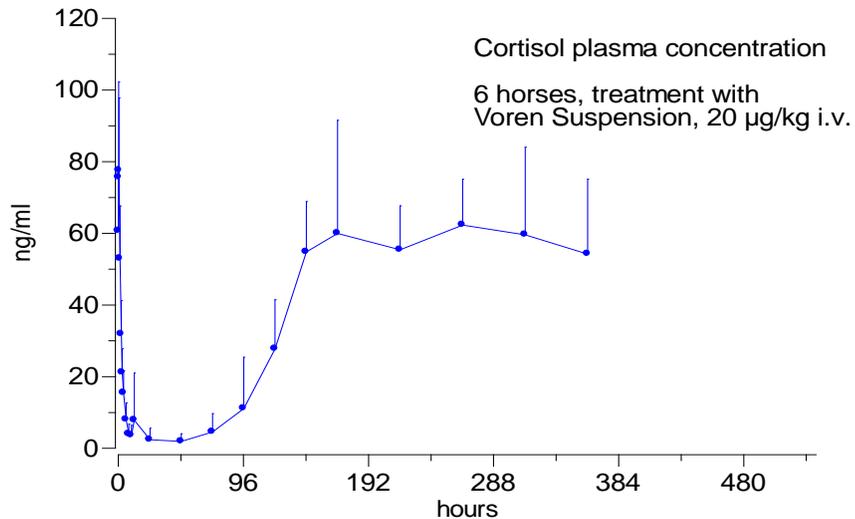
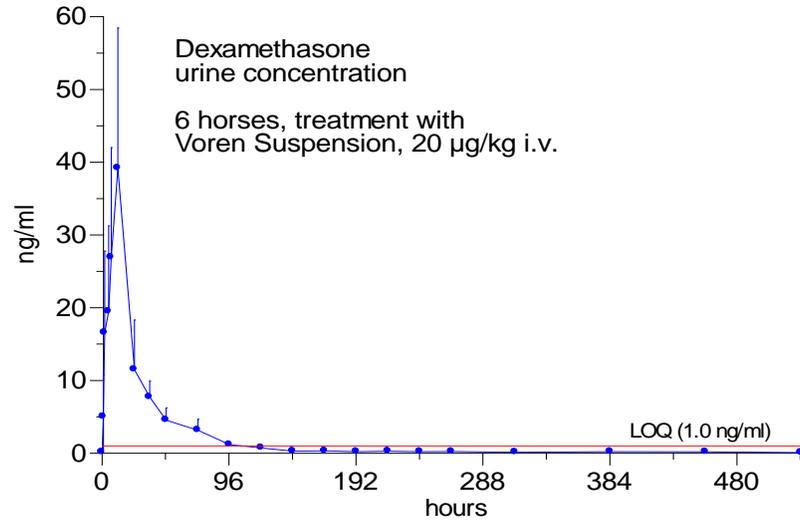
Treatment with Voren Suspension, 20 µg/kg, i.v.

(mean ± S.D., 6 horses)



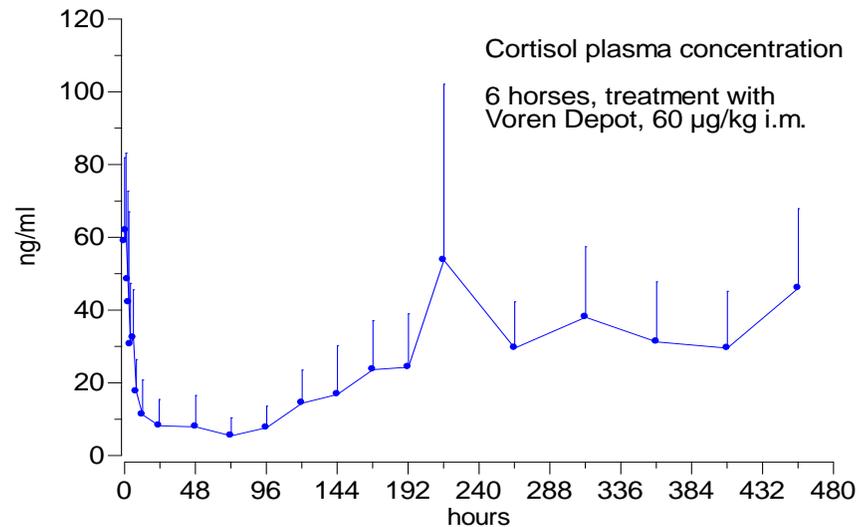
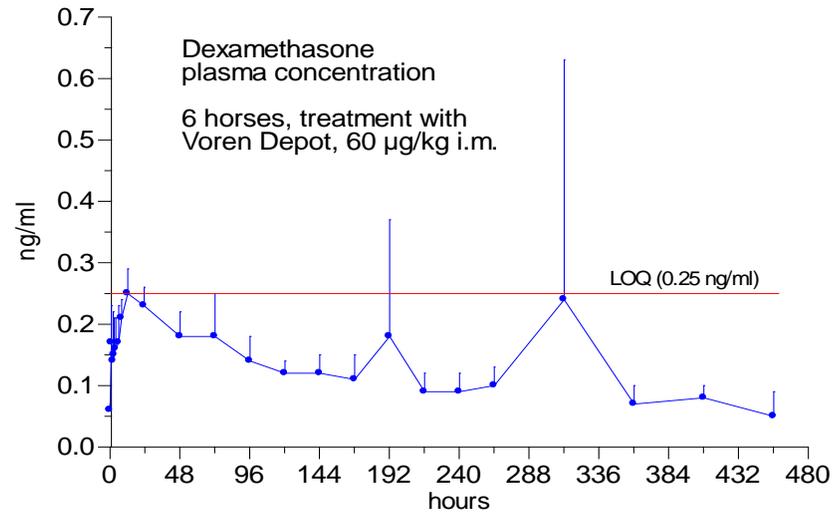
Dexamethasone urine concentration and cortisol suppression

Treatment with Voren Suspension, 20 µg/kg, i.v. (mean ± S.D., 6 horses)



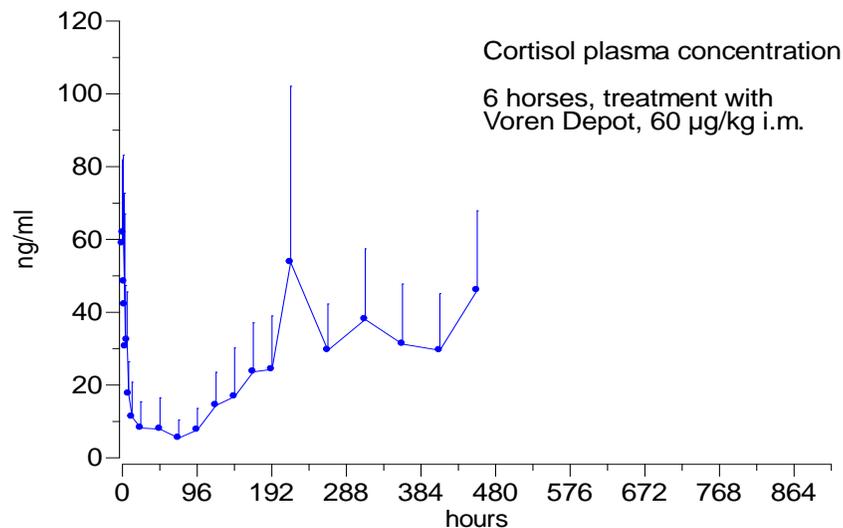
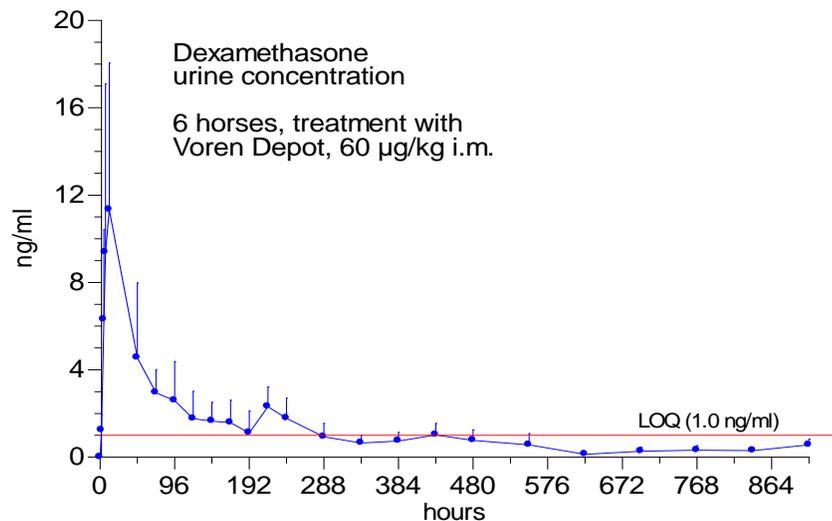
Dexamethasone plasma concentration and cortisol suppression

Treatment with
Voren Depot,
60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.
(mean \pm S.D.,
6 horses)



Dexamethasone urine concentration and cortisol suppression

Treatment with Voren Depot, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v. (mean \pm S.D., 6 horses)



Studie mit Betamethason-Formulierungen

Celestan[®] soluble (Betamethasondihydrogenphosphat)

→ intravenös

Celestovet[®] (Betamethasondihydrogenphosphat-Dinatrium,
Betamethasonacetat)

→ intramuskulär

Celestan[®] V (Betamethasonvalerat)

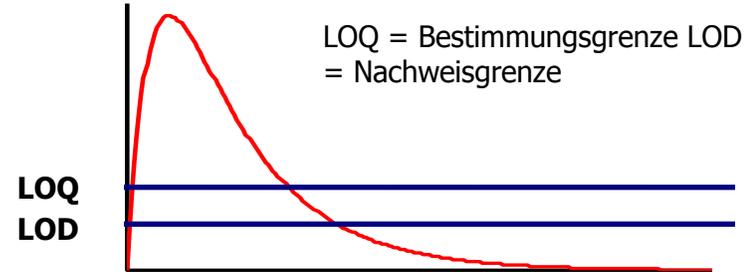
→ dermal

Betagentam[®] Augensalbe (Betamethasondihydrogenphosphat-
Dinatrium, Gentamycinsulfat)

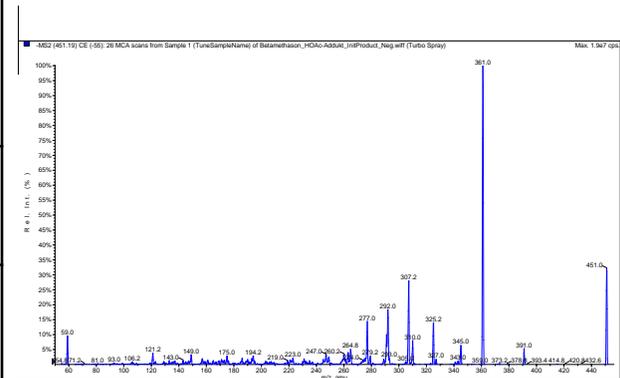
→ konjunktival

Nachweis- und Bestimmungsgrenze von Betamethason

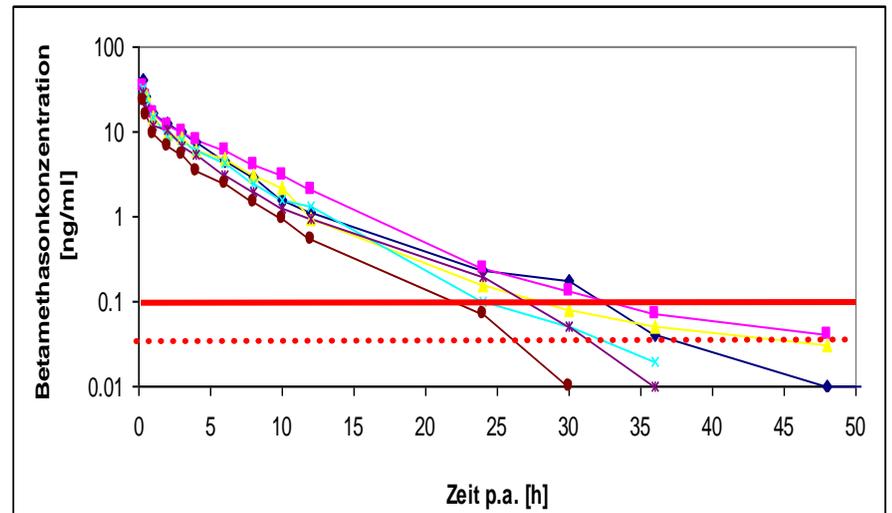
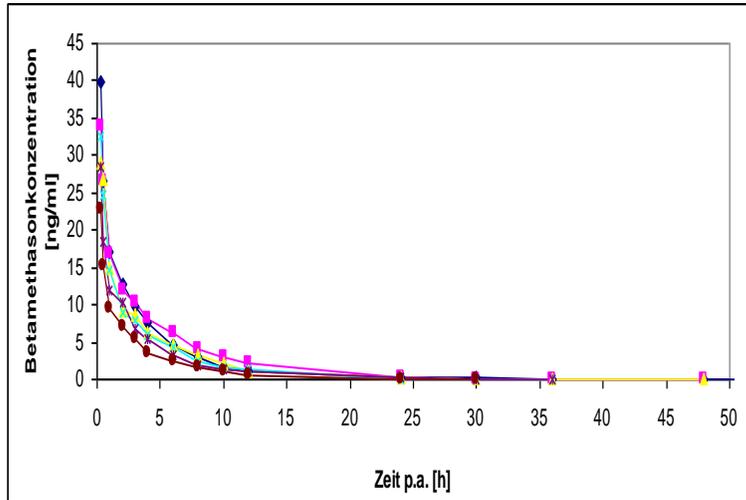
**Methodik:
HPLC-MS/MS, validiert**



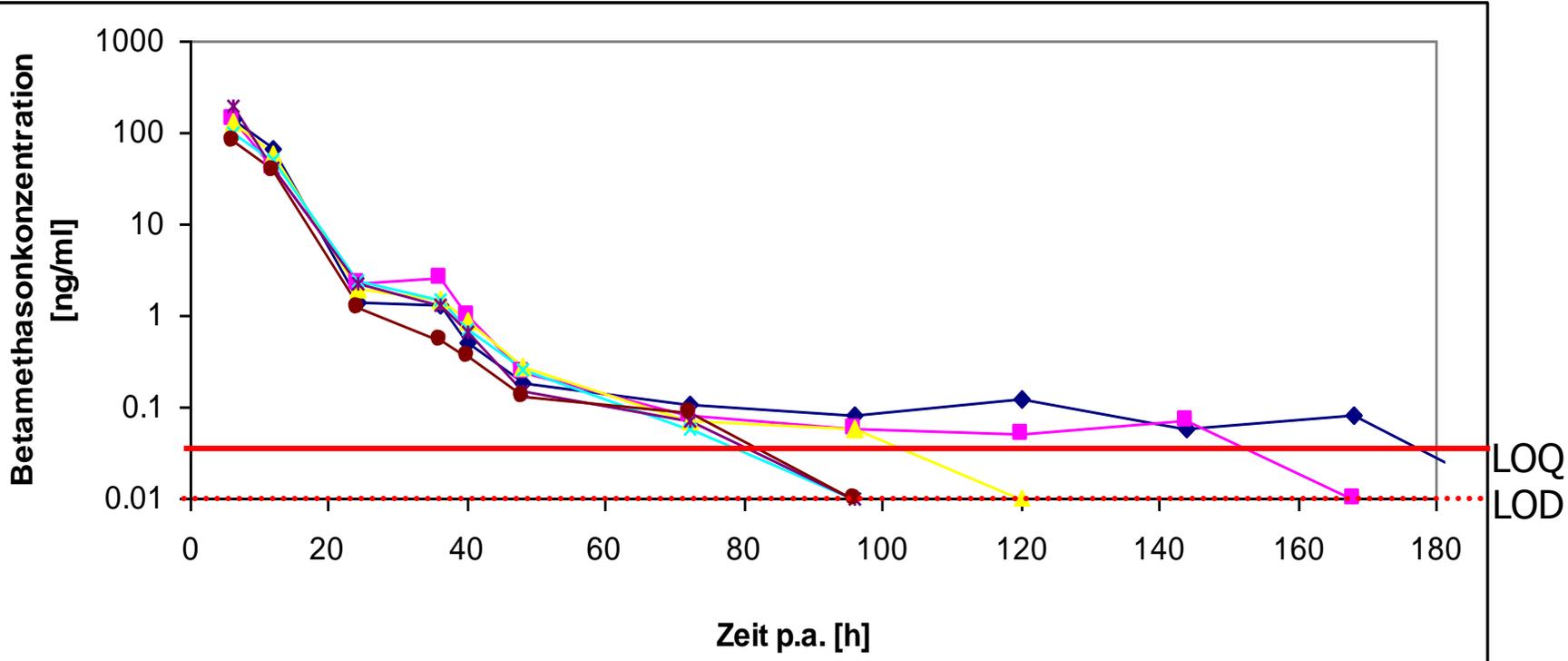
Matrix	Nachweisgrenze (ng/ml) (= LOD)	Bestimmungsgrenze (ng/ml) (= LOQ)
Plasma	0,02	0,1
Urin	0,01	0,05



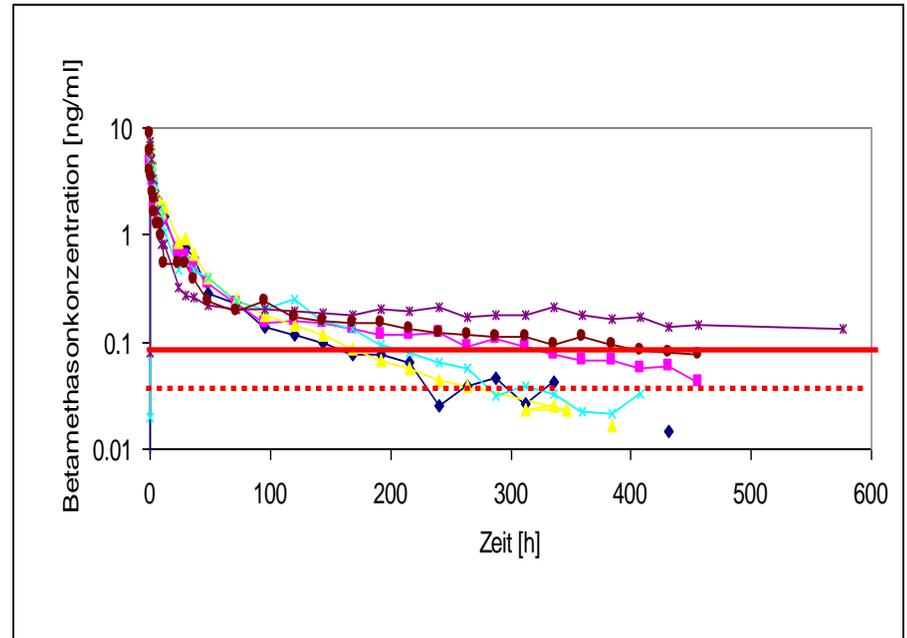
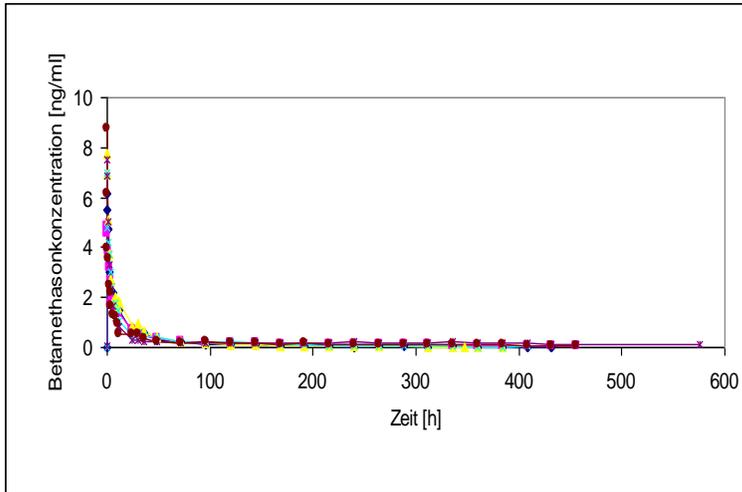
Plasmakonzentration von Betamethason bei sechs Pferden nach intravenöser Applikation von Betamethasondihydrogenphosphat (0,04 mg/kg)



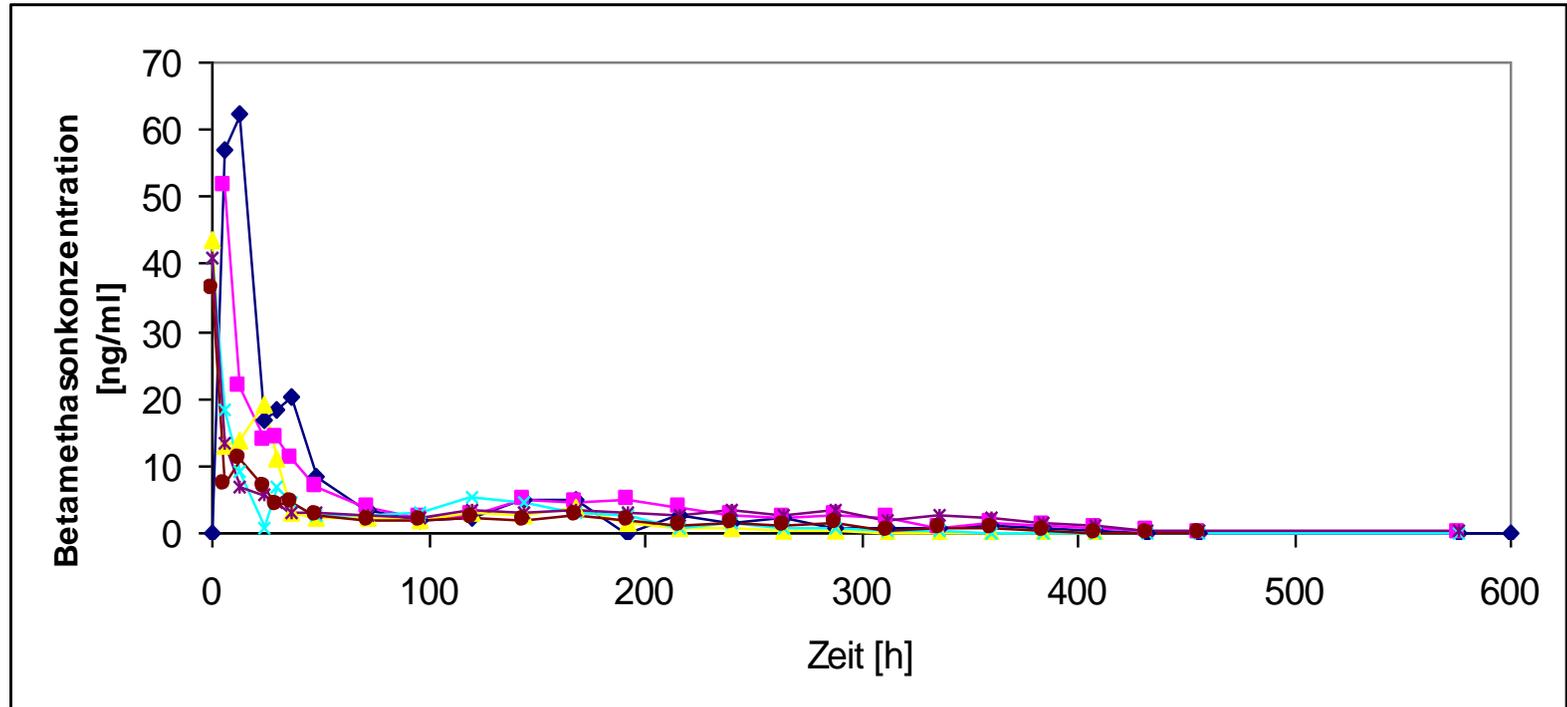
Urinkonzentration (logarithmisch) bei sechs Pferden nach intravenöser Applikation von Betamethasondihydrogenphosphat (0,04 mg/kg)



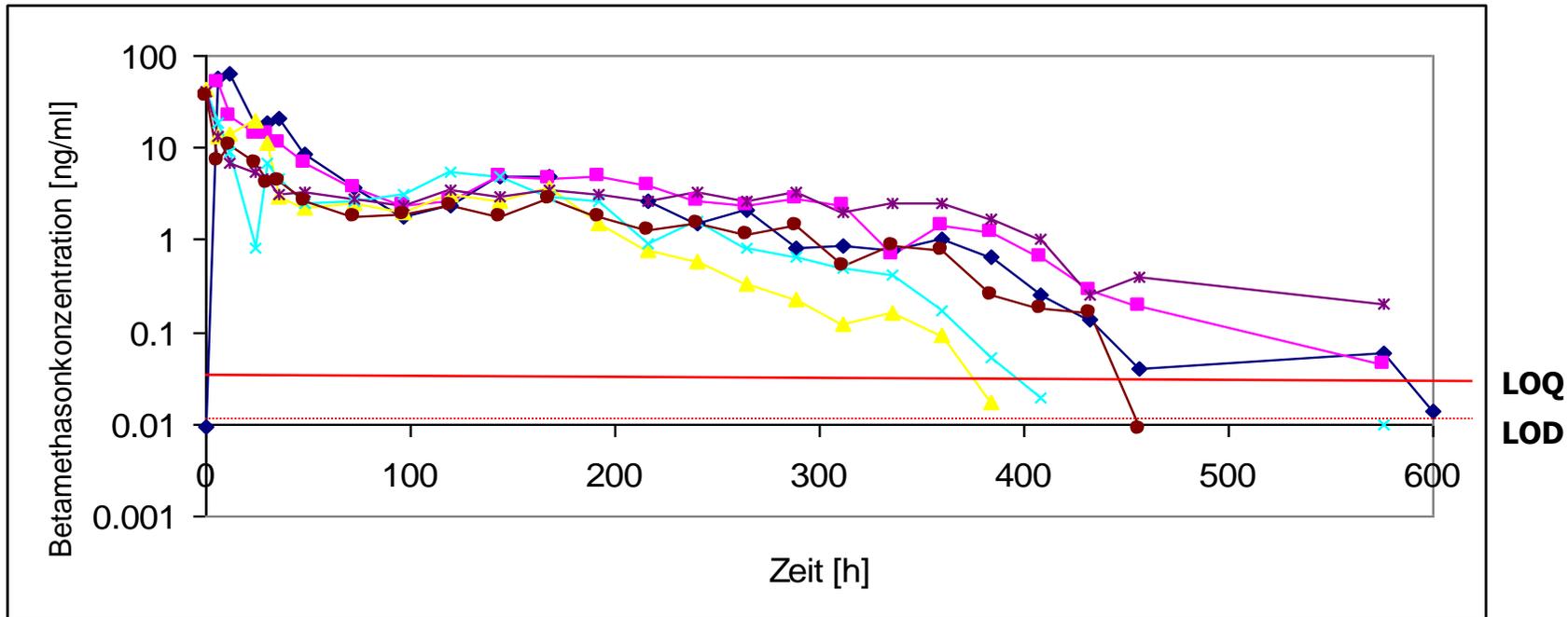
Plasmakonzentration von Betamethason bei sechs Pferden nach intramuskulärer Applikation eines Gemisches von Betamethasondihydrogenphosphat und Betamethasonacetat (0,04 mg/kg)



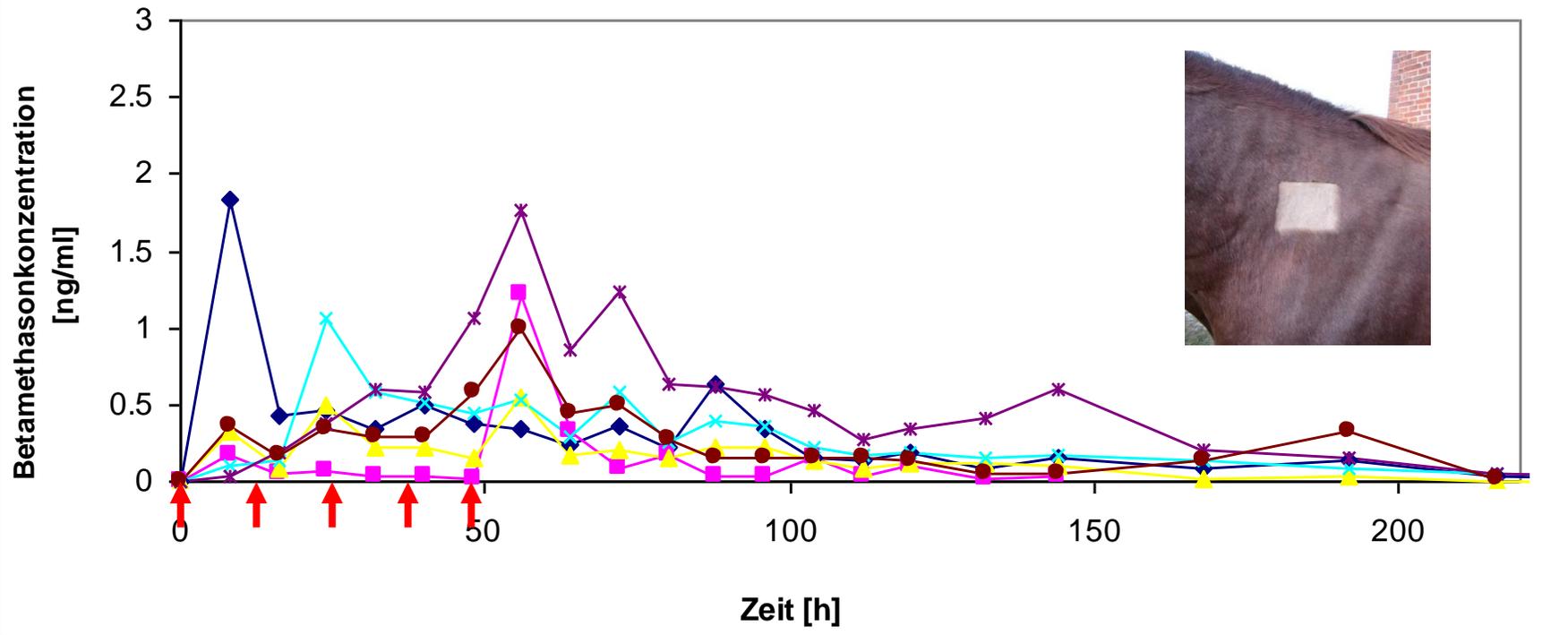
Urinkonzentration von Betamethason bei sechs Pferden nach intramuskulärer Applikation eines Gemisches von Betamethasondihydrogenphosphat und Betamethasonacetat (0,04 mg/kg)



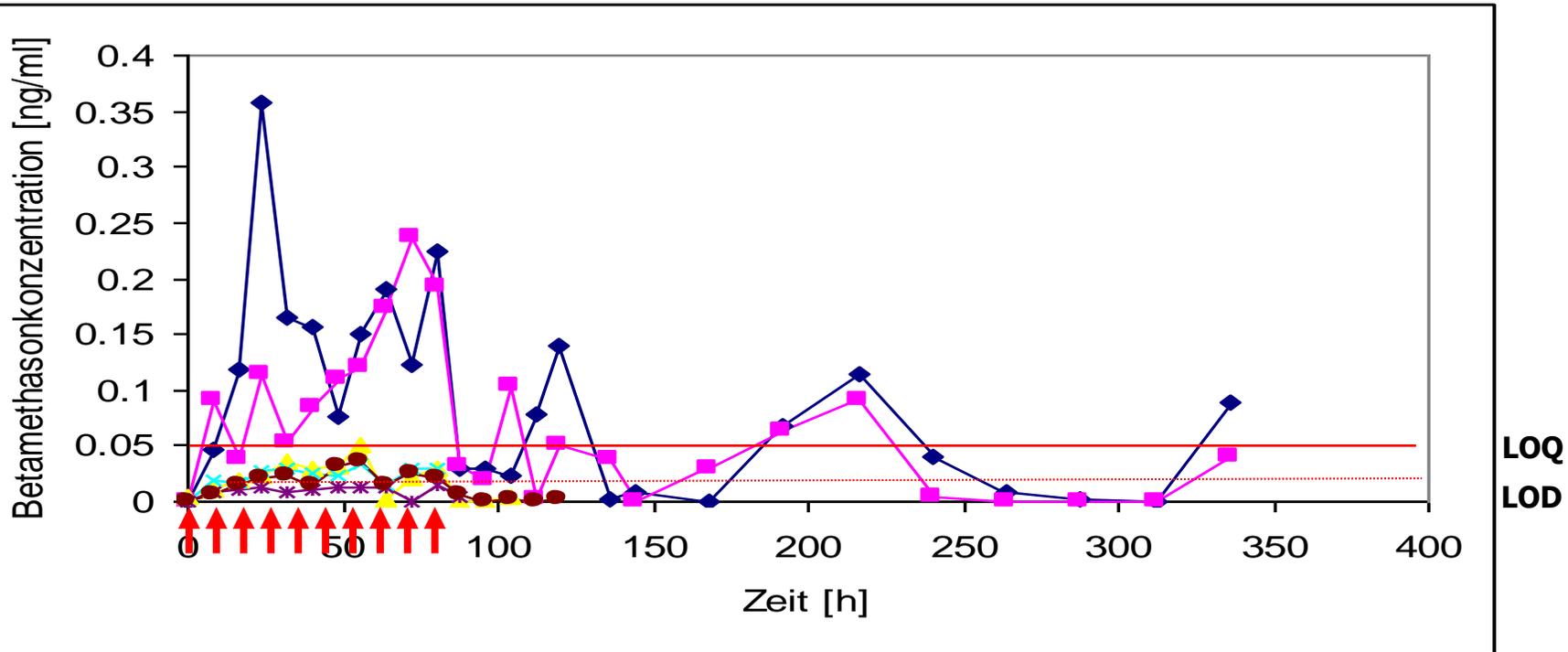
Urinkonzentration von Betamethason bei sechs Pferden nach intramuskulärer Applikation eines Gemisches von Betamethasondihydrogenphosphat und Betamethasonacetat (0,04 mg/kg)



Urinkonzentration (logarithmisch) bei sechs Pferden nach dermalen Applikation von 4,88 mg Betamethasonvalerat auf eine Fläche von 10 x 10 cm



Urinkonzentration von Betamethason bei sechs Pferden nach konjunktivaler Applikation von Betamethasondihydrogenphosphat (in Kombination mit Gentamicinsulfat)



↑ = Applikation von Betagentam AS®

Nachweiszeiten (Betamethason)

Grenze	Matrix	<i>intravenös</i>	<i>intramuskulär</i>	<i>dermal 10x10 cm</i>	<i>konjunktival</i>
		<i>Zeit in Stunden (Tagen)</i>			
<i>LOD</i>	<i>Plasma</i>	42 (2)	448 (19)	---	---
<i>LOD</i>	<i>Urin</i>	120 (3)	506 (21)	212 (9)	93 (4)
<i>LOQ</i>	<i>Plasma</i>	24 (1)	264 (11)	---	---
<i>LOQ</i>	<i>Urin</i>	120 (3)	480 (20)	136 (6)	50 (2)

FEI List of Detection Times

- Dexamethasone 10 mg i.v.
 - Detection time: **48 hours (2 days)**

- Triamcinolone acetonide 12 mg one joint i.a.
 - Detection time: **168 hours (7 days)**

„Einfrieren“ von Nachweisgrenzen (auf heutigem Stand)

- Parallelen zu Grenzwertkonzept
- kein Bezug zu pharmakologischer Wirkung
- nur für therapeutisch eingesetzte Substanzen

Ausnahmen für bestimmte Substanzgruppen

- Kann strenggenommen nur für Substanzen gelten, die prophylaktisch (bei gesunden Pferden) eingesetzt werden

„No medication periods“ vor dem Wettkampf

- Kontrolle?

„Controlled Medication“

- Vorteil:

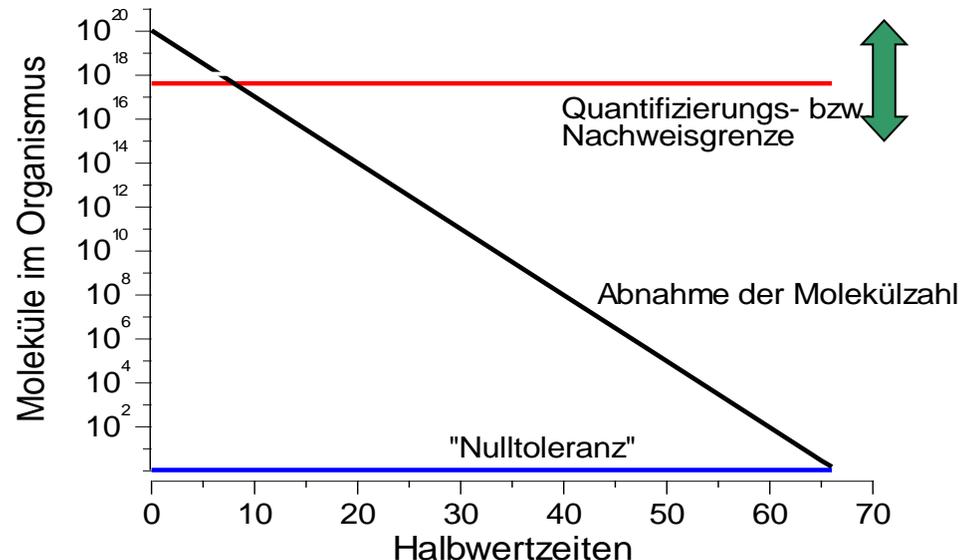
Flexibilität, Entscheidungsfreiheit vor Ort
entsprechend Einzelfall

- Nachteil:

Flexibilität, Entscheidungsgremium überfordert,
„Schiedsrichtersyndrom“

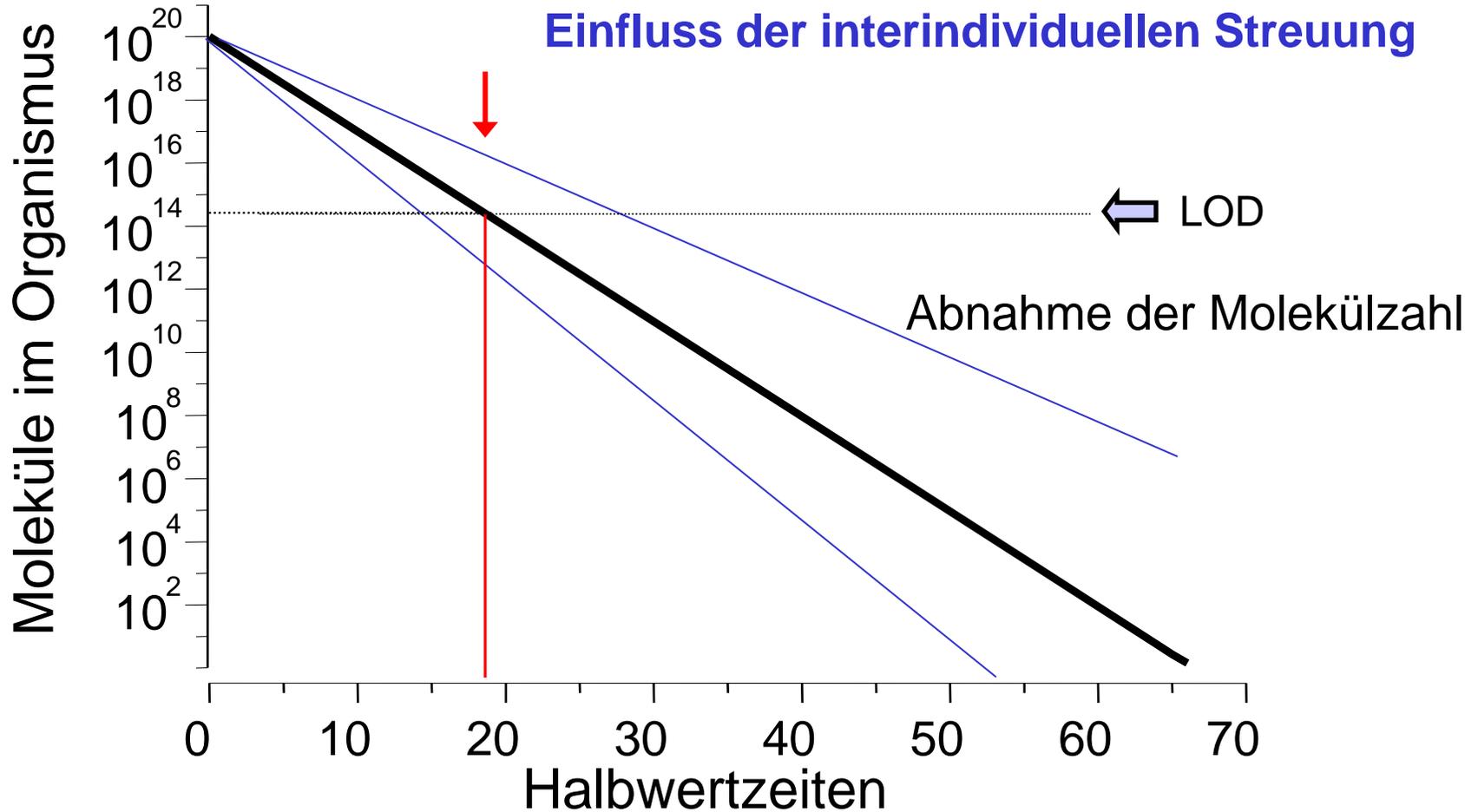
Modellüberlegung zur Festlegung von Karenzzeiten

- Umrechnung der Dosis (z.B. mg/Tier) auf Anzahl der Moleküle (*Moleküle/Tier*)
- bei Unterschreiten der Quantifizierungs- oder Nachweisgrenze noch signifikante Wirkstoffmengen im Organismus
- vollständige Ausscheidung des Wirkstoffs theoretisch (dosisabhängig) z.B. nach **>65 Halbwertzeiten** abgeschlossen

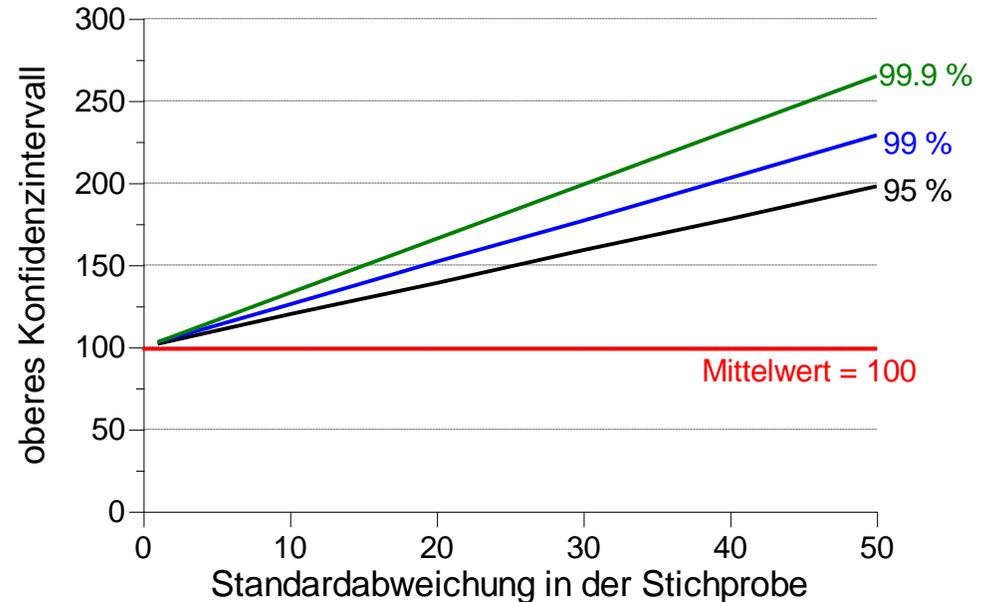


Variabilität der Ausscheidungszeit

Einfluss der interindividuellen Streuung



Abhängigkeit des Konfidenzintervalls von der Streuung der Messwerte in der Stichprobe



Beispiel

Liegen Mittelwert und Standardabweichung bei 100 ± 50 , so können die Einzelwerte erwartet werden im Bereich:

- 95 % zwischen 2 und 198
- 99 % zwischen 0 und 229
- 99.9 % zwischen 0 und 265

Ausblick

- Überlegungen zu Grenzwerten und Ausscheidungszeiten haben Kenntnisse der Pharmakodynamik und pharmakokinetischer Parameter als Basis.
- Da Untersuchungen nur an begrenzten Tierzahlen möglich sind, müssen interindividuelle Unterschiede berücksichtigt werden.
- Generelle und völlige Sicherheit bietende Aussagen zu Karenzzeiten sind daher nicht möglich.
- Voraussetzung für Berechnung von Absetzfristen sind einheitliche analytische Grenzwerte.
- Konfidenzintervall-Berechnungen bieten eine zusätzliche Sicherheit bei der Abschätzung von Karenzzeiten.
- Die sog. „Nulllösung“ muss für Stoffe gelten, für die nach Toutain und Lassourd (2002) berechnete ineffektive Urinkonzentration (IUC) unter der Nachweisgrenze liegt.