

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Studie befaßte sich mit der Aufklärung der Verstoffwechslung von Dehydroepiandrosteron (DHA), Methandriol (MAD) und 17 α -Methyltestosteron (17 α -MT) beim Pferd. Ein weiteres Ziel war darüber hinaus, für die beiden letzteren, oral-wirksamen Steroide mit anaboler Wirkung eine routinemäßig anwendbare Screening-Methode im Rahmen der Dopinganalytik zu entwickeln.

Dazu wurden jeweils zwei im Training befindlichen Vollblutrennpferden gleiche Mengen (200 mg) eines Substanzgemisches der zu untersuchenden Steroidderivate verabreicht. Für DHA und MAD bestanden diese Gemische zu gleichen Teilen aus deuterierten und nicht-deuterierten Molekülen, sowie einem radioaktiv-markierten Isotop (^3H -DHA, ^{14}C -DHA, ^3H -MAD). 17 α -MT wurde lediglich als deuteriertes / nicht-deuteriertes Substanzgemisch verabreicht. Während drei bis fünf Tagen nach der Applikation wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen, sowie der frei abgesetzte Urin gewonnen. Durch Ermittlung der emittierten β -Strahlung in den gesammelten Proben, wurden Resorptions- und Eliminationsverhalten der untersuchten Steroide bestimmt. Zur labortechnischen Extraktion und anschließenden gaschromatographischen / massenspektrometrischen (gc/ms)-analytischen Untersuchung gelangten im Rahmen dieser Arbeit dann lediglich die gesammelten Urinproben.

Die Halbwertszeit in der Eliminationsphase betrug für intramuskulär verabreichtes ^3H -DHA zwischen 9 bis 12 Stunden. Die Halbwertszeit des oral verabreichten ^{14}C -DHA lag bei beiden Pferden bei etwa 3 Stunden. Sie war damit 3 – 4 mal geringer als bei intramuskulär verabreichtem DHA. Dies dürfte hauptsächlich durch einen ausgeprägten hepatischen „first-pass effect“ bei oraler Applikation von ^{14}C -DHA zu erklären sein. Die Halbwertszeit des oral verabreichten Methandriol betrug bei einem Pferd 11,99 h und entsprach damit etwa der, von intramuskulär appliziertem ^3H -DHA, d.h. die 17 α -Alkylierung stellt vermutlich einen wirksamen Schutz gegen den „first-pass effect“ der Leber dar. Bei dem zweiten Pferd betrug die Halbwertszeit von oral verabreichtem ^3H -MAD mit 3,75 h jedoch nur etwa ein Drittel dieses Wertes und war damit eher der Halbwertszeit von oral verabreichtem ^{14}C -DHA vergleichbar, welches einem first-pass effect unterlag. Eine Erklärung für diesen großen Unterschied in den Halbwertszeiten konnte nicht gegeben werden.

Die mit dem Urin insgesamt ausgeschiedene Menge an intramuskulär appliziertem ^3H -DHA betrug etwa 60% der verabreichten Gesamtdosis. Bei oral verabreichtem ^{14}C -DHA und ^3H -MAD lag dieser Wert bei etwa 50%. Der Verlauf der Urinausscheidung von ^3H -MAD-Äquivalenten glich jedoch bei beiden Pferden eher dem, von intramuskulär verabreichtem ^3H -DHA. Bei beiden Steroiden war der Zeitpunkt, zu dem $\geq 95\%$ der über den Urin

ausgeschiedenen Dosis angefallen waren, erst nach etwa 50 Stunden erreicht, während dies für oral verabreichtes ^{14}C -DHA bereits nach 30 – 35 Stunden der Fall war.

Bei der Aufarbeitung des mit radioaktivem DHA und MAD markierten Urins kam es zu großen Verlusten an Radioaktivität und damit an Analysesubstanz. Diese konnten, trotz mehrfacher Änderung der angewendeten Extraktionsmethode, nicht wesentlich reduziert werden: Ein Großteil der verlorenen Radioaktivität fand sich (1) im Anschluß an die Extraktion noch im Urin, ein weiterer Teil (2) in verschiedenen Lösungen, welche zum Waschen der Analyseextrakte verwendet worden waren. Die Ursache dieses Phänomens konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Es wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, daß (1) zumindest teilweise durch die ungenügende Kapazität, der zur Extraktion verwendeten Kartuschen verursacht wurden, während (2) auf das Vorkommen eines / mehrerer stark hydrophiler Metaboliten zurückzuführen sei, welche durch die verwendeten hydrophilen Lösungen aus dem lipophilen Extrakten ausgewaschen wurden.

Generell läßt sich feststellen, daß DHA nur zu einem sehr geringen Anteil unkonjugiert über den Harnweg ausgeschieden wurde (< 2%). Der weitaus größte Anteil wurde als Konjugat ausgeschieden. Es erfolgte eine Konjugation zum geringeren Teil mit Glucuronsäure (10-15%) und zum weitaus größeren Teil mit Schwefelsäure (60%). Auch MAD wurde nur zu einem geringen Prozentsatz in unkonjugierter Form ausgeschieden (< 4%). Ein Anteil von 10-15% der Metaboliten wurde als Glucuronsäure-Konjugat ausgeschieden. Der weitaus größte Teil der bestimmbar Metaboliten wurde auch in diesem Falle als Schwefelsäure-Konjugat ausgeschieden (50%).

Die gc/ms-Analyse der DHA- und MAD-Extrakte zeigte aufgrund dieser Verluste nur eine geringe Konzentration der einzelnen, auffindbaren Metaboliten.

Für DHA konnten folgende drei Metaboliten einwandfrei bestimmt werden:

1. 3β -Hydroxyandrost-5-en-17-on
2. 5-Androsten-3,17-diol
3. 5-Androstan-3,17-diol

Für MAD konnten folgende fünf Metaboliten einwandfrei bestimmt werden:

1. 17α -Methyl-5-androsten- 3β , 17β -diol
2. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan- 3β -ol
3. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3,(15/16)-diol
4. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3,(6/7),16-triol
5. 17-Hydroxy- 17α -methyl-androst-4-en-(6/7),16-diol-3-on

Da im Falle des 17α -MT keine radioaktiven Isotope verabreicht worden waren, unterblieb eine Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter bei diesem Steroid. Bei der gc/ms-

Analyse der Urin-Extrakte nach oraler Gabe von 17α -MT konnten zahlreiche Metaboliten gefunden werden, welche z.T. in sehr hoher Konzentration in den Analyseflüssigkeiten vorkamen. Es wurde deshalb angenommen, daß 17α -MT die für DHA und MAD beschriebenen Verluste nicht oder nur in sehr viel geringerem Ausmaß aufwies.

Für 17α -MT konnten folgende 12 Metaboliten einwandfrei bestimmt werden:

1. 17α -Methyl- 17β -hydroxy-4-androsten-3-on
2. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3-ol
3. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-(6/7)-ol-3-on
4. 17-Hydroxy- 17α -methylandrost-4-en-(6/7)-ol-3-on
5. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3,(6/7 bzw. 15/16)-diol
6. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androst-3,(6/7)-diol
7. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3,16-diol
8. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3,(6/7),(15/16)-triol
9. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-3,(6/7),16-triol
10. 17-Hydroxy- 17α -methyl-androst-4-en-3,(6/7),(15/16)-triol
11. 17-Hydroxy- 17α -methyl-androst-4-en-(6/7),16-diol-3-on
12. 17-Hydroxy- 17α -methyl-5-androstan-(6/7),(15/16)-diol-3-on

Voraussetzung für die Etablierung einer routinemäßigen Nachweismethode für MAD ist die Optimierung des Extraktionsverfahrens, welches unter den gegebenen Bedingungen nicht für ein Screening-Verfahren geeignet ist. Für 17α -MT dagegen erwiesen sich die Metaboliten 2, 6, 7 und 9 als geeignet, bei der gc/ms-Screening-Analyse eine mißbräuchliche Anwendung dieses Stoffes beim Pferd nachzuweisen. Mit Hilfe des 'Single Ion Monitoring (SIM)' sollte auf die für 17α -methylierte Steroide charakteristischen Ionen m/z 143, m/z 218 und m/z 231 untersucht werden. Diese Methode ermöglicht den Nachweis einer 17α -MT-Anwendung (zu Dopingzwecken) bis zu einem Zeitraum von mindestens 50 h nach der Applikation. Da im Rahmen dieser Studie über diesen Zeitraum hinaus keine Urinproben mehr gewonnen worden waren, sind weitergehende Untersuchungen nötig, um zu bestimmen, bis zu welchem Zeitpunkt nach der Applikation ein Nachweis der mißbräuchlichen Anwendung von 17α -MT mittels der hier beschriebenen Methode längstens möglich ist.