

# ATLARDA DOPİNG GRUBU MADDELERİN DETEKSIYON LİMİTLERİNİN ELISA İLE TESBİTİ\*

Tevhide Sel\*\*

Hilal Karagül\*\*\*

Taşkın Özdemir\*\*\*

Nil Borazancı\*\*\*\*\*

Ulvi Reha Fidancı\*\*\*\*\*

## Determination of doping agents in racing horses by the ELISA

**Summary:** Serum samples from postrace and non-racing horses were collected and the analyses of 11 doping agents (Phenylbutazone, Furosemide, Rezerpine, Morphine, Procaine, Etorphine, Butorphanol, Clenbuterol, Pentazocine, Dexamethasone, Fentanyl) were carried out using ELISA and the detection limits of these substances were determined. A total of 26 post-race serum samples of racing horses collected from various races in the 1993 season were analysed for the presence of doping agent. The rate of doping detection was between 4% and 27%. Samples were also analysed in Germany by Gas Chromatography Mass Spectrometry.

**Özet:** Yarış sonrası ve yarış dışı atların serum numuneleri toplanarak, 11 doping maddesinin (Phenylbutazone, Furosemide, Rezerpine, Morphine, Procaine, Etorphine, Butorphanol, Clenbuterol, Pentazocine, Dexamethasone, Fentanyl) ELISA ile analizleri yapılmış ve deteksiyon limitleri tayin edilmiştir. 1993 yarış döneminde çeşitli yarışlarda 26 yarış atından yarış sonrası serum örneği toplanarak doping maddelerinin analizleri yapılmıştır. Pozitiflik yüzdesi %4-27 arasında saptanmıştır. Numuneler Almanya'da da Gas Kromatografi Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiştir.

## Giriş

Organizmanın gücünü yapay olarak ve kural dışı bir şekilde artırmak amacı ile kullanılan uyarıcı maddeler doping olarak tanımlanmaktadır (12, 14, 19). Uluslararası Binicilik Federasyonu (FEI), yarışlarda yer alacak atların sağlıklı olmalarını ve kendi kalıtsal güçleri ile yarışmaları gerektiğini bildirmektedir (1). Zararlı yan etkileri yanında yarış koşullarına aykırı olduğu için doping yapılmasını önlemek ve her geçen gün sayıları çoğalan, performans artırıcı yapay yollara başvurmayı engellemek için bugün dünyada bu maddelerin uygulanması ile ilgili kurallar mevcuttur; Bazı ilaçlar için belli tolerans sınırları konulmuştur (5, 17, 21). Örneğin; Salisilik asit idrarda 750 µg/ml, plazmada 6.5 µg/ml maksimum konsantrasyonu geçmemelidir (1). Zaman kuralına göre ise belli ilaçlar yarıştan önce kullanılmazlar; Örneğin Prokain yarıştan önce 7 gün verilmemelidir. Ancak

bu kuralın uygulanıp uygulanmadığını denetlemek çok zordur (5, 17, 19, 21). Bazı maddelerin deteksiyonu çok pahalı veya zor olacağından dikkate alınmamaktadır (5, 12, 19). İngiltere, Kanada ve Avustralya da hiçbir vücut sıvısında herhangi bir ilaç kalıntısı bulunmayacak kuralı uygulanmaktadır; Bu ülkelerde belli ilaçlar için vücuttan uzaklaşma süreleri bellidir (5, 17, 21).

Ülkemizde at yarışları için bir doping yönetmeliği bulunmakta ise de (3) bilimsel gelişmelere ve hızla gelişen ilaç endüstrisine yönetmeliği, ya da ilaçları yönetmeliğe uydurmak pek mümkün olamamaktadır. Özellikle Batı standartları içerisinde bundan söz etmek mümkün değildir. Ülkemizde yasal düzenlemelerle yürütülen at yarışlarında doping kontrolü, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı ilgili kuruluşlarca yapılmakta, Binicilik Federasyonunca yapılanlarda böyle bir kontrol sözkonusu olmamaktadır.

\* Çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 92.10.00.09.

\*\* Yrd. Doç. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya ABD, Ankara.

\*\*\* Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya ABD, Ankara.

\*\*\*\* Dr. Türkiye Binicilik Federasyonu, Ankara.

\*\*\*\*\* Araş. Gör. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya ABD, Ankara.

\*\*\*\*\* Doç. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya ABD, Ankara.

Belçika'da 1966-1982 yılları arasında yapılan doping analizlerinde; 1966-1972 periyodunda daha çok klasik stimulan ilaçlara (anfeta-min, kafein gibi) rastlanmıştır; 1973-1982 periyodunda ise amfetamin kullanımı azalırken kafeinin halen kullanıldığı bunun yanında arsenik kullanımının arttığı bildirilmektedir (8). Şili'de 1973-1977 yılları arasında yarış sonrası ve özellikle kazanan atlardan alınan 9733 numunenin analizinde 15 pozitif sonuç alınmıştır; En sık rastlanan ilaç amfetamin olmuştur. (Aynı dönemde mücade edilen ilaç yönünden 227 pozitif bulunmuştur); 1978-1984 yıllarında ise 11742 numune de 27 pozitif bulunmuştur (4). Avustralya, Melbourne'de 1963-1985 yılları arasında yapılan yarışlarda yarış sonrası ve daha çok kazanan atlardan alınan 12.076 numunenin doping analizlerinde % 0.06 pozitif bulunmuştur. Pozitif numunelerin %50'sini nonsteroid-antiinflamatuvarlar, %12 ksantinler, %12 kortikosteroidler oluşturmaktadır (6). Kuzey Amerika'da çeşitli eyaletlerde 1975-1983 yılları arasında yarış öncesi veya sonrası kan ve idrar numunelerinde yapılan doping analizlerinde en düşük pozitiflik New Jersey'de (0,2/1000 numunede) en yüksek Güney Dakota'da (6,5/1000 numunede) bulunmuştur; Verilen değerler stimulanlar, depresanlar, narkotikler, trankilizanlar ve lokal anestezipler içindir (18, 21). Bu maddelerin 1977-1981 yıllarında İngiltere'deki analizlerine göre her 1000 numune için 4.6 pozitif bulunmuştur; Yunanistan'da aynı dönem için her 1000 numunede 0,7 pozitif bulunmuştur; 1978-1980 yıllarında İran'da ise her 1000 numunenin 122.3'de pozitif bulunurken; Trinidad-Tobaco'da her 1000 numunede 17.9 pozitif bulunmuştur; İran'daki yüksek düzeyde doping maddelerinin kullanımı, doping maddelerinin kontrollerinin yetersizliğine bağlanmaktadır; İstatistik bilgilere göre atların %12'sinde illegal ilaç uygulaması yapıldığını göstermektedir. Trinidad-Tobaco'daki %19 civarındaki doping pozitiflik etkili kontroller sonucu 3-5 ay içinde %0'a inmiştir (18, 21).

Türkiye'de ise yarış atlarında yapılan doping analiz sonuçları ile ilgili literatürlerde verildiği şekilde bilgiler yoktur. Çünkü ilgili bakanlığın yapılan başvurularında "Yüksek Komiserler Kurulu kararı ile 6132 sayılı At yarışları kanunu ve ilgili maddelerince her ne şekilde olursa olsun gizlilik gerektiren doping yönünden yarış atlarından alınan numunelerin araştırma amacı ile de olsa başka bir kuruma verilemeyeceği bildirilmiştir (2).

Hassas yöntemlere dayalı kurallar ve yasakların konulmasıyla her biri servet olan elit at varlığımızın sağlığının korunması ve yarışların eşit şartlarda yapılabilmesi sağlanabilir. Bu ça-

lışma ile ülkemiz konkurhipik yarış atlarında doping maddelerinin deteksiyon limitlerinin tesbiti, diğer ülkelerde olduğu gibi yasak olan doping maddelerinin kullanılıp kullanılmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metod

Binicilik Fedarasyonu'nun 1993 yarış programı çerçevesinde yapılan yarışmalarda konkurhipik yarış atlarından yarış sonrası 26 serum örneği toplandı. Bunlarda 11 doping maddesinin (Fenilbutazon, Furasemid, Rezerpin, Morfin, Procain, Etorphin, Butarfenol, Clenbuterol, Pentazosin, Dexametazon, Fentanil) analizleri yapıldı. Ayrıca yarış dışı 20 konkurhipik yarış atından da serum örnekleri toplanarak belirtilen doping maddeleri için analizleri yapılarak deteksiyon limitleri tesbit edildi.

Doping maddelerinin analizleri hazır kitler (ELISA Technologies Lexington KY) kullanılarak Enzimimmunoassay ile yapılmıştır. Aynı örnekler Almanya'ya da gaz kromatografi kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz için gönderilmiştir (9).

## Bulgular

Doping maddeleri için ELISA ile pozitif serum örneklerinin deteksiyon limitleri Tablo 1'de verilmiştir. Sonuçlar 0-0.75 µg/ml arasında değişmektedir.

Yarış sonrası atlarda serum doping maddelerinin ELISA ile değerlendirilmesi Tablo 2'de verilmiştir. Pozitiflik yüzdesi %4 ile %27 arasında saptanmıştır. Onbir doping maddesinin 9 tanesi ELISA ile pozitif bulunmuştur. Teyid amacı ile Almanya ya gönderilen örneklerden sonucu alınanlardan Fenilbutazon pozitif (+) bulunmuştur.

Tablo 1. Çeşitli doping maddeleri için ELISA ile pozitif serum örneklerinin deteksiyon limitleri (n: 20).

Table 1. Detection limits of various doping agents of positive serum samples by ELISA (n: 20).

Doping Maddesi	Konsantrasyon (ng/ml)
Fenilbutazon	0
Furasemid	0
Rezerpin	0-0.5
Morfin	0
Procain	0
Etorphin	0 - 0.75
Butarfenol	0
Clenbuterol	0 - 0.6
Pentazosin	0 - 0.75
Dexametazon	0
Fentanil	0

Tablo 2. Yarış sonrası atların serum numunelerinde çeşitli doping maddeleri.

Table 2. Doping agents in serum samples of post-race horses.

Doping Maddesi	Numune Sayısı	Pozitif Numune Sayısı	% Pozitif
Fenilbutazon	26	3	11.5
Furasemid	26	2	7.7
Rezerpin	26	1	3.8
Morfin	26	2	7.7
Procain	26	0	0
Etorfin	26	7	27
Butarfenol	26	5	19
Clenbuterol	26	3	11.5
Pentazosin	26	7	27
Dexametazon	26	0	0
Fentanil	26	4	15

### Tartışma ve Sonuç

Atlarda, fiziksel güç ve performansı etkileyen çeşitli maddeler kullanılmaktadır (19). Bunlardan, opiat narkotikler (morfin, fentanil, pentazosin gibi) lokomotor aktiviteyi 10-15 kat artırıcı etkilidirler; Narkotik analjezikler insanlarda ve hayvanlarda sedasyon etkili olmakla beraber yarış atlarında uygun doz ve yolla uygulandıklarında performanslarını artırıcı etki gösterirler (15, 19, 22, 23). Bu çalışmada narkotik analjeziklerden Butarfenol, Fentanil, Morfin, Pentazosin ve Etorfin'in analizleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

Anabolik etkili  $\beta$ -Agonist Clenbuterol vücut yağlarında azalma ve kas kitlesinde artışa neden olmaktadır, bunun yanında solunumu uyarıcı etkisi de vardır; Hem insanlarda hem de hayvanlarda doping olarak kullanılmaktadır (19). Lokal anesteziğin kullanılmaları sonucu ayak eklemlerinde zedelenmeler olabilmekte ve atın düşme riski artmaktadır; Bunun sonucunda hem atın hem de jokeyin ciddi yaralanmaları, hatta ölümleri görülebilmektedir; Procain, lidocain gibi lokal anesteziğin paradoksal etkileri sonucu sinirlerin fonksiyonunda blokaj meydana getirirken, aynı zamanda beyni stimule etmektedir; Bu etkileri pek açık olmamakla beraber beynin inhibitör mekanizmasını inhibe ettiği sanılmaktadır (19). Fenilbutazon (non-steroid antiinflamatuvar), yarışa katılamayacak durumdaki ata verildiğinde, at üstün performans göstererek yarışını kazanmaktadır; Dolayısıyla yarışın eşitliğini ve güvenilirliğini bozmaktadır (19). Fenilbutozan kullanımı çok farklılıklar göstermektedir; Bazı ülkelerde ve yarışlarda kullanımı kesinlikle yasakken bazılarında 24 saat kuralı geçerlidir; Bazılarında ise fenilbutazon için bir üst limit belirtilmektedir (5, 17, 21). Fenilbutazonun yarış atlarında kul-

lanıldığında yasak olan diğer maddelerle etkileşebileceği veya onları maskeleyebileceği bildirilmektedir (11). Bununla beraber fenilbutazonun diğer ilaçları maskeleymesinin önemli olmadığını vurgulayanlar da vardır (11, 19). ELISA ile analizler sonucunda fenilbutazon pozitif numuneler saptanmıştır (Tablo 2). Sonuçlar GC-MS ile de teyit edilmiştir (9). Kortikosteroidler (Deksamethazon) uzun zaman kullanıldıklarında eklem bozuklukları (kuru eklem) şekillenmektedir (19). Kanada ve Japonya gibi bazı ülkelerde kullanımı yasak maddelerden değildir (20). Yapılan analizlerde Dexametazon pozitif numuneye rastlanmamıştır. Uzun etkili trankilizan olan Rezerpin, hayvanlarda medikal amaçlı kullanımları yanında atlarda santral sinir sistemi stimulanıdır (16, 19). Diüretikler (furasemid gibi) ile uygulanan doping maddelerinin idrar konsantrasyonları kolaylıkla dilue edilebilmektedir (19). Furasemid, kullanılan doping maddelerinin idrar konsantrasyonunu %50 oranında dilue edebilmektedir (7).

**Sonuç olarak:** Doping analizleri sırasında dikkat edilecek en önemli nokta, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle analiz laboratuvarları yeterli araç-gereç ve bilgi birikimine sahip olmalıdır. Bu konuda standart geliştirmek ve homojeniteyi sağlamak için bazı kurallar geliştirilmeli ve doping analizi yapmaya yetkili laboratuvarlar belirlenmelidir.

Çalışmalarda elde edilen doping maddeleri için pozitif serum numunelerin deteksiyon limitleri, ileride Türkiye de kurulacak kontrol laboratuvarları için bir baz teşkil edebilecektir. Sadece yasakların konulması yaptırımı da tam etkili olamamaktadır. Kullanımı azaltmak için kontrolde kullanılan analiz yöntemlerinin de çok hassas olması gerekir (5, 18, 19, 21).

ELISA ile yapılan bu çalışma atlarda doping kullanımı için bir baskı oluşturabilecek ve yasal olmayan kullanımı azaltacaktır. Diğer ülkelerde yasalarla belirtilmiş hususlara ülkemizde de uyulması ile hayvan sağlığında tehdit eden doping maddelerinin zararlı etkilerinden (19) atlar korunmuş olacaktır.

Bunların yanında Theobromin, Rezerpin, Salisilik asit, Opium, Kafein gibi maddeler normalde atların yediği yemlerinde ve dolayısıyla idrar ve kanlarında bulunur (10, 13, 19). Yemlerde de bulunan yasak maddelerin eşik değerlerinin tesbit edilmesi ile ilgili çalışmalara da ağırlık verilmelidir.

Yapılan çalışma konkurhipik at yarışlarında doping analizleri konusunda Türkiye'deki ilk çalışmayı oluşturmaktadır.

## Kaynaklar

1. **Anonim:** *Federation Equestre Internationale (FEI) Veterinary Regulations*. 7th edition, effective 1st January 1994, Switzerland.
2. **Anonim:** *Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün 3.8.1994 tarih ve 6143 sayılı yazısı.*
3. **Anonim.** *6132 sayılı At yarışları kanun ve yönetmeliği.*
4. **Baez-G., H.S.** (1985). *History, Organization and Statistics of Doping Control in Chili*. Proceeding of the 6th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians. Hong Kong, 129-131.
5. **Blake J. J.W., Tobin, T.** (1986). *Testing for Drugs in Horses*. J Equine Vet Sci, 6(2): 93-97.
6. **Bourke, J.M.** (1985). *Twenty-two years of Drug Testing of Racehorses in Victoria*. Proceeding of the 6th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians. Hong Kong, 123-128.
7. **Combie, J., Blake, J.W., Chay, S., Woods, W.E. and Tobin, T.** (1981). *II. Pharmacological Studies of Drugs in horses phenylbutazone and other drugs in horses racing under a controlled medication program*. Proceeding of the 4th International Conference on the Control of the use of Drugs in Racehorses. Melbourne.
8. **Delbeke, F.T. and Debackere, M.** (1983). *Fifteen Years of Race Horse Doping Analysis in Belgium*. Proceeding of the 5th International Conference on the Control of the use of Drugs in Racehorses. Toronto, Kanada, 34-37.
9. **Dönike, M.:** *Beaufragter für Dopingsanalytik des Bundesinstituts für Sportwissenschaft, Carl-Diem-Weg 6, 50933 Köln. Rapor no: 1464/02.11.1993.*
10. **Haywood, P.E., Teale, P. and Moss, M.S.** (1990). *The Excretion of Theobromine in Thoroughbred Racehorses After Feeding Compounded Cubes Containing Cocoa Husk-estabishment of a Threshold Value in Horse Urine*. Equine Vet J, 22 (4): 244-246.
11. **Houstun, T., Tobin, T. and Blake, J.W.** (1983). *Effect of Urine pH on Urine levels of Phenylbutazone, Oxypentazone and v-Hydroxyphenylbutazone in Racing Horses*. Proceeding of the 5th International Conference on the Control of the use of Drugs in Racehorses. Toronto, Kanada, 26-31.
12. **Kalyon, T.A.** (1990). *Spor Hekimliği*, GATA Basımevi.
13. **Lambert, M.B.T., Miller, J., Kelly, R. and Evans, J.A.** (1985). *Urinary Theobromin levels After Adding Cocoa Husks to Horses feed*. Proceeding of the 6th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians. Hong Kong, 137-140.
14. **Moss, M.S.** (1986). *The Analysis of Drugs and Their Metabolites*. Analytical Proceedings, 23: 48-50.
15. **Tai, C.L.,** (1988). *Radioimmunoassay for Etorphine in Horses with a <sup>125</sup>I analog of Etorphine*. Am J Vet Res, 49(5): 622-628.
16. **Tobin, T.** (1989). *Tranquilizers, Analgesics and Local Anesthetics*. Equine Pharmacology and Therapy. Proceeding of Eleventh Bain-Fallon Memorial lectures. May 22-26, Australian, 179-187.
17. **Tobin, T.** (1986). *Medication Control: Rules*. J Equine Vet Sci, 6(4): 191-195.
18. **Tobin, T., Woods, W.E. and Blake, J.W.** (1985). *Efficacy and Cost of Testing for Illegal Medication in Horses*. Proceeding of the 6th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians. Hong Kong, 113-121.
19. **Tobin, T.** (1981). *Drugs and The Performance Horse*, Charles C. Thomus Publisher, Springried, Illinois.
20. **Watrin, L.R.** (1988). *The Influence of Synthetic Corticosteroids on Racing Performance*. Proceeding of the 7th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians. Kentucky, 37-39.
21. **Woods, W.E., Chay, S., Houston, T., Blake, J.W. and Tobin, T.** (1985). *Efficacy of Testing for Illegal Medication in Horses*, JAVMA, 187 (9): 927-930.
22. **Woods, W.E., Tai, H.H., Tai, C., Weckman, T., Wood, T., Barrios, H., Blake, J.W. and Tobin, T.** (1986). *High-sensitivity Radioimmunoassay Screening Method for Fentanyl*, Am J Vet Res 47 (10): 2180-2183.
23. **Young, L.M. and Robillo, V.** (1985). *A Study of Fentanyl: Metabolism and Excretion by the Horse*. Proceeding of the 6th International Conferences of Racing Analysts and Veterinarians. Hong Kong, 257-267.