
Projekttitel: Peptider och proteiner – bekämpning av nya missbrukspreparat inom hästsporten

Projektnummer: H1347097

Rapportförfattare: Mikael Hedeland, Kristian Björnstad

Bakgrund

När det 2007 rapporterades om ett fynd av ampuller med kobratoxin i ett tävlingsstall i USA och det därmed väcktes misstankar om att detta ämne hade använts i dopningssammanhang, blev det för många en obehaglig överraskning.[1] Kobratoxin är ett protein med 71 aminosyror och en molekylvikt på 7821 Da. Plötsligt hade det dykt upp en substans med förmodat liknande effekter som många av de substanser man ständigt letar efter fast med skillnaden att denna nya substans tillhör en kemisk klass - proteiner - som inte tidigare täckts in av analyserna. År 2011 kom liknande avslöjande gällande en substans som heter dermorfin.[2] I likhet med kobratoxin så består den av aminosyror men aminosyrakedjan är mycket kortare, endast 7 stycken. Sådana kortare aminosyrasekvenser som ej veckas som proteiner gör, kallas peptider. Även dessa är väsentligt större och har väldigt annorlunda kemiska egenskaper jämfört med de substanser man normalt letar efter i dopningskontrollen och riskerar därför att missas helt.

Både kobratoxin och dermorfin används i smärtstillande syfte. Dermorfin har opioida egenskaper och anses ha en smärtstillande effekt som är 11 gånger mer potent än morfin.[3] I fallet med kobratoxin har det ännu inte gjorts några fynd i dopningskontrollen, medan analys av dermorfin lett till ett antal positiva fall. Det finns dock en uppsjö av liknande peptider som skulle klara sig igenom dopningskontrollerna även om just dermorfin täcks in i analysomfånget. Dermorfiner och kobratoxin är exempel på substanser som är ganska kortlivade och för att den smärtstillande effekten ska vara till någon nytta behöver de ges tätt på start i tävling. Detta ökar möjligheten att upptäcka dem om man har metoder som kan hantera dem. Dessutom finns det bland proteiner och peptider många substanser som har en tillväxtreglerande effekt, t ex growth hormone releasing peptides (GHRPs).[4] Även peptider som kan stimulera käriltillväxt förekommer (t ex TB-500). Användningen av dessa lär med största sannolikhet ske under uppbyggnad i träning en tid från tävlingsstart, varför det är mycket viktigt att även ta oannonserade dopningsprov i träningsammanhang.

Jämfört med analys av klassiska dopningspreparat så kompliceras analys av proteiner och peptider, i framför allt plasmaprover, av i huvudsak två faktorer. 1) proteiner och peptider bryts lätt ner av alla de enzymer (proteaser) som finns i blodet, 2) den stora mängd proteiner (ca 70 mg/ml) som finns i blodplasma gör extraktion/isolering av just dopningsrelaterade proteiner och peptider mycket svårt. Dessa faktorer ställer höga krav på både hantering av prover och på analysmetoderna. Utöver dessa, i dopningssammanhang, mindre kända substanser finns det t ex erythropoietin (EPO) som också är ett protein och välkänt inom humandopningen.[5]

För oss som jobbar med dopningsanalyser är det viktigt att hela tiden försöka hålla jämna steg med de som försöker kringgå reglerna. Att visa att vi snabbt kan anpassa våra analyser till nya klasser av substanser är avgörande för att hålla hästsporten så ren som möjligt. Detta är, som bekant, inte bara en fråga om att se till att alla tävlar på lika villkor, utan handlar lika mycket om att försäkra sig om att hästarna inte far illa. När det gäller nya experimentella substanser är det ofta så att man inte riktigt vet hur hästarna kommer att påverkas och vilka doser de klarar av. För många substanser finns det inga effekt- eller toxikologiska studier på hästar.

Det övergripande syftet med projektet har varit att utveckla och implementera ny metodik för att stärka analysförmågan inom hästdopningskontroll avseende peptider och proteiner, samt att undersöka användandet av dessa nya dopningspreparat inom den skandinaviska hästsporten.

Material och metoder

Peptider

Analytiska tekniker

Analysmetoder grundade på masspektrometrisk detektion är idag de mest förekommande inom dopningskontrollen. Tekniken lämpar sig även väl för analys av proteiner och peptider. För peptidanalyserna (dermorfin, GHRPs m fl) använde vi inledningsvis vätskekromatografi kopplat till en time-of-flight-masspektrometer (TOF). För att öka känsligheten i analyserna bytte vi till en trippelkvadrupolmasspektrometer, men fortfarande kopplad till vätskekromatografi. Den här uppsättningen benämns ofta som LC-MS/MS. På dopningslaboratorier runt om i världen är det just LC-MS/MS som främst används för peptidanalys. Det som ofta skiljer är upparbetningen av prover innan analys.

Vi använde två olika metoder, en för plasmaprover och en för urinprover. Anledningen till detta är att plasma och urin har väldigt olika egenskaper och beter sig annorlunda i de uppberetningsprocedurer vi använder. Metoderna är validerade för att simultant söka efter 16 st olika peptider och metaboliter, bl a dermorfiner, GHRPs och TB-500, men nya substanser kan lätt läggas till vid behov.

Studiebesök

På Racing Analytical Services (RAS) i Melbourne, Australien, har man utvecklat en metod för att öka känsligheten vid analys av peptider med LC-MS/MS.[6] I denna metod så kopplas acetylgrupper på peptidmolekylen, som ett steg i fastfasextraktionen, vilket gör att peptiden får egenskaper som passar analys med LC-MS/MS bättre.

Vi fick en inbjudan av dr Rohan Steel på RAS, att komma till hans laboratorium för att lära oss denna uppberetningsprocedur. Studiebesöket gjordes av Kristian Björnstad i november 2014 inom detta SHF-projekts ram. Att få komma dit för att se och utföra alla steg som ingår i proceduren var helt avgörande för en lyckad applicering av metoden hos oss och gav oss den kunskap som behövdes för att stärka vår analysförmåga ytterligare.

Validering

Med tanke på de allvarliga konsekvenser som blir följden av ett prov bedöms som positivt, har stor vikt lagts vid val, utveckling och validering av metoderna. Valideringen är ett viktigt men tidsödande arbete som säkerställer att metoderna har tillräcklig prestanda för sina ändamål.

De utvecklade analysmetoderna är kvalitativa i sin karaktär, d.v.s. de är konstruerade för att identifiera otillåtna peptider. De validerades i helblod, plasma och urin med avseende på detektionsgräns (känslighet, limit of detection [LOD]) stabilitet i extrakt, stabilitet i provmaterialet samt precision. Dessa parametrar är av stor vikt för att 1) bedöma om vi kan upptäcka relevanta nivåer i provet, 2) säkerställa att om den masspektrometriska analysen blir försenad så är provet stabilt, 3) bedöma hur prover ska hanteras och 4) för att säkerställa att resultaten är repeterbara.

För att testa metoderna fick vi prover från en administrationsstudie med dermorfin. Studien gjordes på PennVet Equine Pharmacology Lab (Pennsylvania, USA). I denna studie gavs 5 mg dermorfin intravenöst till en häst och blodprov samlades upp till 12 h efter injektion. Urinprov samlades upp till 72 h efter injektion. Proverna sparades i frys -70 °C och transporterades till oss förpackade i kolsyreis.

Precisionen för både plasma- och urinmetoden utvärderades genom att prov till tre analysserier bereddes. Peptiderna spikades i hästplasma eller hästurin. Plasma- eller urinpoolen delades sedan upp i

tre stycken serier och från varje serie togs tre enheter, d.v.s. triplikat. Varje serie upparbetades och analyserades under separata dagar. Inomdags- och mellandagsprecisionen utvärderades genom att den relativa standardavvikelsen (RSD) i topparea beräknades för de tre replikaten respektive för samtliga replikaten för de tre dagarna.

Vi gjorde en noggrann jämförelse med avseende på peptidernas stabilitet i både helblod, plasma och urin vid förvaring i olika temperaturer under 3 dagar. En delad pool av helblod spikad med peptider förvarades vid rumstemperatur och vid 8 °C. En delad pool av plasma, och en av urin, spikade med peptider, förvarades vid rumstemperatur, 8 °C, -20 °C och -70 °C. För att vara säkra på att eventuell nedbrytning av peptiderna beror på proteaser och inte är ett resultat av kemisk instabilitet så gjorde vi samma experiment i en fosfatbuffrad saltlösning (PBS, pH 7,4). Denna lösning liknar den som finns i plasma fast saknar alla proteiner och proteaser.

Fältstudie: Undersökning av användandet av dopningspeptider i Sverige och Norge

För att utvärdera ett eventuellt användande av dopningspeptider inom den skandinaviska travsporten analyserades 15 plasmaprover och 320 urinprover från svenska travhästar, samt 8 plasmaprover och 60 urinprover från norska hästar med de utvecklade metoderna. Provtagningen arrangerades av Svensk Travsport respektive Det Norske Travselkap..

Kobratoxin

Analys av kobratoxin gjordes med en masspektrometrisk teknik som heter time-of-flight (TOF) kopplat till vätskekromatografi. Plasmaprover utsattes först för en fastfasextraktion följt av klyvning av kobratoxin med enzymet trypsin. Trypsinet klyver kobratoxin på förutbestämda platser i aminosyrasekvensen vilket möjliggör den efterföljande mjukvaruanalysen, där provets analysresultat matchas mot det för teoretiskt trypsinerat kobratoxin och identifiering görs efter överensstämmelse med detta. Kobratoxin har endast analyserats i plasma eftersom det är ett protein som är väsentligt större än dopningspeptiderna, och därför inte förväntas utsöndras i urinen i samma utsträckning.

EPO

Metoden för EPO är en ELISA-(enzyme linked immuno sorbent assay)-baserad screeningmetod. ELISA-kitet (Human Erythropoietin Quantikine IVD ELISA Kit, R&D Systems, Storbritannien) som utvärderats är en kommersiell produkt med god känslighet som fångar upp humant EPO och en rad olika EPO-preparat (Eprex®, Aranesp®, and Mircera®).

Eftersom denna metod är tänkt att användas för screening av plasmaprover validerades metoden med avseende på känslighet och linjaritet. För utvärdering av dessa parametrar så bereddes plasmaprover till 2 analysserier genom att humant EPO spikades i 8 koncentrationer (0,02-2,0 ng/ml) i blankplasma. Plasmapoolen delades sedan upp i 2 stycken serier och från varje serie togs 2 enheter, d.v.s. duplikat. Varje serie upparbetades och analyserades under separata dagar.

Resultat

Peptidanalys

Vi har satt upp två metoder för analys av dopningspeptider i plasma respektive urin. För närvarande ingår 16 peptider i de kontrollprov vi använder. Metoderna anpassas dock kontinuerligt för att inkludera fler peptider.

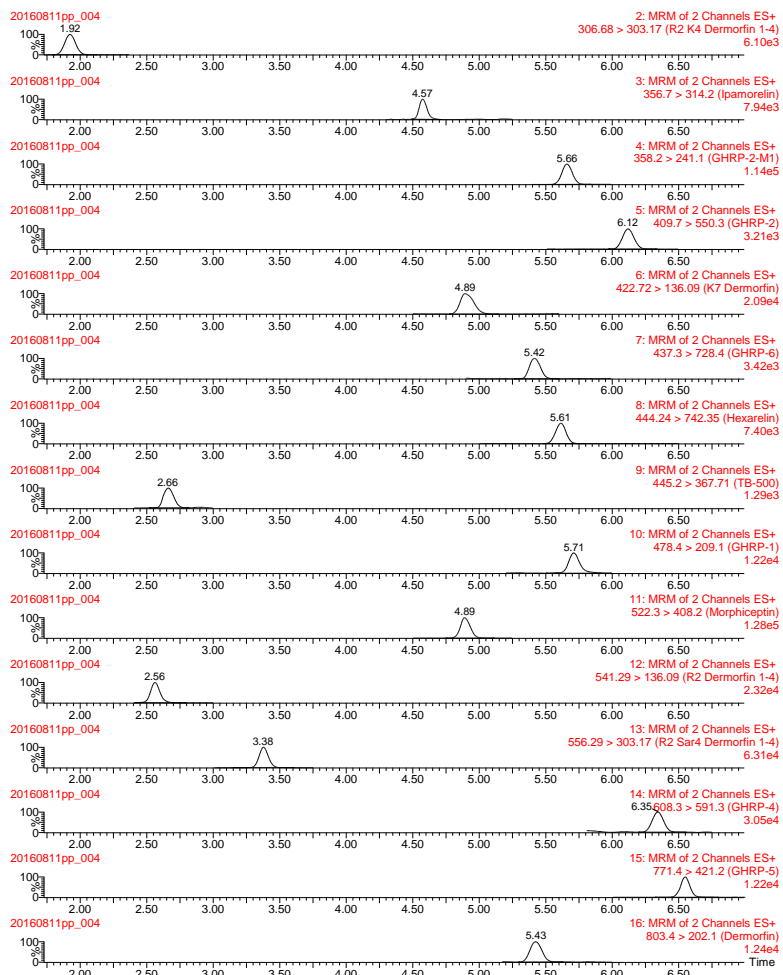


Fig 1. Extraherade kromatogram för ett positivt plasmakontrollprov med 15 dopningspeptider och metaboliter.

Validering

Känslighet och precision

Känsligheten (LOD) för samtliga analyter ligger i intervallet 0,1-0,5 ng/mL i både plasma- och urinprover.

För urinmetoden låg inomdagsvariationen på mellan 2 och 49 % för samtliga peptider.

Vid utvärderingen av mellandagsprecisionen utvärderades RSD för alla replikat för de tre dagarna.

RSD var mindre än eller lika med 44 % för samtliga peptider. För plasmametoden låg inomdagsvariationen på mellan 1 och 41 % för samtliga peptider.

Vid utvärderingen av mellandagsprecisionen utvärderades RSD för alla replikat för de tre dagarna.

RSD var mindre än eller lika med 42 % för samtliga peptider

Eftersom metoderna är kvalitativa bedöms precisionen vara acceptabel.

Stabilitet

Stabiliteten i vial var i paritet med inom- och mellandagsvariationen för både plasma och urinprover.

Peptidernas stabilitet i helblod, plasma och urin visade sig skilja stort. I helblod och plasma förvarade i rumstemperatur eller kylskåp (8 °C) var det 6 peptider som nästan helt brutits ner efter förvaring (TB-500, TB-500 metabolit, GHRP-1, R2K4-dermorfin, morficeptin och K7-dermorfin), se tabell 1.

Tabell 1. Procentuell förlust av signal under 3 dygn vid förvaring i rumtemperatur och kyl (8 °C) för de 6 mest påverkade peptiderna.

	Rumtemperatur			Kylskåp		
	1 dygn	2 dygn	3 dygn	1 dygn	2 dygn	3 dygn
TB500	98	99	99	95	97	96
TB500 metabolit	99	100	100	76	83	88
GHRP1	99	99	99	81	90	95
R2K4-dermorfin	94	99	100	84	90	95
Morficeptin	100	100	100	77	84	91
K7-dermorfin	79	87	93	72	74	82

I plasmaprover förvarade i frys -20 °C eller -70 °C observerade vi en mer än 50 %-ig nedbrytning för dessa 6 peptider. I urinprover observerades ingen signifikant nedbrytning under de tre dagarna vid någon av förvaringstemperaturerna (rumtemperatur, kylskåp (8 °C), -20 °C eller -70 °C). Vid förvaring i PBS syntes inga tecken på kemisk instabilitet.

Administrationsstudie

Analysen av prover från administrationsförsöket med dermorfin visade på en snabb elimination i både plasma och urin. Från resultaten gör vi bedömningen att vi, vid denna dos, kan detektera dermorfin i plasma upp till 3 timmar efter administration och i urin upp till 12 timmar efter administration.

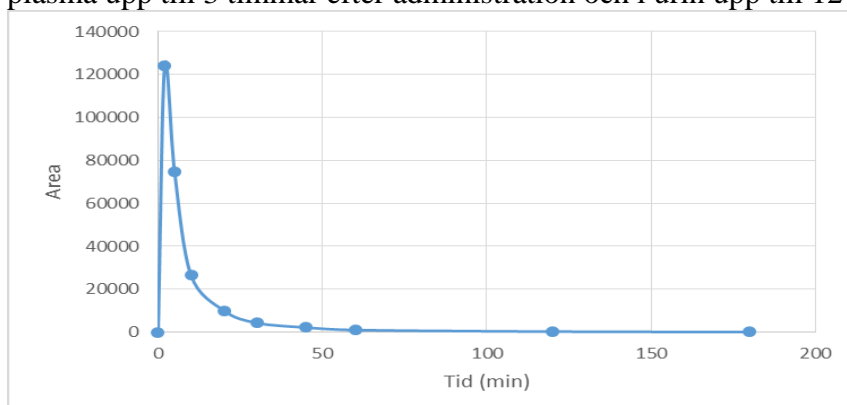


Fig 2. Area för dermorfin i plasma vid 0-180 min efter intravenös administration av 5 mg dermorfin.

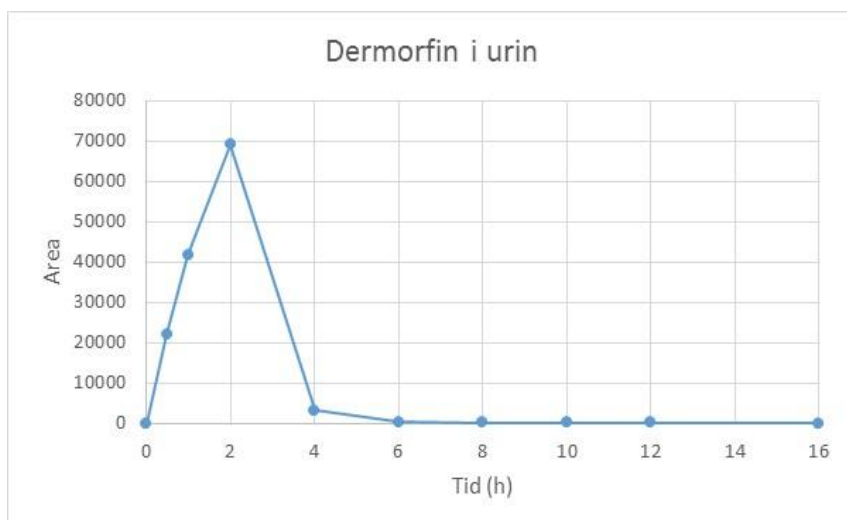


Fig 3. Area för dermorfin i urin vid 0-16 timmar efter intravenös administration av 5 mg dermorfin.

Fältstudie: Analys av prover från travsporten i Skandinavien

Totalt analyserades 413 prover (26 plasmaprover och 387 urinprover) från travsporten i Sverige, Norge och Danmark. Inga otillåtna peptider kunde identifieras.

Kobratoxin

I figur 4 ses tre så kallade tryptiska peptider som är resultatet av enzymatisk klyvning av referensmaterial av kobratoxin med proteaset trypsin. Den nedersta peptiden (TWCDAFCSIR) är helt unik för kobratoxin. Detta betyder att inga andra kända proteiner innehåller den här sekvensen, vilket i förlängningen innebär att om man säkert kan identifiera den här peptiden är det ett starkt tecken på förekomst av kobratoxin. De övriga peptiderna är till för att ytterligare stärka bevisen för att man verkligen har detekterat kobratoxin. Metoden klarar för närvarande att identifiera kobratoxin i hästplasma i koncentrationer ner till 100 ng/ml.

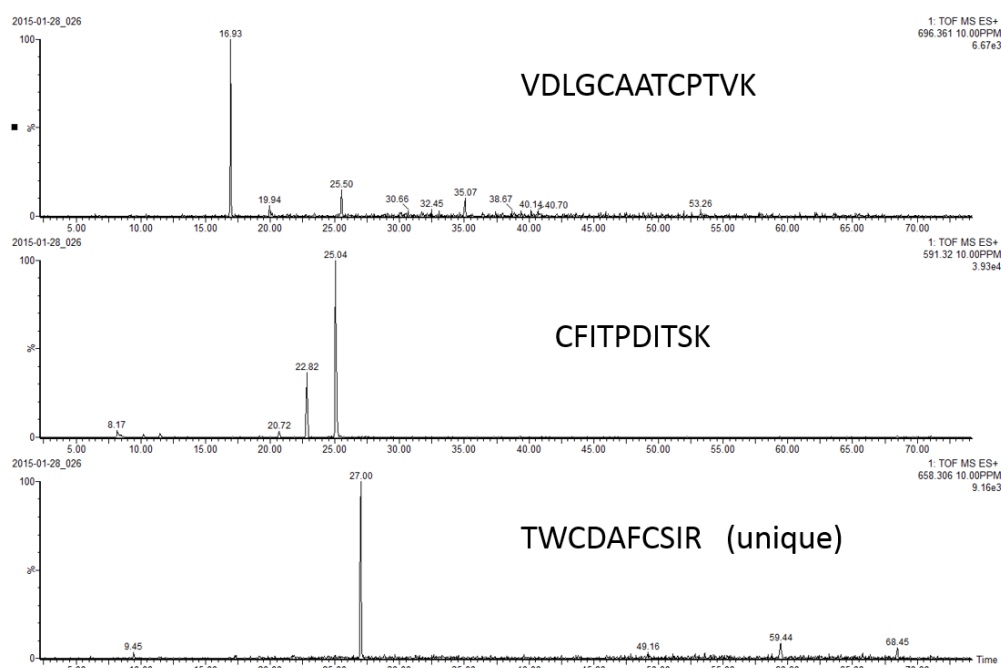


Fig 4. Extraherade jonkromatogram för 3 peptider från kobratoxin. Aminosyrasekvensen för varje peptid är skriven i standardenbokstavskod.

EPO

Eftersom de egentillverkade kontrollerna och standardkurvan i kitet angivits i olika enheter och konverteringen ej är exakt så jämfördes de båda med avseende på R^2 -värdet på den linjära trendlinjen. Ifall båda har R^2 -värden över 0,98 anses det vara en god linjäritet och överensstämmelse. Samtliga uträknade R^2 -värden var över 0,99, se exempel i Fig 5.

Känsligheten i metoden utvärderades genom jämförelse mellan de spikade plasmakontrollerna och kontrollerna som följde med kitet. Baserat på detta nådde vi en detektionsgräns på 0,1 ng/mL. Analys av blankplasmaprover visade inga tecken på interfererande korsreaktioner.

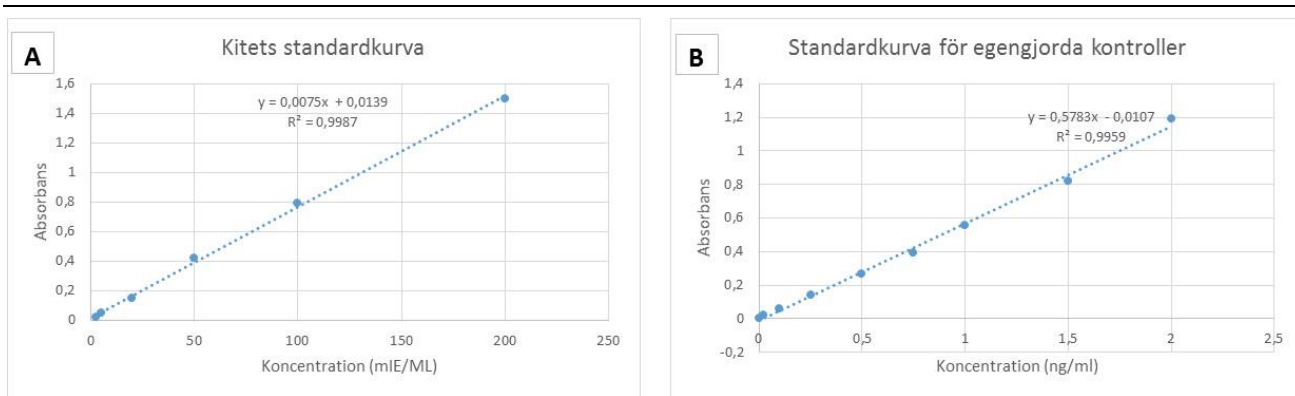


Fig 5. Standardkurvor för kontrollerna som ingår i EPO-kitet (A) och de egengjorda kontrollerna (B).

Diskussion

I jämförelse med de preparat som man vanligtvis söker efter i dopningskontrollen, så skiljer sig proteiner och peptider avsevärt, framför allt vad gäller storlek och kemiska egenskaper. Detta resulterar i att de tidigare inte täckts in av de dopningsanalyser man normalt screenar prover med.

I och med detta projekt har vi nu metoder för analys av flera olika peptider och proteiner. Dessa metoder är redan implementerade i rutindriften och både breddar och stärker vår förmåga att övervaka missbruk av otillåtna preparat inom hästsporten.

Vår studie av dopningspeptidernas stabilitet i helblod, plasma och urin visar på stora skillnader för de olika provmaterialen. Att en stor andel av peptiderna nästan helt bryts ner i plasma och helblod vid förvaring i rumstemperatur eller kyl, är ett problem. Med tanke på hur hantering och försändelse av prover sker idag så är det inte troligt att vissa substanser skulle kunna detekteras även om de förekommer i provet vid provtagningen. Våra resultat tyder på att urin är ett bättre provmaterial än plasma för analys av peptider. För att öka möjligheterna att komma åt missbruk bör man fundera på om blodprovstagning för analys av peptider ska planeras annorlunda. Det ideala skulle vara att proverna centrifugerades efter provtagning och skickades till laboratoriet lagda på kolsyreis. Tre av de 6 peptider med sämst stabilitet vid förvaring i blod (se tabell 1) har det gemensamt att de inte innehåller några naturliga (icke-kroppsegna) aminosyror eller är modifierade i slutet på kedjan. De andra 3 innehåller naturliga aminosyror, men det verkar som det spelar roll hur många de är och var de sitter i kedjan. Om den sista aminosyran är lysin ser det också ut att inverka negativt på stabiliteten.

Dopningspeptider kan inte bedömas som en homogen klass av substanser. Även om analysen behandlar peptiderna lika så måste man fundera på vilka peptider man är intresserad av att undersöka och anpassa provtagningen därefter. Sannolikheten att man ska upptäcka missbruk av t ex GHRP (en substans som har tillväxtreglerande effekt) genom att ta prover vid tävlingar är ytterst liten. För att komma åt dessa måste oannonserad träningsprovtagning ske.

Även analyserna av proverna från administrationsstudien med dermorfin visar på svårigheterna med att identifiera användning av otillåtna peptider. Den snabba eliminationen av dermorfin från både plasma och urin tydliggör det faktum att prover behöver tas kort efter administration av substanserna. För t ex GHRP, som ej förväntas användas i samband med tävlan, är detta givetvis svårt medan det för dermorfiner inte borde utgöra ett problem.

Om anledningen till att vi inte kunnat identifiera några otillåtna peptider i fältstudieproverna i varken Sverige eller Norge beror på att substanserna inte används, att de brutits ner i proverna under transport eller att prov tagits för långt efter administration är svårt att bedöma.

En möjlig framtida utveckling för att komma åt användningen av dopningspeptider, kan vara att inte leta efter peptiderna i sig utan istället identifiera mer långlivade markörer som tillsammans tyder på användning. Sådana markörer skulle kunna bestå av endogena proteiner som får höjda eller sänkta värden vid användning av dopningspeptider.

Om analys peptider kan vara problematiskt så är det ännu värre med proteiner. För det första så har man inget val mellan plasma och urin. De större proteinerna utsöndras inte i urinen så analyserna sker på plasma. För det andra så finns det väldigt mycket interfererande proteiner i plasman som försvårar isolering av just det protein man är intresserad av. Därför är det mycket svårare att göra en metod som passar flera proteiner, dessa metoder måste istället var väldigt riktade. Idag är det vanligt att man först renar fram sitt protein med antikroppar, därefter trypsineras proteinet och peptiderna analyseras med LC-MS/MS. Sådana metoder finns beskrivna för t ex EPO. Men mot de flesta proteiner, som är intressanta i dopningssammanhang, är det svårt att hitta selektiva antikroppar. I dessa lägen krävs det ofta komplicerade och långa metoder för att lösa uppgiften. Att just kobratoxin ska börja användas i någon större utsträckning är inte troligt, inte minst med tanke på att det borde vara ganska svåröverkomligt. Däremot är det ändå viktigt att visa att vi har kapaciteten att agera på alla substanser som kan tänkas missbrukas.

Publikationer

Våra studier av dopningspeptiderna stabilitet i helblod, plasma och urin kommer att presenteras för hästdopningvärlden på nästa International Conference of Racing Analysts and Veterinarians (ICRAV) i Montevideo, Uruguay.

Vi håller på att sammanställa detta arbete i ett manuskript för publikation i en vetenskaplig tidskrift eftersom våra data pekar på att man generellt behöver se över provhanteringen vid analys av dopningspeptider.

Slutsatser

Vi har, tack vare detta projekt, nu nya analysmetoder för att upptäcka ett flertal dopningspeptider i både plasma och urinprover, samt metoder för detektion av kobratoxin och EPO i plasmaprover. Denna utvecklingsinsats hade aldrig varit möjlig utan de erhållna medlen från Stiftelsen hästforskning. För sportförbundens del är det viktigt att noga fundera över tidpunkt för provtagning, vilket provmaterial man väljer och hur det hanteras. Vår rekommendation är att i första hand ta urinprover vid analys av dopningspeptider.

Resultatförmedling till näringen

Under projektets gång har vi haft löpande kontakter med olika berörda parter. Vid ett antal tillfällen har projektets framskridande presenterats för Nordic Equine Medication and Antidoping Committee (NEMAC). De nationella travsportförbunden i de skandinaviska länderna, har kontinuerligt uppdaterats på detta sätt. Viss allmän information om projektet kan komma att läggas ut på travsport.se och/eller hastsverige.se. Dock måste först en diskussion hållas med de skandinaviska travförbunden om vilken typ av information som kan offentliggöras eftersom det finns risk för att en alltför detaljerad information om dopningskontrollmetodernas beskaffenhet kan komma att missbrukas.

Kommentar angående avvikande tidsplan

På grund av föräldraledighet har tiden för projektet och den tidsplan som angavs i ansökan förskjutits. Datum för slutrapport sattes till 2016-10-01. Tillstånd till denna förlängning av projektet erhöles 2016-02-06. Detta har betytt att även publikationer och konferenspresentationer förskjutits i tid jämfört med den ursprungliga planen.

Referenser

1. Kind, A.H., W. *Proceedings of the 17th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians, Antalya, Turkey.* 2008.
2. Guan, F., et al., *Detection, quantification, and identification of dermorphin in equine plasma and urine by LC-MS/MS for doping control.* Anal Bioanal Chem, 2013. **405**(14): p. 4707-17.
3. Broccardo, M., et al., *Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin.* Br J Pharmacol, 1981. **73**(3): p. 625-31.
4. Bowers, C.Y., *Growth hormone-releasing peptide (GHRP).* Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(12): p. 1316-29.
5. Scott, J. and G.C. Phillips, *Erythropoietin in sports: a new look at an old problem.* Curr Sports Med Rep, 2005. **4**(4): p. 224-6.
6. Timms, M., et al., *A high-throughput LC-MS/MS screen for GHRP in equine and human urine, featuring peptide derivatization for improved chromatography.* Drug Test Anal, 2014. **6**(10): p. 985-95.