

Projectnr.: 7202301
Dierproeven samenwerking Nederland België
Projectleider: : M.J. Groot

Dit project kon gerealiseerd worden dankzij een financiële bijdrage van LNV

Rapport 2005.008

oktober 2005

Effecten van combinaties van androgenen bij kalveren: histologie en detectie van residuen van hormoonesters in haren

M.J. Groot en M.W.F. Nielen

Business Unit: Veiligheid & Gezondheid
Cluster: Toxicologie & Effectenmonitoring

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Tel 0317-475422
Fax 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2005, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

EXTERN:

Ministerie Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, directie VD (dr.ir. H. Paul, drs. F. van Leeuwen, drs. M.E. Siemelink)

Voedsel- en Waren Autoriteit (VWA). (drs. B.W. Ooms)

Algemene Inspectiedienst (R. v. d. Helm, G.E. Kolkman, drs.ing B. Schat, P.L.C.W. Kiemeney,

A.T.T. Schroeder)

Rijks Universiteit Gent (prof. H. den Brabander)

INHOUDSOPGAVE	blz
SAMENVATTING	2
AANBEVELINGEN VOOR HET BELEID	2
1 INLEIDING	3
2 MATERIAAL EN METHODEN	3
2.1 Behandelplan	3
2.2 Histologie	4
2.3 Chemisch onderzoek	4
3 RESULTATEN	5
3.1 Histologische bevindingen	5
3.2 Analytische-chemische bevindingen	5
4 CONCLUSIES	6
LITERATUUR	6

SAMENVATTING

In het kader van het samenwerkingsproject Nederland België (LNV-WOT thema 3) is een dierproef gehouden met legaal verkrijgbare androgenen voor veterinaire of humane gebruik in Nederland en België.

Boldane, Laurabolin, Sustanon 250 en Durateston zijn in twee doseringen toegediend aan kalveren waarbij vrouwelijke dieren de door de fabrikant aanbevolen dosering kregen en de mannelijke dieren de dubbele dosering. De dieren zijn 3 x behandeld met een tussenpoos van 2 weken en daarna geslacht.

Bij histologisch onderzoek van de mannelijke dieren viel vooral de degeneratie van het kiemepitheel in de testis op. De prostaat vertoonde geringe afwijkingen zoals wat verwijde tubuli, mucus klierweefsel en perifere hyperplasie.

Bij de vrouwelijke dieren was de vergroting van de clitoris opvallend. Ook vertoonden de ovaria degeneratie en waren de epithelia in de vagina en klier van Bartholin dunner dan normaal.

Bij alle dieren vertoonde de lever een milde toxische hepatitis, waarbij de mannelijke dieren ernstiger afwijkingen vertoonden dan de vrouwelijke dieren. In de overige organen werden geen consistente veranderingen aangetroffen.

Bij het chemische onderzoek in het haar waren bij de hoger gedoseerde mannelijke dieren de intacte esters van -boldenon (Boldane), -nandrolon (Laurabolin) en -testosteron (Sustanon en Durateston) 7-14 dagen na toediening nog aantoonbaar. Bij vrouwelijke dieren waren alleen de hogere concentraties van testosteronesters (Sustanon) terug te vinden.

In tegenstelling tot urine analyse waarbij geen onderscheid gemaakt kan worden tussen reeds aanwezig testosteron en extra illegaal toegediend testosteron, biedt haaranalyse wel deze mogelijkheid omdat de originele synthetische esters gemeten worden

AANBEVELINGEN VOOR HET BELEID

1. Aanbevolen wordt om bij de keuring aandacht te schenken aan macroscopisch en histologisch onderzoek van de geslachtsorganen. Hiermee kan een indicatie verkregen worden voor mogelijk misbruik van androgenen en andere geslachtshormonen:
 - degeneratie van de testis en ovaria kan een aanwijzing zijn voor mogelijk misbruik van toepassing van (o.a.) androgenen
 - vergroting van de clitoris bij vrouwelijke dieren is een specifieke aanwijzing voor toepassing van androgenen.
2. Verdachte dieren zouden nader moeten worden onderzocht op residuen van de intacte hormoonesters in spuitplekken en in haar, en op de bedrijven van herkomst zouden de voeders dienen te worden onderzocht op hormonaal actieve stoffen.

1 INLEIDING

In het kader van het samenwerkingsproject Nederland België (LNV-WOT thema 3) is een dierproef gehouden met legaal verkrijgbare androgenen voor veterinaire of humane gebruik in Nederland en België.

Androgenen (mannelijke geslachtshormonen) worden veel aangetroffen in illegale hormooncocktails voor de rundveehouderij. Bij sporters worden vrijwel alleen androgenen gebruikt, in de veehouderij worden androgenen vaak gecombineerd met oestrogenen (vrouwelijke geslachtshormonen), gestagenen (zwangerschapshormoon) en corticosteroiden (bijnierschorshormonen).

Doel van het onderzoek is het verkrijgen van referentiemateriaal van dieren behandeld met voor de praktijk in Nederland en België relevante groeibevorderaars. Hiertoe zijn de weefselafwijkingen die door deze stoffen worden geïnduceerd in kaart gebracht en is de mogelijkheid om residuen van de oorspronkelijke intacte esters van androgene steroïden aan te tonen in haar onderzocht.

2 MATERIAAL EN METHODEN

Proefopzet

De proef is uitgevoerd met kalveren van +/- 200 kg, zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. De dieren zijn aangekocht via een handelaar in samenwerking met de faculteit Diergeneeskunde van de RU Gent te Merelbeke. De meeste dieren waren ongeveer een jaar oud, een vrouwelijk dier (Durateston) was 7.5 maand en een ander vrouwelijk dier (Boldane) was 2 jaar oud.. Ze zijn individueel gestald op de faculteit en volgens praktijk gevoerd.

Boldane, Laurabolin, Sustanon 250 en Durateston zijn in twee doseringen toegediend aan kalveren waarbij vrouwelijke dieren de door de fabrikant aanbevolen dosering kreeg en de mannelijke dieren de dubbele dosering .

De dieren zijn 3 x behandeld met een tussenpoos van 2 weken, toediening vond plaats middels intramusculaire injectie.

Voor en tijdens de behandeling zijn dagelijks urine en wekelijks haarmonsters genomen.

Na 6 weken zijn de dieren geslacht op de faculteit in Merelbeke.

2.1 Behandelplan

Tabel 1: behandelingsschema androgenenproef

Start	Week 1	Week 3	Week 5	Week 6
Acclimatiseren en scheren	Injectie	injectie	injectie	Scheren en slachten

Tabel 2: gebruikte preparaten en doseringen

Naam	samestelling	dosering	afkomst
Boldane	25 mg boldenone-undecylenaat	1 mg/kg 2 mg/kg	Veterinair NL
Durateston	testosteronpropionaat: 6 mg/ml testosteronphenylpropionaat: 12 mg/ml testosteronisocaproaat: 12 mg/ml testosterondecanoaat: 20 mg/ml	5 ml/dier 10 ml/dier	Veterinair BE
Laurabolin	nandrolonlaurinaat: 25 mg/ml	1 mg/kg 2 mg/kg	Veterinair BE
Sustanon 250	30 mg testosteron propionaat 60 mg testosteronfenylpropionaat 60 mg testosteronisohexanoaat 100 mg testosterondecanoaat/ml	2 ml/ dier 4 ml/dier	Humaan NL

Tabel 3: Diernummers, geslacht, gewicht, leeftijd en dosering middelen

histologienr	Diernr	geslacht	gewicht	leeftijd	Dosering (3 x)
05O0K1	8327	♀	188 kg	1 jaar	7,5 ml Laurabolin
05O0K2	4143	♂	243 kg	1 jaar	20 ml Laurabolin
05O0K3	8990	♀	211 kg	2 jaar, 1 mnd	8,5 ml Boldane
05O0K4	4146	♂	248 kg	1 jaar	20 ml Boldane
05O0K5	0532	♀	273 kg	10 maanden	2 ml Sustanon 250
05O0K6	2429	♂	300 kg	1 jaar	4 ml Sustanon 250
05O0K7	5404	♀	245 kg	7,5 maanden	5 ml Durateston
05O0K8	4145	♂	252 kg	1 jaar	10 ml Durateston

2.2 Histologie

Bij het slachten zijn verzameld voor histologisch onderzoek:

Testis, prostaat en bulbo-urethraalklier bij de stierkalveren, ovaria, vagina, uier, klier van Bartholin en cervix van de vrouwelijke kalveren. En lever, nier, thymus en bijnier van alle dieren.

2.3 Chemisch onderzoek

Het haar is na voorbereiding onderzocht op residuen van de intacte oorspronkelijk toegediende hormoonesters met behulp van LC/MS/MS volgens een binnen het RIKILT nieuw ontwikkelde methode. De technische details van deze methode zijn beschreven in een recente wetenschappelijke publicatie [Nielen et al.].

Hiertoe is het nieuw gegroeide haar bemonsterd door middel van scheren op een afstand van circa 65 cm van de plaats van injectie.

3 RESULTATEN

De proef is volgens plan uitgevoerd. De dieren zijn geschoten en verbloed in de sectiezaal van de Veterinaire Faculteit van de RU Gent te Merelbeke. De gewichten van de testis van de dieren behandeld met Durateston en Laurabolin waren relatief laag, verder weinig opvallends.

3.1 Histologische bevindingen

Opvallendste histologische bevindingen waren afwijkingen aan de testis bij de mannelijke dieren. In geen van de dieren (allen ouder dan een jaar) was voor hun leeftijd normale spermavorming aanwezig. Slechts een dier vertoonde nog wat spermavorming, maar duidelijk gestoord met losse kopjes en geknikte staartjes, bij de anderen was geen sperma aanwezig en alle dieren vertoonden sterke degeneratie van het weefsel met afwijkend celmateriaal in de holten van de kiembuisjes. Dit beeld komt overeen met eerdere bevindingen bij praktijkdieren die eerder positief waren bevonden in het utineonderzoek op 17beta-boldenon (Groot en Biolatti 2004).

De prostaten vertoonden geringe niet specifieke veranderingen zoals toename in slijmvorming, verwijde tubuli en wat hyperplasie.

Bij de vrouwelijke dieren viel vergroting van de clitoris op met preputiumvorming en een vrijliggende glans. Tevens vertoonden de dieren degeneratie van de ovaria op met degenererende follikels en veel bindweefsel.

De epithelia van de vagina en de klieren van Bartholin waren veel dunner dan normaal.

Verder vertoonden alle dieren in meer of minder mate leverafwijkingen wijzend op een toxische hepatitis

3.2 Analytische-chemische bevindingen

Bij de vrouwelijke dieren waren de haren negatief op intacte boldenonester, terwijl boldenonundecylenaat bij de mannelijke dieren tot wel 14 dagen aantoonbaar was. Dit komt door de lagere dosering die bij de vrouwelijk dieren is gebruikt en wellicht ook door specifieke effecten zoals bijvoorbeeld een andere enzymactiviteit waardoor de hormoonesters sneller worden afgebroken.

Ook bij de laag-gedoseerde testosteronesters van Durateston waren de vrouwelijken dieren negatief op testosteronesters in haar. Sustanon bevat dezelfde testosteronesters maar in een hogere dosering: residuen van intact testosterondecanoaat waren zowel bij mannelijke als vrouwelijk dieren aantoonbaar in haar.

In *urine* worden geen intacte hormoonesters opgeslagen. Illegale toediening van testosteronesters draagt in urine slechts bij aan de natuurlijke achtergrondgehalten van testosteron. Haaranalyse kan derhalve een belangrijke bewijslast opleveren voor het illegaal gebruik van natuurlijke hormonen.

4 CONCLUSIES

- androgenen leiden tot histologische afwijkingen in de testis, ovaria en clitoris
- intacte androgeenesters zijn aantoonbaar in *haar* en kunnen zo illegaal gebruik van natuurlijke androgene hormonen aantonen.

LITERATUUR

Groot MJ and Biolatti B 2004. Histopathological effects of Boldenone in cattle. J. Vet Med. A 50, 1-6.

M.W.F. Nielen, J.J.P. Lasaroms, P.P.J. Mulder, J. Van Hende, J..A. van Rhijn, and M.J. Groot, “*Multi-residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*”, J. Chromatogr. B, (2005).